



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DE LA INTERNEURONA COLINÉRGICA EN LA DINÁMICA DEL
MICROCIRCUITO NEOESTRIATAL PARKINSONIANO Y DISCINÉTICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANDREA HARÉE PANTOJA URBÁN

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR:
DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

MÉXICO, CD. DE MÉXICO, OCTUBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DE LA INTERNEURONA COLINÉRGICA EN LA DINÁMICA DEL
MICROCIRCUITO NEOESTRIATAL PARKINSONIANO Y DISCINÉTICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANDREA HARÉE PANTOJA URBÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

MÉXICO, CD. DE MÉXICO, OCTUBRE, 2016

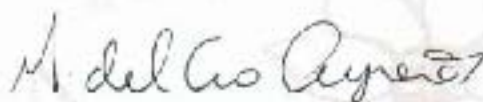
Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria del día 23 de mayo de 2016, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **PANTOJA URBÁN ANDREA HARÉE** con número de cuenta 305209104 con la tesis "Participación de la interneurona colinérgica en la dinámica del circuito neostriatal parkinsoniano y discinético", realizada bajo la dirección del **DR. ARTURO HERNANDEZ CRUZ**:

Presidente:	DRA. MARIA ROSA AVILA ACOSTA
Vocal	DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ
Secretario:	DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEGARAY
Suplente	DR. JUAN CARLOS GOMORA MARTÍNEZ
Suplente	DR. BENJAMÍN FLORAN GARDUÑO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 04 de octubre de 2016



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar este proyecto, con el número (CVU/Becario): 545327/294526 a partir de la fecha 4 de agosto de 2013 hasta el 31 de agosto del 2015.

Al proyecto “Desarrollo de un contraceptivo masculino basado en la inhibición específica de los canales iónicos CatSper y Slo3 de espermatozoide humano” que cuenta con el financiamiento ICyTDF y SECITI 039/2013.

A los miembros del Comité Tutor por el apoyo que mostraron para conmigo y el asesoramiento de este proyecto:

Dr. Arturo Hernández Cruz (Instituto de Fisiología Celular)

Dr. José Bargas Díaz (Instituto de Fisiología Celular)

Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray (Facultad de Estudios Superiores Iztacala)

Agradecimientos

Al Dr. Arturo Hernández Cruz por su guía en este proyecto, por todo el apoyo brindado para que se pudiera realizar este trabajo.

Al Q.F.B. Nicolás Jiménez Pérez por el apoyo técnico dentro del laboratorio.

A la M. en C. María Mildred Tzitzitlini Alejandre García por la ayuda brindada e instruirme técnicamente.

Al Dr. Jesús Pérez Ortega por su tiempo, paciencia, ayuda, además de proporcionarme el programa fSIENN para el análisis de datos.

A la Dra. Ma. Luisa Durán Pasten por su ayuda técnica con el equipo de trabajo.

Al Dr. Pedro Segura Chama por su apoyo y ayuda dentro del laboratorio.

A Marina Valeria Urbán Sánchez por su revisión y observaciones del trabajo.

A los miembros de mi Jurado:

Dra. María Rosa Ávila Costa

Dra. Verónica Anaya Martínez

Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Dr. Benjamín Floran Garduño

A la Dra. Claudia Rivero Cerecedo directora del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Al Instituto de Fisiología Celular y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

A mis padres que me han apoyado siempre en todo momento y sin dudarlo, gracias por todo, sin ustedes no lo habría logrado, los quiero mucho.

A mi hermana que me acompaña en este viaje temerario de la vida, 我爱妹妹, du bist die beste Schwester der Welt.

A Johanna, gracias por estar a mi lado (literalmente) y amenizar el día con las bromas, la comida, las charlas, por escuchar y aconsejar sobre mis reveses en el laboratorio, sin ti no habría sido lo mismo.

A Tzitzí, tú me ayudaste a salir a flote cuando no veía la luz al final del túnel, gracias por toda la ayuda con los experimentos y la teoría, no habría podido terminar esta tesis sin ti.

A la tinigang, Elena, Olivia y Stefan, rakastan teitä paljon, kirkastate päiväni, ustedes fueron un gran apoyo en estos años de maestría, gracias por escuchar las quejas y los lamentos, animarme siempre y ser los mejores amigos.

A Claudia, Pedro, Luisa, Nicolás y Dani, su compañía y apoyo son incomparables, muchas gracias por todo.

A Ceci y Cin, Ihr seid die beste, Danke für alles, Ich liebe euer sehr viel. Los momentos con ustedes hicieron que este trabajo fuera menos pesado.

A Mónica, ευχαριστώ για την υποστήριξη, φίλη μου. Esto ha sido una locura y tú me has animado y alentado siempre, ti voglio bene, amica.

A Gaby, Iskander, Manu y Sandra, gracias por su compañía y los ratos agradables que pasamos juntos, me ayudaron mucho para seguir avanzando.

A los γρεεκ φρεακς, αγαπητοί μου φίλοι, είστε φανταστικοί!

A Cheli, merci beaucoup, mon amie! Je t'aime bien! Aunque por mis estudios y tu trabajo no hemos podido vernos mucho, gracias por los ánimos desde lejos.

A mi tía Valeria, gracias por revisar la tesis para que no hubiera errores, fue una gran ayuda.

A Marce, Rick, Ery, Mónica, Alan, Sharon, Ximena y Ricardo porque ustedes hicieron que estudiar chino y la maestría al mismo tiempo fuera más divertido y que valiera la pena. 谢谢,朋友们!

A toda mi familia y a mis amigos.

Dedicada a mis padres José y Cecilia

y a mi hermana Mirza.

Índice

Índice de Figuras	I
Glosario	IV
Resumen	VI
Abstract	VII
I. Introducción.....	1
1. Ganglios Basales.....	4
1.1 Estriado.....	7
1.2 NEMs.....	8
1.3 Interneuronas GABAérgicas.....	8
1.3.1 Interneuronas PV(+)......	9
1.3.2 Interneuronas SOM/ NPY/NOS+.....	10
1.3.3 Interneuronas CR+.....	10
1.3.4 Interneuronas TH+.....	11
1.3.5 Interneuronas 5HT3a ^{EGFP}	11
1.4 Interneuronas Colinérgicas.....	12
1.4.1 Interneurona Colinérgica y Dopamina.....	13
2. Enfermedad de Parkinson.....	15
2.1 Tratamiento de EP.....	17
3. Discinesias.....	19
4. Microcircuito estriatal.....	24
II. Planteamiento del problema.....	26
III. Hipótesis.....	27
IV. Objetivo General.....	28
V. Objetivos Particulares.....	29
VI. Método.....	30
1. Lesión de la SNc con 6-OHDA.....	30
2. Evaluación de la conducta de giro.....	31
3. Obtención de rebanadas de tejido cerebral para el registro de la actividad neuronal.....	34

4. Análisis.....	35
VII. Resultados.....	38
1. Evaluación de los MIAs.....	38
2. Registros de actividad Neuronal.....	40
2.1 Control.....	40
2.2 Hemi-Parkinson.....	52
2.3 Discinesia inducidas por L-DOPA.....	61
VIII. Discusión.....	71
1. Movimientos Involuntarios Anormales.....	71
2. Registro de la Actividad Neuronal.....	72
IX. Conclusión.....	78
X. Referencias Bibliográficas.....	79

Índice de Figuras

Figura 1.	Organización estructural de los GB.....	4
Figura 2.	Conexiones entre los GB.....	5
Figura 3.	Esquema de las vías de salida, directa e indirecta.....	6
Figura 4.	Relación entre discinesia y el nivel de L-DOPA en la sangre.....	20
Figura 5.	Esquema del tratamiento con L-DOPA y evaluación de los MIAs.....	32
Tabla 1.	Movimientos Involuntarios Anormales (MIAs) a monitorear.....	33
Tabla 2.	Índice (MIAs).....	33
Figura 6.	Porcentaje de cada MIA en las ratas a lo largo del tratamiento con L-DOPA.....	39
Figura 7.	Evolución temporal del puntaje neto de los MIAs.....	40
Figura 8.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho control.....	41
Figura 9.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho control después de añadir NMDA (10 μ M).....	43
Figura 10.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho control con NMDA y al añadir Mecamilamina (10 μ M).....	45
Figura 11.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho control después del lavado de los fármacos (NMDA y Mecamilamina).....	46
Figura 12.	Histograma de picos de sincronización por época en control, NMDA y Mecamilamina.....	47
Figura 13.	Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas en control, NMDA y Mecamilamina.....	47
Figura 14.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho control después de añadir NMDA (10 μ M).....	48
Figura 15.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho control con NMDA y al añadir Pirenzepina (1 μ M).....	49
Figura 16.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho control después del lavado de los fármacos (NMDA y Pirenzepina).....	50
Figura 17.	Histograma de número de picos de sincronización por época en control, NMDA y Pirenzepina.....	51
Figura 18.	Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas en control, NMDA y Pirenzepina.....	51

Figura 19.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho hemi-parkinsonico.....	53
Figura 20.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho hemi-parkinsonico con 10µM de Mecamilamina.....	54
Figura 21.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho hemi-parkinsonico durante el lavado del fármaco (10µM de Mecamilamina)..	55
Figura 22.	Histograma del número de picos de sincronización por época en tejido hemi-parkinsonico y Mecamilamina.....	56
Figura 23.	Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas en tejido hemi-parkinsonico y Mecamilamina.....	56
Figura 24.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho hemi-parkinsonico.....	57
Figura 25.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho hemi-parkinsonico, se añadió 1µM de Pirenzepina.....	58
Figura 26.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho hemi-parkinsonico durante el lavado del fármaco (1µM de Pirenzepina).....	59
Figura 27.	Histograma de número de picos de sincronización por época en tejido hemi-parkinsonico y Pirenzepina.....	60
Figura 28.	Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas en tejido hemi-parkinsonico y Pirenzepina.....	60
Figura 29.	Histograma comparativo del número de picos de sincronización por época en NMDA, Parkinson y Discinesia.....	61
Figura 30.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho discinético....	62
Figura 31.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho discinético, se añadió 10µM de Mecamilamina.....	63
Figura 32.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho discinético durante el lavado del fármaco (10µM de Mecamilamina).....	64
Figura 33.	Histograma de número de picos de sincronización por época en tejido discinético y Mecamilamina.....	65
Figura 34.	Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas en tejido discinético y Mecamilamina.....	65
Figura 35.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho discinético....	67
Figura 36.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho discinético, se añadió 1µM de Pirenzepina.....	68

Figura 37.	Registro de la actividad neuronal de Rata Wistar macho discinético durante el lavado del fármaco (1 μ M de Pirenzepina).....	69
Figura 38.	Histograma de número de picos de sincronización por época en tejido discinético y pirenzepina.....	70
Figura 39.	Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas en tejido discinético y pirenzepina.....	70

Glosario

5-HT	5-hidroxitriptamina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AADC	Aminoácido aromántico l-descarboxilasa
ACh	Acetilcolina
AMPC	Adenosín Monofosfato cíclico
CPG	Generador central de patrones
CR	Calretinina
D1	Receptores dopaminérgicos subtipo D1(familia D1)
D2	Receptores dopaminérgicos subtipo D2 (familia D2)
D3	Receptores dopaminérgicos subtipo D3 (familia D2)
D5	Receptores dopaminérgicos subtipo D5 (familia D1)
DA	Dopamina
DJ-1, PARK7	Gen que codifica para la proteína de Parkinson 7
EP	Enfermedad de Parkinson
FosB	Gen que codifica la proteína FosB
FS	Interneuronas de disparo rápido (Fast spiking)
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GB	Ganglios basales
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina ó Levodopa
LS-NGF	Interneurona de disparo tardío (Late spiking-Negative neurogliaform)
LTS	Interneurona con umbral de disparo bajo (Low-threshold spikes)
LRRK2	Cinasa de repetición rica en Leucina 2
MIA's	Movimientos involuntarios anormales
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NEMs	Neuronas espinosas medianas
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintasa
NPY	Neuropéptido Y
NST	Núcleo subtalámico
M1	Receptores muscarínicos de acetilcolina tipo M1
M2	Receptores muscarínicos de acetilcolina tipo M2
MSK1	Mitógeno y cinasa activada por estrés
SNCA	Gen α -sinucleína
SNC	Sustancia nigra pars compacta
SNr	Sustancia nigra pars reticulata
SOM	Somatostatina
PRKN, PARK2	Gen que codifica para la proteína Parkina
PV	Parvalbúmina
TAN	Neurona tónicamente activa
TH	Tirosina hydroxylasa
Thr581	Treonina fosforilada
VMAT2	Transportador 2vesicular de monoaminas
VPS35	Proteína 35 asociada al arreglo vacuolar

Resumen

Los estudios de la dinámica de microcircuitos han permitido observar el comportamiento de las poblaciones de neuronas e interneuronas del estriado en condiciones fisiológicas y patológicas, como son la enfermedad de Parkinson y las discinesias inducidas por L-DOPA. Se ha observado que en condiciones fisiológicas la actividad neuronal es baja y con poca actividad espontánea, en cambio en las condiciones patológicas de Parkinson y discinesias inducidas por L-DOPA hay incremento de la actividad basal de las neuronas. Existe poca información de cuáles son los tipos de poblaciones de interneuronas que regulan la dinámica del microcircuito, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, en este trabajo se propone que la interneurona colinérgica puede ser la responsable de la regulación de la dinámica del microcircuito estriatal. Para caracterizar la participación de la interneurona colinérgica en el microcircuito estriatal, primero se obtuvieron individuos hemi-parkinsónicos empleando un modelo en rata de la enfermedad de Parkinson y un modelo en rata de discinesias inducidas por L-DOPA. Después, fue utilizada la técnica de imagenología de calcio para registrar docenas de células de forma simultánea y fueron añadidos antagonistas colinérgicos con lo cual fue posible dilucidar el comportamiento de las poblaciones neuronales de rebanadas cerebrales corticoestriatales obtenidas de los individuos hemi-parkinsónicos. Se observó que al inhibir los receptores nicotínicos y muscarínicos tipo M1, se cambia la dinámica de la red. Al agregar el antagonista nicotínico y muscarínico en el estriado normal con NMDA, hay disminución en las neuronas sincronizadas. En el estriado sin dopamina en cambio, hay aumento de la sincronización al agregar los antagonistas, en la discinesia pasa algo similar, pues hay tendencia al aumento de neuronas sincronizadas. Esto nos indica que la interneurona colinérgica interviene en la dinámica de la red a través de sus receptores nicotínicos y muscarínicos.

Abstract

Microcircuit dynamics studies allowed making observations of the neuronal population of the striatum in physiological and pathological conditions, in particular Parkinson's disease (PD) and dyskinesia caused by L-DOPA (LID). It has been showed that in physiological conditions, most striatal cells are silent, thus their spontaneous activity is lower compared to pathological conditions like PD and LID, in which it has been observed that spontaneous firing and synaptic activity of striatal neurons is enhanced. There is limited research on which types of interneurons are regulating the microcircuit dynamics under physiological and pathological conditions, in this work it's proposed that the cholinergic interneuron is the one responsible of regulating the striatal microcircuit dynamics. To test this hypothesis, we used a PD an LID model, with calcium imaging of neuronal populations in a corticostriatal slice preparation to monitor dozens of cells simultaneously and we used cholinergic antagonist to observe the response of the cells. This work demonstrates that when nicotinic and muscarinic (M1) receptors are inhibited there is a reconfiguration of the striatal microcircuit. When the cholinergic antagonist where added in control tissue and tissue with NMDA there were fewer striatal neurons synchronized. Contrarily, after dopamine depletion and during LID there was neuronal synchronization enhancement. This shows that the cholinergic interneuron intervenes in the network dynamics through its nicotinic and muscarinic receptors.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo (Clarke, 2007; Davie, 2008), que se caracteriza por la presencia de rigidez en el cuerpo, alteraciones posturales, bradicinesia (movimientos lentos) y temblor (Clavero-Ibarra y Gil-Azueta, 2012). Esta sintomatología se pone en evidencia tras la pérdida de más del 80% de la transmisión dopaminérgica de la *sustancia nigra* hacia el estriado (Bohena-Trujillo *et al.*, 2000; Davie, 2008). La dopamina modula la actividad colinérgica y, cuando hay disminución de la dopamina en la enfermedad, hay aumento sostenido en el disparo tónico de las interneuronas colinérgicas, lo que lleva a la aparición de una sincronía excesiva en los ganglios basales, y esto a su vez, al aumento en los niveles de acetilcolina estriatales (Aosaki *et al.*, 1998; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a; Pisani *et al.*, 2000; Pisani *et al.* 2007).

La L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina), precursor metabólico de la dopamina, es usada como el principal tratamiento de esta enfermedad (Davie, 2008). La L-DOPA mejora la calidad de vida de los pacientes; sin embargo, el tratamiento crónico (> de 5 años) conduce a la pérdida de la eficacia del tratamiento y efectos adversos como la discinesia tardía, la cual se caracteriza por movimientos involuntarios incontrolables de los músculos de la cara y de los miembros superiores e inferiores (Bohena-Trujillo *et al.*, 2000; Clavero-Ibarra y Gil-Azueta, 2012).

Debido a que hay muchos factores influyendo en las discinesias no ha sido tarea fácil encontrar un tratamiento para eliminarlas. Para hallar una terapia efectiva es necesario tener un entendimiento a fondo de los estudios patológicos y es importante conocer lo que ocurre con las poblaciones neuronales. Desde esta perspectiva se han realizado diversos estudios sobre la dinámica del microcircuito estriatal en los que se ha demostrado que las poblaciones neuronales y las interneuronas generan una actividad correlacionada de varios ensambles neuronales y estos ensambles exhiben patrones de actividad recurrente, alternada y sincronizada espacio-temporalmente (Carrillo-Reid *et al.*, 2008, 2009a y b; Jáidar *et al.*, 2010; Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Se ha observado que la mayoría de las células estriatales son inactivas en condiciones normales y su disparo raramente es sincronizado (Barnes *et al.*, 2005; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Experimentos en rebanadas de estriado *in vitro* en un modelo en roedor de la enfermedad de Parkinson (inyección intra-nigral de 6-OHDA en rata), mostraron que en animales lesionados la actividad basal de las neuronas neoestriatales incrementa, y frecuentemente se observan períodos de sincronización espontánea (Jáidar *et al.*, 2010).

La actividad basal y la sincronización de las neuronas espontáneamente activas aumentan en animales discinéticos en comparación con animales parkinsonianos (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Se necesita identificar con precisión qué subtipos de neuronas participan en la dinámica del microcircuito del estriado parkinsoniano y del discinético, para poder diseñar tratamientos más eficaces para estas enfermedades.

En este trabajo se trató de dilucidar si las interneuronas colinérgicas son las encargadas de modular la dinámica del microcircuito neostriatal en los estados normal, parkinsoniano y discinético. Para resolver este planteamiento fue usada la técnica de imagenología de calcio la cual permitió registrar la actividad de las células en el microcircuito estriatal normal, parkinsoniano y discinético, así como comparar los cambios en la dinámica del microcircuito al inhibirse farmacológicamente los receptores colinérgicos con pirenzepina y mecamilamina. Los cambios observados son importantes para entender el funcionamiento del estriado en el parkinsonismo y las discinesias inducidas por L-DOPA.

1. Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB), son un conjunto de estructuras subcorticales que están organizados anatómica y fisiológicamente de tal forma que facilitan los movimientos voluntarios (Mink, 2003b); también están asociados a la integración de la información sensoriomotora, los procesos asociativos, los cognitivos y emocionales (Houk *et al.*, 1996, Herrero *et al.*, 2012). Los GB (Fig. 1) están constituidos por el núcleo de entrada, el estriado; los núcleos intermedios, la *sustancia nigra pars compacta* (SNc), el globo pálido externo (GPe) y el núcleo subtalámico (NST); por último, los núcleos de salida, el globo pálido interno (GPI) y la *sustancia nigra pars reticulata* (SNr) (Bolam *et al.*, 2000).

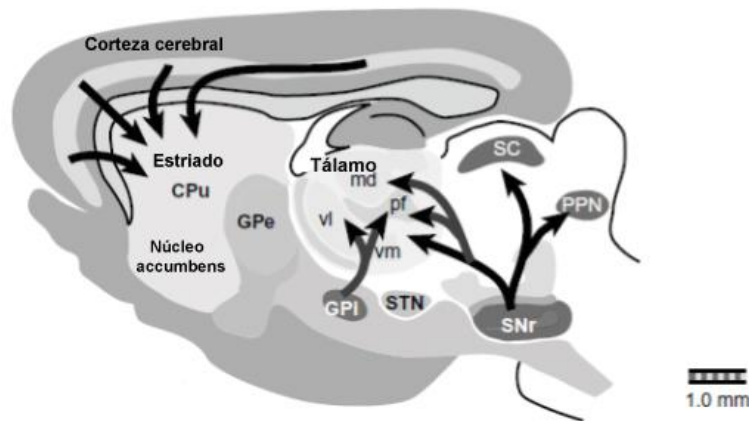


Figura 1. Organización estructural de los GB. Se muestran el estriado o caudado-putamen (CPu), el globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPI), Núcleo subtalámico (STN), *Sustancia nigra pars reticulata* (SNr). Se observan también los núcleos talámicos: ventral lateral (vl), medio dorsal (md), ventro medial (vm) y el complejo intralaminar/parafascicular (pf), el colícolosuperior (SC) y el núcleo pedúnculo pontino (PPN) (Gerfen & Bolam, 2010).

El modelo clásico de la organización funcional de los GB (Fig. 2) describe a la corteza como la principal fuente de información que llega a los ganglios basales, esto es debido a que hay una entrada glutamatérgica excitatoria hacia el estriado que parte de la corteza cerebral formando un circuito que va hacia los núcleos de salida, el GPi y la Snr, los cuales proyectan eferencias GABAérgicas inhibitorias hacia el tálamo ventral y éste a su vez envía proyecciones glutamatérgicas hacia la corteza (Kemp & Powell, 1970; Parent, 1995; Parent, 2001; Yelnik, 2002). Entre el núcleo de entrada y los de salida se han identificado dos vías de información que se originan en el estriado, una vía directa y una indirecta que se encargan de la ejecución y la inhibición de movimientos respectivamente (Kreitzer, 2009, García-Muñoz *et al.*, 2010).

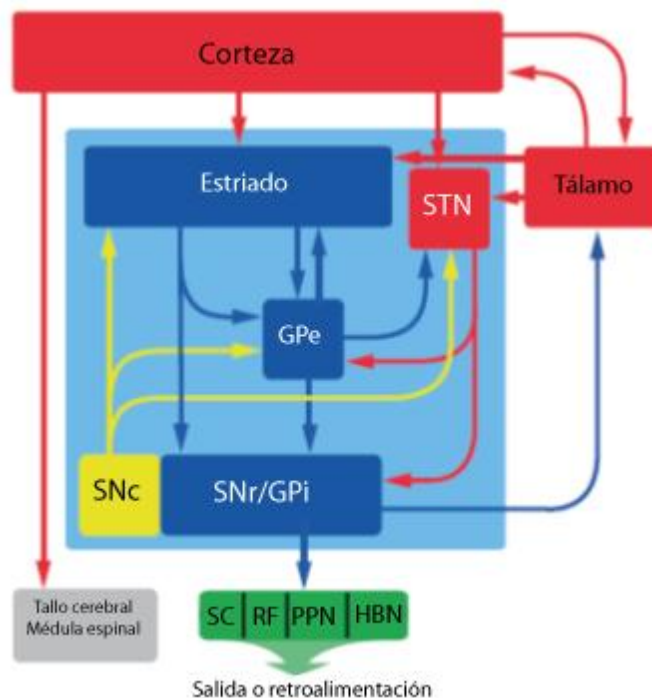


Figura 2. Se muestran las conexiones entre los GB (el estriado, el globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPi), Núcleo subtalámico (STN), *Sustancia nigra pars reticulata* (SNr), *Sustancia nigra pars compacta* (SNc)), los sitios de entrada (corteza y tálamo) y las proyecciones al colículo superior (SC), la formación reticular (RF), el núcleo pedúnculo pontino (PPN) y la habenula lateral (HBN) (Bolam *et al.*, 2009).

La vía directa proyecta al GPi donde hace sinapsis en las neuronas GABAérgicas que proyectan hacia el tálamo. Debido a que las proyecciones del estriado son GABAérgicas, éstas impiden los efectos inhibitorios de las proyecciones del GPi hacia el tálamo, por lo que el efecto de la vía directa es un aumento en la actividad de las neuronas del tálamo y la corteza, que conlleva al movimiento. La vía indirecta proyecta al GPe en donde hace sinapsis con las neuronas GABAérgicas que a su vez proyectan al NST. Las neuronas glutamatérgicas del NST proyectan al GPi donde hacen sinapsis en las aferencias GABAérgicas que proyectan hacia el tálamo. El GPe al estar inhibido por el estriado permite el efecto excitatorio del NST hacia el GPi, lo que resulta en aumento en la actividad de las neuronas del GPi y a su vez aumento en la inhibición del tálamo y la disminución en la actividad de la corteza que frena el movimiento. (Alexander & Crutcher, 1990; Jenner, 2008).

