



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

PLASTICIDAD MORFOLÓGICA DE
CÉLULAS COLINÉRGICAS EN EL
NÚCLEO CAUDADO DE RATONES
LESIONADOS CON
6-HIDROXIDOPAMINA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

LILLIAN ROJAS ESCÁRCEGA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
COMITÉ TUTOR: DRA. ANA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de abril de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ROJAS ESCARCEGA LILLIAN** con número de cuenta 094232772 con la tesis titulada **"PLASTICIDAD MORFOLOGICA DE CELULAS COLINERGICAS EN EL NUCLEO CAUDADO DE RATONES LESIONADOS CON 6-HIDROXIDOPAMINA"**, realizada bajo la dirección del **DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA:**

Presidente: DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DIAZ
Vocal: DR. GABRIEL GUIZAR SAHAGUN
Secretario: DRA. LAURA COLIN BARENQUE
Suplente: DRA. MARIA ROSA AVILA COSTA
Suplente: DR. ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de junio de 2012.

M^{te} del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por la posibilidad de realizar mis estudios de Maestría.

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, con financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (82879), la Dirección de Asunto del Personal Académico (PAPIIT IN215208-3) y de la Coordinación de la Investigación Científica (IMPULSA-02). Adicionalmente, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (registro 249141) aportó el soporte económico para la realización de mis estudios de posgrado.

A mi Tutor Principal y Director de tesis, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina. Gracias por la oportunidad de explorar y aprender en el quehacer científico, por la paciencia, y por las lecciones. Ahora entiendo un par de ellas, en el camino por venir fortaleceré las que restan.

A los miembros de mi Comité Tutoral, Dra. Clorinda Arias Álvarez y Dr. Iván Velasco Velázquez por su apoyo, disposición y críticas constructivas, tanto en el desarrollo de este proyecto de investigación como en el proceso de mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS

A la parte fundamental de mi vida: Enrique, Edith, Iván, Herlinda e Irene.

Su apoyo, fortaleza y coraje hacen de mi existencia una experiencia única. Cualquier cosa que escriba sale sobrando. Gracias a ustedes puedo escribir esta tesis.

A las Dras. Armida Báez y Esperanza Meléndez, por su apoyo constante. En un punto crucial del camino sus opiniones conjuntas fueron decisivas. En verdad, gracias. El aprendizaje y su cariño me los llevo puestos.

Al Dr. Jesús Chimal Monroy. Sus recomendaciones, apoyo técnico y cordialidad siempre estuvieron presentes. Por ello, y por la oportunidad de convivir en su laboratorio, gracias.

Al laboratorio Chimal: Carlos, Rod, Marcia, Alberto, Martha, Alex, Sabina... en fin, a todos. Su apoyo, la convivencia y sus risas se volvieron una parte importante durante mi estancia en Biomédicas.

A mi amigo Iván Meneses. Gracias por compartir siempre una buena taza de café, ser sabio escucha y por tus buenos consejos.

A mis amigas Noma Padilla y Nidia González: por su cariño, las aventuras y el apoyo incondicional durante años. Por los momentos de trabajo, las tertulias y el compartir de dos mujeres bien hechas y fuertes.

A Marilú Molina y mamá Martha López-Santibañez: por el cariño y transparencia en su saber compartir.

A Horacio Villafán: por las buenas charlas y el compartir de sus técnicas y experiencias.

A Miguel Tapia y Eduardo Martínez. La asesoría técnica, el apoyo en el microscopio y las sugerencias forman parte de este y otros trabajos. Me llevo buenos recuerdos de trabajo en compañía.

A mis amigos Ale Name y Daniel Barrón: gracias por estos años de vivencias únicas. Su apoyo incondicional, sabiduría y consejos oportunos han estado siempre presentes e indirectamente forman parte de la concreción de este trabajo.

A dos ejemplos académicos y familiares. La Maestra Irma Escárcega y el Dr. Armando Rivas siempre han estado presentes y al pendiente. Gracias por estos años de apoyo y buenas enseñanzas.

Al personal de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Gracias por su labor y buena disposición constantes.

Se reconoce el apoyo técnico administrativo a la M. en C. Patricia Padilla Cortés y al Dr. Jesús Ramírez Santos quiénes aportaron dirección y asesoría en las distintas fases del proyecto.

INDICE

TEMA	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCION	14
ANTECEDENTES	14
Enfermedad de Parkinson: Generalidades y reflexiones.....	14
Enfermedad de Parkinson e inadaptación de la plasticidad neural.....	19
Enfermedad de Parkinson, hipercolinergia y plasticidad mal adaptativa.....	22
Modelo de inyección unilateral estriatal de 6-OHDA.....	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
Objetivos particulares.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Animales.....	28
Administración unilateral de 6-OHDA en el núcleo caudado.....	28
Obtención, procesamiento e inmunotinción de las muestras histológicas.....	29
Determinación del área de lesión.....	30
Evaluación del área denervada en el núcleo caudado.....	31
Determinación del número de interneuronas colinérgicas.....	32
Determinación del tamaño somático de las interneuronas colinérgicas.....	33
Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS	35
Área dopaminérgica lesionada en el caudoputamen.....	35
Número de interneuronas colinérgicas gigantes.....	37

Área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes.....	42
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina.	MPPP: 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina.
AC: adenililciclasa.	MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.
ACh: acetilcolina.	nAChR: receptor ionotrópico nicotínico colinérgico.
AChE: acetilcolinesterasa.	NEP: núcleo entopeduncular.
ADNm: ácido desoxirribonucléico mitocondrial.	NMDAr: receptor ionotrópico de glutamato (N-metil D-aspartato).
AMPC: adenosinmonofosfato cíclico.	NOS: óxido nítrico sintetasa.
AMPT: alfa-metil paratirosina.	NST: núcleo subtalámico.
ATP: adenosintrifosfato.	PBS: solución amortiguadora de fosfatos-salina 0.1M, pH 7.4.
AVT: área ventral tegmental.	PFA: solución amortiguada con PBS de paraformaldehído al 4%.
BDNF: factor de crecimiento derivado del cerebro.	PINK-1: cinasa 1 putativa inducida por PTEN.
ChAT: colina acetiltransferasa.	PLC: fosfolipasa C .
D1, D2: receptores metabotrópicos dopaminérgicos.	RNA: ácido ribonucléico.
DA: dopamina.	SNC: sustancia <i>nigra</i> compacta.
EP: enfermedad de Parkinson.	SNCA: gene que codifica para α -sinucleína.
GABA: ácido gamma-aminobutírico.	SNr: sustancia <i>nigra</i> reticular.
Glu: glutamato.	TH: tirosina hidroxilasa.
GPe: globo pálido externo.	UCH-L1: ubiquitina hidrolasa L1 de carboxilo terminal.
GPI: globo pálido interno.	
InsP ₃ : Inositol 1,4,5-trifosfato.	
M1, M2: receptores metabotrópicos muscarínicos colinérgicos.	

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

TEMA	PÁGINA
Cuadro 1. Factores relacionados con la etiología de la enfermedad de Parkinson.....	17
Figura 1. Regulación de las aferencias excitatorias corticales por las poblaciones neuronales que participan en el circuito estriatal y su conectividad.....	23
Figura 2. Interacciones bidireccionales de la dopamina y acetilcolina en el estriado.....	25
Figura 3. Inyección unilateral de 6-hidroxidopamina mediante aparato estereotáxico.....	28
Figura 4. Dibujos obtenidos a través de una cámara lúcida que muestran ejemplos de ratones con lesiones parciales o totales del núcleo caudado.....	31
Figura 5. Se muestran ejemplos de dibujos obtenidos a través de la cámara lúcida, y los trazados empleados para evaluar las zonas medial y lateral, en el núcleo caudado de ratones con lesiones parciales o totales.....	32
Figura 6. Dibujos representativos de somas de interneuronas colinérgicas gigantes obtenidos a través de una cámara lúcida.....	33
Figura 7. Denervación dopaminérgica variable en el caudoputamen.....	35

Figura 8. Evaluación del área dopaminérgica inervada en el caudoputamen lesionado.....	36
Figura 9. A-B. Distribución de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión parcial. Inmunohistoquímica para colina acetiltransferasa (ChAT).....	38
Figura 9. C. Evaluación del número de interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión parcial.....	39
Figura 10. A-B. Distribución de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión total. Inmunohistoquímica para ChAT.....	40
Figura 10. C. Evaluación del número de interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión total.....	41
Figura 11. A-B. Evaluación morfológica de las interneuronas colinérgicas en el núcleo caudado con lesión parcial. Inmunohistoquímica para ChAT.....	43
Figura 11. C. Evaluación del área somática de las interneuronas colinérgicas en el núcleo caudado con lesión parcial.....	44
Figura 12. A-B. Evaluación morfológica de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión total. Inmunohistoquímica para ChAT.....	45
Figura 12. C. Evaluación del área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión total.....	46

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson está asociada a la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas de proyección *nigro*-estriatales. Este proceso degenerativo conduce a los síntomas motores clásicos de la enfermedad. La investigación en el área se ha enfocado principalmente a la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas *nigro*-estriatales como la causa de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, es posible que las respuestas de reorganización de las neuronas estriatales restantes (e.g., interneuronas colinérgicas gigantes) pudiera también intervenir en la patogénesis de la enfermedad. En el presente trabajo, exploramos esta posibilidad evaluando los cambios en el tamaño y densidad de las neuronas colinérgicas en ratones tratados con 6-hidroxidopamina administrada unilateralmente en el núcleo caudado; un modelo bien aceptado que replica las características de la enfermedad de Parkinson en animales experimentales. Nuestros resultados muestran que las interneuronas colinérgicas disminuyen su área somática en las regiones denervadas mediales del núcleo caudado. La densidad de estas interneuronas también disminuye en la región medial del núcleo caudado después de una deafferentación parcial y total. Nuestros datos sugieren que las interneuronas colinérgicas gigantes estriatales pueden estar sujetas a hipotrofia después de la denervación dopaminérgica *nigro*-estriatal al menos después de una lesión neurotóxica. No podemos prever si estos cambios serán permanentes a largo plazo, una circunstancia que será necesario evaluar para explorar la participación de la plasticidad neuronal en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

ABSTRACT

Parkinson's disease is associated with the progressive death of the nigrostriatal-projecting dopaminergic neurons. This degenerative process leads to the classic motor symptoms of the disease. Research on the field has been primarily focused on the progressive degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons as the cause of Parkinson's disease. It is possible, however, that reorganization responses of the remaining striatal neurons (e.g., giant cholinergic interneurons) could also intervene in the pathogenesis of the disease. Here, we explored this possibility by evaluating shifts in cholinergic neuron size and density in mice treated with 6-hydroxydopamine administered unilaterally in the caudate nucleus; this model is well accepted as replicative of Parkinson's disease in experimental animals. Our results showed that cholinergic neurons decrease their somatic area when located in medial denervated regions of the caudate nucleus. The density of these neurons also was found decreased at the medial region of the caudate nucleus following partial and total deafferentation. Hence, our data suggest that striatal cholinergic neurons might be subjected to hypotrophy following nigro-striatal dopaminergic denervation at least after neurotoxic lesion. We cannot foresee whether these changes are permanent in the long term, a circumstance that will be needed to evaluate in order to explore the participation of neuronal plasticity in pathogenesis of Parkinson's disease.

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

Enfermedad de Parkinson: Generalidades y reflexiones

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un serio problema de salud entre la población mundial mayor de 50 años (Fearnley y Less, 1991). De ellas, la enfermedad de Parkinson (EP) ocupa la segunda posición en frecuencia y prevalencia solo por debajo de la enfermedad de Alzheimer. Dada la tasa de envejecimiento de la población mundial, se estima que el número de nuevos casos de pacientes que sufrirán EP se incrementará significativamente en el transcurso de las siguientes tres décadas. Así, estudios encaminados a establecer la etiología, entender la fisiopatología y promover el desarrollo de medidas que prevengan, retrasen, traten o aminoren la aparición y/o la evolución sintomatológica de la EP son de suma importancia para la biomedicina.