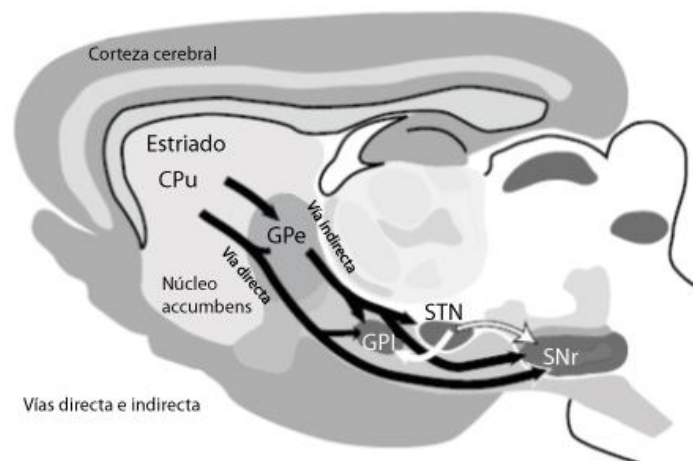


Figura 3. Esquema de las vías de salida, directa e indirecta (Gerfen & Bolam, 2010).

Ambas vías están reguladas por la entrada dopaminérgica de la SNc hacia el estriado, la vía directa tiene neuronas con receptores D1 excitatorios y la vía indirecta tiene neuronas con D2 que son inhibitorios. La vía indirecta ejerce un

efecto inhibitorio del movimiento, sin embargo la dopamina inhibe este efecto y por lo tanto facilita el movimiento al estimular ambos receptores (Jenner, 2008). La regulación del flujo de información también tiene otros componentes que se encuentran en el estriado.

1.1 Estriado

El estriado no sólo está encargado de integrar la información glutamatérgica proveniente de la corteza, sino también del tálamo, aferentes dopaminérgicas de la SNc y otros núcleos, por lo que es considerado la estructura aferente primaria de los ganglios basales (Smith *et al.*, 1994; Parr-Brownlie *et al.*, 2009). En algunos mamíferos, como los roedores, el estriado es una sola estructura, pero en otros, como los primates, consiste en dos estructuras el caudado medial y el putamen lateral, las cuales están divididas por las fibras de la cápsula interna (Albin *et al.*, 1989). El estriado está constituido por un 95% de neuronas espinosas medianas (NEMs), también conocidas como neuronas de proyección y un 5% de interneuronas estriatales (Tepper & Bolam, 2004).

1.2 NEMs

La información integrada y procesada por las NEMs es transmitida al resto de los GB. En estado basal están hiperpolarizadas (-85 mV) y silentes; sin embargo, la actividad de la corteza lleva a las NEMs a un estado activo o llamado “*up state*” en el que disparan potenciales de acción. De esta forma llevan la información por las vías directa e indirecta hacia los otros núcleos (Tepper & Bolam, 2004). Reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza y del tálamo, y dopaminérgicas de la SNc. Las NEMs son GABAérgicas y se dividen entre las que proyectan a la SNr y al núcleo entopedicular (vía directa) y las que van al GPe (vía indirecta), estas dos subpoblaciones se distribuyen homogéneamente a lo largo del estriado. Las NEMs de la vía directa además de tener receptores de dopamina D1, también tienen receptores muscarínicos de tipo 4 así como dinorfina y sustancia P. Las NEMs de la vía indirecta tienen receptores de dopamina D2, receptores de adenosina A2A y encefalina. La actividad de las NEMs, además de ser regulada por dopamina, también es regulada por acetilcolina y GABA proveniente de las interneuronas del estriado (Kawaguchi, 1989; Kreitzer, 2009; Matamales *et al.*, 2009).

1.3 Interneuronas GABAérgicas

Las interneuronas estriatales se pueden dividir en dos tipos, las GABAérgicas (un 3-4% de la población) y las interneuronas gigantes colinérgicas (un 0.5–1% de la población). Las interneuronas GABAérgicas son de tamaño medio (10 a 20 μm) y

carecen de espinas dendríticas, forman circuitos locales dentro del estriado y son las encargadas de las inhibiciones retrógradas dentro de las neuronas de proyección (Kreitzer, 2009; Jaidar, 2011). Las interneuronas GABAérgicas a su vez se subdividen en las interneuronas SOM/NPY/NOS+, las parvalbúmina positivas PV+ o *fast spiking* (FS), las interneuronas CR+, las interneuronas TH+, las interneuronas 5HT3a^{EGFP} (Kreitzer, 2009; Muñoz-Manchado *et al.*, 2014; Tepper *et al.*, 2010).

1.3.1 Interneuronas PV(+)

Las neuronas PV+ o FS son de tamaño mediano (entre 13 a 15 μm de diámetro), sus dendritas son escasas y no tienen gran arborización; el axón mide de 200 a 300 μm (Kubota & Kawaguchi, 2000; Herrero *et al.*, 2012; Tepper *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2014). Al igual que las NEMs, las PV+ están hiperpolarizadas y no disparan espontáneamente; sin embargo, si se les administran corrientes fuertes (más de 1000 pA) de despolarización disparan a frecuencias arriba de 400 Hz y los potenciales de acción duran menos de 0.5 ms (Tepper *et al.*, 2010). Reciben aferencias excitatorias de la corteza y en menos cantidad del tálamo (Kita, 1993), inhibición GABAérgica de las NEMs y de neuronas del GPe, así como aferencias colinérgicas (Tepper & Bolam, 2004). A través de múltiples contactos sinápticos contribuyen a la regulación de la tasa de disparo de las NEMs por lo que son muy importantes para regular el flujo de información hacia fuera del estriado (Bennet & Bolam, 1994; Kawaguchi *et al.*, 1995; Kubota & Kawaguchi 2000.)

1.3.2 Interneuronas SOM/NPY/NOS+

También son llamadas LTS (*low threshold spiking*), tienen presencia de somatostatina (SOM), neuropéptido Y (NPY) y óxido nítrico (NO); son de tamaño mediano (9-25 μm de diámetro), en promedio tienen de 3 a 5 dendritas que carecen de espinas con varicosidades hacia las partes distales, crecen en línea recta y no es frecuente que estén ramificadas; su arborización tiene unos 600 μm de diámetro. Por otro lado, su arborización axonal es la menos densa de todas las interneuronas pero la más larga con axones que pueden medir hasta 1 mm (Kawaguchi, 1993; Tepper *et al.*, 2010). Pueden generar largos platós de despolarización y espigas de bajo umbral dependientes de calcio (Kawaguchi, *et al.*, 1995). Reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza y del tálamo, además de dopaminérgicas y colinérgicas, y forman sinapsis con las NEMs. Expresan receptores de dopamina D5 que al activarse despolarizan a las células y aumentan el disparo, también expresan receptores muscarínicos M1 y M2, pero aún no se conoce su papel fisiológico (Kreitzer, 2009). Son importantes para la función estriatal pues a través de la liberación de NO pueden facilitar la liberación de acetilcolina, GABA y glutamato (Kawaguchi, *et al.*, 1995).

1.3.3 Interneuronas CR+

Estas interneuronas expresan calretinina, la cual es una proteína de unión a calcio, no hay registros electrofisiológicos de estas neuronas por lo que hay pocos datos sobre ellas. Su tamaño varía, pueden ser pequeñas, medianas o grandes

(Tepper *et al.*, 2010), tienen de una a tres dendritas primarias que ramifican en una o dos dendritas secundarias, las dendritas pueden llegar a medir 200 μm (Bennett & Bolam, 1993).

1.3.4 Interneuronas TH+

Expresan tirosina hidroxilasa, tienen un tamaño mediano (11-24 μm de diámetro), se pueden distinguir cuatro tipos de estas neuronas por sus características electrofisiológicas. Las dendritas carecen de espinas pero contienen varicosidades, la arborización del axón es densa con ramificaciones delgadas y varicosidades (Ibáñez-Sandoval *et al.*, 2010). Reciben sinapsis simétricas y asimétricas y forman sinapsis GABAérgicas con las NEM's (Tepper *et al.*, 2010).

1.3.5 Interneuronas 5HT3a^{EGFP}

Son interneuronas GABAérgicas, se han distinguido dos subtipos, las LS-NGF (Tipo II) y las LTS-like (Tipo III), ambos tipos son de tamaño medio (8–13 μm de diámetro) pero las de tipo II tienen un árbol dendrítico denso cercano al soma y las de tipo tres tienen 2-3 dendritas primarias arregladas de manera longitudinal (Muñoz-Manchado *et al.*, 2014).

1.4 Interneuronas Colinérgicas

Las interneuronas colinérgicas tienen un cuerpo celular grande (entre 20 y 50 μm de diámetro), poseen de dos a cuatro largas dendritas primarias sin espinas que bifurcan y pueden abarcar hasta 1 mm, el árbol axonal es denso y se extiende profusamente por el estriado, se les identifica por la presencia de colina acetiltransferasa y, a pesar de ser escasas son la fuente de acetilcolina en el estriado ya que tienen una gran inervación en este núcleo debido a la longitud de su axón que les permite que inerven áreas grandes del estriado (Kawaguchi *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2002; Goldberg and Reynolds, 2011).

Electrofisiológicamente se distinguen por una resistencia de entrada alta (Kawaguchi, 1993) y por su actividad espontánea continua en condiciones fisiológicas (Bennett & Wilson, 1990; Tepper and Bolam, 2004; Kreitzer 2009), por lo que también se les conoce como neuronas tónicamente activas (TANs, por sus siglas en inglés “*tonic active neurons*”). Las TANs despliegan 3 patrones de disparo que surgen de sus propiedades intrínsecas de membrana: irregular, tónico y de ráfaga (Goldberg and Reynolds, 2011), presentan potenciales de acción amplios, su frecuencia de disparo es de 2 a 10 Hz (Wilson *et al.*, 1990; Aosaki *et al.*, 1994). Dos elementos que las caracterizan son, la presencia de una prolongada hiperpolarización después del disparo (Kawaguchi *et al.*, 1995) así como “pausas” en su disparo tónico en respuesta a un estímulo sensorial en tareas motoras aprendidas (Kimura *et al.*, 1984).

Reciben aferencias excitatorias de la corteza y del tálamo, aferencias inhibitorias de las NEMs e inervación dopaminérgica de la sustancia nigra (Dimova *et al.*, 1993; Kreitzer, 2009; Doig *et al.*, 2014). Funcionalmente las TANs están involucradas en patrones de recompensa y en el aprendizaje motor (Bennet and Wilson, 1998; Reynolds and Wickens, 2004).

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) se encuentran en las interneuronas GABAérgicas y en los axones de neuronas dopaminérgicas, al contrario de los receptores muscarínicos (mAChR) que se encuentran en todos los tipos neuronales. Los mAChR regulan la dinámica y el equilibrio de acetilcolina-dopamina (Goldberg & Reynolds 2011).

1.4.1 Interneurona Colinérgica y Dopamina

Las neuronas del mesencéfalo en la SNc y el área tegmental ventral proveen la dopamina (DA) a los ganglios basales y al lóbulo frontal; contienen la mayoría de las neuronas dopaminérgicas. Las interneuronas colinérgicas expresan los receptores D2 y D5, ambos receptores influyen el potencial de membrana de estas interneuronas. La DA al estimular los receptores D5 en las TANs, despolarizan las interneuronas colinérgicas para promover el disparo a través de la supresión de la conductancia de K⁺ dependiente de AMPc y la apertura de un canal de cationes no definido. La activación directa de los receptores D2 induce una despolarización dependiente de dosis y disparo de PA. Es posible que la DA promueva la activación sincrónica de las interneuronas colinérgicas, activando una

cascada complicada de eventos de señalización, lo cual resulta en liberación de DA e inhibición de las aferencias de las NEM's (Tritsch & Sabatini, 2012).

Un mal funcionamiento de las interneuronas colinérgicas puede estar involucrado en la enfermedad del Parkinson, debido a que la DA modula la actividad colinérgica (Aosaki *et al.*, 1998; Pisani *et al.*, 2000) y, cuando hay disminución de la DA en la enfermedad, hay aumento sostenido en el disparo tónico de estas interneuronas, lo que lleva a la aparición de una sincronía excesiva en los ganglios basales (Carrillo-Reid *et al.*, 2009a) y esto a su vez al aumento en los niveles de acetilcolina estriatales (Pisani *et al.* 2007).

2. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo desorden neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer (Lau & Breteler, 2006). Es crónico y progresivo (Clarke, 2007; Davie, 2008), se caracteriza por la presencia intracelular de cúmulos de α -sinucleína llamados cuerpos de Lewy y la pérdida de más del 80% de la transmisión dopaminérgica de la sustancia nigra hacia el estriado (Bohena-Trujillo *et al.*, 2000; Davie, 2008; Alves *et al.*, 2008) lo que ocasiona diferentes síntomas motores como rigidez muscular, alteraciones posturales, bradicinesia (movimientos lentos) y temblor (Cheshire & Williams, 2012; Clavero-Ibarra & Gil-Azueta, 2012). Los síntomas motores se utilizan como criterio para el diagnóstico de EP, sin embargo hay evidencia de síntomas no motores que preceden a los síntomas motores, como déficit olfativo, estreñimiento, hipotensión y desordenes de sueño (Hawkes, 2008).

Las causas de EP se desconocen pero se considera que esta enfermedad es potenciada por la interacción de factores ambientales y genéticos (Shafique *et al.*, 2011). Diferentes toxinas ambientales han sido asociadas con aumento en el riesgo de la enfermedad, entre ellas están el herbicida *paraquat*, el pesticida rotenona y la exposición ocupacional a metales pesados (Shulman *et al.*, 2011). Otros factores como niveles altos de ácido úrico, el consumo de tabaco y cafeína se asocian con la reducción en el riesgo de EP (Tan, 2013). Por otro lado, estudios genómicos han encontrado variaciones en más de 20 genes que están asociados a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad y se han identificado genes con mutaciones que causan EP. Por ejemplo, las mutaciones en los genes SNCA,

LRRK2 y VPS35 son causa de formas de EP autosómicas dominantes, mientras que mutaciones en parkina (PRKN, PARK2), cinasa putativa inducida por PTEN 1 (PINK1, PARK6), y proteína de Parkinson 7 (DJ-1, PARK7) son causa de formas autosómicas recesivas de parkinsonismos de inicio temprano (antes de los 45 años). Las mutaciones en estos tres genes ATP13A2 (PARK9), PLA2G6 (PARK14) y FBX07 (PARK15) causan formas raras de parkinsonismo recesivo, usualmente con inicio juvenil y características clínicas atípicas como signos piramidales, demencia, distonia, movimiento ocular y perturbaciones cognitivas (Lai et al., 2012). Las mutaciones en EIF4G1 se han relacionado a EP autosómica dominante de inicio tardío con cuerpos de Lewy en el tallo cerebral y características clínicas como temblor, caídas, bradicinesia, rigidez y dolor muscular (Chartier *et al.*, 2011). Las mutaciones más comunes se dan en los genes SNCA, LRRK2 y parkina (Wirdefeldt *et al.*, 2011; Bonifati, 2014).

El SNCA es el gen que codifica para la proteína α -sinucleína. Esta proteína se acumula y forma núcleos fibrilares que se asocian con proteínas relacionadas con la autofagia; estos cúmulos son esféricos y son llamados cuerpos de Lewy, los cuales son una característica neuropatológica de la EP (Schapira & Jenner, 2011; Shulman *et al.*, 2011).

El gen LRRK2 (cinasa de repetición rica en Leucina 2) codifica para una proteína de 2527 aminoácidos con dos dominios enzimáticos (GTPasa y cinasa) y que tiene varios dominios para la interacción con otras proteínas, las mutaciones en este gen son la causa más común de la EP autosómica dominante, está asociada tanto a la EP familiar (7-10%) como a los casos esporádicos. Los pacientes con

mutaciones en este gen generalmente tienen las características clásicas de la EP, como pérdida de neuronas dopaminérgicas y gliosis de la sustancia nigra, cuerpos de Lewy, inclusiones de ubiquitina o de tau (Mata *et al.*, 2006; Bonifati, 2014), mientras que las características clínicas son muy similares o casi indistinguibles de aquéllas que presentan los pacientes con EP idiopática (Singleton *et al.*, 2013).

Las mutaciones en la parkina están asociadas con la mitad de los casos de EP autosómica recesiva de inicio temprano, el 10-20% de los casos esporádicos de inicio temprano y un 0.4–0.7% en los casos esporádicos en general. Los pacientes con mutaciones en la parkina generalmente muestran una respuesta a la L-DOPA buena y tienen un progreso lento de la enfermedad (Shulman *et al.*, 2011).

2.1 Tratamiento de EP

A lo largo del tiempo, diferentes tratamientos se han empleado para controlar los síntomas motores. Por ejemplo las lesiones en el tálamo se aplicaban para tratar el temblor, pero no eran efectivas contra la acinesia (Dunnett & Björklund, 1999). Desde hace 40 años la L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina), precursor metabólico de la DA, es usada como el principal tratamiento de esta enfermedad, generalmente combinada con un inhibidor periférico de la descarboxilasa (Davie, 2008). La L-DOPA mejora de manera importante la calidad de vida de los pacientes, sin embargo el tratamiento crónico con este fármaco (> de 5 años) conduce a la pérdida de la eficacia del tratamiento y efectos adversos como la discinesia tardía, la cual se caracteriza por movimientos involuntarios

incontrolables de los músculos de la cara y de los miembros superiores e inferiores (Bohena-Trujillo *et al.*, 2000; Clavero-Ibarra y Gil-Azueta, 2012).

Esas complicaciones motoras llevaron a la búsqueda de otros fármacos que tuvieran mayor eficacia contra los síntomas motores y retrasaran la administración de L-DOPA, dando como resultado la introducción de agonistas dopaminérgicos como bromocriptina, pergolida, cabergolina, lisorida, ropinirol y pramipexol. Aunque, se ha observado que los pacientes tratados con pramipexol tienen reducción de síntomas depresivos y desórdenes cognitivos. Otros síntomas no motores como la ansiedad y apatía son tratados con inhibidores de la colinesterasa (Muzerengi *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de que la administración de los agonistas dopaminérgicos reducen las complicaciones motoras, se produce disminución en la eficacia contra los síntomas motores y aumento en efectos secundarios como confusión y alucinaciones (Davie, 2008).

Para los síntomas iniciales de la EP, se ha optado por el tratamiento con L-DOPA con agonistas dopaminérgicos o con otros fármacos que han demostrado eficacia contra los síntomas motores como inhibidores de la monoaminaoxidasa B o inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa y bloqueadores del transporte de DA (Dunnett & Björklund, 1999; Clarke, 2007). Las discinesias generalmente son tratadas con amantadina, un antagonista del receptor de NMDA, pues reduce la frecuencia de las complicaciones motoras, no obstante, al igual que los anticolinérgicos, interfiere con la función cognitiva y empeora la demencia y el efecto anti-discinético y sólo dura de tres a ocho meses (Horstink *et al.*, 2006; Muzerengi *et al.*, 2007).

3. Discinesias

Si bien se han desarrollado fármacos alternativos o adicionales, la L-DOPA sigue siendo el principal tratamiento contra los síntomas motores de la EP. Después de diez años de administración crónica de la L-DOPA el 90% de los pacientes desarrolla discinesias (Ahlskog & Muenter, 2001). Las discinesias incluyen diferentes tipos de desórdenes de movimientos como corea-balismo, distonia, mioclonus, tics y temblor (Guridi *et al.*, 2012). Se han asociado la duración de la enfermedad y la dosis de L-DOPA empleada con la frecuencia de las complicaciones motoras. Se ha observado que los pacientes más jóvenes desarrollan discinesias antes que los pacientes más viejos (Schrag & Quinn, 2000).

Las discinesias se presentan en diferentes formas (Fig. 4), como son las discinesias “on”, la discinesia difásica (on/off) y la distonia “off”. Las primeras o también llamadas “pico de dosis” son las más comunes y están relacionadas con los niveles de L-DOPA en la sangre y con una respuesta benéfica contra los síntomas de la enfermedad. Estas discinesias son coréicas en su mayoría y se localizan en el cuello, el tronco y extremidades superiores. La discinesia difásica ocurre cuando las concentraciones de L-DOPA en la sangre aumentan o disminuyen, generalmente son impredecibles y hay cambios abruptos entre movilidad e inmovilidad, en el primer caso tienden a ser movimientos estereotipados, repetitivos y lentos de las extremidades inferiores y temblor en las extremidades superiores. En el efecto “off”, se percibe disminución en la movilidad,

se presenta la distonia, la cual está caracterizada por posturas fijas y dolorosas que afectan mayormente a los pies, en general los pacientes no pueden moverse en este estado (Lang & Lees *et al.*, 2002; Guridi *et al.*, 2012; Tambasco *et al.*, 2012).

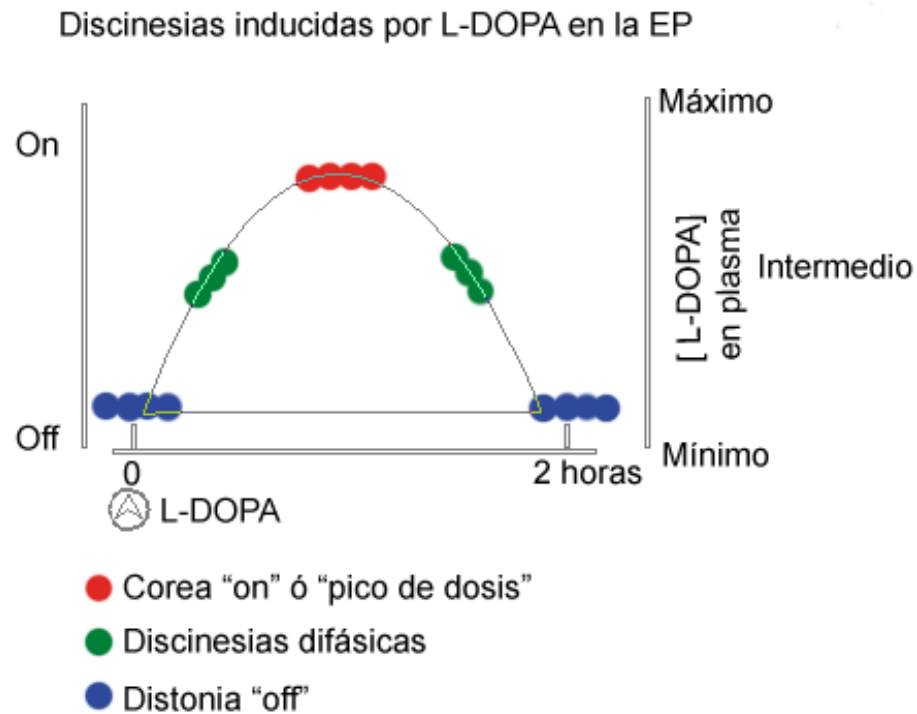


Figura 4. Relación entre discinesia y el nivel de L-DOPA en la sangre. El pico de dosis está correlacionado con la mayor concentración de L-DOPA en sangre al contrario que la distonia. La discinesia difásica aparece al incrementar o disminuir la concentración de L-DOPA. Generalmente se presentan los tres tipos en los pacientes con complicaciones motoras (Modificado de Guridi *et al.*, 2012).

El riesgo de adquirir estas discinesias depende de la severidad o la duración de la enfermedad, la dosis de L-DOPA y la administración de otros tratamientos. Hay menor riesgo de desarrollar discinesia con tratamientos de agonistas de los receptores D2 en comparación con los agonistas de los receptores D1. En presencia de antagonistas de los receptores D3, la estimulación de los receptores

D1 induce movimientos discinéticos semejantes a la discinesia de pico de dosis. La administración de agonistas de receptores D1 inducen discinesia y la expresión de factores de transcripción FosB/ Δ FosB en neuronas de proyección estriatales. La expresión de Δ FosB, puede llevar a cambios en la expresión de genes; por ejemplo, se ha observado que el Thr581 del mitógeno y cinasa activada por estrés (MSK1), está activado persistentemente en las neuronas de proyección de la vía directa en roedores que desarrollan discinesia (Murer & Moratalla, 2011).

Además de la expresión de factores de transcripción, la disminución de la DA estriatal que resulta de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc conlleva al aumento en la sensibilidad de los receptores dopaminérgicos en las NEMs. La DA puede estimular la adenilato ciclasa al activar los receptores D1. En el estriado, los receptores D1 están acoplados a la proteína $G_{\alpha olf}$ que activa la adenilato ciclasa y a su vez estimula la señalización de AMPc. Cuando no hay DA se incrementan los niveles de $G_{\alpha olf}$, en los pacientes de la EP; hay una hipersensibilidad de los receptores D1 en compensación por la falta de DA estriatal. Es probable que esta hipersensibilidad sea un factor que contribuye al desarrollo de la discinesia, debido a que lleva a la hiperactivación persistente de la señalización del AMPc en las NEMs de la vía directa (Santini *et al.*, 2008).