La EP es una enfermedad que afecta tanto a las neuronas aminérgicas del sistema nervioso central (e.g. dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* y área ventral tegmental, noradrenérgicas del *locus coeruleus*; Blum et al., 2001) como a aquellas del sistema nervioso periférico (e.g. ganglios simpáticos paravertebral y celíaco, plexos de Auerbach, axones noradrenérgicos del plexo submucosal colónico y médula adrenal, axones dopaminérgicos del nervio simpático cardiaco y ganglios simpáticos paravertebrales; Ohama e Ikuta, 1976; Schmidt et al., 1991; Orimo et al., 2008; Lebouvier et al., 2010). La afectación neuronal es, sin embargo, asincrónica pues las neuronas catecolaminérgicas periféricas y las dopaminérgicas nigrales parecen ser las que se afectan predominantemente durante las etapas tempranas-intermedias de la enfermedad (Levoubier et al., 2010), seguidas por las catecolaminérgicas, serotoninérgicas y colinérgicas centrales en las fases intermedias-tardías del padecimiento (Perry et al., 1985; Hirsch et al., 1987). Es este proceso neurodegenerativo secuencial el que seguramente explica la aparición de síntomas y signos disautonómicos “inespecíficos” (e.g., hipotensión

ortostática) en las etapas tempranas, la pérdida de la olfacción y la desregulación motora (temblor en reposo/vigilia, rigidez, hipotonía muscular facial, dificultad para iniciar y detener el movimiento) características de las etapas intermedias del padecimiento, para finalmente evolucionar a la instalación de problemas cognitivos (depresión, cambios del temperamento y demencia) en las etapas más tardías del mismo (Kish et al., 1988; Lee et al., 2004; Hilker et al., 2005). Es importante resaltar, sin embargo, que en la mayor parte de los pacientes EP la sintomatología y signología progresan de forma irregular y poco predecible en el tiempo, y que en realidad un porcentaje relativamente bajo de estos pacientes alcanzan las fases más tardías de la enfermedad desarrollando alteraciones cognitivas severas como demencias. De hecho, no es infrecuente que la EP parezca estabilizarse en sus etapas intermedias en un número significativo de pacientes. Esta heterogeneidad ha conducido a la concepción de que la EP no constituye en sí misma un estado nosológico específico y bien definido, sino que encuadra a un conjunto de enfermedades que comparten el síndrome parkinsoniano motor.

Con relación a su etiología, entre las causas que conducen al desarrollo de síndromes parkinsonianos, se ha reportado la recepción frecuente de golpes sub-letales en la cabeza en practicantes de deportes de contacto y víctimas de violencia con parkinsonismo por encefalopatía traumática crónica (demencia pugilística; McKee et al., 2009). Este es un padecimiento caracterizado por la presencia de agregados neurofibrilares de la proteína tau en neuronas y astrocitos. Por otro lado, las infecciones virales (e.g. encefalitis Japonesa, encefalitis de St. Louis; entre otras) también han sido asociadas con el desarrollo de parkinsonismo post-encefálico (Riederer y Foley, 2002); particularmente en la infección por el virus Epstein-Barr se le ha relacionado con reactividad cruzada de anticuerpos contra el virus hacia la proteína α -sinucleína (Espay y Henderson, 2011). El daño cerebral en etapas tempranas del desarrollo (e.g. trauma *in utero* o post-parto e infecciones virales intrauterinas) ha sido asociado a niños con trastornos extrapiramidales en el movimiento (síndrome infantil hipocinético/hipertónico con síntomas parkinsonianos; Riederer y Foley, 2002).

En lo referente a los parkinsonismos por neurotoxicidad y agentes farmacológicos, en la década de los 80's se documentó el desarrollo de un estado agudo de acinesia en usuarios de drogas después de la inyección intravenosa de 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina (MPPP, un análogo del narcótico meperidina). El MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) producido durante la síntesis ilícita del MPPP fue identificado como el agente causal de las manifestaciones clínicas, cuya administración en humanos y monos produce un síndrome parkinsoniano severo e irreversible (con síntomas motores y deterioro cognitivo). La capacidad de este neurotóxico para inhibir al complejo I mitocondrial, generar una pérdida de neuronas dopaminérgicas nigrales y daño agudo a la vía dopaminérgica *nigro-estriatal*, permitió el desarrollo de modelos farmacológicos de la EP en animales (Bové et al., 2005).

En el caso particular de la EP esporádica, las causas que conducen a su instalación son desconocidas. Esta situación dista de ser trivial. La dificultad con la que nos enfrentamos para lograr la identificación cierta de factores etiológicos, con excepción hecha de aquellos parkinsonismos relacionados con la exposición a neurotóxicos (e.g., pesticidas como rotenona; Betarbet et al., 2000; y MPTP en usuarios de drogas; Bové et al., 2005), se relaciona al menos con dos hechos. Por un lado, la EP carece de sintomatología/signología prodrómica reconocida que permita un diagnóstico presuntivo temprano eficaz. Por el otro, el diagnóstico de EP se realiza generalmente en pacientes sintomáticos, por lo que es probable que la enfermedad tenga un tiempo más largo de evolución, al menos de alrededor de 5 años (Fearnley y Less, 1991; Lee et al., 2004, Hilker et al., 2005), circunstancia que abre la posibilidad de que se confundan a los factores y mecanismos fisiopatológicos con aquellos que son responsables de la etiología. Adicionalmente, un tercer hecho que dificulta la identificación de los factores y mecanismos etiológicos de la EP con certidumbre es la carencia de modelos animales que desarrollen a la enfermedad o un síndrome equivalente de manera espontánea. No obstante estas dificultades se han postulado la existencia de 1) factores de predisposición genética, 2) alteraciones del metabolismo de proteínas, del metabolismo energético y del amortiguamiento del calcio

intracelular, 3) deficiencias crónicas en el amortiguamiento de especies reactivas de oxígeno, 4) y la existencia de factores predisponentes asociados a eventos epigenéticos de reprogramación genética durante la ontogenia, como responsables de instaurar el daño inicial (Cuadro 1).

Factores	Mecanismos
Predisposición genética	<p>Las mutaciones en el gen SNCA (ubicado en el loci PARK1) que codifica para α-sinucleína están relacionadas con el comienzo temprano de la enfermedad. En su conformación fibrilar se une a las proteínas sinfilina-1, parkina, ubiquitina y chaperona anti-apoptótica, formando cuerpos de Lewy.</p> <p>Mutaciones en los siguientes loci:</p> <p>PARK2 (cromosoma 6q25.2–q27) en el gen parkina (ubiquitina E3 ligasa).</p> <p>PARK4: 4 copias funcionales del gen para α-sinucleína, causan una enfermedad más severa.</p> <p>PARK5 (cromosoma 4p14) en el gen UCH-L1 (ubiquitina hidrolasa L1 de carboxilo terminal).</p> <p>PARK6 (cromosoma 1p35-36) en el gen PINK-1 (cinasa 1 putativa inducida por PTEN).</p> <p>PARK7 (cromosoma 1p36) en el gen DJ-1 (proteína mitocondrial involucrada en la protección contra el estrés oxidativo).</p> <p>PARK8 (cromosoma 12q12) en el gen LRRK2 (codifica para la proteína dardarina que contiene el dominio catalítico para la enzima tirosina hidroxilasa).</p>
Susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas nigrales al estrés oxidativo	<p>El catabolismo basal de dopamina genera peróxido de hidrógeno mediante la enzima monoamino oxidasa.</p> <p>La auto-oxidación de dopamina por especies reactivas de oxígeno incrementa la producción de radicales libres, quinonas tóxicas y melanina.</p> <p>Las especies reactivas de oxígeno aceleran el proceso de fibrilación de α-sinucleína y la cascada de señalización que activa a las caspasas 9 y 3, conduciendo a apoptosis.</p>
Factores ambientales	La inyección intravenosa de MPTP en usuarios de drogas y la exposición crónica al pesticida rotenona inducen inhibición del complejo I mitocondrial.

Alteraciones del metabolismo energético	La disminución en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial genera incremento de especies reactivas de oxígeno, disminución de ATP, deterioro del bombeo de protones, disminución del potencial de la membrana mitocondrial y apoptosis.
	La generación de especies reactivas de oxígeno y las deficiencias en el sistema de reparación del ADN mitocondrial (ADNm) generan incremento de mutaciones en el ADNm.
Deficiencias crónicas en el amortiguamiento especies reactivas de oxígeno	La disminución de glutatión reducido y glutatión peroxidasa incrementan la producción de radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, que participan en la peroxidación de macromoléculas celulares.
Deficiencias en el amortiguamiento de calcio intracelular	Disminución de calbindina D28K (proteína de unión a calcio) en neuronas dopaminérgicas.
Eventos epigenéticos	La hipometilación de islas CpG en el intron 1 del gen SNCA (que codifica para α -sinucleína) en la sustancia <i>nigra</i> de cerebros <i>post mortem</i> de pacientes con EP esporádica está asociada a la expresión incrementada de α -sinucleína.

Cuadro 1. Factores relacionados con la etiología de la enfermedad de Parkinson. Revisados por Blum et al., 2001; Stecce-Collier et al., 2002; Migliore y Coppedé, 2009; Jowaed et al., 2010; Matsumoto et al., 2010

Desde el punto de vista fisiopatológico, las cosas parecen estar un poco más claras. En general se acepta que las manifestaciones características de la EP se asocian con la muerte de las neuronas aminérgicas (e.g. dopaminérgicas de la sustancia *nigra* compacta y área ventral tegmental, noradrenérgicas del *locus coeruleus*, serotoninérgicas del núcleo de *Raphe dorsalis*; Blum et al., 2001; Jenner y Olanow, 2006), la consecuente denervación de sus sitios blancos y la reducción en los niveles de los neurotransmisores que ellas liberan (Anglade et al., 1995; Deumens et al., 2002; Bové et al., 2005). Dado que los síntomas motores son dominantes y muy evidentes en el cuadro sindromático de la EP, una mayor atención ha sido puesta en el estudio del proceso degenerativo de las neuronas dopaminérgicas de proyección *nigro*-estriatales. Diversas líneas de evidencia sugieren que la muerte progresiva de estas neuronas es el resultado de una combinación factorial que

incluye la reducción en la disponibilidad del Factor de Crecimiento derivado del Cerebro a nivel estriatal, el desarrollo de estrés oxidativo y nitrosativo relacionado con el metabolismo de la dopamina y del amortiguamiento del calcio intracelular, un incremento en el tono glutamatérgico que conduce a excitotoxicidad y un proceso inflamatorio secundario (Jenner y Olanow 2006). Las manifestaciones de la EP aparecen hasta que un porcentaje mayor al 50-70 por ciento de la población neuronal dopaminérgica involucrada muere (lo que se traduce en una disminución del 80 por ciento de la dopamina estriatal disponible) (Kish et al., 1988; Blum et al., 2001, Larch et al., 1992; Hirsh, 2000; Deumens et al., 2002). Este último hecho es importante pues indica que la inervación dopaminérgica muestra una gran reserva funcional que permitiría compensar por la muerte de un porcentaje significativo de las neuronas dopaminérgicas.

Aunque es innegable la importancia que tiene la muerte de las neuronas dopaminérgicas como el evento central de la fisiopatogenia motora de la EP, si uno asume como cierta la presunción de que el síndrome evoluciona de manera progresiva a lo largo de al menos una década previa al diagnóstico, es probable que conforme las neuronas dopaminérgicas mueren, se desarrolle una respuesta de reorganización de los circuitos neuronales involucrados que pudiese también influir negativamente en el funcionamiento de los ganglios basales en pacientes con EP; por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar los cambios plásticos en la morfología de las interneuronas colinérgicas gigantes.

Enfermedad de Parkinson e inadaptación de la plasticidad neural

Tradicionalmente se ha considerado que la reorganización cerebral en respuesta a diversos estímulos posee un valor intrínsecamente adaptativo y por tanto refleja el “esfuerzo neuronal”, en el caso de haber sufrido algún daño, por restablecer lo más cercanamente posible las condiciones de normalidad anatómica y funcional del sistema neural afectado. En la actualidad, sin embargo, esta visión “adaptacionista” de la plasticidad neuronal se ha cuestionado seriamente con base en observaciones que muestran que las respuestas de reorganización o regeneración neurales no siempre

conducen a condiciones morfo-fisiológicas aceptables, útiles o compensatorias sino que por el contrario contribuyen a las manifestaciones fisiopatológicas (e.g., sensación del miembro fantasma; Kohama et al., 2000; Karl et al., 2001; Flor et al., 2006). Esta situación no debe sorprendernos pues las respuestas plásticas neuronales consecutivas a lesiones reflejan, en buena medida, la “necesidad” de sobrevivir de las neuronas que no fueron directamente afectadas por el daño (Gutiérrez-Ospina et al., 2011). Para entender este último argumento debemos recordar que todas las neuronas requieren de un número mínimo crítico de conexiones para sobrevivir debido a que a través de ellas estas obtienen un soporte trófico (Purves, 1990; Purves et al., 2008). En relación a las conexiones neuronales, se ha demostrado que existe una relación directa entre el incremento en el tamaño del soma y la longitud y complejidad del árbol dendrítico (Purves et al., 1990). Estudios efectuados durante el desarrollo postnatal en ratas muestran que, al nacimiento, el tamaño y morfología de las células de los ganglios cervicales superiores es relativamente simple (con pocas ramificaciones dendríticas), y alrededor de la semanas 4 hasta la edad adulta (16 semanas), el aumento en el diámetro celular se encuentra acompañado del incremento en la longitud dendrítica, número de dendritas primarias y extensión del árbol dendrítico (Voyvodic, 1987).

Así, dado que en general existe una relación entre el tamaño del soma y la complejidad de arboles axónicos y dendríticos, si las neuritas de las interneuronas colinérgicas gigantes rebrotan, sus somas deben incrementar su tamaño.

Bajo esta lógica, la muerte celular progresiva que ocurre como elemento fundamental de la EP, induciría una respuesta de rebrote de las neuritas por parte de las neuronas deafferentadas que subsisten en la búsqueda de alcanzar el nivel crítico de conectividad que les permite sobrevivir (Gutiérrez-Ospina et al., 2011). Este hecho podría conducir a la creación de conexiones “aberrantes” que llevarían a una disfunción, si bien garantizarían la preservación de las neuronas remanentes. De esta manera, los procesos de reorganización neuronal podrían ser un elemento fundamental en el desarrollo de la

fisiopatología de la enfermedad y su modulación podría ser terapéuticamente útil (Gutiérrez-Ospina et al., 2011).

En referencia a ello, existen algunos ejemplos de plasticidad inadecuada o mal adaptativa en cerebros de pacientes que sufrieron de EP. En la sustancia *nigra* compacta las alteraciones se presentan en terminales colinérgicas (incremento en el tamaño y número) y GABAérgicas putativas (disminución en el número) en contacto con dendritas dopaminérgicas (Anglade et al., 1995a); mientras que en el núcleo caudado se observan cambios en las aferencias córtico-estriatales (incremento en longitud y número de densidades postsinápticas y en el número de sinapsis perforadas) hacia espinas dendríticas GABAérgicas (Anglade et al., 1996).

De igual forma, datos morfológicos obtenidos en modelos animales farmacológicos aceptados como adecuados para el estudio de la fisiopatología de la EP documentan que la deaferentación dopaminérgica disminuye la longitud y número de ramificaciones dendríticas, así como el número de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas estriatales, en tanto que las interneuronas GABAérgicas incrementan la proporción de sinapsis simples o múltiples que establecen con sus blancos (Ingham et al., 1993; Nitsh y Reisenberg 1995; Solis et al., 2007; Azdad et al., 2009). La reorganización de la conectividad no solo ocurre local y anterógradamente, sino también afecta retrógradamente a las aferentes córtico-estriatales y a las neuronas que le dan origen. Se han reportado el incremento en la longitud de las sinapsis asimétricas córtico-estriatales y la disminución de la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas corticales (Ingham et al., 1993; Meshul et al., 1999; Solis et al., 2007). Estos cambios se asocian con un incremento en la excitabilidad estriatal (Jáidar et al., 2010), una mayor disponibilidad estriatal de glutamato y un incremento en el tono GABAérgico en los núcleos estriatales de salida que probablemente explican parte de la sintomatología/signología observada en los animales “dopaminérgicamente deaferentados” (DeBoer et al., 1993; Jackson et al., 1993; Bata-García et al., 2007), y quizás en los seres humanos afectados por la EP.

Las observaciones comentadas apoyan la idea de que modificaciones plásticas neuronales pudieran participar en la fisiopatología de la EP. Datos adicionales que apoyan esta idea provienen de estudios en los que se ha documentado en ratas, monos y humanos que la administración crónica de levodopa, fármaco que se utiliza para controlar las anomalías motoras características de la EP, conduce a un rebrote de las aferentes serotoninérgicas estriatales que se traduce en discinesias (Rylander et al., 2010). Esta situación solo se presenta en los individuos que sufren el síndrome parkinsoniano experimental o natural y no en cerebros *post mortem* de individuos neurológicamente sanos no-tratados (Rylander et al., 2010), lo que sugiere que los mecanismos de plasticidad están alterados en la EP, conduciendo a reorganizaciones de los circuitos que son mal adaptativas desde el punto de vista funcional.

Enfermedad de Parkinson, hipercolinergia y plasticidad mal adaptativa

Los circuitos que constituyen el sustrato anatomo-funcional sobre el cual se desarrollan los signos y síntomas de la EP están formados por varios sistemas de aferencias, incluida la dopaminérgica, y una vía de salida GABAérgica originada por las neuronas medianas estelares espinosas y por conexiones intrínsecas entre las que destacan aquellas originadas en la interneuronas gigantes colinérgicas (Figura 1). Así, la modificación en el número, geometría y propiedades fisiológicas de estos elementos, rompería el balance necesario para asegurar una adecuada función.

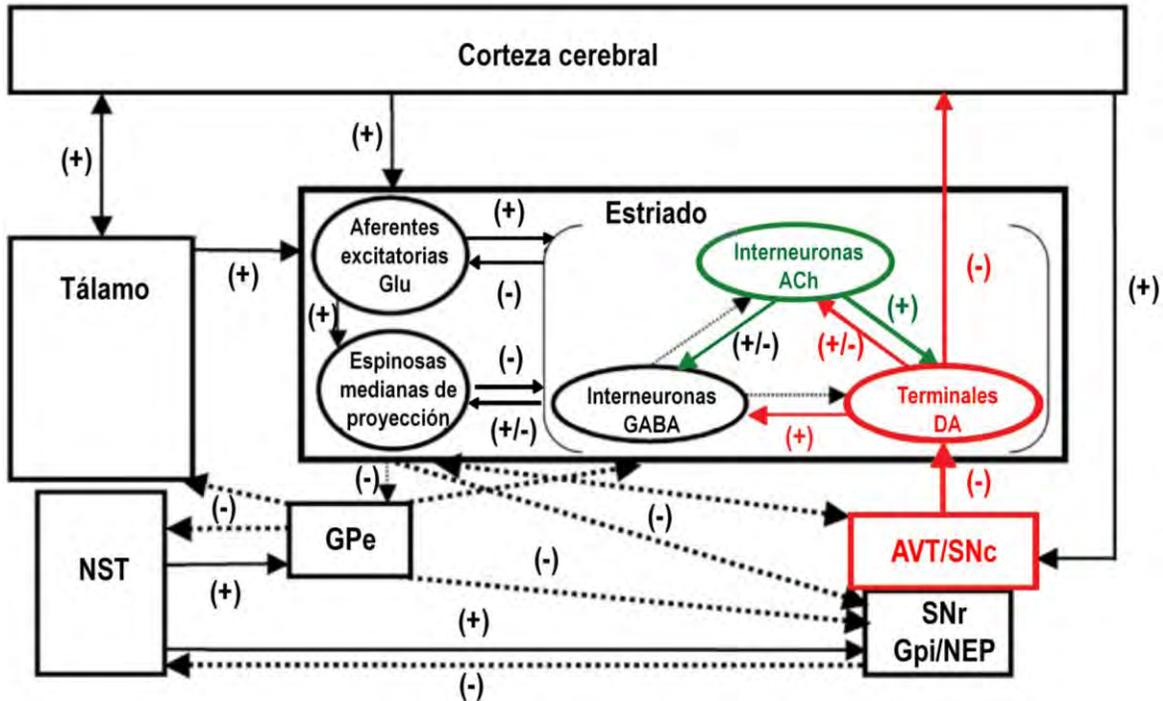


Figura 1. Regulación de las aferencias excitatorias corticales por las poblaciones neuronales que participan en el circuito estriatal y su conectividad. (+) Excitación; (-) inhibición; (+/-) excitación/inhibición. *Glu*, glutamato; *ACh*, acetilcolina; *DA*, dopamina *GPe*, globo pálido externo; *Gpi*, globo pálido interno; *NEP*, núcleo entopeduncular; *SNc*, sustancia *nigra* compacta; *SNr*, sustancia *nigra* reticular; *NST*, núcleo subtalámico; *AVT*, área ventral tegmental. Imagen modificada de Zhou et al., 2002, con información adicional de Pisani et al., 2003; Tepper y Bolam, 2004.

En condiciones normales, la acetilcolina liberada por las interneuronas colinérgicas gigantes facilita la secreción de dopamina desde las aferentes *nigro*-estriatales. Una vez liberada la dopamina, reduce la secreción de acetilcolina desde las interneuronas colinérgicas. El arreglo descrito genera un balance de la disponibilidad de dopamina y acetilcolina no solo en las sinapsis establecidas entre las neuronas de proyección *nigro*-estriatales y las interneuronas colinérgicas gigantes, sino en las sinapsis establecidas entre ambas con las aferentes córtico-estriatales glutamatérgicas y con las neuronas estelares espinosas GABAérgicas de proyección (Figura 2). Por consiguiente, la eliminación de la vía dopaminérgica *nigro*-estriatal establece un estado de hipercolinergia asociado a la dominancia del tono colinérgico dependiente, en mayor grado, de las interneuronas

colinérgicas gigantes (Spehlmann y Stahl, 1976; DeBoer et al., 1993; Jackson et al., 1993; Sanchez et al., 2011).

No obstante, se ha sugerido que la degeneración de las fibras y neuronas dopaminérgicas *nigro*-estriatales pudiera resultar en el rebrote de los axones de las interneuronas colinérgicas en el núcleo caudado (Spehlmann y Stahl, 1976), aumentándose así la innervación colinérgica estriatal y con ello en la disponibilidad de acetilcolina, hecho que podría conducir a la rigidez característica de los pacientes EP (Barbeau, 1962; Duvoisin, 1967; Spehlmann y Stahl, 1976). En referencia a ello, estudios clínicos efectuados en pacientes con EP en grado variable, muestran que la aplicación de inhibidores de la acetilcolinesterasa (fisostigmina) exacerba la sintomatología parkinsoniana (e.g. incremento del temblor en reposo, rigidez, anomalías en la postura, alteraciones en el lenguaje), en tanto que la administración posterior de fármacos anticolinérgicos (e.g. benztropina) conduce al mejoramiento de estas manifestaciones en algunos pacientes solamente, básicamente en aquellos pacientes que no responden a la terapia dopaminérgica (Duvoisin, 1976). Debemos enfatizar que, no obstante la congruencia de esta hipótesis, el desarrollo de respuestas plásticas por parte de las neuronas colinérgicas estriatales, si bien esperable, no ha sido sistemáticamente explorado por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo el iniciar un proyecto que caracterice las respuestas plásticas de las interneuronas colinérgicas gigantes en respuesta a la deafferentación dopaminérgica del núcleo caudado, utilizando un modelo de ratón hemiparkinsoniano. De ser positivos los resultados obtenidos, estos nos permitirían reforzar la idea de que la plasticidad mal adaptativa constituye una parte fundamental de los mecanismos fisiopatológicos de la EP, y nos permitiría empezar a considerar medidas de modulación de la plasticidad neuronal como parte del arsenal de posibilidades terapéuticas para la enfermedad.