Los receptores D3, también juegan un papel en la discinesia, pues el aumento de la expresión de estos receptores en las NEMs de la vía directa en ratas lesionadas con 6-OHDA es similar a la sensibilización de la respuesta rotacional a L-DOPA, y en monos lesionados con MPTP se observó que la reducción farmacológica de estos receptores reduce la discinesia. En ratas con discinesia, un agonista con

preferencia al receptor D3 indujo cambios hemodinámicos en regiones cerebrales similares a los inducidos por los agonistas D1, cuando no había discinesia el agonista no tuvo este efecto, lo que sugiere que la estimulación del receptor D3 actúa potenciando al receptor D1 en la discinesia (Murer & Moratalla, 2011).

Además del papel que juegan los receptores dopaminérgicos en la discinesia, también se ha observado la influencia del sistema serotoninérgico en el desarrollo de discinesias, pues a pesar de que la regulación de la DA por parte de los receptores D2 es funcional aún en ratas con déficit de DA estriatal, la liberación de DA inducida por L-DOPA no es sensible a los procesos de autorregulación de la DA, es decir, la estimulación de los receptores D2 por parte de la inhibición del transportador de la DA. La descarboxilación de L-DOPA a DA se realiza por el aminoácido aromático l-d Descarboxilasa (AADC) que es expresado por diferentes tipos celulares, incluyendo las neuronas productoras de serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT). En ausencia de DA, la L-DOPA es descarboxilada a DA por el AADC dentro de las neuronas 5-HT, esta DA es almacenada en vesículas por medio del transportador de dopamina VMAT2 y es co-liberada con la serotonina mediante exocitosis, lo cual no sólo lleva al aumento masivo en los niveles extracelulares de la DA en todas las regiones cerebrales invadidas por las neuronas 5-HT, sino también hay alteración de la liberación de 5-HT, esto puede participar en la aparición de los efectos secundarios motores y no motores de la L-DOPA, pues las discinesias se desarrollan como consecuencia de las fluctuaciones anormales de los niveles sinápticos inducidos por el tratamiento de

L-DOPA y la alteración de la función serotoninérgica puede resultar en desórdenes cognitivos y de humor (Navailles & Deurwaerdère, 2012).

4. Microcircuito estriatal

El cerebro está formado de varias redes con diferentes funciones en diversas regiones del mismo cerebro. En particular, cualquier red en el sistema nervioso central que coordine un movimiento o una parte de movimiento es denominada generador central de patrones (CPG, por sus siglas en inglés). La unidad de CPG es un grupo de neuronas que generan actividad recurrente sin necesidad de mecanismos inhibitorios, cuando la unidad de CPG está acoplada a otra, ambas alternan sus patrones de actividad y al reclutarse varios circuitos preensamblados en forma de CPGs pueden generarse diferentes movimientos. Los ganglios basales, son importantes para el control y coordinación de los CPGs que están encargados de muchas conductas motoras (Grillner *et al.*, 2005; Grillner, 2006).

Se ha demostrado que las rebanadas estriatales aisladas tienen los elementos necesarios para generar actividad correlacionada de varios ensambles neuronales, estos ensambles exhiben patrones de actividad recurrente, alternada y sincronizada espacio-temporalmente. Se ha observado que la mayoría de las células estriatales son inactivas en condiciones normales y su disparo raramente es sincronizado (Barnes *et al.*, 2005; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Sin embargo, la aplicación del agonista glutamatérgico NMDA induce la activación de las neuronas estriatales y la sincronización del disparo de potenciales de acción en varios ensambles de neuronas por un extenso período (Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

Experimentos en rebanadas de estriado *in vitro* de un modelo en roedor de la EP (inyección intra-nigral de 6-OHDA en rata), mostraron que en animales lesionados

la actividad basal de las neuronas neostriatales incrementa y frecuentemente se observan períodos de sincronización espontánea. La sincronización genera un estado dominante en la red que recluta a la mayoría de las células espontáneamente activas (Jáidar *et al.*, 2010).

La actividad basal y la sincronización de las neuronas espontáneamente activas aumentan en animales discinéticos en comparación con animales lesionados solamente con 6-OHDA pero no tratados con L-DOPA (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Hasta ahora, no se han identificado con precisión qué subtipos de neuronas participan en la dinámica del microcircuito del estriado parkinsoniano.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las discinesias son un efecto secundario del tratamiento de L-DOPA que afecta a los pacientes bajo el tratamiento, actualmente no se han elucidado con precisión las causas de este trastorno.

Desde la perspectiva del análisis de redes se ha identificado aumento en la actividad neuronal y la sincronización anormal de las neuronas en el microcircuito estriatal parkinsoniano y parkinsoniano con discinesias inducidas por L-DOPA.

La identificación de los subtipos neuronales que están involucrados en la modulación del microcircuito estriatal, podría acercar al desarrollo de un tratamiento efectivo, tanto de la EP como de la discinesias inducidas por L-DOPA.

III. HIPÓTESIS

Las interneuronas colinérgicas regulan la dinámica del microcircuito neostriatal tanto parkinsoniano como en las discinesias inducidas por L-DOPA.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la participación de las interneuronas colinérgicas en la dinámica del microcircuito neostriatal en el estado parkinsoniano y en las discinesias inducidas por L-DOPA.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener animales hemi-parkinsónicos y con discinesias inducidas por L-DOPA.

- Mediante técnicas de imagenología de calcio, caracterizar la participación de las interneuronas colinérgicas en:
 - El microcircuito neostriatal normal.
 - El microcircuito neostriatal parkinsoniano.
 - El microcircuito neostriatal parkinsoniano con discinesias inducidas por L-DOPA.

VI. MÉTODO

Se trabajó con tres grupos de Ratas Wistar macho: control, hemi-parkinsonianas y discinéticas de 33-40 días de edad.

1. Lesión de la SNc con 6-OHDA

Ratas Wistar (de 14 días de edad) fueron inyectadas intracerebralmente con la neurotoxina 6-hidroxydopamina (6-OHDA) en la SNc del hemisferio derecho. Esta inyección produce la destrucción selectiva de neuronas dopaminérgicas.

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilazina (70/30 mg/Kg i.p. respectivamente) y posteriormente fueron colocadas en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA). Para localizar las coordenadas se realizaron pruebas con azul de metileno. Debido a que el número de elementos neuronales que puede ser registrado con la técnica de imagenología de calcio mediante epifluorescencia es mayor mientras más joven sea el animal, la edad de las ratas fue modificada hasta un rango de edad en donde la lesión fuera posible (14 días) y el registro de la dinámica de red no se viera comprometido. También fue necesario ajustar las coordenadas para hacer la lesión en ratas de menor edad. Las coordenadas que se obtuvieron para la rata de 14 días, tomando como referencia el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1988) de rata adulta, fueron: lateral +2.1 mm, anteroposterior +3.9 mm y dorsoventral -7.7 mm).

Se inyectó 1 μ l de la neurotoxina 6-hidroxydopamina (6-OHDA) (Sigma-Aldrich-RBI, St Louis, MO, EUA; 4 μ g/ μ l en 0.9% de NaCl, 0.5% C₆H₆O₆) en la SNc del hemisferio derecho a razón de 0.5 μ l/min, la cánula de inyección se mantuvo 5

minutos en la misma posición para permitir la difusión. Después de la operación, los animales se regresaron con su madre, de la cual se les separó a los 21 días. Ocho días después de la administración de 6-OHDA, se evaluó la lesión mediante la prueba de giro. Fueron sacrificados 30 individuos control y 33 individuos hemiparkinsónicos y 43 individuos con discinesias inducidas por L-DOPA. La n final fue de 11 individuos control, 12 hemiparkinsónicos y 10 hemiparkinsónicos con discinesias inducidas por L-DOPA.

2. Evaluación de la conducta de giro

El grado de la lesión se verificó administrando subcutáneamente 1 ml/kg de apomorfina ocho días después de la lesión (Sigma-Aldrich-RBI, St Louis, MO, EUA; 0.05 mg de apomorfina + 0.2 mg de ácido ascórbico en 1 ml de 0.9% de NaCl). La apomorfina induce movimientos rotatorios hacia el lado contralateral a la lesión con 6-OHDA, se contabilizaron los giros en un periodo de 30 minutos a partir de la inyección. Los animales que presentaron más de 90 giros fueron seleccionados para los procedimientos adicionales. Si los animales no obtenían el puntaje mínimo, se dejaba actuar la neurotoxina 6-OHDA por diez días más y eran evaluados una segunda vez; si obtenían el puntaje se incluían en el grupo de hemiparkinsónicos. Generalmente estos animales presentaron un mayor número de giros, debido a que la lesión fue evaluada en un estado más avanzado. El grupo sometido a tratamiento con L-DOPA, sólo fue evaluado una vez al inicio del tratamiento.

Los animales cuya dopamina fue eliminada unilateralmente fueron divididos en dos grupos, hemi-parkinsonicos sin otro tratamiento y los seleccionados para iniciar el tratamiento de L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenil alanina) por 10 días.

Las ratas fueron inyectadas todos los días con 1 ml/kg de L-DOPA y 15 mg/kg/día de benserazida (disueltas en 0.9% de NaCl) vía intraperitoneal por 10 días, nueve días después de la lesión. La dosis fue aumentando cada tres días, se inició con una dosis de 6 mg/kg/día de L-DOPA, la cual aumentó a 15 mg/kg/día de L-DOPA y después de tres días se incrementó a 25 mg/kg/día de L-DOPA (Fig. 5).

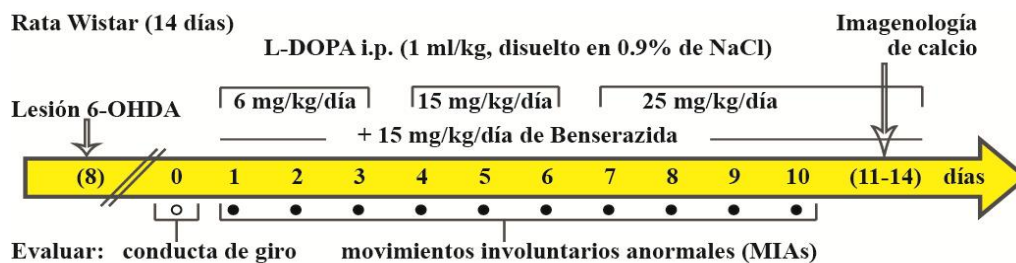


Figura 5. Esquema del tratamiento con L-DOPA y evaluación de los MIAs.

La discinesia causada por L-DOPA fue evaluada mediante la cuantificación del desarrollo de movimientos involuntarios anormales (MIAs) en los animales, los cuales fueron monitoreados diariamente a partir de la primera administración de L-DOPA. Las ratas fueron separadas individualmente y observadas por un minuto cada 20 minutos, durante 4 horas posteriores a la inyección de L-DOPA todos los días de tratamiento.

Fueron contabilizados cuatro subtipos de MIAs: axial, orolingual, locomotor y de extremidades anteriores (Tabla 1). Se les asignó una calificación de 0 a 4 en cada uno de los cuatro MIAs, dependiendo de la frecuencia de presencia de los MIAs, siendo el 0 ausente y el 4 una presencia continua ininterrumpida (Tabla 2) (Cenci *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Lundblad *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002). El registro de los movimientos se hizo a mano.

Tabla 1. Movimientos Involuntarios Anormales (MIAs) que se monitorearon en las ratas. Modificado de Winkler *et al.*, 2002

Locomotor.	Giro contralateral a la lesión.
Orolingual.	Movimientos de la mandíbula, muecas faciales, protrusión de la lengua. Estos movimientos son bilaterales, pero más pronunciados al lado contralateral a la lesión.
Axial.	Torsión de la cabeza, tronco y cuello hacia el lado contralateral a la lesión. Esta posición es a menudo sostenida, pero también puede tener el carácter de un movimiento de torsión coreiforme.
De extremidades anteriores.	Sostenidas sobre las dos patas traseras, con las dos patas delanteras moviéndose arriba y abajo varias veces.

Tabla 2. Índice (MIAs)

0	Ausente
1	Ocasional, es decir, presente en menos del 50% del tiempo de observación
2	Con frecuencia, es decir, presente en más del 50% del tiempo de observación
3	Continua, pero interrumpida por fuertes estímulos sensoriales, es decir, la apertura súbita y ruidosa de la tapa de la jaula
4	Continua, no interrumpida por fuertes estímulos sensoriales, ni por las maniobras de riesgo, es decir, los movimientos gruesos del experimentador por ejemplo al colocar la mano en la jaula de la rata a monitorear.

3. Obtención de rebanadas de tejido cerebral para el registro de la actividad neuronal

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (1ml/2.5 kg), 19 días después de la lesión y posteriormente se les realizó una perfusión intracardiaca con solución salina (4°C) que contenía (en mM): 124 ColinaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl₂, 2.4 CaCl₂, 26 NaHCO₃ y 10 glucosa, solución saturada con 95% O₂ and 5% CO₂; pH=7.4; 298 mOsm/L. El cerebro se sumergió en la misma solución con colina helada para mantener el balance osmótico al llevar a cabo los cortes. Con ayuda de un vibratomo (Vibratome 3000), se obtuvieron rebanadas oblicuas córtico-estriatales (200-250 µm de grosor) de cerebro de rata control, hemi-parkinsonicas y con discinesias inducidas por L-DOPA, para conservar las aferencias corticales se utilizó un corte transversal con un ángulo de 45° (Kawaguchi, 1993). Sólo se analizaron las rebanadas del hemisferio lesionado y las del hemisferio no lesionado fueron desechadas.

Las rebanadas fueron incubadas en la oscuridad durante 20-25 minutos inmersas dentro de la solución KREBS normal (en mM: 123 NaCl, 3.5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 26 NAHCO₃, 11 Glucosa) en presencia de 10 µM de Fluo-4 (Fluo-4AM) (Tef Labs, Austin, TX, EUA), en una atmósfera saturada con 95% O₂ y 5% CO₂. Después de la incubación, las rebanadas se mantuvieron con un flujo continuo de solución KREBS normal dentro de la cámara de registro montada sobre la platina de un microscopio vertical de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Melvilla, NY, EUA). La excitación del fluoróforo se realizó a 488 nm, con el microscopio conectado mediante una fibra óptica con un monocromador Polychrome V (TiLL Photonics).

La fluorescencia emitida fue seleccionada a 510 nm al pasar por una serie de filtros de emisión Nikon B-2E/C. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD IMAGO-QE.

El campo de registro fue de 688x520 pixeles. Se grabaron películas cortas (180s, 30 ms de exposición 250-500 ms/imagen) con intervalos de 5-20 minutos durante una hora. Al final de los registros se adicionó al baño una solución KREBS normal con 50 mM de KCl. Esta solución despolariza todas las células y provoca el influjo de calcio el cual se detecta con el indicador de calcio y permite determinar el número total de neuronas viables al final de cada uno de los experimentos.

Para inhibir la participación de las neuronas colinérgicas, se emplearon antagonistas muscarínicos y nicotínicos: pirenzepina y mecamilamina.

4. Análisis

El procesamiento de las secuencias de imágenes se llevó a cabo con los programas Image J (versión 1.36, National Institutes of Health), fSIENN (IFC, UNAM), NNDynA (IFC, UNAM, plataforma en MATLAB) y MATLAB (The Math-Works, Inc., Natick, MA). Con el programa fSIENN se seleccionaron las neuronas activas y la media de fluorescencia se calculó en función del tiempo. Se obtuvieron las coordenadas de las neuronas activas y se ordenaron de izquierda a derecha de arriba hacia abajo. Las señales de fluorescencia dependientes de calcio fueron computadas como $(F_i - F_o)/F_o$, donde F_i es la intensidad de fluorescencia en cualquier cuadro (frame) de la película y F_o es la fluorescencia basal

(fluorescencia promedio de los 4 primeros cuadros de la película). Los potenciales de acción corresponden al crecimiento de la fluorescencia por lo que se seleccionó la parte positiva de la derivada de los transitorios de calcio, después se obtuvo una matriz binaria, donde el eje y representa el número de neuronas activas y el eje x representa el tiempo (se convirtió el número de frames de imagen en una película a segundos). En esta matriz el número 1 representa una neurona activa y 0 representa una neurona inactiva. Cada columna de actividad representa un vector, es decir, cada vector columna está compuesto de varias neuronas disparando juntas en un mismo frame. Los registros fueron inspeccionados manualmente para eliminar artefactos. (Jáidar *et al.*, 2010; Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

La definición de estados de red se llevó a cabo con el programa NeuralNetwork (versión 5.6, IFC, UNAM, plataforma en MATLAB). Primero se obtuvo un vector $1 \times F$, donde F es el número de frames, con la suma de todas las neuronas coactivas de la matriz experimental, después se determinó un valor umbral de significancia. El valor umbral está determinado por la simulación de Monte Carlo en la cual se hacen 1000 permutaciones de los datos de la matriz, con la hipótesis nula de que la actividad sincronizada de las neuronas es azarosa, de esta forma con este umbral se puede discernir la sincronización azarosa de la funcional, este umbral tuvo una significancia de $P < 0.05$ (Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

Los grupos de neuronas cuya actividad sincronizada en el mismo frame sobrepasó el umbral de significancia, fueron definidos como picos de sincronización. Cada pico de sincronización es entonces un vector columna neuronal $N \times 1$, donde N son las neuronas activas. Se extrajo una matriz de picos $A \times P$, donde A es el

número de neuronas activas en los picos y P es el número de picos. Para determinar si dos picos de sincronización eran similares, es decir, si hubo la participación de las mismas neuronas, se utilizó el índice de similitud de Jaccard para ello se computó el producto punto de todos los posibles pares de vectores, que es equivalente al coseno del ángulo entre vectores. Después se graficó los índices de similitud como una matriz en pseudocolor en la cual los estados funcionales aparecen como bloques (clusters) de colores (Carrillo-Reid *et al.*, 2008, Jáidar *et al.*, 2010). Después se usaron estos valores en un análisis de cluster para identificar los diferentes grupos de neuronas en los picos de sincronización (Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar el número de picos de sincronización entre las muestras se tomó como nivel de significancia una de $P < 0.05$.

Se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para comparar la coactividad acumulada entre el microcircuito con y sin antagonista colinérgico. Se tomó como nivel de significancia una de $P < 0.05$.

Para distinguir la diferencia entre el puntaje de los MIAs a lo largo del tratamiento fue empleada la prueba ANOVA de dos vías y se tomó como nivel de significancia una de $P < 0.05$.

VII. RESULTADOS

1. Evaluación de los MIAs

Se evaluó la evolución temporal de los MIAs en las ratas hemi-parkinsónicas, durante 10 días de tratamiento con L-DOPA. Se registró la actividad neuronal de las ratas que presentaron los cuatro MIAs al final del tratamiento. Sólo se seleccionaron para la siguiente fase, los individuos que obtuvieron el puntaje más alto (4) para cada uno de los movimientos anormales.

En la figura 6 se ilustra como aumentó el porcentaje de los MIAs para cada día de tratamiento (n=18, $P < 0.0001$ para efecto del tiempo y del tratamiento). En el día 4 del tratamiento hubo disminución del puntaje, es posible que se deba al ajuste de dosis de la L-DOPA, sin embargo para el día 5 y 6 se puede ver el efecto de la L-DOPA pues ya hay aumento significativo del puntaje de cada MIA en comparación con el inicio de tratamiento.

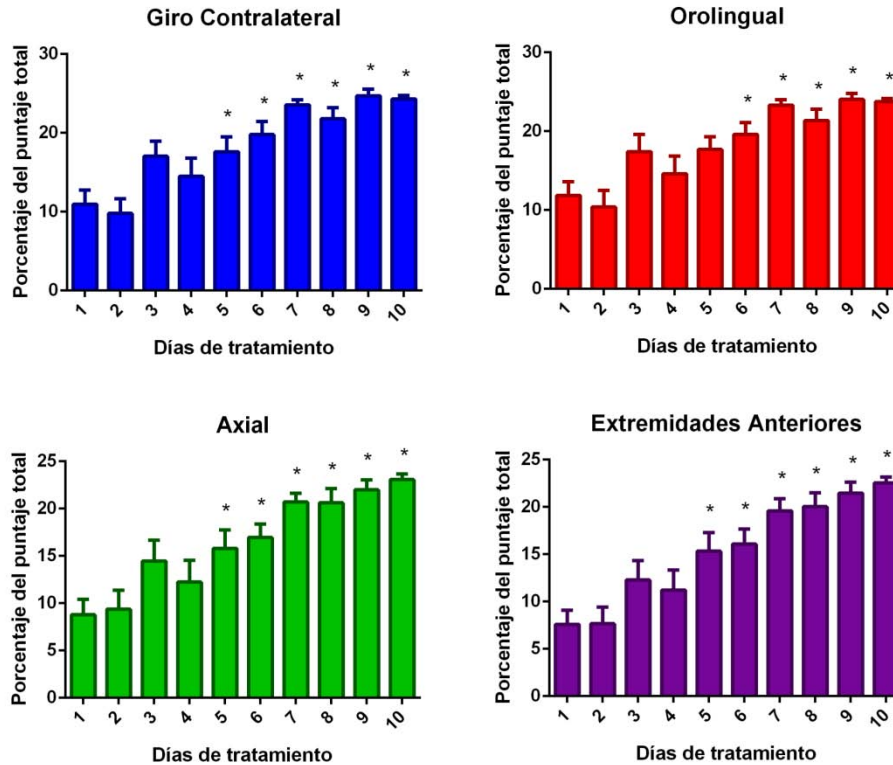


Figura 6. Porcentaje de cada MIA en las ratas a lo largo del tratamiento con L-DOPA. Los datos están normalizados con el puntaje más alto de cada individuo en un período de dos horas durante el pico de dosis (n=18).

En todos los grupos evaluados hubo aumento en el puntaje de los MIAs a lo largo del tiempo, que es significativo a partir del quinto día de tratamiento. Todos los MIAs tuvieron el mismo comportamiento a lo largo del tiempo, lo cual indica un desarrollo uniforme de la discinesia (Figura 7; n=18 $P < 0.0001$ para efecto del tiempo y del tratamiento).

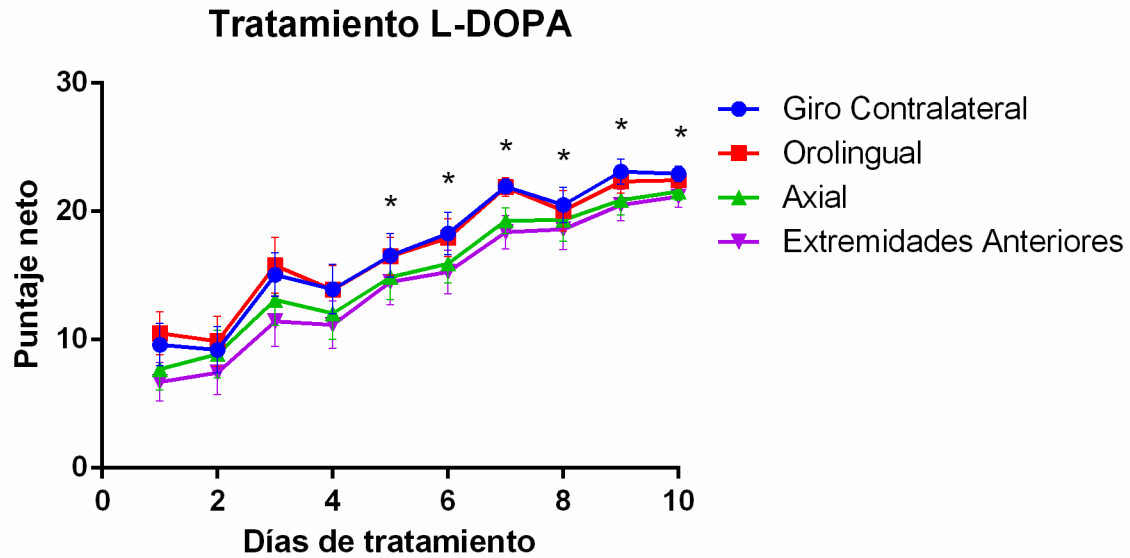


Figura 7. Evolución temporal del puntaje neto de los MIAs (n=18). Se observa que no hay diferencia en el comportamiento de cada MIA, pero sí se observa que hay aumento significativo en comparación con el inicio del tratamiento.

2. Registros de actividad neuronal

2.1 Control

Se realizaron registros de rebanadas estriales de animales control de 33-36 días de edad y se obtuvieron gráficas tipo ráster de las neuronas activas en el microcircuito estriatal normal, el cual se usó como control. Un ráster consta de una matriz de celdas organizadas en filas y columnas en la que cada celda contiene un valor que representa información (ArcMap, 2015), en este caso si hay un disparo de potencial de acción se representa con un punto negro.

Debido a que el tejido estriatal normal muestra poca actividad espontánea y ausencia de picos de sincronización (Fig. 8), no se puede apreciar si hay un cambio al añadir mecamilamina o pirenzepina por lo que se añadió NMDA (Fig. 9 y Fig. 14) para incrementar la actividad del circuito, y posteriormente se añadieron mecamilamina (Fig. 10, n=6) o pirenzepina (Fig.16, n=5) para observar mejor la respuesta ante estos fármacos.