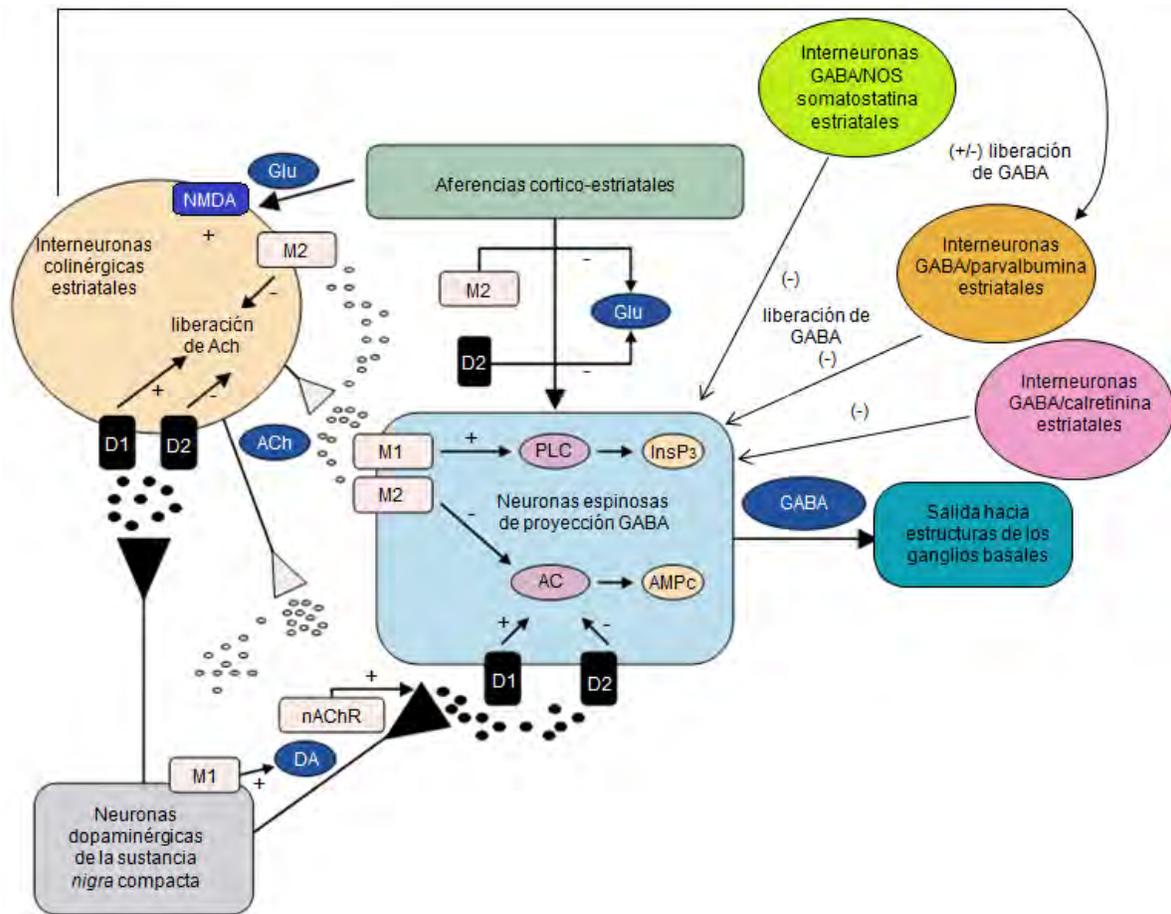


Figura 2. Interacciones bidireccionales de la dopamina y acetilcolina en el estriado. La acetilcolina de las interneuronas colinérgicas controla la liberación de dopamina, actuando sobre receptores nicotínicos (nAChR) localizados sobre las terminales dopaminérgicas y sobre receptores muscarínicos M1 localizados sobre las neuronas en la sustancia *nigra* compacta. La acetilcolina también actúa sobre los receptores M1 y M2 en las neuronas GABAérgicas espinosas estriales, reduce la liberación de glutamato de las terminales glutamatérgicas actuando sobre los receptores M2, y controla su propia liberación actuando sobre auto-receptores M2. Sin embargo, la dopamina a través de la interacción con receptores dopaminérgicos D1 y D2, expresados por las interneuronas colinérgicas, incrementa y reduce (respectivamente) la liberación de acetilcolina. La dopamina a partir de la sustancia *nigra* pars compacta actúa sobre los receptores D1 y D2 sobre las neuronas espinosas GABAérgicas, incrementando y reduciendo (respectivamente) la liberación de GABA; en tanto que la dopamina reduce la liberación de glutamato actuando sobre receptores D2 localizados sobre las terminales glutamatérgicas estriales. AC, adenililciclase; ACh, acetilcolina; AMPc, adenosinmonofosfato cíclico; D1 y D2, receptores metabotrópicos dopaminérgicos; DA, dopamina; GABA, ácido gamma-aminobutírico; Glu, glutamato; InsP3, Inositol 1,4,5-trifosfato; M1 y M2 receptores

metabotrópicos muscarínicos colinérgicos; nAChR, receptor ionotrópico nicotínico colinérgico; NMDAR, receptor ionotrópico de glutamato (N-metil D-aspartato); NOS, óxido nítrico sintetasa; PLC, fosfolipasa C. Imagen modificada de Calabresi et al., 2006, con información adicional de Dimova et al., 1993; Koós y Tepper, 2002; Pisani et al., 2003; Tepper y Bolam, 2004; Purves, 2008.

Modelo de inyección unilateral de 6-OHDA

Las causas que desencadenan la aparición de la enfermedad de Parkinson idiopática a la fecha son desconocidas, sin embargo el entendimiento de algunos factores asociados a la patogénesis de la EP provienen de investigaciones desarrolladas en modelos experimentales en animales empleando neurotoxinas, para recapitular algunas características distintivas de la EP idopática (Bové et al., 2005). Puesto que la 6-OHDA es un neurotóxico selectivo para neuronas catecolaminérgicas (dopaminérgicas y noradrenérgicas), su auto-oxidación intracelular en las neuronas dopaminérgicas reproduce algunas de las alteraciones observadas en la enfermedad de Parkinson idiopática, tales como generación de radicales libres y disfunción mitocondrial, induciendo una pérdida estable de neuronas dopaminérgicas nigrales y disminución de dopamina estriatal (Alvarez-Fischer et al., 2008).

La inyección unilateral de 6-OHDA en estriado de ratón, es un modelo farmacológico de la EP bien caracterizado (Alvarez-Fischer et al., 2008). La inyección unilateral en el estriado, presenta las ventajas de que operativamente es más sencilla por el gran tamaño de esta estructura, produce una baja mortalidad en los ratones lesionados (10%) y permite evaluar un comportamiento motor asimétrico (espontáneo o al administrar agentes farmacológicos) que es de utilidad para evaluar la eficacia de la lesión, la efectividad de agentes terapéuticos y/o complicaciones motoras asociadas a la terapia dopaminérgica de reemplazo (e.g. discinesia) (Iancu et al., 2005; Cenci y Lundbland, 2007; Alvarez-Fischer et al., 2008).

HIPÓTESIS

La denervación dopaminérgica en el núcleo caudado estriatal se asociará con cambios morfológicos de las interneuronas colinérgicas consistentes en un incremento en el tamaño del soma como consecuencia de un aumento de la complejidad de los árboles dendríticos y axonales.

OBJETIVO GENERAL

Comparar los cambios en el número y en el área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado de ratones lesionados unilateralmente con 6-hidroxidopamina.

Objetivos particulares

1. Comparar los cambios en el número de somas colinérgicos por unidad de área evaluada, entre las zonas parcial o totalmente denervadas de fibras dopaminérgicas *nigro*-estriatales en ratones C57BL6 machos, inyectados unilateralmente con 6-OHDA; mediante cortes cerebrales con inmunotinciones para colina acetiltransferasa, microscopía de campo claro y técnicas morfométricas digitales.
2. Comparar los cambios en el tamaño de los somas de las interneuronas colinérgicas gigantes entre las zonas parcial o totalmente denervadas de fibras dopaminérgicas *nigro*-estriatales en ratones C57BL6 machos, inyectados unilateralmente con 6-OHDA; mediante cortes cerebrales con inmunotinciones para colina acetiltransferasa y contratinción nuclear con verde de metilo, empleando microscopía de campo claro y técnicas morfométricas digitales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este trabajo se emplearon 10 ratones machos jóvenes de la cepa C57BL6 en un rango de peso de 25-30 g (para minimizar las diferencias en el tamaño del cerebro). Estos animales fueron inyectados unilateralmente con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) aplicada en



Figura 3. Inyección unilateral de 6-hidroxidopamina mediante aparato estereotáxico.

el núcleo caudado, con el objetivo de producir una degeneración neurotóxica retrógrada del sistema dopaminérgico *nigro*-estriatal (Blum et al., 2001; Cenci y Lundbland, 2007; Simola et al., 2007). Durante los procedimientos pre- y post-operatorios, los animales fueron mantenidos en el módulo de alojamiento temporal para animales de la nueva sede del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo ciclos de luz-oscuridad controlados (12-12 hrs) y alimento y agua a libre acceso. Los protocolos de manejo, experimentales y quirúrgicos efectuados en los ratones empleados fueron aprobados por el Comité de Bioética de este Instituto.

Administración unilateral de 6-OHDA en el núcleo caudado

Los ratones (n=10) fueron anestesiados (isoflurano) y montados en un aparato estereotáxico (Figura 3). Una vez expuesta la superficie cerebral, se introdujo una cánula a través de la cual se infundió 1 μL de una solución de 6-OHDA (80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y ácido ascórbico (32.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) disueltos en solución salina fisiológica, con ayuda de una bomba de perfusión (250nL/min; coordenadas: antero-posterior +0.01, medio-lateral -0.20 y dorso-ventral -0.35; Franklin y Paxinos, 2007). La concentración de 6-OHDA empleada fue

elegida con base en observaciones previas, empleando una inyección de 1 μL de 6-OHDA a concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Ésta última concentración induce deafferentación dopaminérgica en la mayoría del estriado. No obstante algunas fibras dopaminérgicas permanecen y se presenta variabilidad interindividual en la extensión de la lesión. La confirmación de estas lesiones fue efectuada mediante inmunohistoquímica para TH, dos semanas posteriores a la inyección (Valle-Leija, comunicación personal).

Finalizada la perfusión se dejó reposar la cánula por 5 minutos antes de retirarla. Concluida la cirugía, se aplicó un antiséptico local, se administraron analgésicos (Napzin; 2.5 mg/kg peso/ 4 días) y antibióticos (Baytril; 10 mg/kg peso/ 4 días) y se permitió la recuperación de los ratones vigilando cuidadosamente su estado físico.

Obtención, procesamiento e inmunotinción de las muestras histológicas

Después de la inyección se dejaron transcurrir catorce días, ya que se ha reportado que la administración unilateral de 6-OHDA en el estriado de ratones, a partir de 7 días produce una pérdida estable de neuronas dopaminérgicas nigrales y una reducción estable en los niveles de dopamina estriatal (con niveles remanentes de 32.2% y 27.5%, respectivamente; Alvarez-Fisher et al., 2008). Transcurrido este tiempo, los ratones fueron anestesiados (ketamina, 70 mg/Kg de peso, intraperitoneal / xilacina, 10 mg/Kg de peso, intraperitoneal) y perfundidos por vía intracardiaca con una solución amortiguadora de fosfatos-salina (PBS; 0.1 M, pH 7.4) durante 10 minutos, seguida de una solución amortiguada con PBS de paraformaldehído (PFA; 4%) administrada a 4°C durante 15 minutos. Se procedió a la extracción y post-fijación del cerebro en PFA durante 2 horas a 4°C para, posteriormente, ser transferido y almacenado a 4°C en una solución de sacarosa al 30% en PBS hasta su ulterior uso.

La eficacia de la lesión fue monitoreada mediante la utilización de una técnica inmunohistoquímica dirigida a la detección de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH); enzima limitante involucrada en la síntesis de dopamina (Purves 2008). La identificación de las neuronas colinérgicas fue realizada a través del uso de inmunotinciones dirigidas a la detección de la enzima Colina Acetiltransferasa (ChAT por sus siglas en inglés); enzima

responsable de la síntesis de la acetilcolina (Izzo y Bolam, 1988; Dimova et. al., 1993). Para ello, los cerebros de ratones lesionados fueron congelados y cortados coronalmente (32 cortes totales con un grosor de 50 μm) en un criostato, procurando abarcar una fracción significativa del núcleo caudado (1600 μm lineales totales). Series de 16 cortes por cada ratón fueron colectados, lavados en PBS adicionado con Tritón X-100 (0.3%; PBT) e incubados con peróxido de hidrógeno (3% en PBS) durante 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en PBT, los cortes fueron incubados con solución de bloqueo (suero de caballo al 5% en PBT; SB) durante 2 horas a 4°C con agitación, para posteriormente ser incubados con anticuerpos primarios anti-TH de rata producido en oveja (1: 1500 en SB; 18-20 hrs; Chemicon) o anti-ChAT de rata producido en ratón (1:500 en SB; 72 horas, Chemicon) diluidos en PBT a 4°C con agitación; cortes contiguos fueron inmunoteñidos con cada anticuerpo de forma alternada. Al término del periodo, se efectuaron 3 lavados con PBT, y los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes anti-IgG de oveja producido en burro (1:1000 en PBT; 2 horas, Chemicon) y anti-IgG de ratón producido en burro (1:500 en PBT, 3 horas, Chemicon) acoplados a biotina. Después de 3 lavados, los cortes fueron incubados con el complejo avidina/biotina/peroxidasa (ABC kit, Vector Laboratories) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Terminado el periodo, se efectuaron 3 lavados en PBT y se reveló la actividad de peroxidasa usando el estuche comercial de 3,3-diaminobencidina/H₂O₂ (Vector Laboratories). Finalmente, los cortes fueron fijados en PFA durante 10 minutos a 4°C con agitación, lavados en PBS, colocados en laminillas cubiertas con gelatina, contra-teñidos o no con verde de metilo (sólo los cortes inmunomarcados para ChAT) y montados con Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific).

Determinación del área de lesión

La estimación del área total denervada de dopamina en el caudoputamen fue realizada para cada ratón a partir de dibujos de cámara lúcida digitalizados, obtenidos con base en las series de cortes inmunoteñidos para TH (Figura 4), mediante la ayuda de un

microscopio de campo claro (4X; Optiphot 2 o Labophot 2, Nikon). Se consideró como denervada el área del núcleo caudado que en cada corte careció de inmunotinción. Las estimaciones de las áreas libres de lesión y de las afectadas por la misma fueron realizadas con el programa Image J (NIH), calibrando las referencias a un milímetro cuadrado. En los animales con denervación parcial, se evaluó un rango de 2 a 7 cortes (promedio, 3 cortes/ratón). En los animales con denervación total, se evaluaron 9 a 10 cortes (promedio, 9 cortes/ratón).

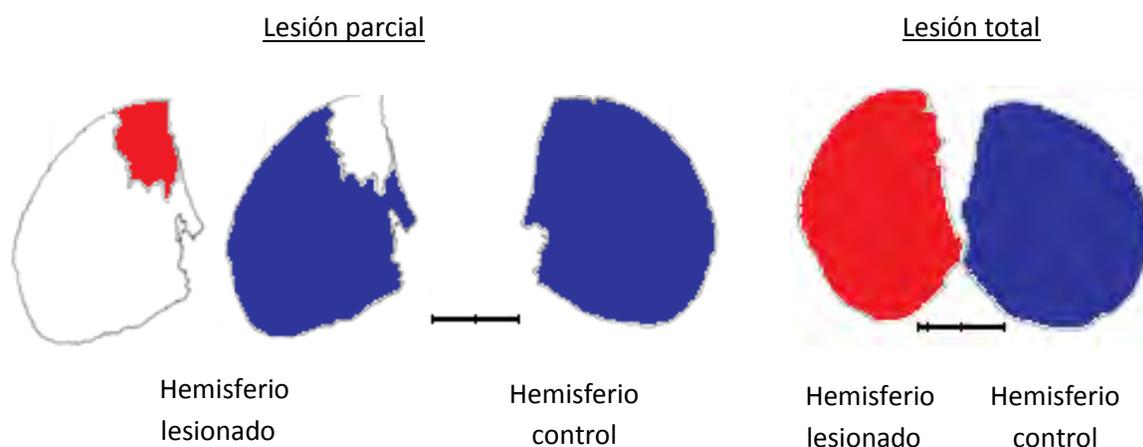


Figura 4. Dibujos obtenidos a través de una cámara lúcida que muestran ejemplos de ratones con lesiones (área en rojo) parciales o totales del núcleo caudado. El área en azul representa aquella que permaneció inervada. Cada área fue evaluada por separado. Escala=1 mm.

Evaluación del área denervada en el núcleo caudado

En cada animal se seleccionaron los dibujos de 2 a 3 cortes contiguos inmunoteñidos para TH, con mayor denervación en el caudoputamen.

La evaluación de las áreas parcial y totalmente lesionadas, se realizó estableciendo 2 regiones (medial y lateral) [Figura 5] en el núcleo caudado de ambos hemisferios. La zona parcialmente denervada se delimitó trazando un cuadrado [Figura 5]. Se efectuó el mismo trazado en la zona lateral inervada, y en las correspondientes del hemisferio intacto. Las dimensiones de los trazos se promediaron y aplicaron a los dibujos de los animales con

denervación total [Figura 5]. Los 54 dibujos obtenidos fueron procesados y evaluados en la forma descrita.

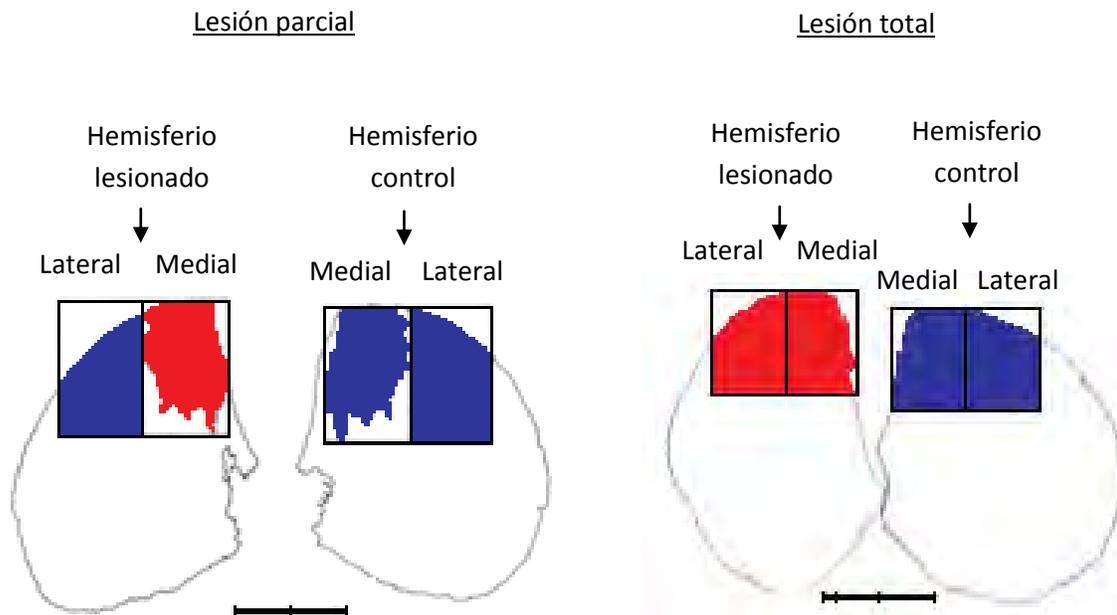


Figura 5. Se muestran ejemplos de dibujos obtenidos a través de la cámara lúcida, y los trazados empleados para evaluar las zonas medial y lateral en el núcleo caudado de ratones con lesiones (área en rojo) parciales o totales. El área en azul representa aquella que permaneció inervada. Cada área fue evaluada por separado. Escala=1mm

Determinación del número de interneuronas colinérgicas

El número de interneuronas colinérgicas gigantes en los animales con denervación parcial y total fue estimado contando e indicando los perfiles celulares inmunoreactivos para ChAT sobre los trazos del núcleo caudado dibujados con base al material contiguo inmunoteñido para la detección de TH, utilizando una cámara lúcida y bajo un aumento de 4X. La identidad de los perfiles celulares considerados siempre se corroboró a mayor aumento (32X). Nuestros conteos incluyeron interneuronas colinérgicas gigantes ubicadas tanto en la zona denervada como en la periferia contigua y lejana que mostraran somas

de morfología normal o ligeramente retraído y al menos la emergencia de los procesos dendríticos primarios. El conteo se efectuó empleando un contador manual. El número (densidad) de interneuronas colinérgicas se obtuvo dividiendo el número de células entre el área estimada para cada región evaluada.

Determinación del tamaño somático de las interneuronas colinérgicas

El área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes fue obtenida a partir de dibujos de cámara lúcida digitalizados, realizados con base en el material histológico inmunoteñido para la detección de ChAT contra-teñidos con verde de metilo bajo un aumento de 100X (Figura 6). Se dibujaron un máximo de 10 somas colinérgicos por cada zona evaluada. Nuestras estimaciones incluyeron interneuronas colinérgicas gigantes ubicadas tanto en la zona denervada como en la periferia contigua que mostraran somas de morfología normal o ligeramente retraído y al menos la emergencia de los procesos dendríticos primarios. Siempre se procuró dibujar el contorno celular máximo a un nivel que permitió la identificación clara del núcleo neuronal. Se dibujaron un total de 328 somas.

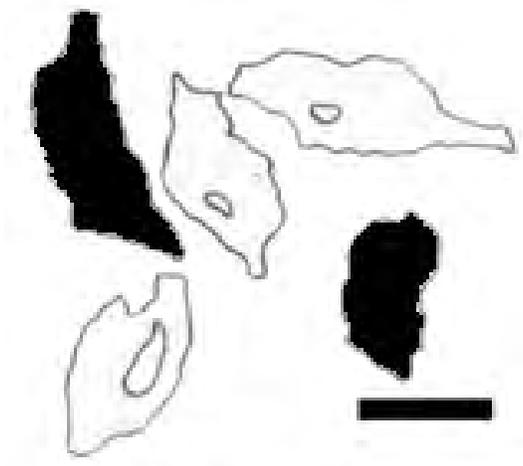


Figura 6. Dibujos representativos de somas de interneuronas colinérgicas gigantes obtenidos a través de una cámara lúcida. En negro se muestran ejemplos utilizados para medir el área de los mismos. Escala=10 μ m.

Análisis estadístico

En los grupos denervación parcial (n= 8 ratones) y total (n= 2 ratones), el análisis estadístico para cada evaluación se efectuó empleando el programa 5.0 (GaphPad Prism). Se aplicó la prueba de distribución normal de Kolmogorov-Smirnov, y los datos de las cuatro regiones evaluadas que superaron la prueba mostrando una distribución normal, fueron analizados mediante las pruebas paramétricas de análisis de varianza de una vía y comparaciones múltiples de Bonferroni, considerándose $P < 0.05$ como significativo. Tal es el caso de los valores promedio en el número de neuronas entre las zonas denervada y no denervada en dopamina en el núcleo caudado lesionado y no lesionado para el grupo de ratones con denervación parcial; así como para los valores promedio del área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes, entre las zonas denervada y no denervada en dopamina en el núcleo caudado lesionado y no lesionado para el grupo de ratones con denervación parcial.

Los casos en los cuales uno o más, de los cuatro grupos de datos para las regiones evaluadas, no presentaron distribución normal, se aplicaron las pruebas no-paramétricas de ANOVA Kruskal-Wallis seguidas de comparaciones múltiples de Dunn, considerándose $P < 0.05$ como significativo. Tal es el caso de los valores promedio de las áreas inervadas en dopamina en el caudoputamen lesionado y no lesionado para ambos grupos de ratones; para los valores promedio en el número de neuronas entre las zonas denervada y no denervada en dopamina en el núcleo caudado lesionado y no lesionado para el grupo de ratones con denervación parcial; así como para los valores promedio del área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes entre las zonas denervada y no denervada en dopamina en el núcleo caudado lesionado y no lesionado para el grupo de ratones con denervación total.