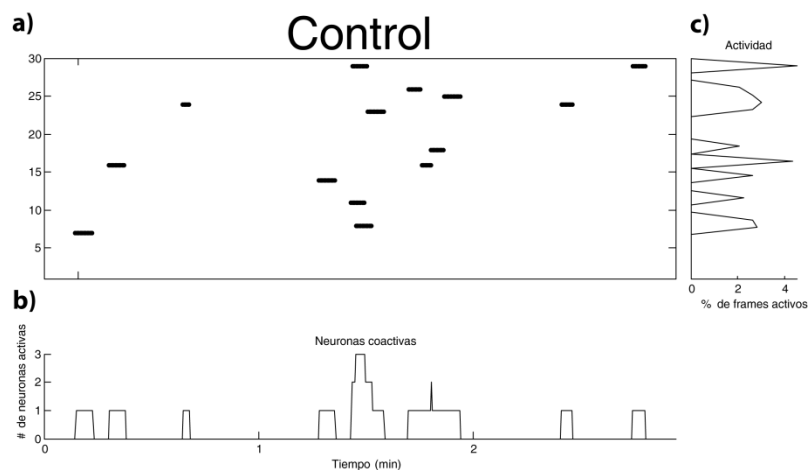


Figura 8. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho control. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). Cada fila representa una neurona, en el extremo izquierdo de la gráfica se indica el número de neuronas que participan en el experimento. b) Suma de la actividad neuronal, muestra el número de neuronas coactivas a lo largo del tiempo, es decir, el número de neuronas que disparan juntas en una época (3 min). c) Histograma de actividad, representa la suma de la actividad de neuronas individuales a través del tiempo, algunas neuronas son más activas que otras.

Al añadir NMDA al tejido estriatal las neuronas aumentaron su actividad. En la gráfica tipo ráster se pueden observar puntos negros que denotan el disparo de potenciales de acción; los puntos coloreados (Fig. 9a) representan a las neuronas que disparan juntas y que pertenecen a un grupo o estado de red (Fig. 9a izquierda), cada color simboliza un estado por lo que colores diferentes representan diferentes estados (Plata *et al.*, 2013).

En la figura 9a el histograma de neuronas coactivas representa la suma de la actividad neuronal columna por columna a través del tiempo, muestra cómo la activación espontánea de las neuronas que disparan de manera sincronizada ocurre a lo largo del tiempo. La línea negra punteada representa el nivel de significancia estadística para los picos de sincronización, los picos de sincronización se refieren al número de neuronas que disparan al mismo tiempo, el nivel de significancia fue obtenida con la simulación Monte Carlo. De esta forma, los picos de sincronización neuronal que cruzan este nivel se colorean para indicar qué grupo de neuronas sincronizan espontáneamente su disparo de manera significativa. También se puede observar cuáles grupos de neuronas alternan su actividad con otros grupos de neuronas como indican los colores, grupo es un estado de red. Se puede observar como el grupo rojo da paso al grupo azul y al grupo rojo nuevamente, finalizando con el grupo verde, esta alternancia es una propiedad característica de los ensamblajes neuronales que participan en la dinámica del microcircuito (Carrillo-Reid *et al.*, 2008, 2009b; Pérez-Ortega *et al.*, 2016; Plata *et al.*, 2013; Jáidar *et al.*, 2010).

La Matriz de índice de similitud de Jaccard (Fig. 9b) es una gráfica donde se compara cada vector (columna) con los otros a través del tiempo, una apariencia de parches de colores de azul claro a rojo representa que hay picos de sincronización similares que están a cargo de la actividad de la red (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Con los valores del índice de similitud se agruparon los picos de sincronización similares, los diferentes grupos que se forman indican los estados de la red en el circuito.

Como ya se mencionó anteriormente los estados muestran alternancia entre ellos; el paso de un estado al otro se llama transición. Las transiciones entre estados de red siguen determinadas secuencias o trayectorias; es decir, pasan de un estado a otro. En la figura 9a se observa cómo el estado rojo pasa al azul, de nuevo al rojo y por último al verde, estas trayectorias están indicadas con flechas y con el porcentaje de probabilidad de que ocurran (Fig. 9c) (Plata *et al.*, 2013).

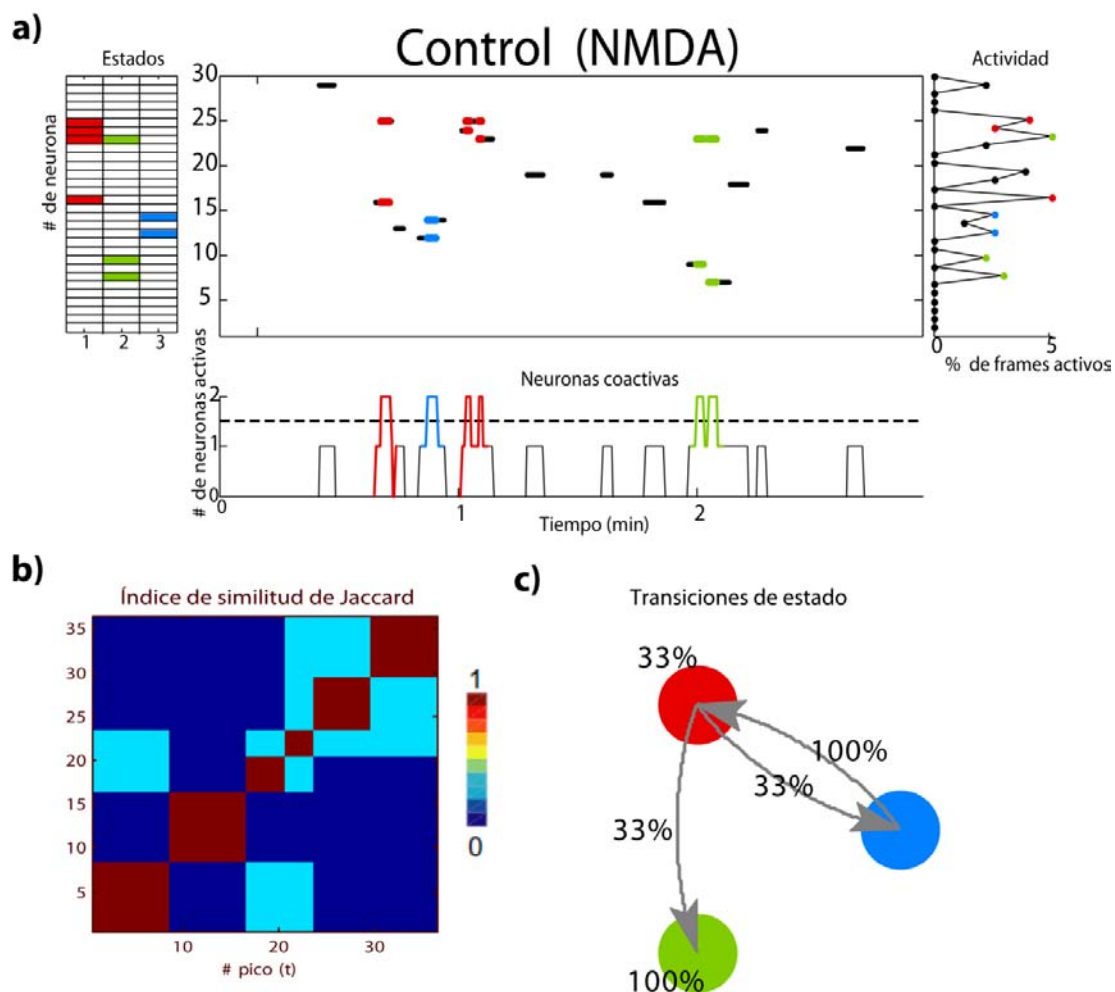


Figura 9. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho control después de añadir NMDA (10 μ M). a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. c) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

Para saber cómo el comportamiento del microcircuito cuando se bloquean los receptores nicotínicos se añadió mecamilamina al baño. En un estudio anterior (Plata *et al.*, 2013) se observó que la nicotina reducía drásticamente el nivel de actividad neuronal y sus efectos eran reversibles al añadir mecamilamina. La mecamilamina es un antagonista colinérgico de los receptores nicotínicos, por lo que se esperaba que aumentara la actividad del microcircuito, no obstante al añadirla al baño (Fig. 10a) se observó reducción del número de grupos de neuronas sincronizados en comparación con el tejido sólo tratado con NMDA. Sin embargo, al cuantificar los picos de sincronización (Fig. 12) se puede apreciar que hay una tendencia a la disminución de picos de sincronización al agregar la mecamilamina pero no hay diferencia significativa con respecto a la situación con NMDA únicamente.

Se realizó la suma (Fig. 13) de la actividad de las neuronas que dispararon al mismo tiempo, también llamadas neuronas coactivas, para comparar los cambios en la coactividad total de las neuronas a través del tiempo. La gráfica muestra que al igual que en la figura 12 hay tendencia a la disminución de la actividad cuando se añade la mecamilamina; sin embargo, contrario a lo esperado, el antagonista nicotínico no tiene un efecto significativo sobre el microcircuito estriatal normal, lo cual indica que la interneurona colinérgica no está regulando la dinámica del microcircuito estriatal normal a través de sus receptores nicotínicos.

Cuando la mecamilamina y el NMDA son retirados del baño, se observa una tendencia de recuperación del microcircuito a su estado previo (Fig. 11a).

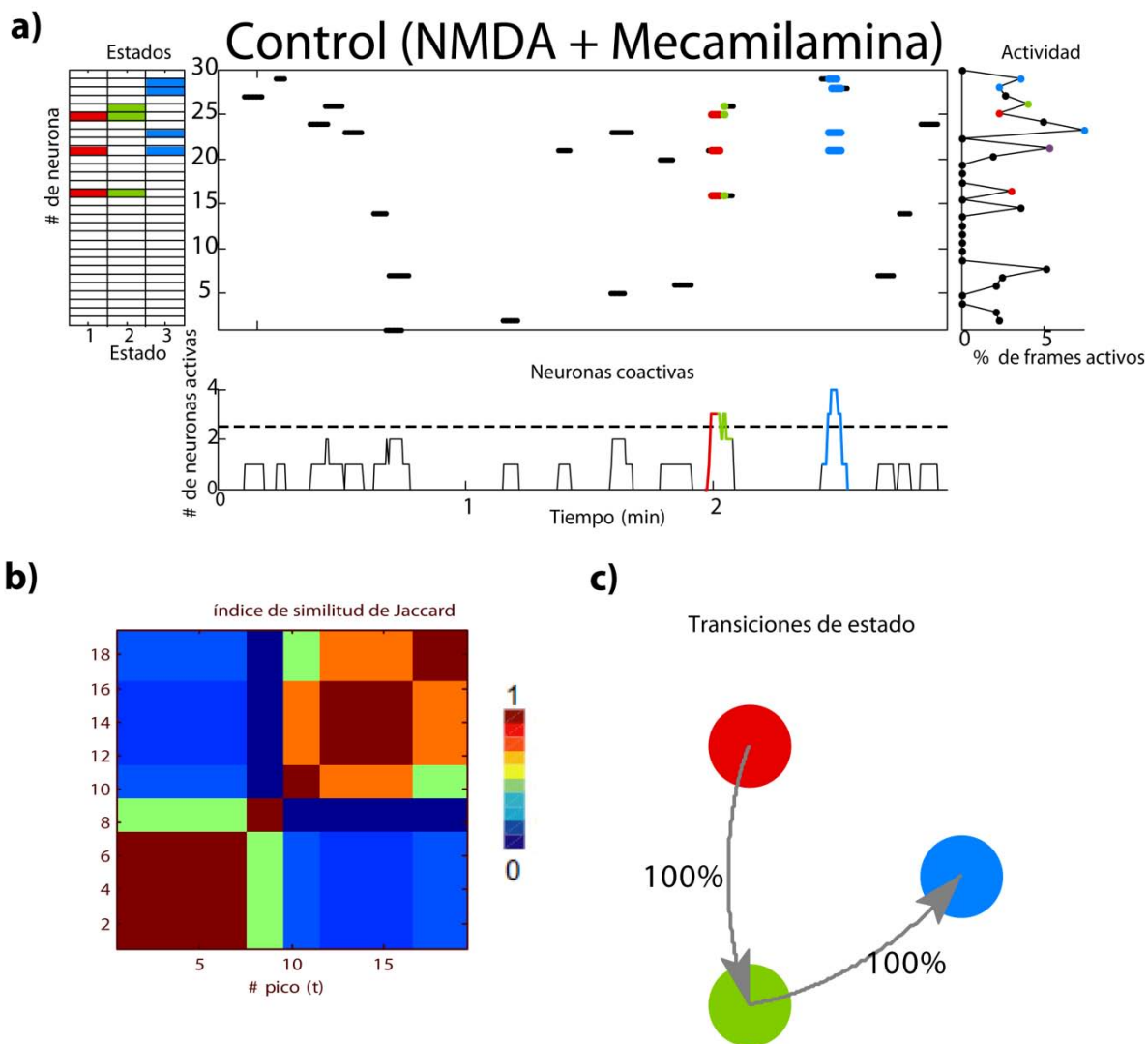
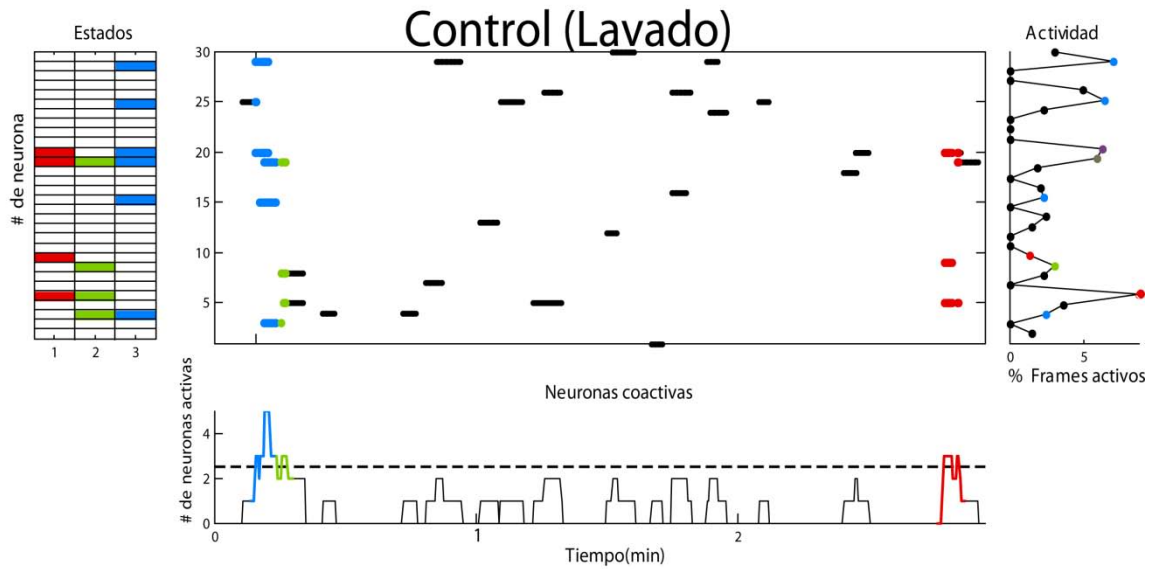
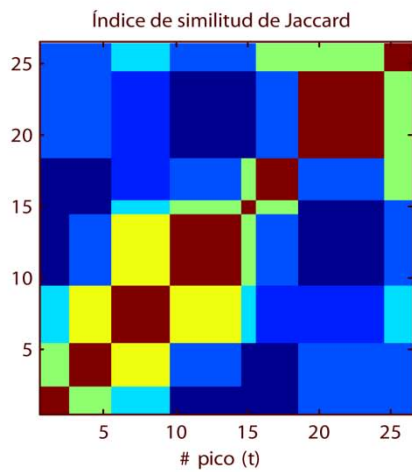


Figura 10. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho control con NMDA y al añadir mecamilamina (10 μ M). a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). Se observan menos picos de sincronización que en la figura 9a b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo, nótese el cambio de la matriz sólo con NMDA a la matriz con NMDA y mecamilamina, hay más parches de colores que indican mayor correlación entre los vectores. c) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas. Debido a que no hay muchos picos de sincronización la probabilidad de que pase de un estado a otro es mayor.

a)



b)



c)

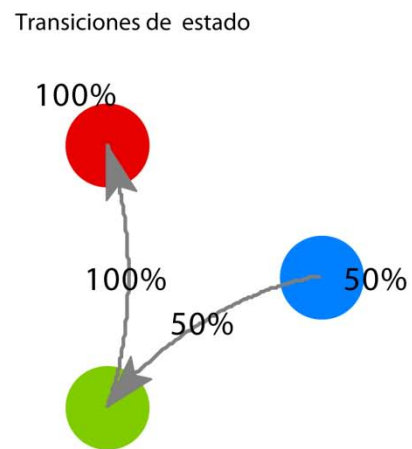


Figura 11. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho control después del lavado. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min) b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. c) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

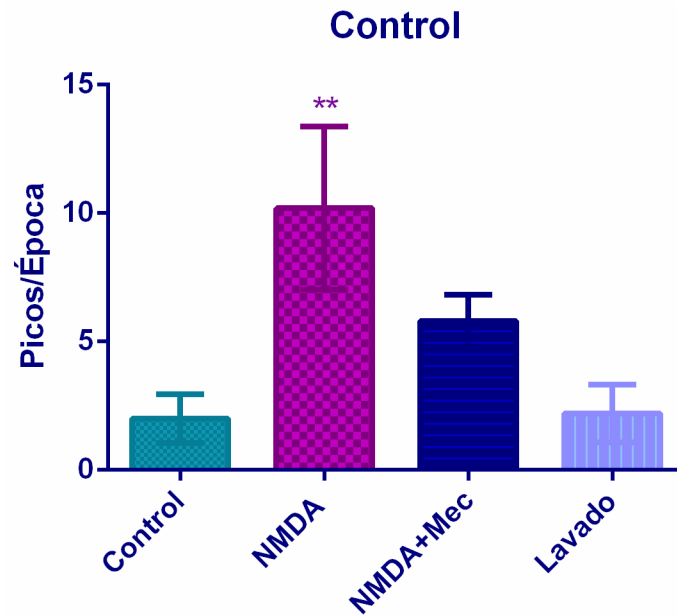


Figura 12. Histograma que muestra como el número de picos de sincronización por época (3 min) ascendió en la presencia de NMDA (** $P < 0.05$) y como tuvo tendencia a disminuir, aunque descendió no alcanzó significancia en presencia de la mecamilamina ($n=6$).

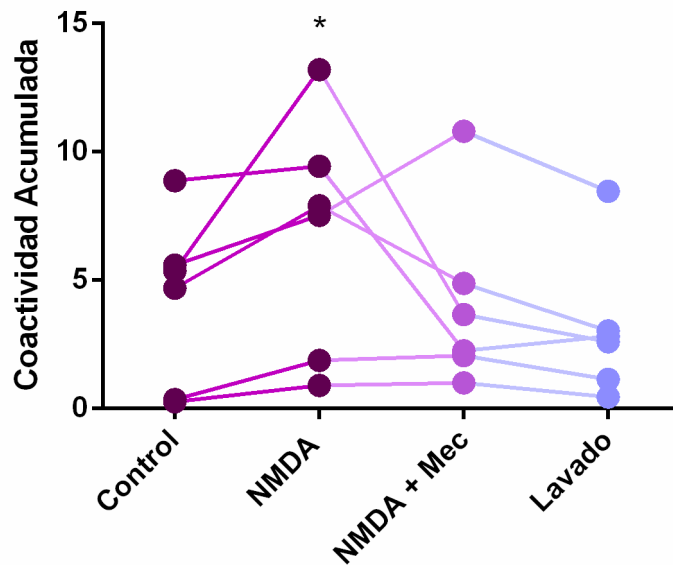


Figura 13. Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas. Las muestras son pareadas para cada experimento. Se observa como el número de neuronas coactivas aumentan cuando se añade NMDA pero no hay diferencia cuando se añade mecamilamina (* $P < 0.05$).

Para el siguiente grupo de experimentos se utilizó la pirenzepina la cual es un antagonista colinérgico de los receptores muscarínicos M1, estos receptores están presentes en las NEMs y a través de ellos la interneurona colinérgica aumenta la excitabilidad de estas neuronas y favorece su disparo (Goldberg *et al.*, 2012) por lo que al bloquearlo se esperaba disminución de la actividad del microcircuito. En efecto, al añadirse pirenzepina (Fig. 15a) se observa reducción del número de neuronas sincronizadas en comparación con el microcircuito sólo con NMDA (Fig. 14a).

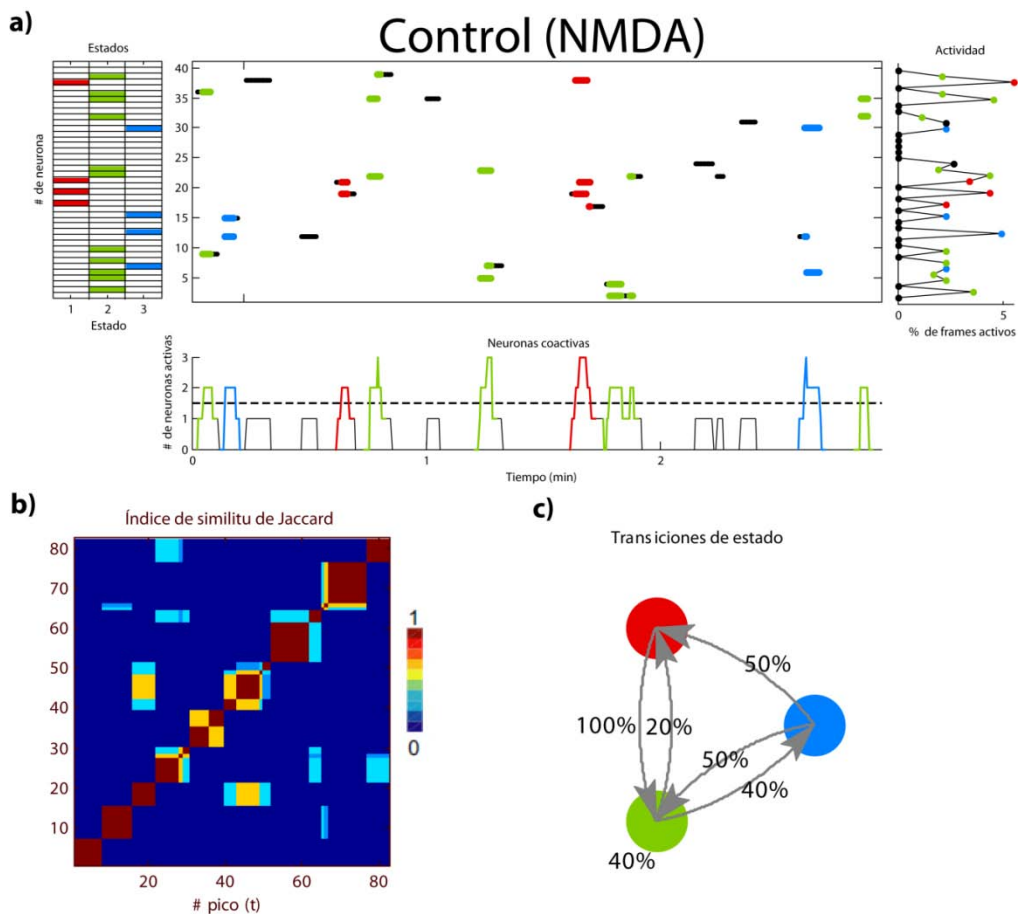


Figura 14. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho control después de añadir NMDA ($10\mu\text{M}$). a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min) b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. c) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas. Hay una gran alternancia en los estados de la red.

Al comparar el número de picos de sincronización (Fig. 17) observa que hay tendencia a la disminución de picos de sincronización; no obstante, al igual que ocurre con la mecamilamina, la diferencia no alcanza a ser significativa con respecto a las condición de exposición únicamente a NMDA (Fig. 17). De la misma forma, la coactivación acumulada de las neuronas (Fig. 18) muestra que no hay diferencias antes y después de añadirse el fármaco, lo cual indica que la inhibición del receptor M1 en las NEMs no tiene un efecto sobre la dinámica del microcircuito estriatal normal.