RESULTADOS

Área dopaminérgica lesionada en el caudoputamen

Los resultados obtenidos a través del procedimiento descrito fueron heterogéneos. Algunos animales mostraron deafferentaciones restringidas, otros más extendidas y unos pocos totales (Figuras 7 y 8).

El área que preserva la inervación dopaminérgica en el caudoputamen lesionado con denervación total (n=2 ratones), disminuyó significativamente al compararla con aquella observada tanto el hemisferio lesionado denervado parcialmente (n=8 ratones), como con el hemisferio intacto de ambos animales. En el caudoputamen lesionado con denervación parcial, se observó una tendencia a reducir el área dopaminérgica inervada al compararla con las regiones inervadas de los hemisferios intactos de ambos animales (Figura 8). No obstante ello, llevamos a cabo las determinaciones morfológicas planeadas indistintamente de la magnitud de la denervación.

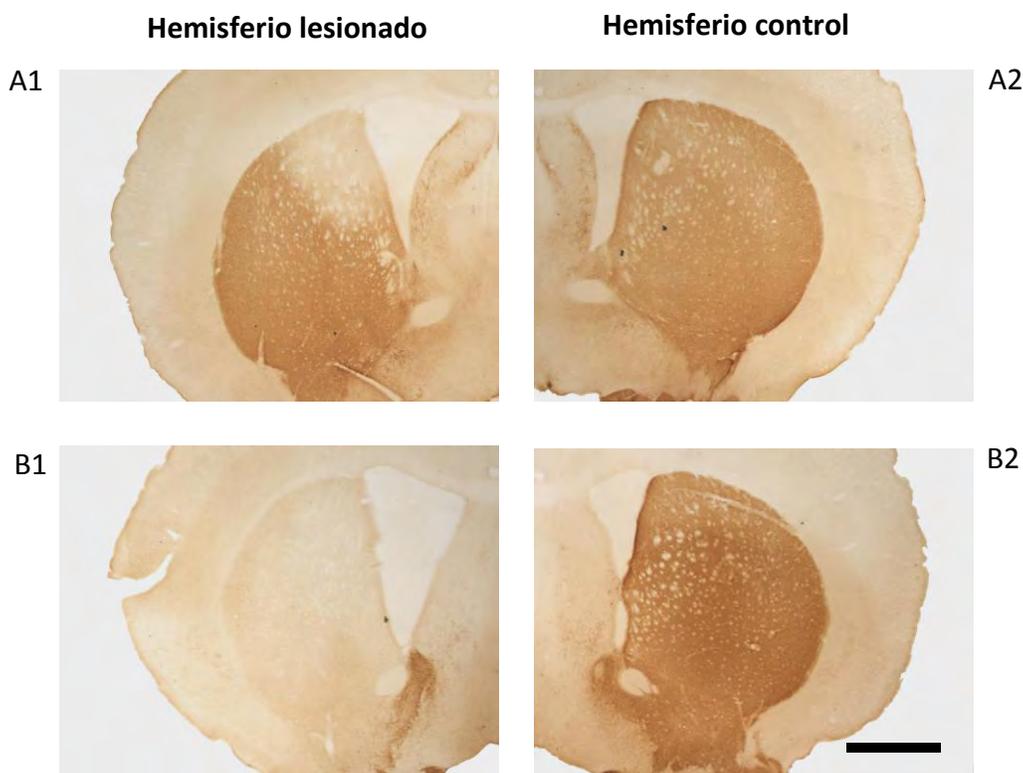


Figura 7. Denervación dopaminérgica variable en el caudoputamen. Inmunotinción para la enzima tirosina hidroxilasa (TH, café) en cortes cerebrales de ratones lesionados. **(A1)** Denervación dopaminérgica parcial. En el hemisferio lesionado se observa pérdida de inmunoreactividad para TH en el núcleo caudado medial. **(B1)** Denervación dopaminérgica total. En el hemisferio lesionado, se aprecia ausencia de la marca en la totalidad del caudoputamen. **(A2,B2)** En el hemisferio control de ambos grupos de ratones, la marca se mantiene intacta. Aumento 2.5x. La escala corresponde a 1 mm.

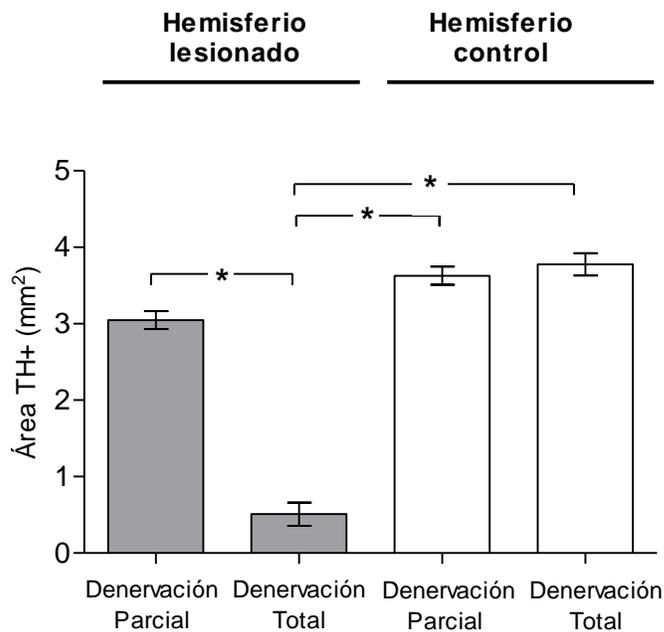


Figura 8. Evaluación del área dopaminérgica inervada en el caudoputamen lesionado. Denervación parcial, n= 8 ratones, 29 cortes evaluados. Denervación total, n= 2 ratones, 19 cortes evaluados. Media +/- error estándar. Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn *P<0.0001.

Número de interneuronas colinérgicas gigantes

El número de interneuronas colinérgicas gigantes en la zona medial denervada parcialmente del núcleo caudado disminuyó significativamente al compararlo con el observado tanto con regiones no deaferentadas del hemisferio afectado, como con regiones no deaferentadas laterales en el hemisferio control (Figura 9C).

En la zona medial denervada totalmente, ésta disminución fue significativa al compararla con regiones no deaferentadas laterales en el hemisferio control de los ratones lesionados (Figura 10C). En la región lateral denervada totalmente, se observa una tendencia a la disminución en el número de interneuronas colinérgicas gigantes al compararla con su homóloga inervada en el hemisferio intacto.

Lesión parcial (8 ratones)

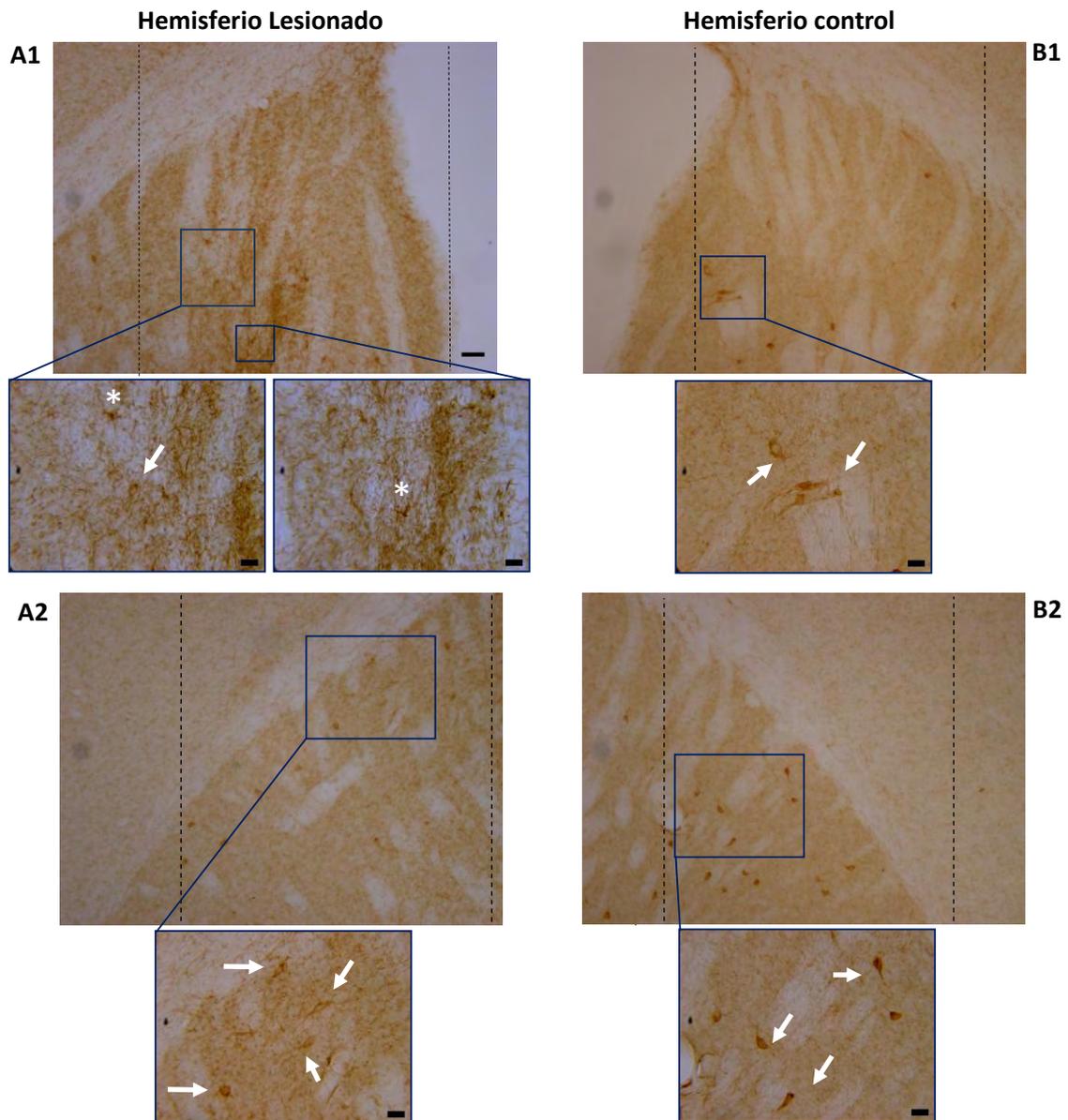


Figura 9. A-B. Distribución de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión parcial. La inmunohistoquímica para ChAT muestra las interneuronas colinérgicas en los hemisferios lesionado (A1,A2) y control (B1,B2). Las líneas punteadas delimitan las zonas evaluadas. **A.** En el hemisferio lesionado, en la zona denervada medial (A1) se observa una interneurona (inserto, flecha) en la zona de lesión. Dentro de ésta, se aprecian restos celulares amorfos con inmunorreactividad incrementada (probablemente células muertas; insertos, asteriscos). En la zona inervada lateral (A2) se aprecia una mayor cantidad de interneuronas (inserto, flechas), en comparación con A1. **B.** En el hemisferio control la zona inervada medial (B1) presenta células con morfología normal (inserto, flechas) y en menor número; en comparación con A1. En la zona inervada lateral (B2) se aprecia un mayor número de interneuronas (inserto, flechas), en comparación con A1 y B1. Imágenes de distribución de las interneuronas: aumento 10x, escala 50 μ m. Insertos, aumento 32x, escalas 20 μ m.

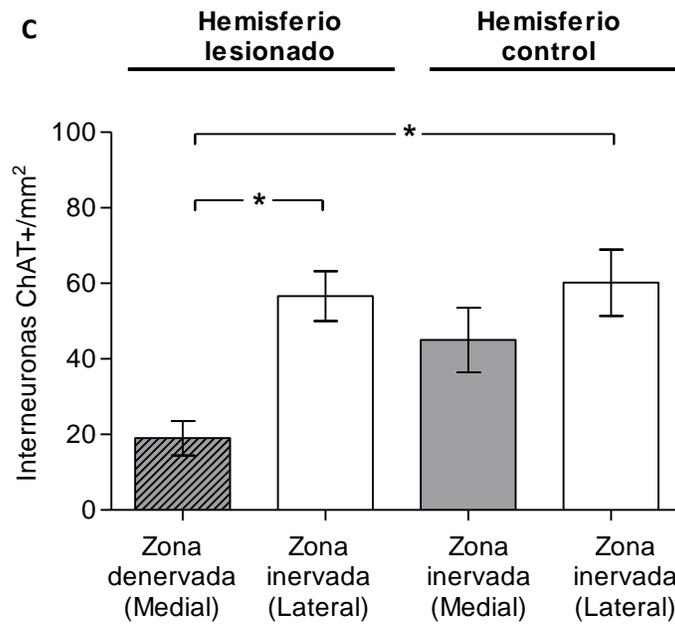


Figura 9. C. Evaluación del número de interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión parcial, 11 cortes totales evaluados, 1-2 cortes por ratón. Media +/- error estándar. Anova de una vía $P=0.0011$ y *post-hoc* Bonferroni $*P<0.05$.

Lesión total (2 ratones)

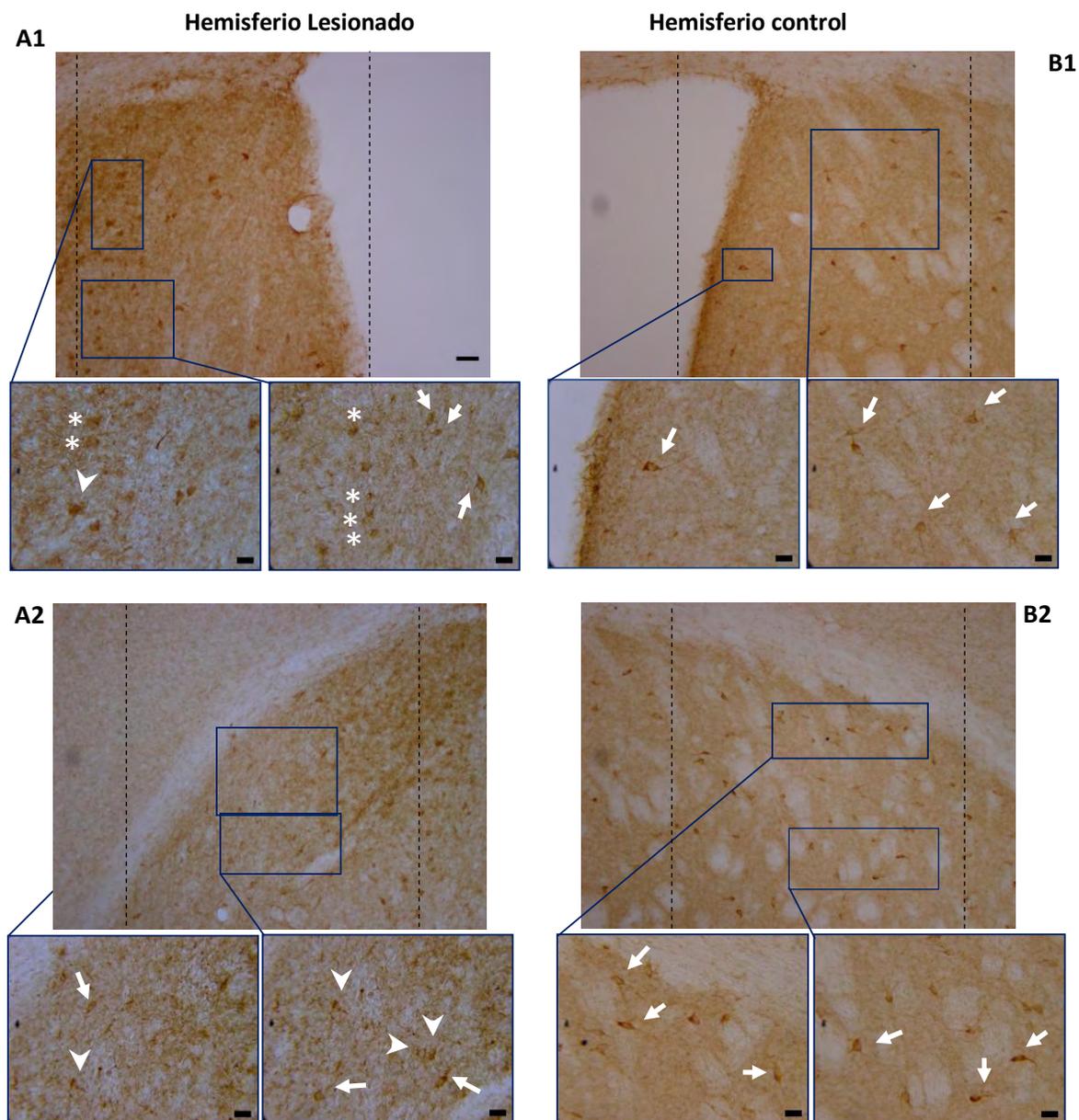


Figura 10. A-B. Distribución de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión total. Inmunohistoquímica para ChAT en las zonas evaluadas. **A.** En el hemisferio lesionado, las zonas medial (A1) y lateral (A2) denervadas en dopamina presentan incremento de la marca, y restos celulares amorfos con inmunorreactividad incrementada (probablemente células muertas; insertos, asteriscos) intercalados con células de morfología alterada (inserto, cabeza de flecha). En las regiones periféricas, se aprecian células con inmunorreactividad variable (inserto, flecha). **B.** En el hemisferio control, las zonas inervadas medial (B1) y lateral (B2) presentan células con morfología normal (inserto, flecha) y el marcaje para la enzima se aprecia con claridad. En las zonas mediales de ambos hemisferios (A1,B1), las células se distribuyen homogéneamente y se observa una menor densidad, en comparación con las zonas laterales (A2,B2) que

presentan células agrupadas y una mayor densidad. Imágenes de distribución de las interneuronas, aumento 10x, escala 50 μm . Insertos, aumento 32x, escalas 20 μm .

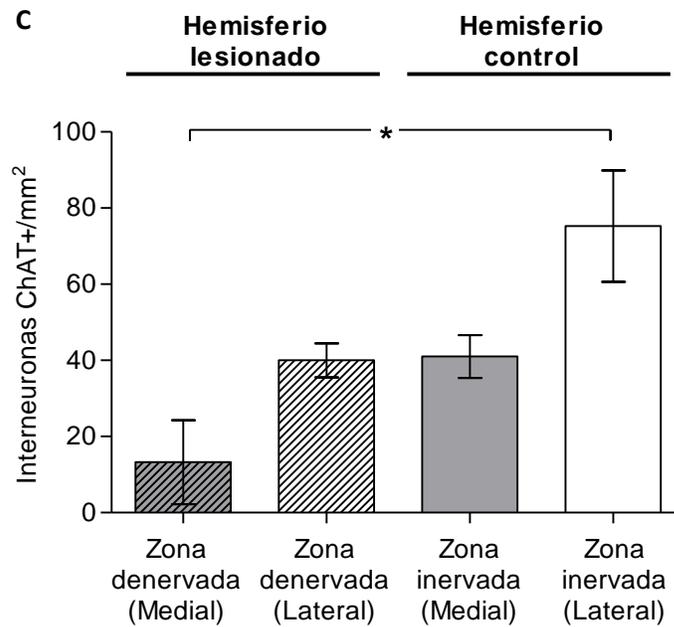


Figura 10. C. Evaluación del número de interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión total, 4 cortes evaluados, 2 cortes por ratón. Media +/- error estándar. Kruskal Wallis $P= 0.0222$ y *post-hoc* Dunn $*P<0.05$.

Área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes

El área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado disminuyó significativamente en la zona medial denervada parcialmente, al compararla con aquella observada en regiones no deaferentadas del hemisferio afectado y del hemisferio intacto en los ratones lesionados (Figura 11C).

En la zona medial denervada totalmente, el área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes disminuyó significativamente al compararla con aquella observada en la región no deaferentada equivalente del hemisferio intacto (Figura 12C). En la zona lateral denervada totalmente, se observa una tendencia a la disminución del área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes, al compararla con la zona inervada equivalente en el hemisferio intacto de los ratones lesionados.

Lesión parcial (8 ratones)

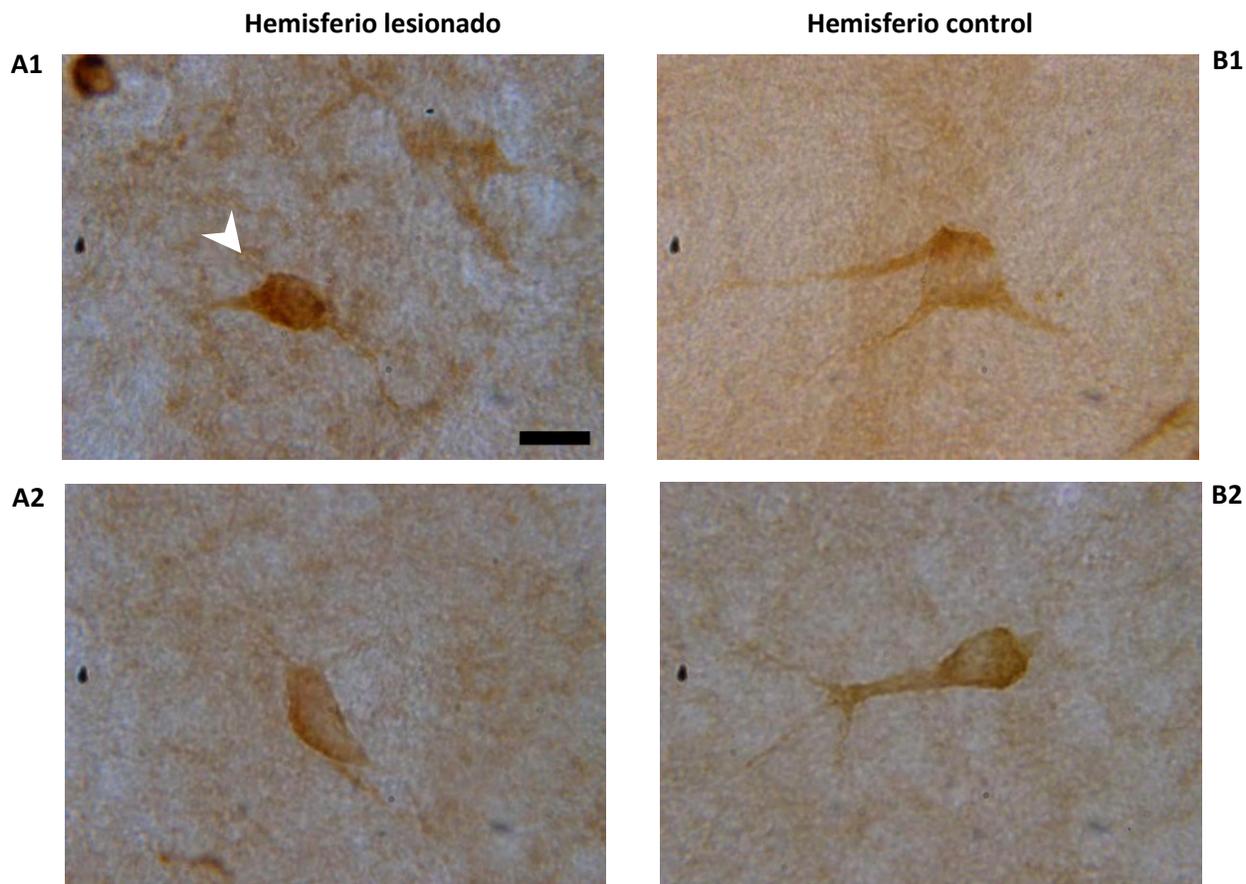


Figura 11. A-B. Evaluación morfológica de interneuronas colinérgicas en el núcleo caudado con lesión parcial. Inmunohistoquímica para ChAT en soma y dendritas de las interneuronas en las zonas evaluadas. **(A)** Hemisferio lesionado. (A1) En la zona medial, se observa una interneurona colinérgica con disminución en su tamaño y soma esférico ligeramente retraído (cabeza de flecha). ChAT se incrementa en el soma y disminuye en las dendritas (y se aprecia con más claridad en la cercanía del soma). (A2) En la zona inervada lateral, una interneurona con soma fusiforme y disminución de la marca en el soma. Las dendritas se aprecian con más claridad. En este hemisferio, el incremento de la marca para ChAT asociado al neurópilo es más evidente en la zona denervada (A1) y de menor intensidad en la zona inervada (A2). **(B)** Hemisferio control. (B1) En la zona medial inervada (B1) se observa una interneurona con soma de mayor tamaño, y la inmunorreactividad es observable en el soma y su dendritas (su tamaño y claridad son mayores en comparación con las interneuronas en A1 y A2). (B2) En la zona inervada lateral, una interneurona con soma esférico e inmunorreactividad clara en el axón. Aumento 100x, escala 10 μ m.