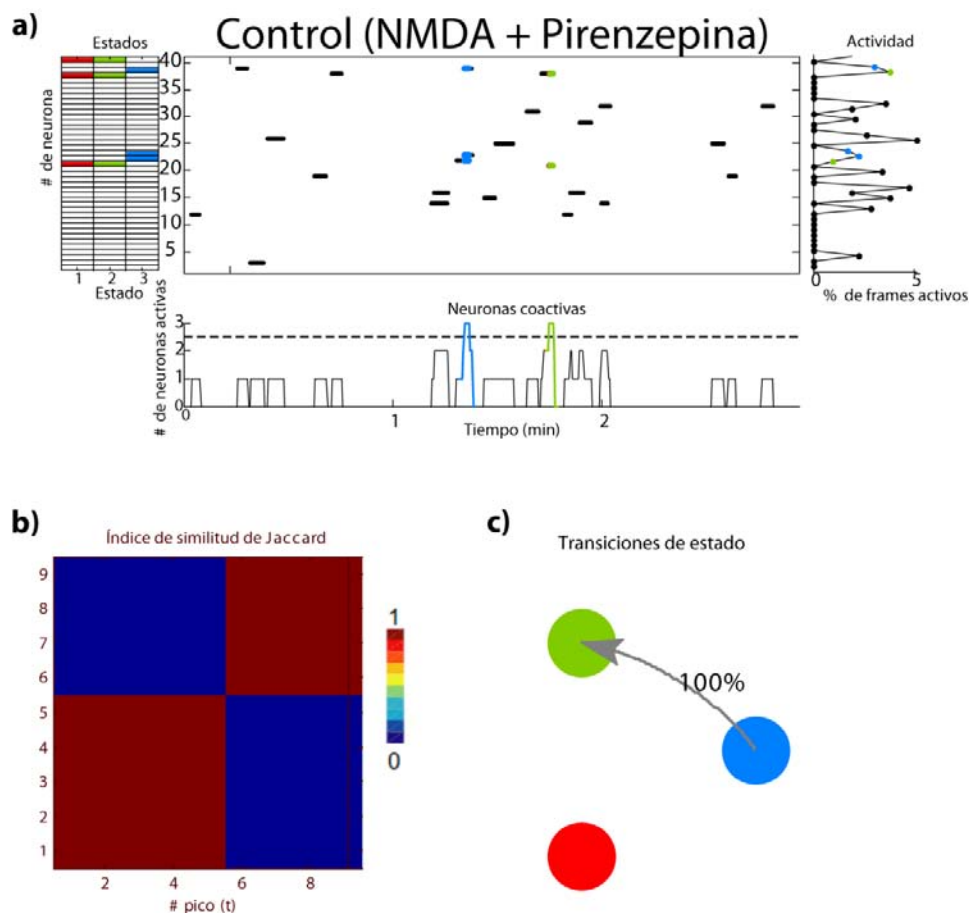


Figura 15. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho control con NMDA y al añadir pirenzepina ($1\mu\text{M}$). a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). Hay menos actividad neuronal y menos grupos de neuronas disparando juntas. b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. Nótese el cambio de la distribución de los parches de colores en comparación con el NMDA solo c) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

Cuando se retiró la pirenzepina del baño los eventos de sincronización espontánea se presentaron de nuevo hasta que se terminó el efecto del NMDA (Fig. 16a).

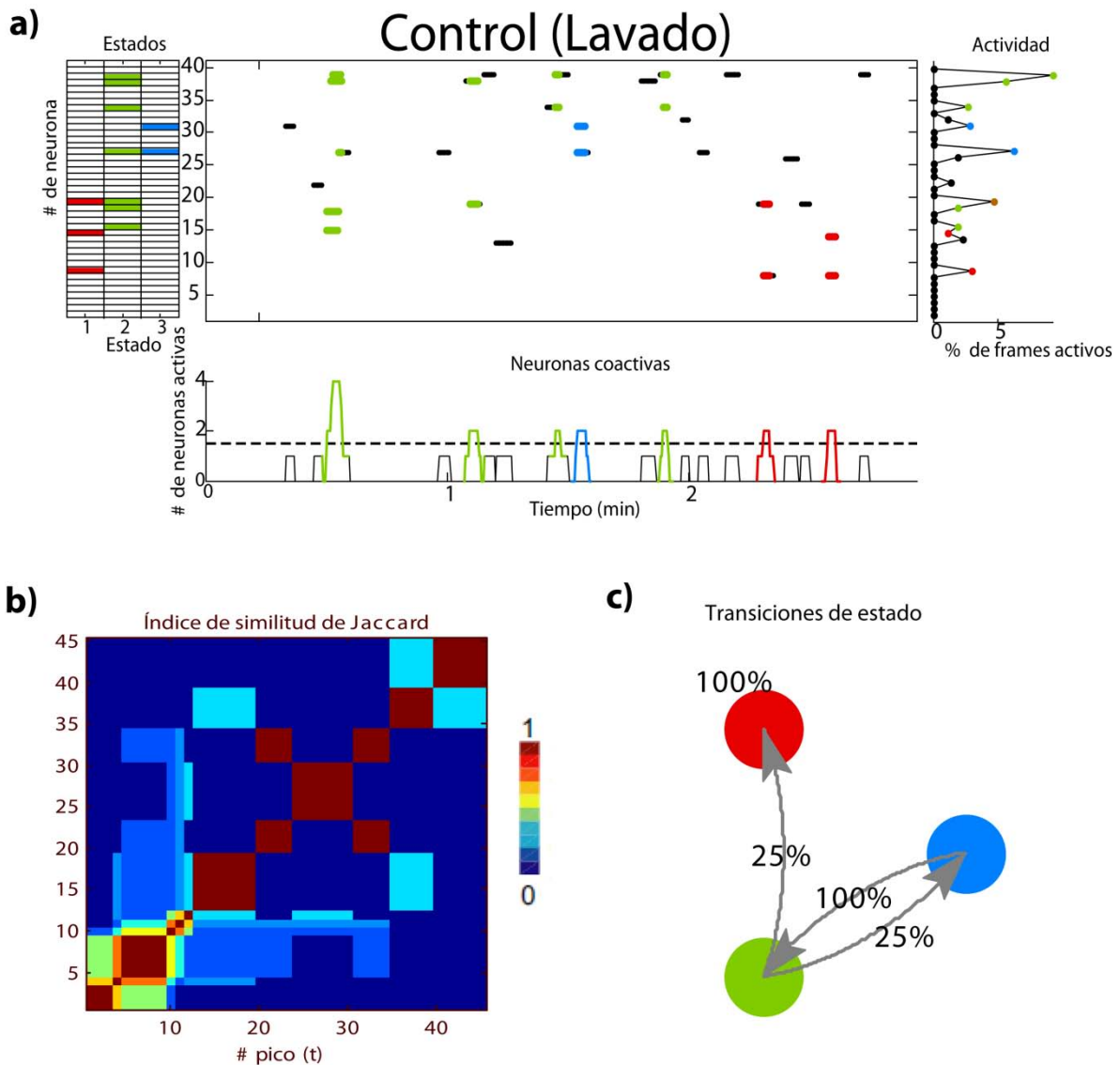


Figura 16. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho control después del lavado de los fármacos (NMDA y pirenzepina). a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). Los eventos de sincronización se vuelven presentes otra vez. b) Matriz de índice de similitud que incluye todas las células activas y que compara cada vector con los otros a través del tiempo. c) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

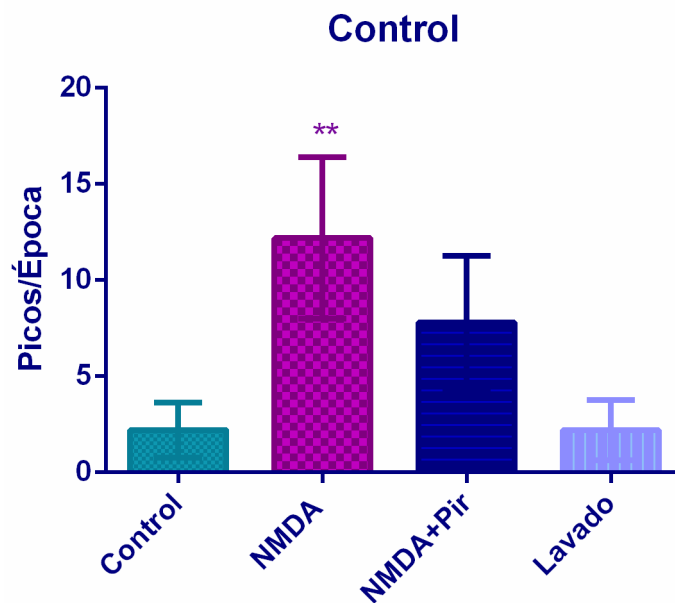


Figura 17. Histograma que muestra cómo el número de picos de sincronización por época (3 min) aumentó en la presencia de NMDA (**P < 0.05) y cómo tuvo tendencia a disminuir aunque no alcanzó significancia estadística cuando fue añadida la pirenzepina (n=5).

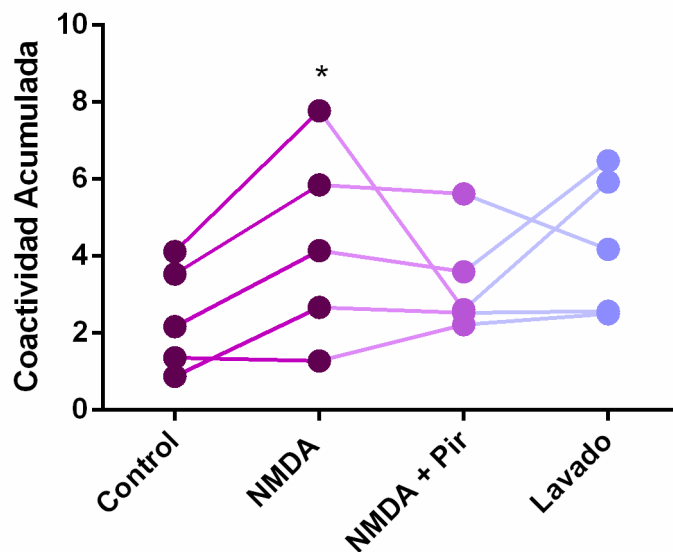


Figura 18. Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas. Hay aumento (*P < 0.05) en la actividad cuando se añade NMDA y aunque se observa disminución en la actividad cuando se añade pirenzepina, no es significativa.

2.2 Hemi-Parkinson

Se obtuvo una serie de ratas hemi-parkinsónicas mediante la lesión unilateral de 6-OHDA. El grado de la lesión se verificó con la prueba de giro contralateral después de inyectar apomorfina por vía intraperitoneal (1 ml/kg), ocho días después de la lesión. Los animales que presentaron más de 90 giros en 30 minutos fueron seleccionados para los procedimientos adicionales. Se realizaron registros de la actividad neuronal en el microcircuito estriatal hemi-parkinsónico con imagenología de calcio, para confirmar la respuesta a la mecamilamina (10 μ M) (Fig. 20, n=6) y pirenzepina (1 μ M) (Fig. 25, n=6).

En contraste con el tejido control (Fig. 8) cuya actividad espontánea es baja, en el tejido donde se eliminó la DA aumentó el número de neuronas que disparaban espontáneamente (Fig. 19a y 24a), así como también aumentó el número de picos de sincronización (Fig. 29). En la figura 19c se muestra el porcentaje de incidencia de los estados de red, se observa que hay un estado que se presenta más que los otros dos, se le llama estado dominante pues no permite la alternancia a otros estados de red, por ello contiene a la mayoría de los picos de sincronización y está presente de manera recurrente en el microcircuito estriatal parkinsoniano. Esta condición ya se había reportado anteriormente (Jáidar *et al.*, 2010).

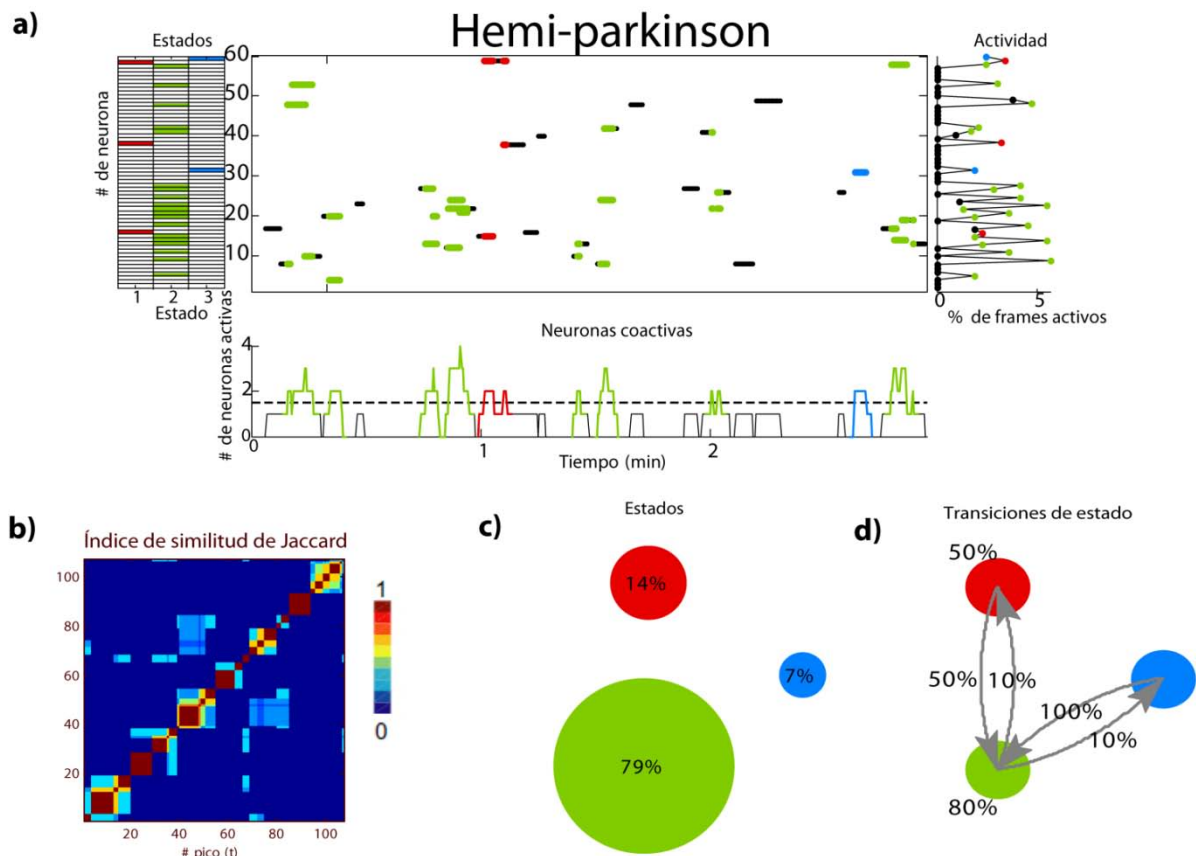


Figura 19. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho hemi-parkinsoniano. a) Se muestra el disparo de cada neurona durante 3 min. Se observa que hay mayor número de puntos coloreados en comparación con el control, esto implica mayor número de eventos de sincronización espontánea. b) Matriz de índice de similitud de todos los vectores representando estados de red como función del tiempo. La apariencia de parches de colores indica que hay picos de sincronización similares a cargo de la actividad. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. d) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas. Se nota que hay una mayor afluencia hacia el estado dominante (verde).

Los receptores nicotínicos se bloquearon añadiendo al baño 10 μ M de mecamilamina (Fig. 20a) y se observó aumento en la actividad y en el número de picos de sincronización con respecto a la rebanada estriatal de rata hemiparkinsoniana (Fig. 22). El aumento en la coactividad (Fig. 23) no fue significativo para la prueba de Wilcoxon de muestras pareadas, esto puede ser debido a que el número de experimentos no fue el suficiente. El estado dominante de la red se mantiene antes y después de añadir el fármaco (Fig. 19c y 20c), este estado de sincronización reverberante dificulta la transición a un estado funcional.

El aumento en los picos de sincronización concuerda con lo observado anteriormente (Plata et al., 2013) donde la nicotina disminuye la actividad global del microcircuito estriatal. En este caso el antagonista nicotínico aumenta la actividad del microcircuito, así como los eventos de sincronización espontánea. Esto puede deberse a que los receptores nicotínicos aumentan el disparo en las interneuronas GABAérgicas PV+, y éstas a su vez inhiben a las NEMs (Luo et al., 2013), al inhibirse los receptores nicotínicos no hay activación de las PV+ y no hay una inhibición de las NEMs por lo que la actividad de estas neuronas aumenta.

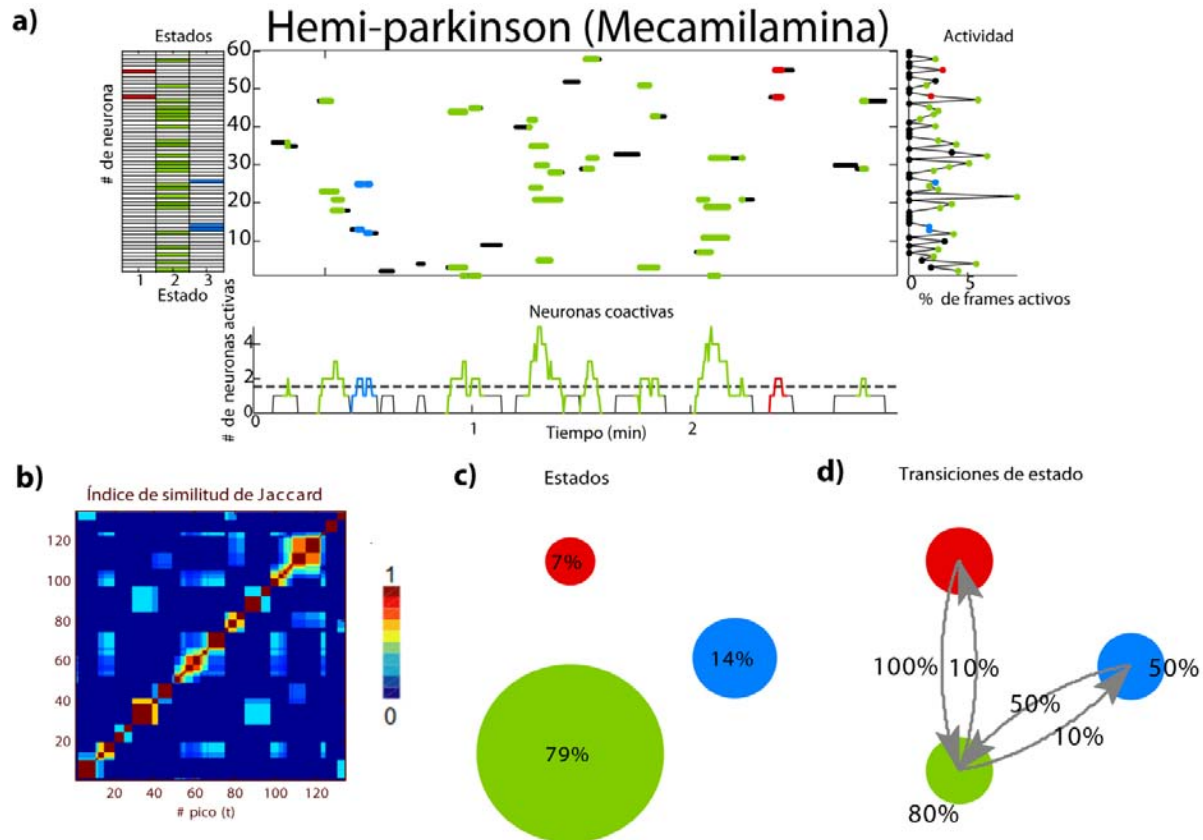


Figura 20. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho hemi-parkinsonica, se añadió 10µM de mecamilamina. a) Gráfica tipo ráster que muestra una época (3 min) de actividad en el microcircuito estriatal hemi-parkinsonico con mecamilamina. Se ve aumento en el número de neuronas sincronizadas. b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. Hay mayor número de vectores similares que en el microcircuito hemi-parkinsonico solo. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. Nótese que hay un estado con mayor porcentaje que los demás (verde). d) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

Cuando se retira la mecamilamina del baño, el tejido recupera la actividad típica del estriado sin DA (Fig. 21a).

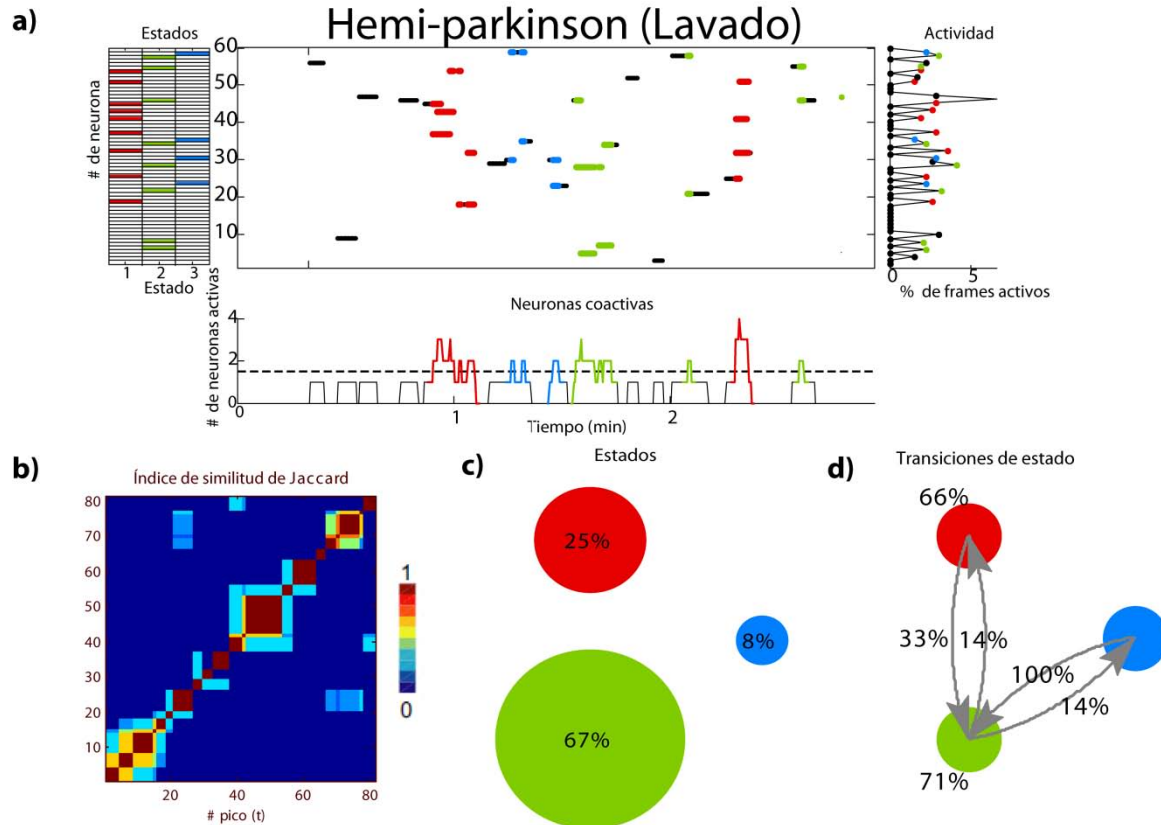


Figura 21. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho hemi-parkinsoniano durante el lavado del fármaco ($10\mu\text{M}$ de mecamilamina), 10 min después de la mecamilamina. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. d) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

Hemi-Parkinson

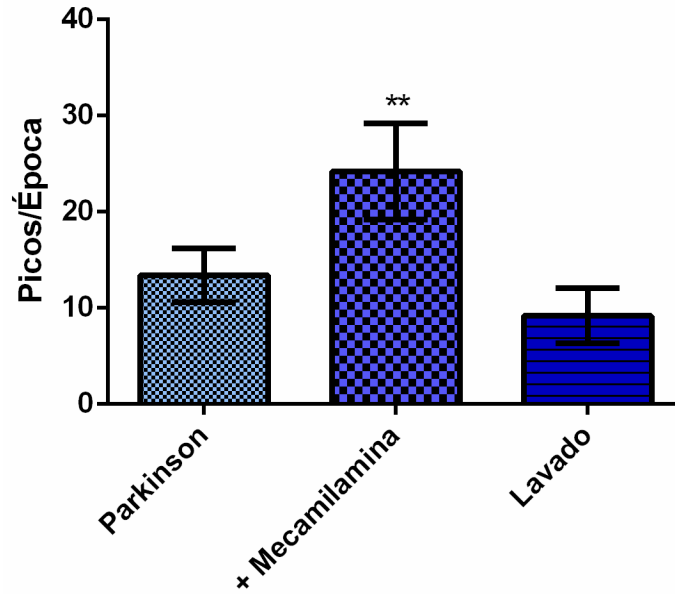


Figura 22. Histograma que muestra cómo el número de picos de sincronización por época (3 min) ya de por sí elevado en el tejido hemi-parkinsonico (**P <0.05) aumenta más y de manera reversible, cuando se añade la mecamilamina (n=6).

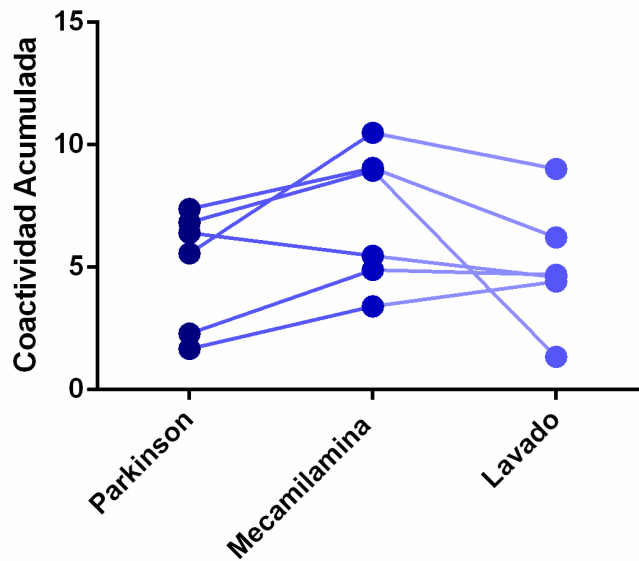


Figura 23. Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas. Se observa aumento en la actividad que corresponde con el aumento en los picos de sincronización.

Los receptores muscarínicos M1 se bloquearon en tejido privado de DA con $1\mu\text{M}$ de pirenzepina (Fig. 25a). Se esperaba que hubiera disminución en la actividad, pues como ya se mencionó, el receptor M1 aumenta la excitabilidad en las NEMs; sin embargo, al igual que al bloquear los receptores nicotínicos, hubo aumento de picos de sincronización (Fig. 27) y un aumento en la coactividad a través del tiempo (Fig. 28). Se mantiene el estado dominante de la red y la alternancia de los estados (Fig. 25c y d).

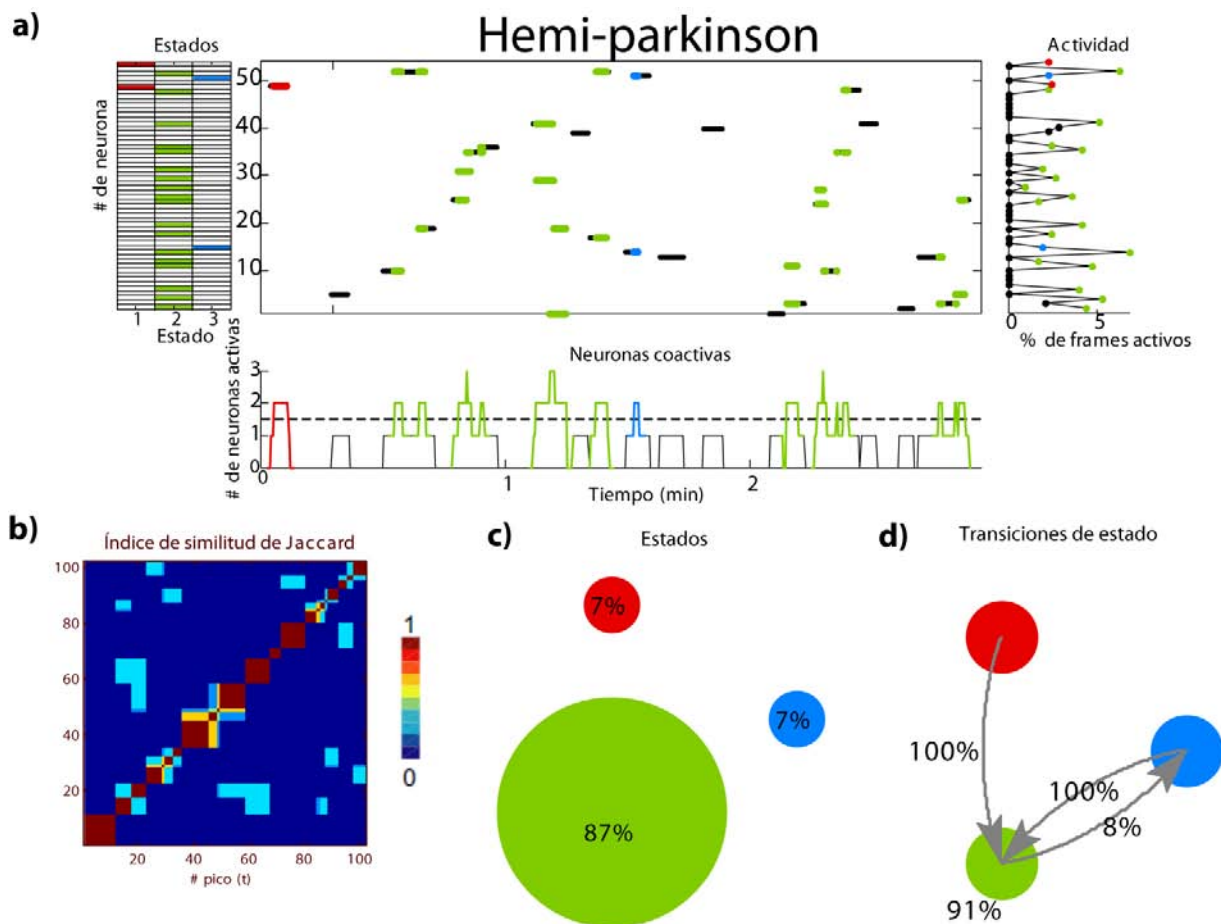


Figura 24. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho hemi-parkinsonica. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). Hay mayor número de eventos de sincronización espontánea en comparación con el control. b) El coeficiente de similitud de Jaccard de todos los vectores significativos como función del tiempo. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. Nótese que hay un estado con el mayor porcentaje que los demás (verde). d) Proporción de las transiciones de los estados. Las flechas representan las trayectorias de las transiciones. Se puede observar que la mayor parte de las transiciones se dirigen a un solo estado.

El aumento en la actividad puede deberse a un efecto indirecto sobre las NEMs a través de las interneuronas GABAérgicas LTS. Las interneuronas colinérgicas activan a las LTS a través del receptor M1 (Kreitzer, 2009) y éstas ejercen una inhibición sobre las NEMs, cuando se inhibe el receptor M1 se elimina la inhibición sobre estas neuronas y por ello aumenta su actividad.

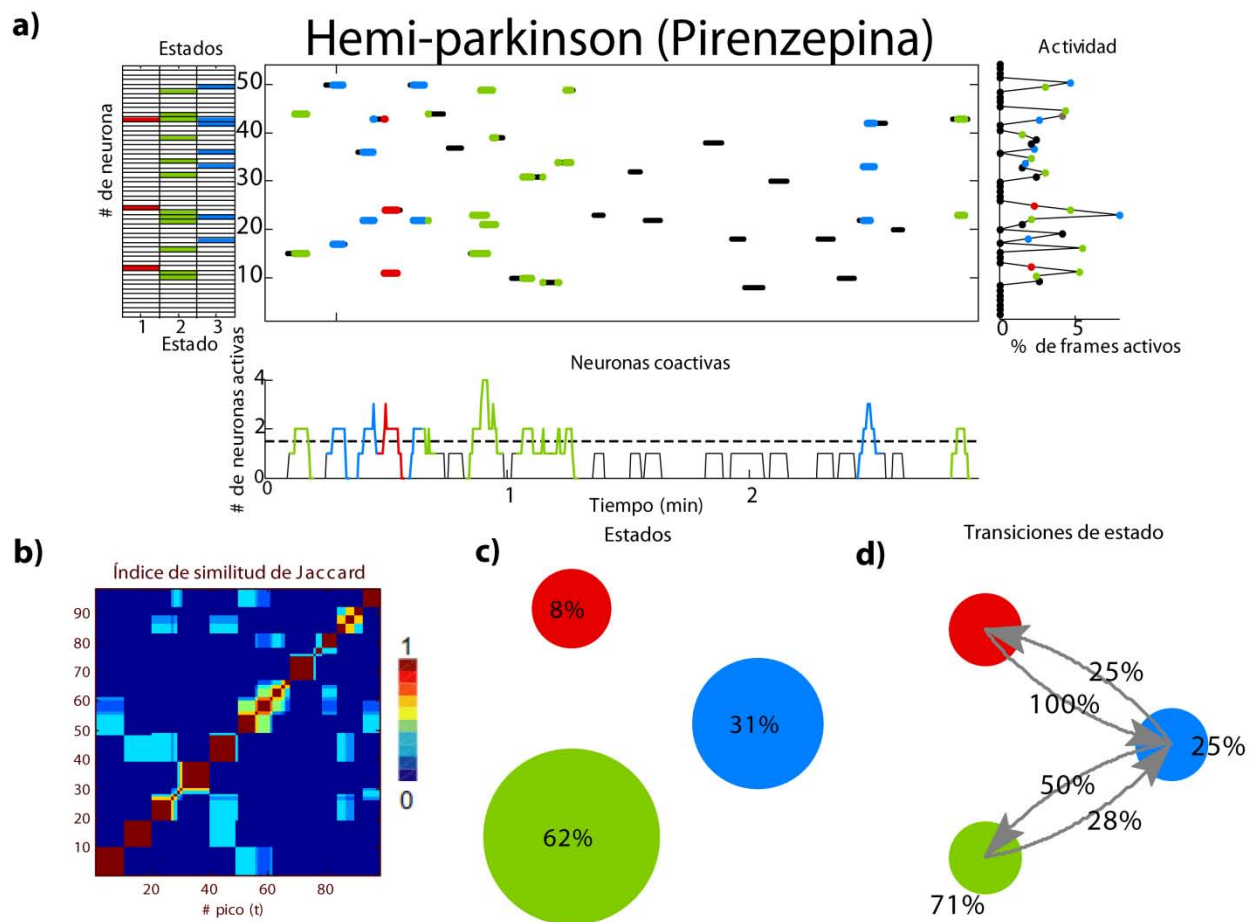


Figura 25. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho hemi-parkinsonica se añadió 1 μ M de pirenzepina. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). Hay disminución en los grupos de neuronas sincronizadas y en la actividad del microcircuito en comparación con el microcircuito hemi-parkinsonico solo, lo cual indica un cambio en la dinámica de la red. b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. c) Proporción de las transiciones de los estados, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. d) Probabilidad de la incidencia de las transiciones de los estados de la red, las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

Durante el lavado de los fármacos, el tejido recupera la actividad típica del estriado hemi-parkinsonico (Fig. 26a)

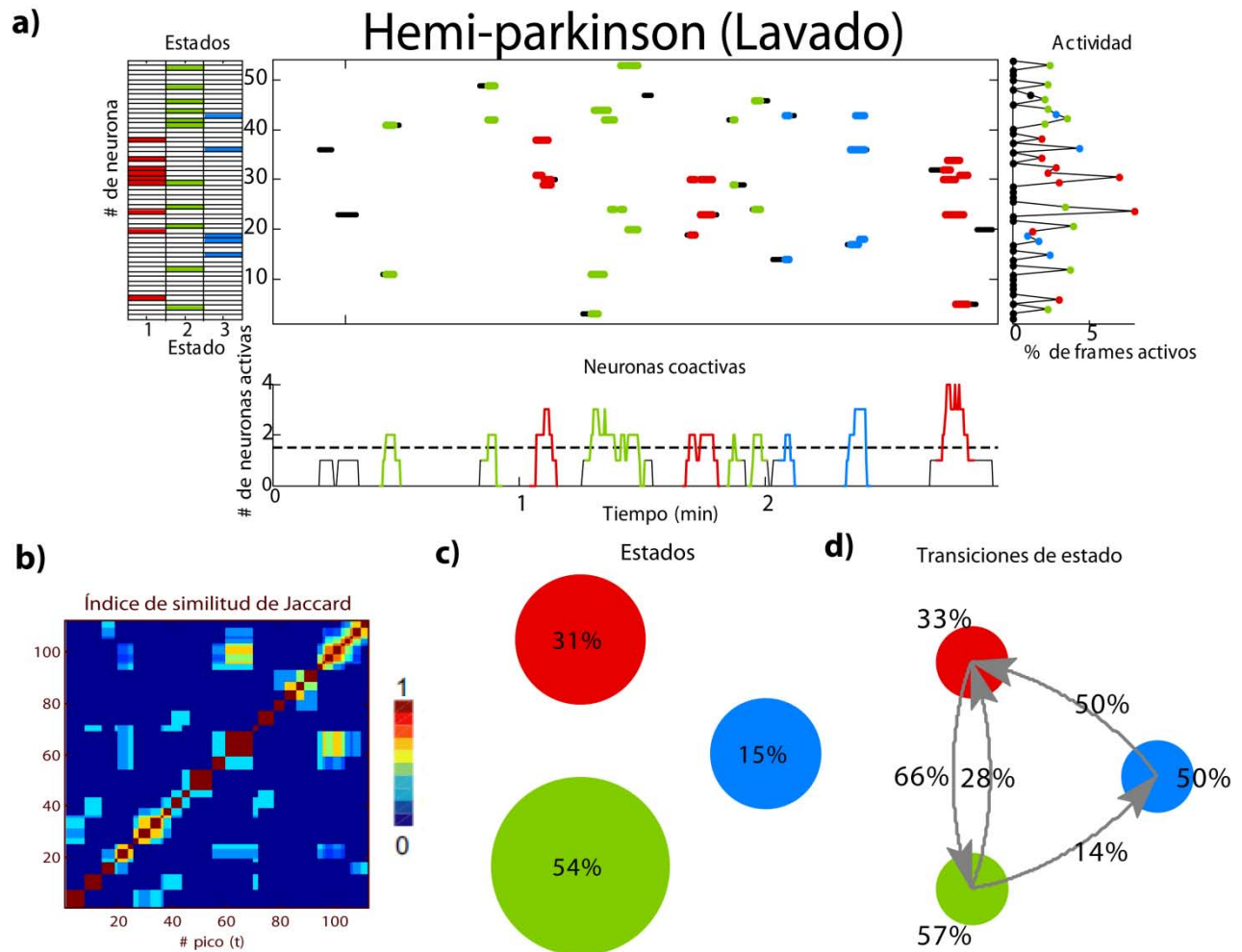


Figura 26. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho hemi-parkinsonica durante el lavado del fármaco ($1\mu\text{M}$ de pirenzepina), 10 min después de la pirenzepina. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. d) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

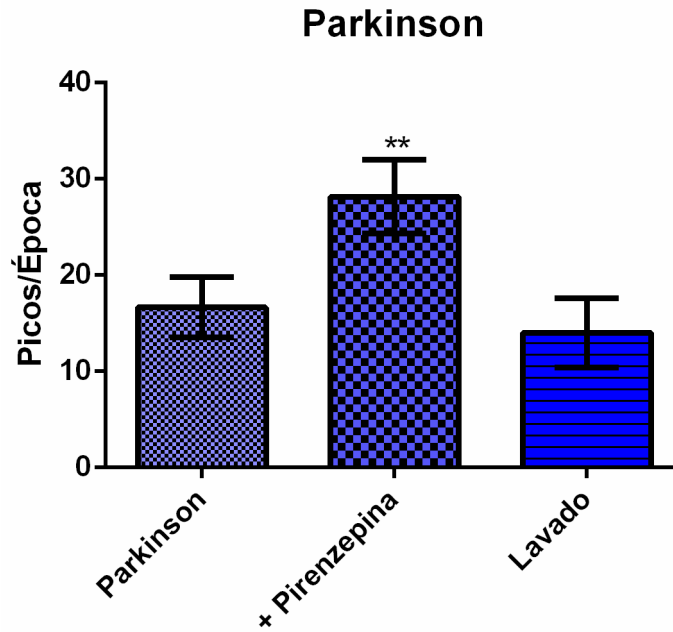


Figura 27. Histograma que muestra cómo el número de picos de sincronización por época (3 min), de por sí aumentado en tejido hemiparkinsoniano (**P < 0.05), aumentó aún más y de manera reversible cuando fue añadida la pirenzepina (n=6).

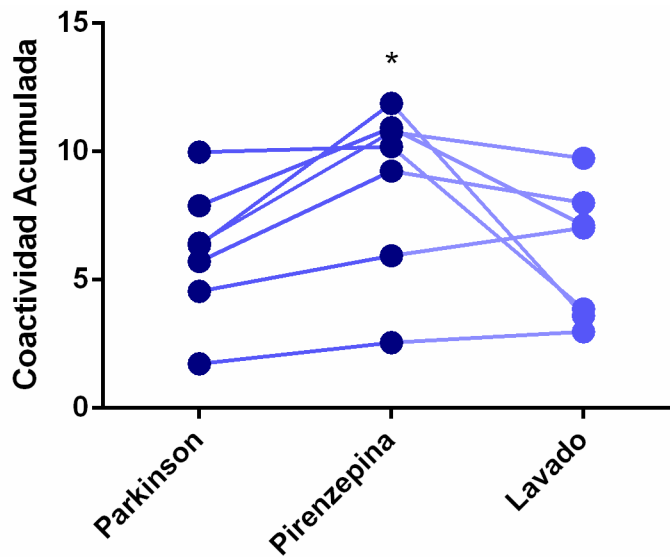


Figura 28. Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas. Se muestra aumento en la actividad de las neuronas al añadir pirenzepina (*P < 0.05). Esto corresponde con el aumento en los picos de sincronización pues hay un cambio en la dinámica del microcircuito.

2.3 Discinesias inducidas por L-DOPA

Se obtuvo una serie de animales hemi-parkinsónicos con discinesias inducidas por L-DOPA mediante la lesión con 6-OHDA y el tratamiento de L-DOPA durante 10 días. Para los experimentos de imagenología se eligieron a los animales que presentaron el puntaje más alto de MIAs. Se obtuvo el registro de la actividad neuronal en el microcircuito estriatal discinético con imagenología de calcio para confirmar la respuesta ante 10 μ M de mecamilamina (Fig. 31a, n=5) y 1 μ M de pirenzepina (Fig. 32a, n=5).

Como ya se había reportado hay una sincronía exacerbada, característica de este estado patológico (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). En comparación con el tejido control, con NMDA y parkinsónico, en el tejido parkinsónico-discinético hay mayor actividad espontánea de las neuronas (Fig. 30a y 35a), así como mayor número de picos de sincronización (Fig. 29). Esta actividad exagerada puede estar asociada con los movimientos estereotipados que están presentes en la discinesia.

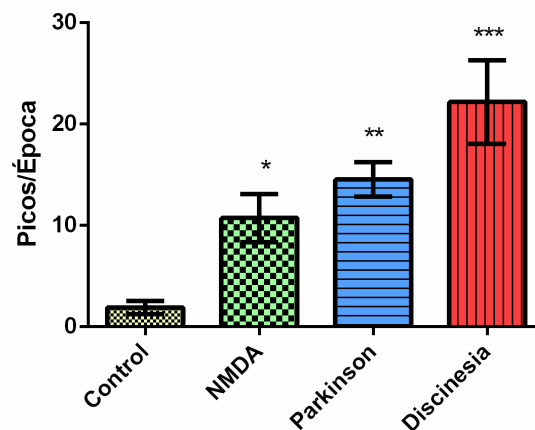


Figura 29. Histograma que muestra cómo el número de picos de sincronización por época (3 min) ascendió en cada condición ($P < 0.0001$).

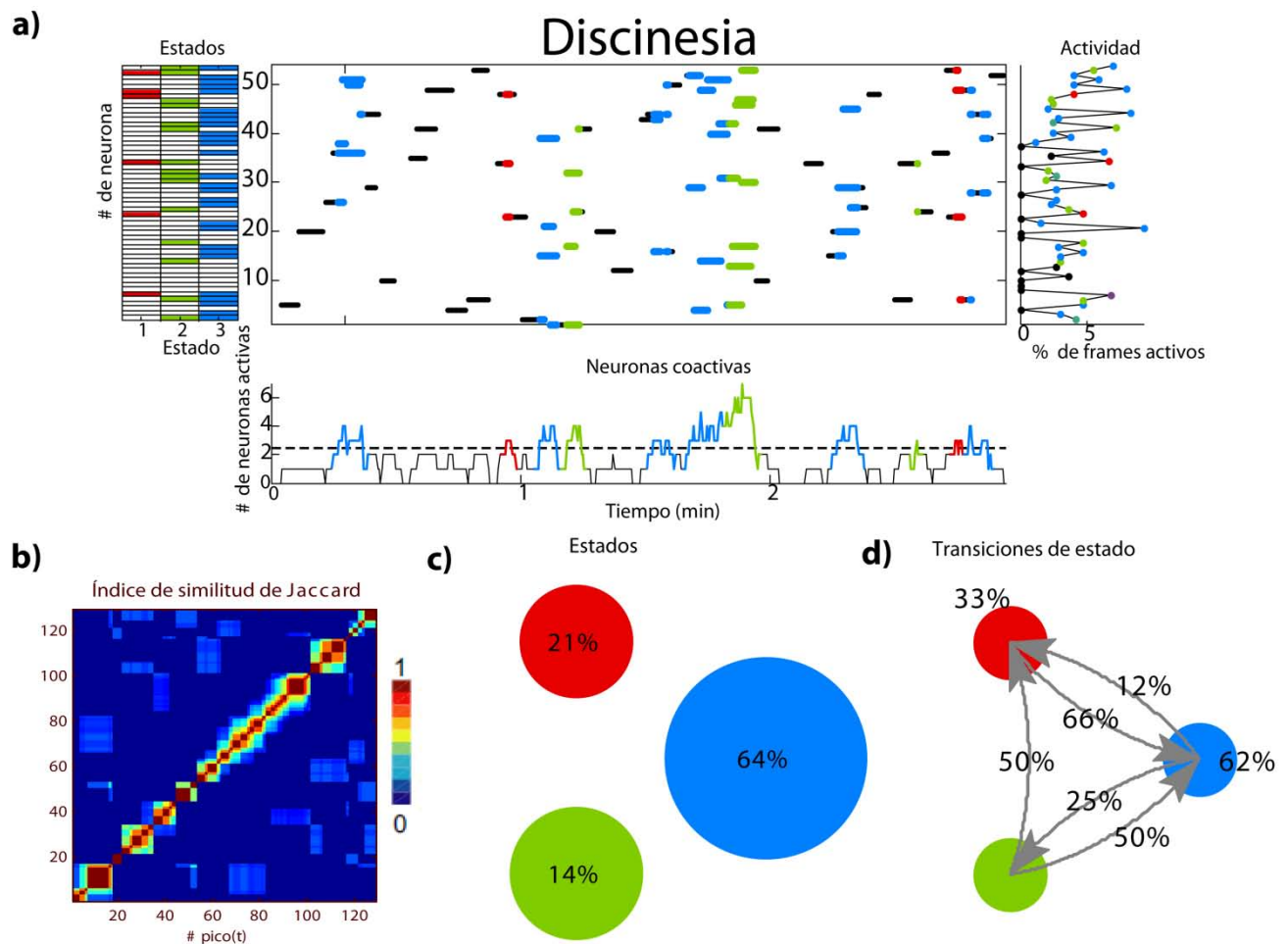


Figura 30. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho discinética. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). Se observa un mayor número de neuronas sincronizadas y mayor número de neuronas activas participando en los picos de sincronización b) Mapa de correlación cruzada donde el índice de similitud de todos los vectores representan estado de la red como función del tiempo. Los parches de colores indican que grupos similares están a cargo de la actividad de la red. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. Como en el microcircuito parkinsoniano hay un estado (azul) con mayor incidencia que los otros. d) Proporción de las transiciones de los estados. Las trayectorias están representadas con flechas.

En rebanadas estriatales de rata hemi-parkinsonica con discinesias inducidas por L-DOPA se bloquearon los receptores nicotínicos con 10 μ M de mecamilamina (Fig. 31a), y se observó tendencia al aumento en los picos de sincronización,

aunque éste no fue significativo (Fig. 33). Tampoco hay cambios en la actividad de las neuronas a lo largo del tiempo (Fig. 34).

La alternancia entre los diferentes estados de la red (Fig. 31d) es parecida al control con NMDA (Fig. 14c), y es mayor en comparación con el microcircuito estriatal discinético sin el fármaco (Fig. 30d). Al lavar el fármaco se recupera el estado dominante inicial (Fig. 32c) y las transiciones se concentran hacia este estado (Fig. 32d).

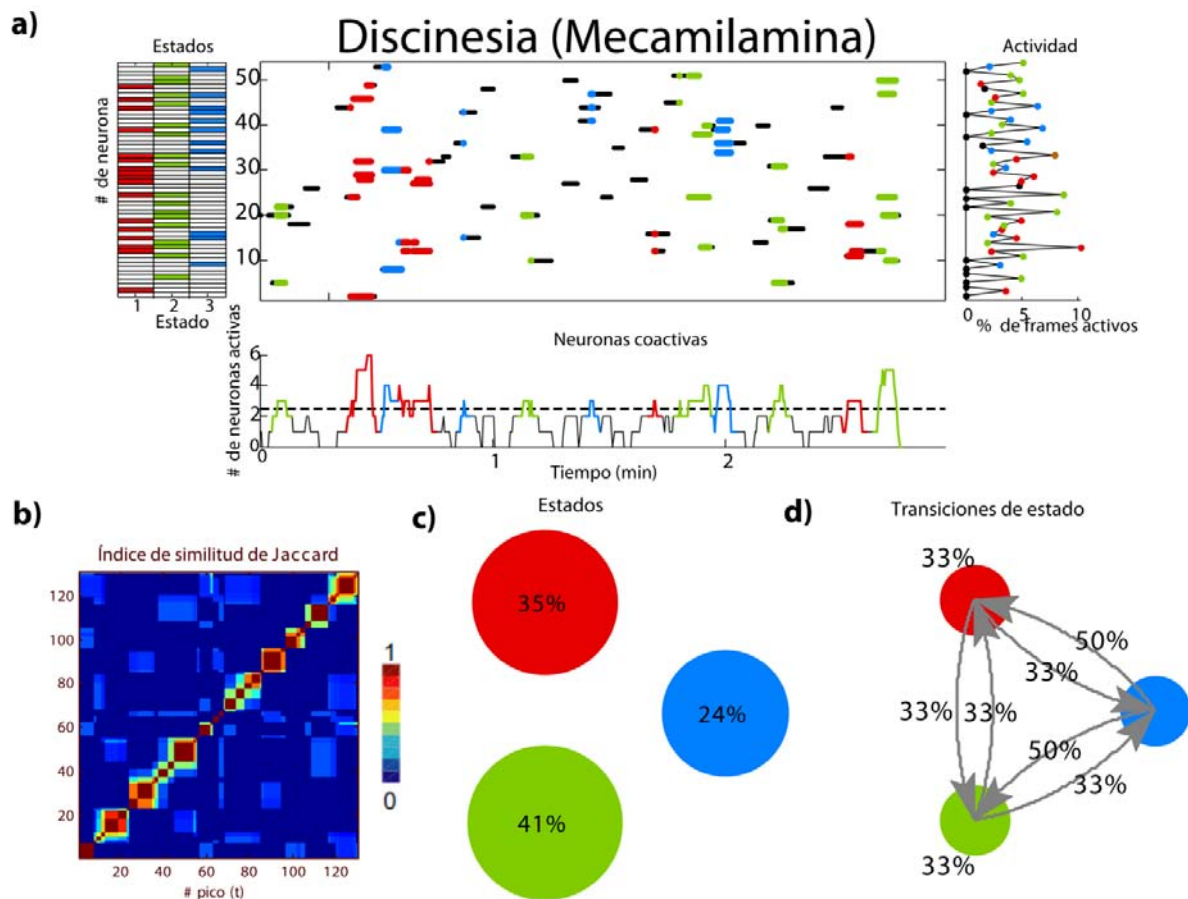


Figura 31. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho discinética en la que se añadió 10 μ M de mecamilamina. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). No hay diferencia visible con el microcircuito estriatal discinético solo. b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. Disminuye el porcentaje del estado dominante (azul) que se observó en la discinesia sin fármaco. d) Proporción de las transiciones de los estados. Las trayectorias están representadas con flechas. Nótese que hay una gran alternancia entre los estados.

El efecto nulo del antagonista nicotínico puede deberse a que la interneurona colinérgica está hiperreactiva en las discinesias inducidas por L-DOPA (Ding *et al.*, 2010) puede haber una desensibilización de los receptores nicotínicos y por ello no se ve un cambio en la dinámica del microcircuito.

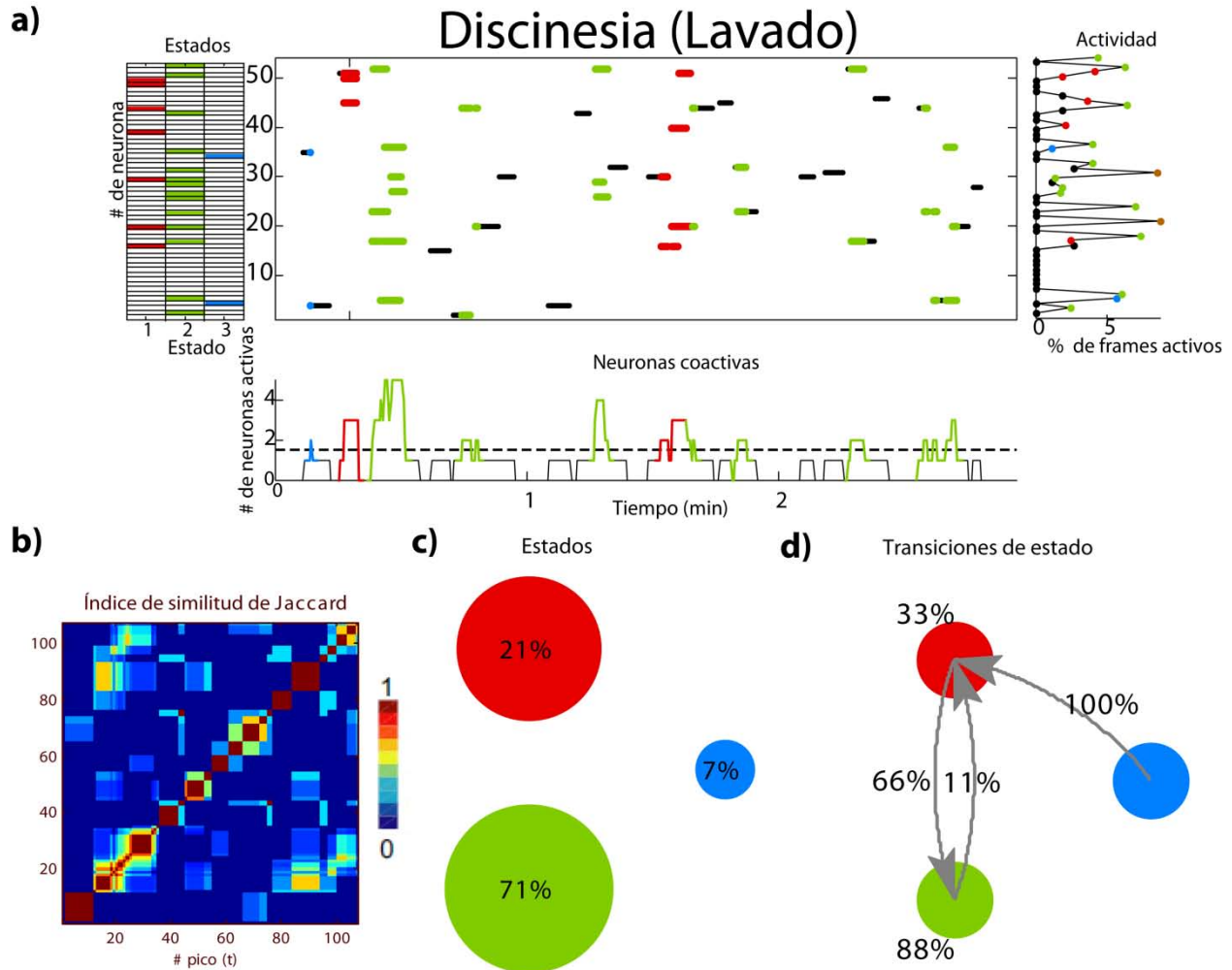


Figura 32. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho discinética durante el lavado del fármaco ($10\mu\text{M}$ de mecamilamina). a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector a través del tiempo. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. d) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

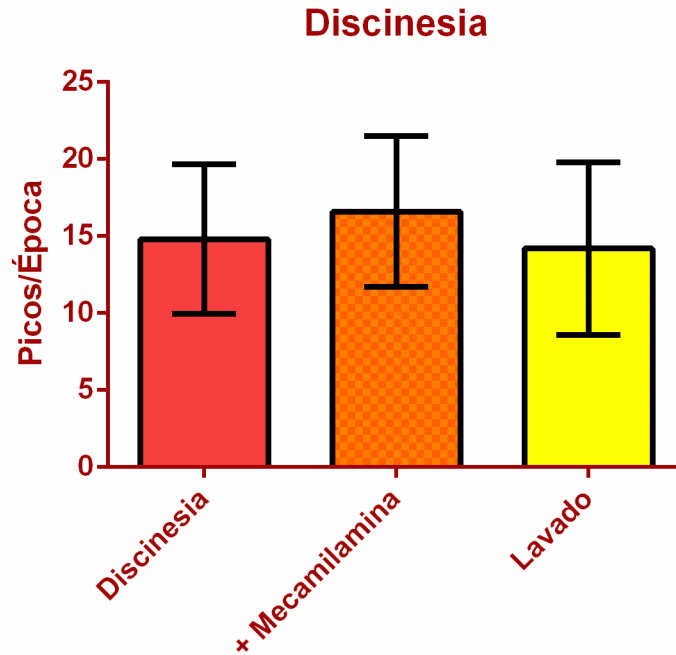


Figura 33. Histograma que muestra cómo el número de picos de sincronización por época (3 min) aumentó en el tejido discinético en comparación con el control y cómo hay tendencia al aumento de actividad cuando fue añadida la mecamilamina (n=5).

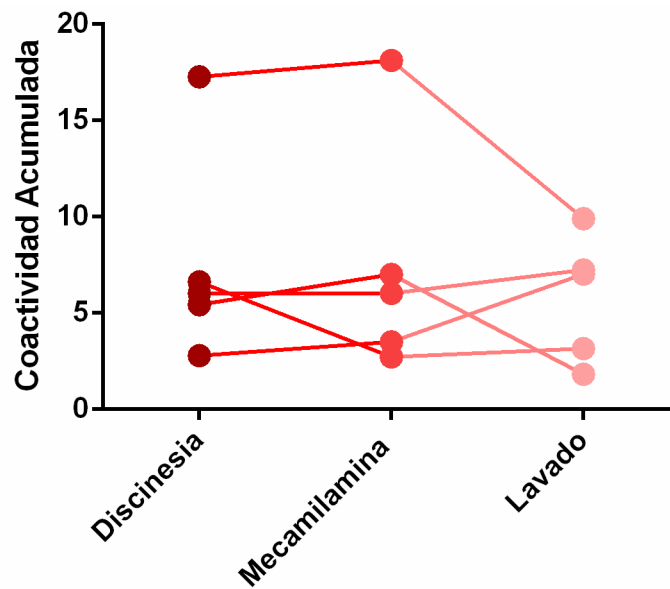


Figura 34. Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas. No hay efecto de la mecamilamina sobre la actividad del microcircuito.

Cuando en rebanadas estriatales de rata discinética se bloquearon los receptores muscarínicos M1 con 1 μ M de pirenzepina (Fig. 36a), se observó aumento en los picos de sincronización (Fig. 38) y en la actividad de las neuronas (Fig. 39) aunque éste no fue significativo. Este efecto puede deberse a la disminución del número de receptores M1 en las NEMs, pues los receptores M1 se encuentran en las espinas dendríticas de las NEMs (Pisani *et al.*, 2007) y en la EP hay pérdida de estas espinas dendríticas (Guridi *et al.*, 2012) por lo que parte de la transmisión muscarínica se pierde. Lo que puede explicar que el aumento de la actividad no sea tan marcado como para ser significativo.

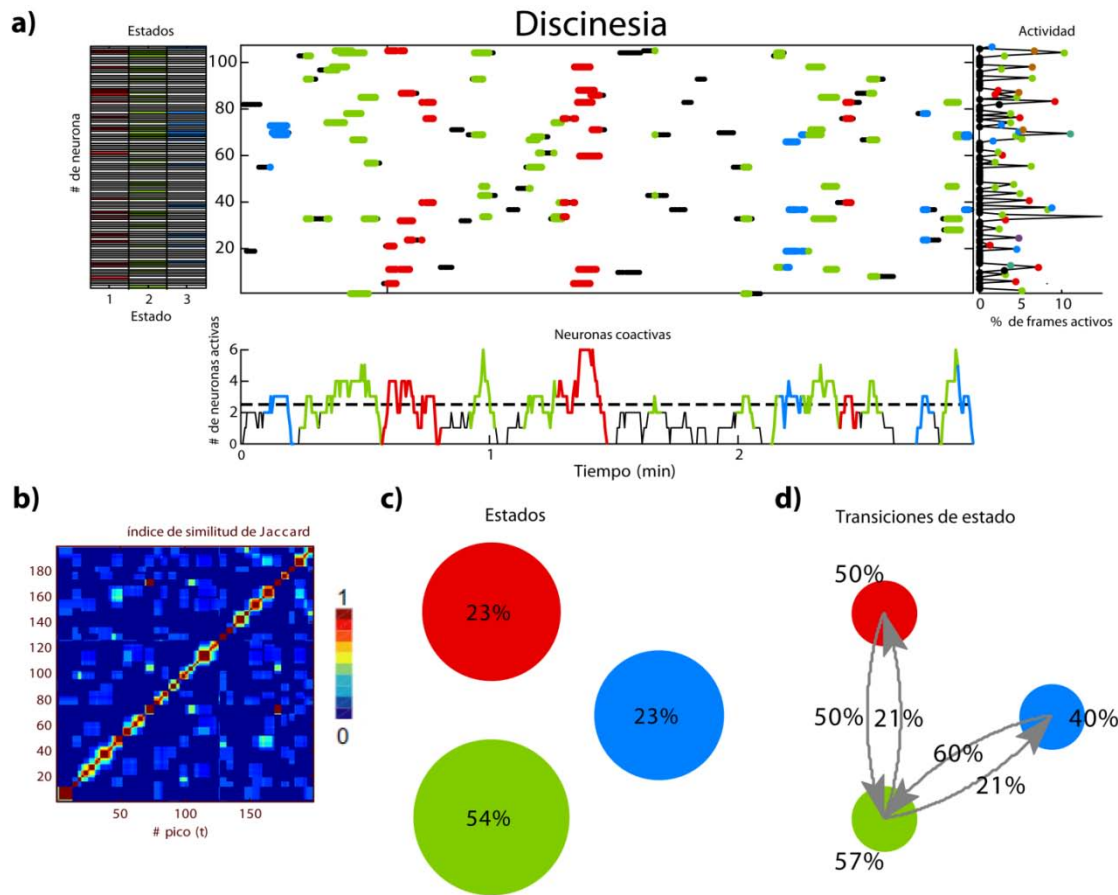


Figura 35. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho discinética. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). La mayoría de las neuronas activas participan en un pico de sincronización b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. Nótese como hay mayor número de vectores similares controlando la actividad que en el control. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. Hay un estado (verde) que tiene mayor porcentaje que los otros. d) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

El estado dominante de la red se mantiene durante el baño con pirenzepina (Fig. 36c), pero hay mayor alternancia entre los estados de red (Fig. 36d) que en el microcircuito estriatal discinético sin pirenzepina.

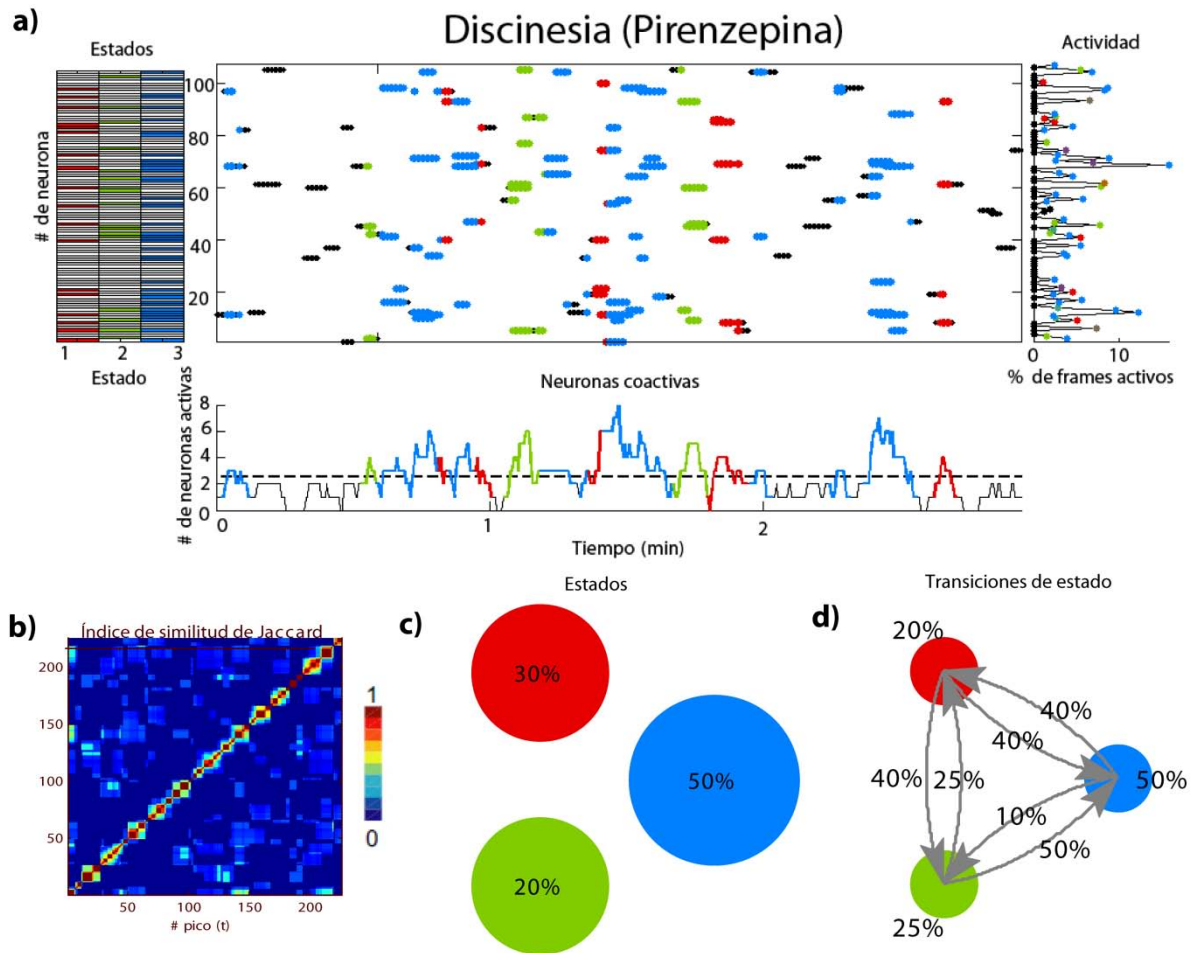


Figura 36. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho discinética se añadió $1\mu\text{M}$ de Pirenzepina. a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). Nótese como hay mayor número de neuronas participando en los picos de sincronización. b) Matriz de similitud que muestra vectores neuronales similares dominando la actividad a través del tiempo en el microcircuito discinético con pirenzepina. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. d) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

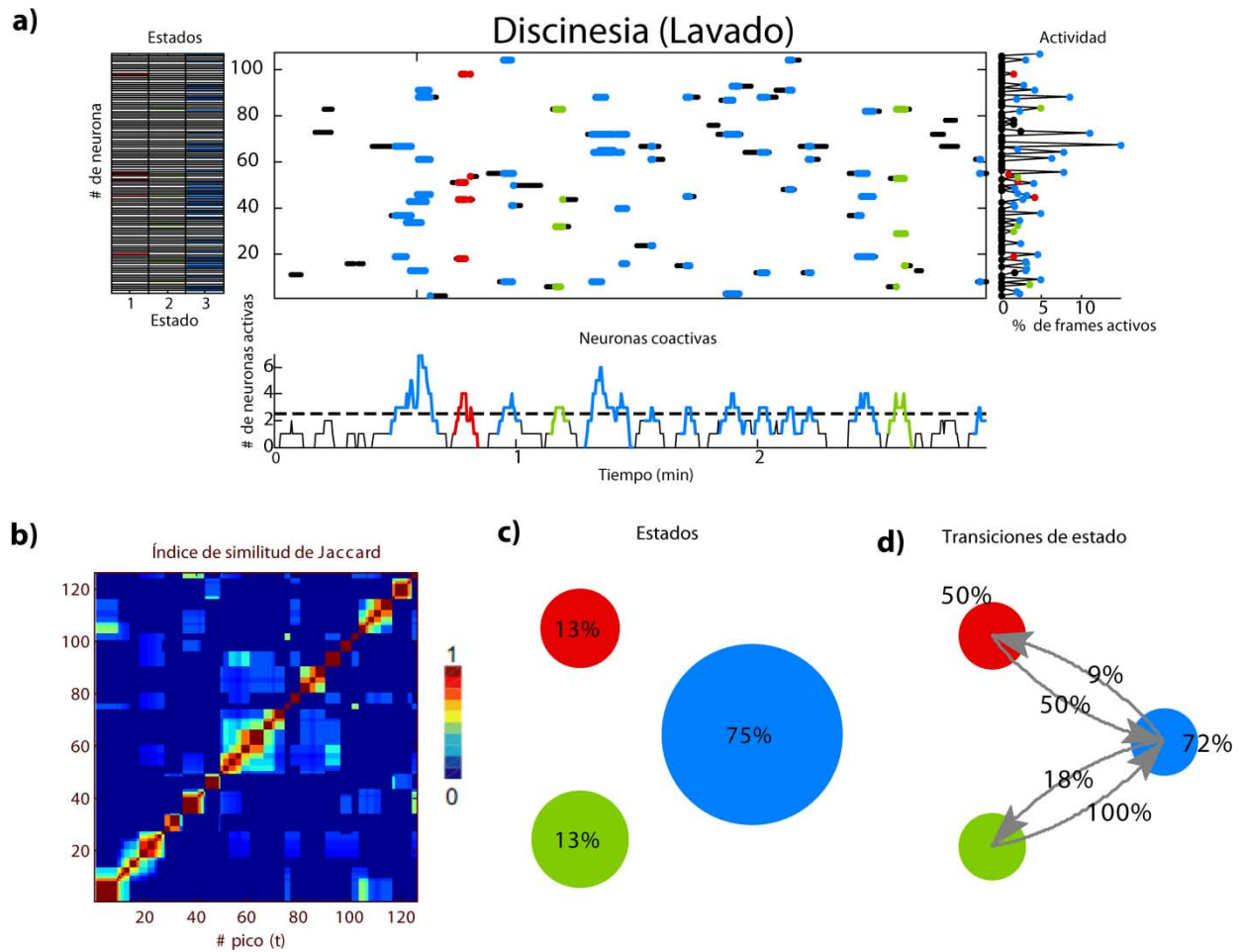


Figura 37. Registro de la actividad neuronal de una rebanada estriatal de una Rata Wistar macho discinética durante el lavado del fármaco ($1\mu\text{M}$ de pirenzepina). a) Gráfica tipo ráster que muestra el disparo de cada neurona durante el tiempo del registro de la actividad (3 min). b) Matriz de índice de similitud que compara cada vector con los otros a través del tiempo. c) Estados de la red, se indica el porcentaje de probabilidad para que la red esté en ese estado. d) Proporción de las transiciones de los estados. Las transiciones de un estado a otro están representadas con flechas.

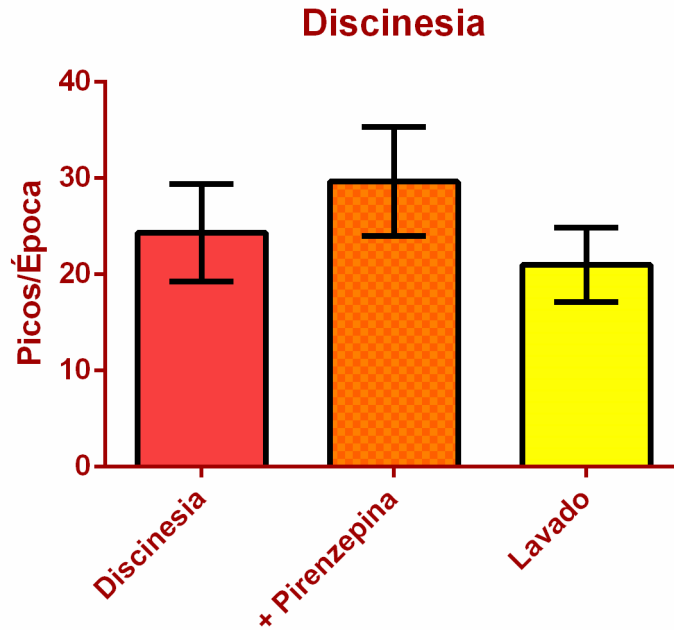


Figura 38. Histograma que muestra cómo el número de picos de sincronización por época (3 min) ascendió en tejido discinético en comparación con el control y cómo hay tendencia al aumento de actividad cuando fue añadida la pirenzepina (n=5).

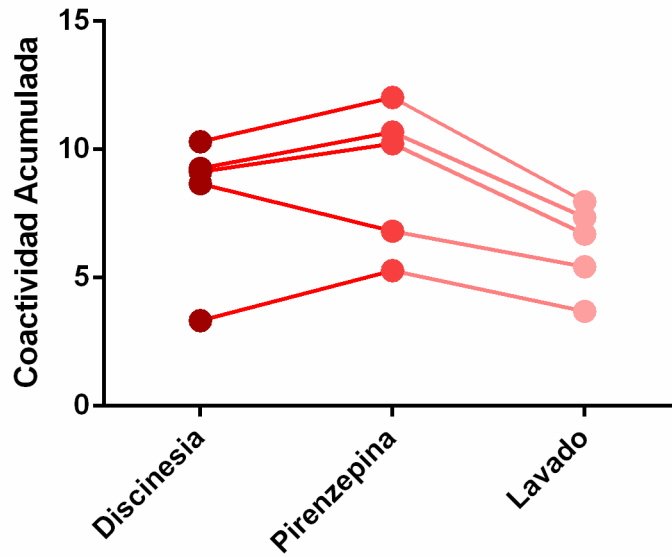


Figura 39. Gráfica de la suma de la actividad de las neuronas. Aunque se observa aumento en la actividad, éste no es significativo.

VIII. DISCUSIÓN

1. Movimientos Involuntarios Anormales

A pesar de que en este modelo el tiempo de tratamiento con L-DOPA es menor que en otros modelos que puede ir de 21 días a 12 semanas (Lee *et al.*, 2000; Lundblad *et al.* 2005), se observó aumento en la puntuación de los MIAs (Gráficas 2 y 3). El aumento indica una evolución positiva de la discinesia (Cenci *et al.*, 1998; Cenci *et al.*, 2002; Lundblad *et al.*, 2002). Los cuatro MIA's se desarrollaron en un 70% de los animales tratados, lo que demuestra que es un modelo aplicable para estudios posteriores que requieran de menor tiempo para el tratamiento.

2. Registro de la actividad neuronal

El tejido estriatal normal (Fig. 8) se caracteriza por tener baja actividad espontánea y sin picos de sincronización (Carrillo Reid *et al.*, 2008) por lo que se añadió al baño NMDA (10 μ M) para aumentar la actividad y poder observar el cambio en la dinámica del microcircuito (Fig. 9 y 14). La hipótesis de este proyecto fue que la interneurona colinérgica regula el microcircuito estriatal a través de los receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR). Se bloquearon los receptores nicotínicos con mecamilamina, pues ésta es un antagonista específico de los receptores colinérgico-nicotínicos. Por otro lado, para bloquear los receptores muscarínicos se eligió pirenzepina pues es un antagonista de los receptores colinérgicos muscarínicos M1, los cuales están presentes en las NEMs.

En el tejido estriatal control con NMDA y mecamilamina (Fig. 10) hubo reducción de picos de sincronización, es decir, hubo menos grupos de neuronas que dispararon al mismo tiempo en comparación con el tejido estriatal con NMDA. Sin embargo no hubo diferencias significativas entre estos dos grupos (Fig.12 y 13), lo mismo ocurrió con el tejido estriatal control con NMDA y pirenzepina (Fig.17 y 18). La disminución de la actividad neuronal al bloquear el receptor M1, puede deberse a que los receptores M1 modulan positivamente las corrientes mediadas por NMDA promoviendo la despolarización de las NEMs y la respuesta a entradas glutamatérgicas (Goldberg *et al.*, 2012). El hecho de que no se vea un cambio significativo al bloquear los receptores nicotínicos puede deberse al hecho de que la dopamina está regulando la actividad colinérgica (Stoof *et al.*, 1992) y no se

pierde el balance acetilcolina-dopamina contrario a lo que ocurre en el microcircuito estriatal parkinsonico (Fig. 27).

El tejido estriatal parkinsonico se caracteriza por una alta actividad espontánea, más picos de sincronización en comparación con el tejido control y un estado dominante en la red (Jáidar *et al.*, 2010) como se puede observar en las figuras 19 y 24. Al añadir tanto mecamilamina (Fig. 20) como pirenzepina (Fig. 25) hubo aumento en los picos de sincronización.

En la enfermedad de Parkinson bajan los niveles de DA en el estriado, mientras que la señalización de las interneuronas colinérgicas aumenta. Este aumento se le atribuye a la pérdida de la modulación negativa del disparo de las interneuronas y liberación de neurotransmisores por parte de los receptores dopaminérgicos D₂. El aumento en la transmisión colinérgica lleva a su vez a aumento en la señalización del receptor M1, puesto que el receptor M1 aumenta la excitabilidad de las NEMs hay aumento del disparo de estas neuronas más allá del límite neuronal y esto lleva a la pérdida de espinas en las NEMs de la vía indirecta. La depleción de DA en el estriado también desencadena reducción en la eficacia de los autoreceptores M4 y aumentan los niveles de ACh. Esta ACh actúa en los receptores muscarínicos de las interneuronas GABAérgicas (Goldberg & Reynolds 2011). De esta forma la interneurona colinérgica puede estar activando a las neuronas LTS que presentan el receptor M1 (Kreitzer, 2009) y al bloquear el receptor se está eliminando la inhibición que ejercen sobre las NEMs aumentando la actividad en el microcircuito.

El cambio en la actividad del microcircuito parkinsoniano al bloquear los receptores nicotínicos con mecamilamina concuerda con el hecho de que la activación de los nAChR $\alpha 4$ y $\beta 2$ induce liberación de GABA, el cual podría provenir de las interneuronas FS debido a que se han encontrado nAChR en este tipo de interneuronas (Koos and Tepper, 2002; Luo *et al.*, 2013). De esta forma, las interneuronas FS ejercen inhibición GABAérgica sobre las NEMs, a su vez la actividad de las interneuronas FS está regulada por las interneuronas colinérgicas a través de sus receptores nicotínicos (Surmeier *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2013).

La respuesta al bloqueo de los receptores nicotínicos en el tejido parkinsoniano es diferente al tejido con NMDA, esto puede deberse a que en la condición con NMDA se está incrementando la actividad oscilatoria del circuito, mientras que en la condición parkinsoniana hay ausencia de DA, la cual modula a los receptores NMDA, mediante el receptor D1 cuyo efecto es aumentar las corrientes de los receptores NMDA de las NEMs. De esta forma, cuando bajan los niveles de DA, aumenta la liberación de acetilcolina y la actividad en el receptor M1 en las NEMs estriatopalidales lo cual lleva al aumento de la respuesta dendrítica a las entradas glutamatérgicas (Surmeier *et al.*, 2007). Además se ha visto que el efecto de los receptores nicotínicos sobre las respuestas GABAérgicas no son uniformes, pues las interneuronas colinérgicas no están distribuidas uniformemente en el estriado, son más abundantes en la frontera entre los estriosomas y la matriz del estriado. Su soma se localiza en los estriosomas y extienden sus dendritas hacia la matriz, se ha observado que en la matriz; reciben mayor número de entradas GABAérgicas mediadas por nAChRs que en los estriosomas, por lo que es

probable que la ACh liberada puede inducir respuestas nicotínicas de manera más efectiva en la matriz que en los estriomas (Inoue *et al.*, 2016). También hay reducción de nAChR en la corteza y ganglios basales en cerebros con EP pues los nAChR también están ubicados en las terminales presinápticas de las terminales dopaminérgicas y al perderse la transmisión dopaminérgica se pierde parte de la transmisión nicotínica (Calabresi *et al.*, 2006). El aumento en la actividad concuerda con lo reportado por Plata (2013), pues observó que la nicotina reducía la actividad del circuito estriatal y esta respuesta podía ser reversible y bloqueada por mecamilamina. También concuerda con los varios estudios que han reportado beneficios de la nicotina en la EP (Villafane *et al.*, 2007; Quick *et al.*, 2009)

En el tejido estriatal discinético hay mayor actividad espontánea y picos de sincronización en comparación con tejido control, con NMDA y parkinsonico (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Al añadir tanto mecamilamina (Fig. 31) como pirenzepina (Fig. 36) hubo aumento en los picos de sincronización, pero no significativamente. El hecho de que el antagonista nicotínico no tuviera un efecto más marcado en la dinámica del microcircuito puede deberse a que la interneurona colinérgica está hiperreactiva en las discinesias inducidas por L-DOPA (Ding *et al.*, 2010) puede haber una desensibilización de los receptores nicotínicos y por ello no se ve un cambio en la dinámica del microcircuito. También puede deberse a que la interneurona colinérgica aumenta la salida de DA de las neuronas dopaminérgicas a través de la activación de receptores nicotínicos; sin embargo, el aumento en la actividad de la red observado en el tejido discinético

puede deberse a que en ese estado patológico la mayor concentración de DA proviene de las neuronas serotoninérgicas que no tienen la regulación fina de las dopaminérgicas y pueden capturar L-DOPA y liberarla como DA. Las neuronas serotoninérgicas expresan la AADC, la cual transforma la L-DOPA en DA; la L-DOPA compite con el 5-hydroxitriptofano (5-HTP) para ser descarboxilada en DA por la AADC dentro de las neuronas serotoninérgicas, cuando hay ausencia de neuronas dopaminérgicas a causa de la EP. Las neuronas serotoninérgicas también expresan el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2) que libera DA por exocitosis junto con la serotonina (5-HT). Además de la liberación por exocitosis, también hay liberación de grandes cantidades de DA por el transportador de 5-HT (SERT) (Carta *et al.*, 2007; Cheshire & Williams, 2012; Navailles & Deurwaerdere, 2012).

Las interneuronas colinérgicas están reguladas por D2 y D5, con la pérdida de DA también se pierde esta regulación en la EP, con el tratamiento de L-DOPA se regresa la DA al sistema, esto produce la reducción de ACh lo que lleva a la inactivación de M1 en las NEMs, pues la activación D2 inhibe liberación de ACh y activación de M1 en interneuronas FS (Goldberg & Reynolds, 2011). También hay disminución del receptor M1 en las NEMs con la pérdida de espinas dendríticas en la EP (Guridi *et al.*, 2012) por lo que parte de la transmisión muscarínica se pierde.

A pesar de que los M1R son uno de los subtipos de receptores muscarínicos más abundantes en el estriado y están presentes en las NEMs, otros tipos de receptores muscarínicos también intervienen en la dinámica del microcircuito como el receptor M2, que inhibe la liberación de glutamato y el M3 induce

liberación de éste (Goldberg *et al.*, 2012) por lo que deben tenerse en consideración para futuros estudios.

IX. CONCLUSIONES

El modelo de animales con el ajuste de edad que se aplicó permitió la utilización de la técnica de imagenología de calcio para observar el microcircuito estriatal en los tres estados analizados, normal, parkinsoniano y con discinesias inducidas por L-DOPA.

La interneurona colinérgica no regula la dinámica del microcircuito estriatal normal y discinético, pero sí tiene un papel importante en el microcircuito estriatal parkinsoniano.

La pérdida de transmisión dopaminérgica produce mayor actividad en el microcircuito estriatal parkinsoniano a comparación del estriado normal. La actividad aumenta cuando se bloquea la transmisión nicotínica y parte de la transmisión muscarínica, lo que indica que la interneurona colinérgica juega un papel de regulación del microcircuito a través de los receptores nicotínicos que se encuentran en las interneuronas GABAérgicas y a través del receptor M1, que se encuentra en las NEMs.

Se necesitan más estudios para caracterizar la participación de diferentes interneuronas en la dinámica del microcircuito estriatal para tener una perspectiva global de su funcionalidad.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlskog, J., Muentner, M. 2001. Frequency of Levodopa-Related Dyskinesias and Motor Fluctuations as Estimated From the Cumulative Literature. *Movement Disorders*, 16(3), 448–458.
- Albin, R., Young, A., Penney, J. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neuroscience*, 12, 366-375.
- Alves, G., Forsaa, E., Pedersen, K., Dreetz, M., Larsen, J. 2008. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol*, 255(Supl 5),18-32.
- Aosaki, T., Tsubokawa, H., Ishida, A., Watanabe, K., Graybiel, A., Kimura, M. 1994. Responses of Tonicly Active Neurons in the Primate's Striatum Undergo Systematic Changes during Behavioral Sensorimotor Conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 14(6), 3969-3984.
- ArcMap. ¿Qué son los datos ráster? Fecha de consulta: Septiembre de 2016. Perfil electrónico: "<http://desktop.arcgis.com/es/arcmap/10.3/manage-data/raster-and-images/what-is-raster-data.htm>" 1995-2015, Esri.
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., Arias-Montaño, J. 2000. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11(1), 39-60.
- Barnes, T., Kubota, Y., Hu, D., Jin, D., Graybiel, A. 2005. Activity of Striatal Neurons Reflects Dynamic Encoding and Recoding of Procedural Memories. *Nature*, 437, 1158-1161.
- Bennett, J., Bolam, J., 1993. Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat. *Brain Research*, 609, 137-148.
- Bennett, J., Bolam, J. 1994. Synaptic Input And Output Of Parvalbumin-Immunoreactive Neurons In The Neostriatum Of The Rat. *Neuroscience*, 62(3), 707-719.

- Bennett, B., Wilson, C. 1998. Synaptic Regulation of Action Potential Timing in Neostriatal Cholinergic Interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 18(20), 8539–8549.
- Bennett, B., Wilson, C. 1999. Spontaneous Activity of Neostriatal Cholinergic Interneurons In Vitro. *The Journal of Neuroscience*, 19(13), 5586-5596.
- Bolam, J., Hanley, J., Booth, P., Bevan, M. 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*, 196(Pt 4), 527-542.
- Bolam, J., Brown, M., Moss, J. Magill. 2009. Basal Ganglia: Internal Organization. *Encyclopedia of Neuroscience*, 2, 97-104.
- Bonifati, V. 2014. Genetics of Parkinson's disease – state of the art, 2013. *Parkinsonism and Related Disorders*, 20S1, S23–S28.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernandez-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R. and Vargas, J. 2008. Encoding Network States by Striatal Cell Assemblies. *J Neurophysiol*, 99, 1435-50.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibanez-Sandoval, O., Hernandez-Cruz, A., Galarraga, E., Vargas, J. 2009a. Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol*, 101, 737-749.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernandez, A., Vergara, R., Galarraga, E., Vargas, J. 2009b. Muscarinic Enhancement of Persistent Sodium Current Synchronizes Striatal Medium Spiny Neurons. *J Neurophysiol*, 102, 682-690.
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D., Björklund, A. 2007. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain*, 130, 1819-1833.

- Cenci, M.A., Lee, C. S., Björklund, A. 1998. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *European Journal of Neuroscience*, 10, 2694-2706.
- Cenci, M.A., Whishaw, I., Schallert, T. 2002. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nature Reviews, Neuroscience*, 3, 574-579.
- Chartier-Harlin, M., Dachsel, J., Vilarinho-Güell, C., Lincoln, S., Leprêtre, F., Hulihan, M. *et al.* 2011. Translation Initiator EIF4G1 Mutations in Familial Parkinson Disease. *The American Journal of Human Genetics*, 89, 398–406.
- Cheshire, P., Williams, D. 2012. Serotonergic involvement in levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, 19, 343-348.
- Clarke, C. 2007. Parkinson's disease. *BMJ*, 335, 441-445.
- Clavero-Ibarra, P., Gil-Alzueta, M. 2012. Abordaje práctico de las discinesias en la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol*, 54(Supl 5), S33-S40.
- Davie, C. 2008. A review of Parkinson's disease. *British Medical Bulletin*, 86, 109 - 127.
- Dimova, R., Vuillet, J., Nieoullon, A., Kerkerian-Le Goff, L. 1993. Ultrastructural features of the choline acetyltransferase-containing neurons and relationships with nigral dopaminergic and cortical afferent pathways in the rat striatum. *Neuroscience*, 53(4), 1059-1071.
- Doig, N., Magill, P., Apicella, P., Bolam, J., Sharott, A. 2014. Cortical and Thalamic Excitation Mediate the Multiphasic Responses of Striatal Cholinergic Interneurons to Motivationally Salient Stimuli. *The Journal of Neuroscience*, 34(8), 3101-3117.
- García-Munoz, M., Carrillo-Red, L., Arbuthnott, W. 2010. Functional anatomy: dynamic states in basal ganglia circuits. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4(144), 1-7.

- Gerfen, C., & Bolam, J. 2010. The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. H. En Steiner, y K. Tseng (eds.), *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (pp. 3-28). USA: Elsevier.
- Goldberg, J.A., Reynolds, J. 2011. Spontaneous Firing and evoked pauses in the tonically active cholinergic interneurons of the striatum. *Neuroscience*, 198, 27-43.
- Goldberg, J., Ding, J., Surmeier, J. 2012. Muscarinic Modulation of Striatal Function and Circuitry. En A. Fryer, A. Christopoulos, y N. Nathanson (eds.), *Muscarinic Receptors* (pp. 223-241). USA: Springer.
- Grillner, S., Markram, H., De Schutter, E., Silberberg, G., LeBeau, F. 2005. Microcircuits in action – from CPGs to neocortex. *TRENDS in Neurosciences*, 28(10), 525-533.
- Grillner, S. 2006. Biological Pattern Generation: Review The Cellular and Computational Logic of Networks in Motion. *Neuron*, 52, 751–766.
- Guridi, J., González-Redondo, R., Obeso J. 2012. Clinical Features, Pathophysiology, and Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, 2012, 1-15.
- Hawkes, C. 2008. The Prodromal Phase of Sporadic Parkinson's Disease: Does It Exist and If So How Long Is It? *Movement Disorders*, 23(13), 1799–1807.
- Herrero, M. T., Luquín M. R., Martín J., De Pablos V., Fernández-Villalba, E. 2012. Anatomía química de los ganglios basales. La transmisión dinámica. En F. Micheli, y M. Luquin-Piudo (eds.), *Movimientos anormales: clínica y terapéutica* (pp: 3-21). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Horstinka, M., Tolosab, E., Bonuccellic, U., Deuschild, G., Friedmane, A., Kanovskyf,P., Larseng, J., Leesh, A., Oerteli, W., Poewej, W., Rascolk, O., Sampaiol, C. 2006. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of

Neurological Societies (EFNS) and the Movement Disorder Society-European Section (MDS-ES). Part II: late (complicated) Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 13, 1186–1202.

Houk, J., Davis, J., Beiser, D. 1995. Models of Information Processing in the Basal Ganglia. USA: The MIT Press. 393 pp.

Ibáñez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Unal, B., Shah, F., Koós, T., Tepper, J. 2010. Electrophysiological and Morphological Characteristics and Synaptic Connectivity of Tyrosine Hydroxylase-Expressing Neurons in Adult Mouse Striatum. *The Journal of Neuroscience*, 30(20), 6999 –7016.

Inoue, R., Suzuki, T., Nishimura, K., Miura, M. 2016. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated GABAergic inputs to cholinergic interneurons in the striosomes and the matrix compartments of the mouse striatum. *Neuropharmacology*. 105, 318-328.

Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., Hernández-Cruz, A. 2010. Dynamics of the Parkinsonian Striatal Microcircuit Entrainment into a Dominant Network State. *The Journal of Neuroscience*, 30(34), 11326-11336.

Jáidar, O. 2011. *Análisis de los Estados del Microcircuito Neoestriatal en un modelo de la Enfermedad de Parkinson*. (Tesis de Doctorado). Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad de México.

Jenner, P. 2008. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature Reviews, Neuroscience*, 9, 665-677.

Kubota, Y., Kawaguchi, Y. 2000. Dependence of GABAergic Synaptic Areas on the Interneuron Type and Target Size. *The Journal of Neuroscience*, 20(1), 375-386.

- Kawaguchi, Y. 1989. Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *Journal of Neurophysiology*, 62, 1052-1068.
- Kawaguchi, Y. 1993. Physiological, Morphological, and Histochemical Characterization of Three Classes of Interneurons in Rat Neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, 13(11), 4908-4923.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C., Augood, S., Emson, P. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *TINS*, 18(12), 527-535.
- Kemp, J., Powell, T. 1970. The cortico-striate projection in the monkey. *Brain*, 93, 525-546.
- Kreitzer, A. 2009. Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Annu. Rev. Neurosci*, 32,127-47.
- Lai, H.J., Lin, C.H., Wu, R.M. 2012. Early-Onset Autosomal-Recessive Parkinsonian-Pyramidal Syndrome. *Acta Neurologica Taiwanica*, 21(3), 99-106
- Lau, L., Breteler, M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5, 525-535.
- Lang, A., Lees, A. 2002. Management of Parkinson's Disease: An Evidence-Based Review. *Movement Disordersv*, 17(Supl. 4), S23- S37.
- Lee, C. S, Cenci, M.A., Schulzer, M., Björklund, A. 2000. Embryonic ventral mesencephalic grafts improve L-DOPA induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain*, 123, 1365-1379.
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., Cenci, M. A. 2002. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 15, 120-132.

- Lundblada, M., Usiellob, A., Cartaa, M., Håkanssond, K., Fisoned, G., Cenci, M.A. Pharmacological validation of a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Experimental Neurology*, 194, 66–75.
- Luo, R., Janssen, M. J., Partridge, J. G., Vicini, S. 2013. Direct and GABA-mediated indirect effects of nicotinic ACh receptor agonists on striatal neurons. *The Journal of Physiology Neuroscience*, 591.1, 203–217.
- Ma, Y., Feng, Q., OuYang, L., Mu, S., Liu, B., Li, Y., Chen, S., Lei, W. 2014. Morphological Diversity of GABAergic and Cholinergic Interneurons in the Striatal Dorsolateral and Ventromedial Regions of Rats. *Cell Mol Neurobiol*, 34, 351–359.
- Matamales, M., Bertran-Gonzalez, J., Salomon, L., Degos, B., Deniau, J-M., et al. 2009. Striatal Medium-Sized Spiny Neurons: Identification by Nuclear Staining and Study of Neuronal Subpopulations in BAC Transgenic Mice. *PLoS ONE*, 4(3), e4770.
- Mink, J. 2003b. The Basal Ganglia and Involuntary Movements. *Archives of neurology*, 60, 1365-1368.
- Muñoz-Manchado, A., Foldi, C., Szydłowski, S., Sjulson, L., Farries, M., Wilson, C., Silberberg, G. Hjerling-Leffler, J. 2014. Novel Striatal GABAergic Interneuron Populations Labeled in the 5HT3a^{EGFP} Mouse. *Cerebral Cortex*, 26(1), 1-10.
- Murer, M., Moratalla, R. 2011. Striatal signaling in L-DOPA –induced dyskinetic common mechanisms with drug abuse and long term memory involving D1 dopamine receptor stimulation. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 1-12.
- Muzerengia, S., Contrafatto, D., Chaudhuri, K. 2007. Non-motor symptoms: Identification and management. *Parkinsonism and Related Disorders*, 13, S450–S456.
- Navailles, S., Deurwaerdair, P. 2012. Contribution of serotonergic transmission to the motor and cognitive effects of High Frequency Stimulation of the

- Subthalamic Nucleus or Levodopa or Levodopa in Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, 45, 173-185.
- Pakhotin, P., Bracci, E. 2007. Cholinergic Interneurons Control the Excitatory Input to the Striatum. *The Journal of Neuroscience*, 27(2), 391-400.
- Paxinos G., Watson C. 1988. The Rat Brain. In Stereotaxic Coordinates. (4a ed.). USA: Academic Press.
- Parent, A., Lévesque, M., Parent, M. 2001. A re-evaluation of the current model of the basal ganglia. *Parkinsonism and Related Disorders*, 7, 193-198.
- Parr-Brownlie, L.; Poloskey, S.; Bergstrom, D.; Walters, J.; 2009. Parafascicular thalamic nucleus activity in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 217, 269-281.
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J., Hernández-Martínez, R., Rueda-Orozco, P., Galarraga, E., Drucker-Colín, R., Bargas, J. 2013. Global actions of nicotine on the striatal microcircuit. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 7(78), 1-13.
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., Bargas, J. 2016. Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiology of Disease*, 91, 347–361.
- Bonsi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Bernardi, G., Calabresi, P. 2003. Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: Focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 45, 45–56.
- Pisani, A., Bernardi, G., Ding, J., Surmeier, D. 2007. Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci*, 30, 545–553.

- Quik, M., Huang, L. Z., Parameswaran, N., Bordia, T., Campos, C., Perez, X. A. 2009. Multiple roles for nicotine in Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 78(7), 677–685.
- Reynolds, J., Wickens, J. 2004. The corticostriatal input to giant aspiny interneurons in the rat: a candidate pathway for synchronising the response to reward-related cues. *Brain Research*, 1011, 115– 128.
- Santini, E., Valjent, E., Fisone, G. 2008. Parkinson's disease: Levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. *FEBS Journal*, 275, 1392-1399.
- Schapira, A. & Jenner, P. 2011. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 26(6), 1049-1055.
- Schrag, A., Quinn, N. 2000. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Brain*, 123, 2297-2305.
- Shafique, H.; Blagrove, A.; Chung, A.; Logendrarajah, R. 2011. Causes of Parkinson's disease: Literature Review. *JPRLS*, 1(1), 5-7.
- Shulman, J., De Jager, P., Fean, M. 2011. Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 193–222.
- Singleton, A. B., Farrer, M. J., Bonifati, V. 2013. The Genetics of Parkinson's Disease: Progress and Therapeutic Implications. *Movement Disorders*, 28(1), 14-23
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., Shen, W. 2007. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 228-235.
- Smith, Y.; Bennett, B.; Bolam, J.; Parent, A; Sadikot, A. 1994. Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J Comp Neurol*, 344,1-19.

- Stoof, J., Drukarch, B., Boer, P., Westerink, B., Groenewegen, H. 1992. Regulation of the activity of striatal cholinergic neurons by dopamine. *Neuroscience*, 47(4), 755-770.
- Tan, L. 2013. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurology Asia*, 18(3), 231-238.
- Tambasco, N., Simoni, S., Marsili, E., Sacchini, E., Murasecco, D., Cardaioli, G., Rossi, A., Calabresi, P. 2012. Clinical Aspects and Management of Levodopa-Induced Dyskinesia. *Parkinson's Disease*, 2012, 1-13.
- Villafane, G., Cesaro, P., Rialland, A., Baloul, S., Azimi, S., Bourdet, C., Le Houezec, J., Macquin-Mavier, I., Maison, P. 2007. Chronic high dose transdermal nicotine in Parkinson's disease: an open trial. *European Journal of Neurology*, 14(12), 1313–1316.
- Wirdefeldt, K., Adami, H-O., Cole, P., Trichopoulos, D., Mandel, K. 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*, 26, S1–S58.
- Wilson, C., Chang, H., Kitai, S. 1990. Firing Patterns and Synaptic Potentials of Identified Giant Aspinic Interneurons in the Rat Neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, 10(2), 508-519.
- Winkler, C., Kirik, D., Bjorklund, A. & Cenci, M. 2002. L-DOPA-Induced Dyskinesia in the Intrastratial 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease: Relation to Motor and Cellular Parameters of Nigrostriatal Function. *Neurobiol Dis*, 10, 165-86.
- Yelnik, J. 2002. Functional Anatomy of the Basal Ganglia. *Movement Disorders*, 17(Supl. 3), S15–S21.
- Zhou, F-M., Wilson, C., Dani, J. 2002. Cholinergic Interneuron Characteristics and Nicotinic Properties in the Striatum. *J Neurobiol*, 53, 590-605.