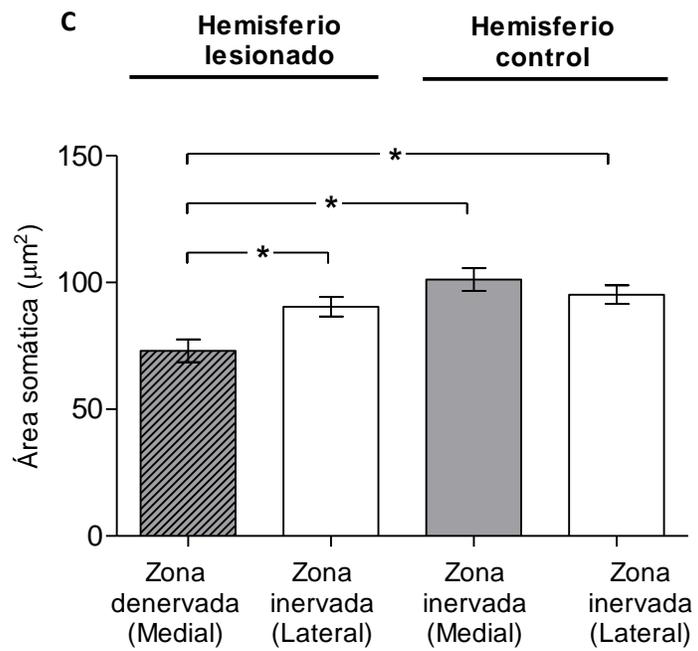


Figura 11. C. Evaluación del área somática de las interneuronas colinérgicas en el núcleo caudado con lesión parcial, 11 cortes evaluados, 1-2 cortes por animal. Hemisferio lesionado: denervada medial, 62 neuronas; inervada lateral, 72 neuronas. Hemisferio control: inervada medial, 77 neuronas; inervada lateral, 88 neuronas. Media +/- error estándar. Anova de una vía $P < 0.0001$ y *post-hoc* Bonferroni $*P < 0.05$.

Lesión total (2 ratones)

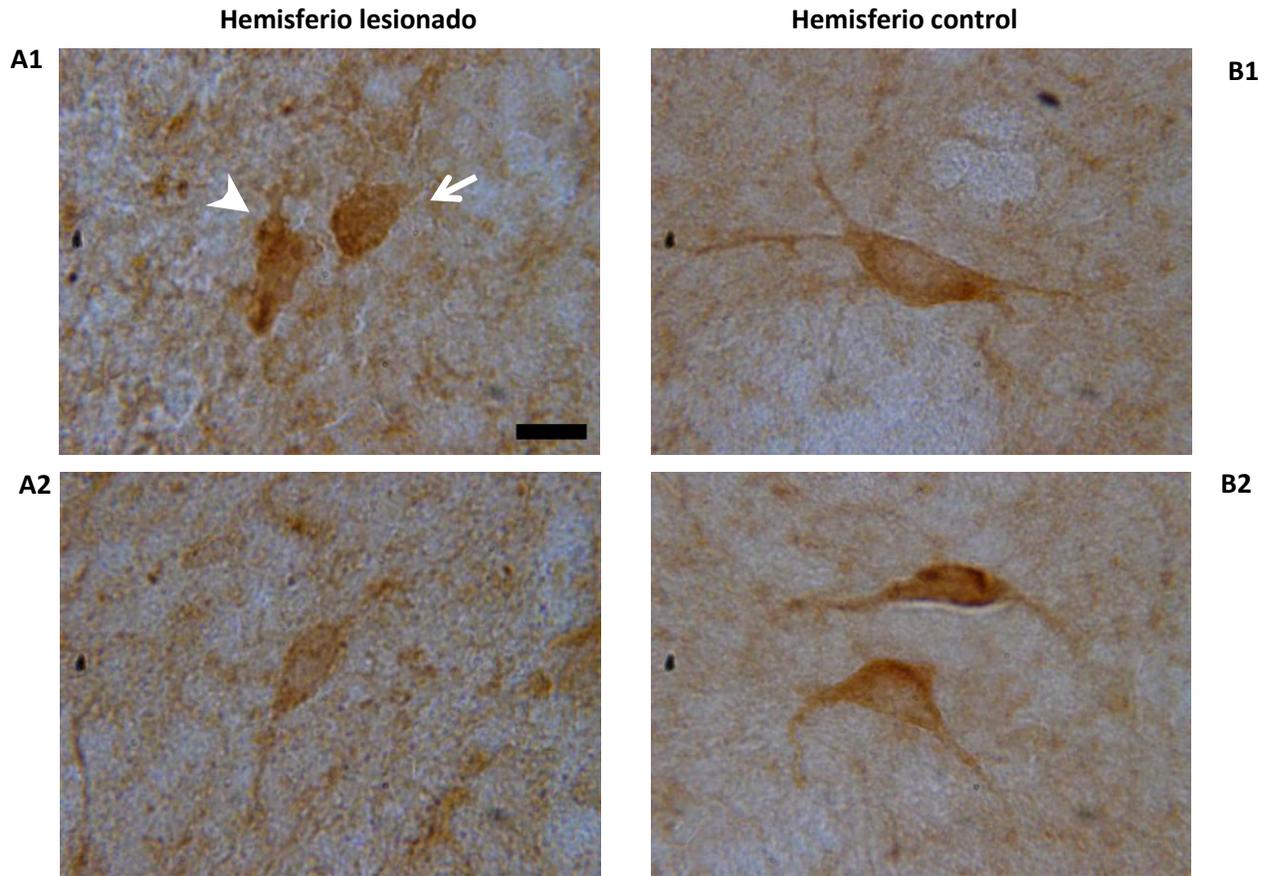


Figura 12. A-B. Evaluación morfológica de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión total. Inmunohistoquímica para ChAT en soma y dendritas de las interneuronas en las zonas evaluadas. **(A)** Hemisferio lesionado. (A1) En la zona denervada medial, se observan dos interneuronas colinérgicas. La primera neurona (cabeza de flecha) presenta rugosidad en la membrana plasmática y retracción somática (semejante a hipotrofia). La segunda neurona (flecha) presenta soma esférico. En ambas células se observa incremento de la marca para ChAT únicamente en el soma. (A2) En la zona denervada lateral, se observa una interneurona colinérgica con morfología alargada y disminución de la marca en soma y dendritas. En ambas zonas, el incremento de la marca para ChAT en el neuropilo es prominente (A1,A2). **(B)** Hemisferio control. (B1) En la zona medial se observa una interneurona con soma fusiforme de mayor tamaño e inmunorreactividad para ChAT claramente observable en el soma y a lo largo de sus dendritas. (B2) En la zona inervada lateral se muestran dos interneuronas colinérgicas, con somas fusiformes. ChAT se aprecia en el soma y sus dendritas. Aumento 100x, escala 10 μ m.

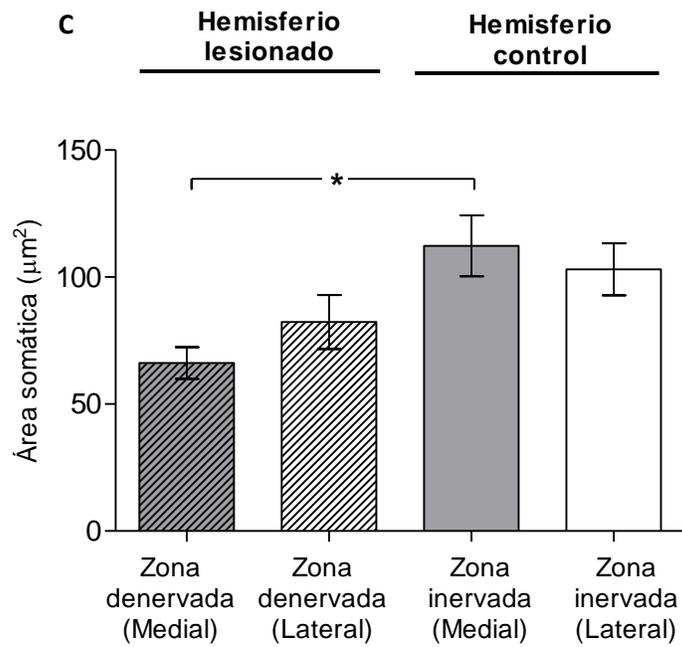


Figura 12. C. Evaluación del área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado con lesión total, 2 cortes evaluados. 1 corte por animal. Hemisferio lesionado: denervada medial, 9 neuronas; denervada lateral, 11 neuronas. Hemisferio control: inervada medial, 17 neuronas; inervada lateral, 20 neuronas. Media +/- error estándar. Kruskal Wallis $P = 0.0387$ y *post-hoc* Dunn $*P < 0.05$.

DISCUSIÓN

Disminución en el número y área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes en el núcleo caudado

Tanto en la EP como en modelos animales farmacológicos de la misma se ha observado un estado de hipercolinergia que resulta, en parte, del desbalance dopamina-acetilcolina producido por la deaferentación dopaminérgica del estriado, característica de etapas intermedias de la EP (Barbeau, 1962; Spehlmann y Stahl, 1976; DeBoer et al., 1993; Calabresi et al., 2006). Se ha sugerido que la hipercolinergia también podría reflejar un proceso de rebrote de los axones originados por las interneuronas colinérgicas gigantes propias del núcleo caudado, lo que conduciría a una alteración en el control del tono colinérgico (Spehlmann y Stahl, 1976; Calabresi et al., 2006). Esta posibilidad no ha sido sistemáticamente explorada. Los resultados en nuestro modelo de deaferentación dopaminérgica en el estriado de ratón muestran que, independientemente de la dimensión del área deaferentada en las zonas mediales denervadas existe disminución del área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes estriatales, lo que se contrapone con la posibilidad de rebrote debido a que en general existe una relación directa entre el tamaño del cuerpo neuronal con la complejidad y número de sinapsis que las neuronas muestran (Purves, 1990). En relación a ello, las interneuronas colinérgicas gigantes también reciben aferentes nigro-estriatales (Izzo y Bolam, 1988; Dimova et al., 1993; Calabresi et al., 2006), y los hechos de que el cuerpo de estas neuronas disminuya sus dimensiones y que su número disminuya sugieren que las fibras dopaminérgicas ejercen acciones tróficas que son fundamentales para el mantenimiento de la integridad morfo-fisiológica de las interneuronas colinérgicas gigantes. Dicha acción trófica podría ser atribuida directamente a la dopamina. En referencia a ello, en ratones adultos se ha documentado que la destrucción de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y el área ventral tegmental genera una disminución en el número de precursores neurales en proliferación en la zona sub-ventricular del ventrículo lateral. Este efecto sobre la proliferación correlaciona con la extensión de la denervación dopaminérgica en el estriado vecino (Baker, et al., 2004). Aunado a ello, estudios *in vivo* en ratas adultas, muestran que

la administración intrasubventricular del agonista del receptor de dopamina D3, 7-hidroxi-N,N-di-n-propil-2-aminotetralina, genera un incremento en la proliferación celular en ZSV adulta (Van Kampen et al., 2004). Estos hallazgos identifican al sistema dopaminérgico como un regulador endógeno de la neurogénesis adulta (Baker, et al., 2004; Van Kampen et al., 2004). Alternativamente, esta acción trófica podría indirectamente llevarse a cabo mediante la liberación de BDNF por las aferencias nigro-estriatales y córtico-estriatales (Altar et. al., 1997; Altar y DiStefano, 1998; Rite et. al., 2003, 2005). En apoyo a esta posibilidad, se ha reportado que la inhabilitación del gene de BDNF conduce a una reducción en el tamaño y número de neuronas colinérgicas y en la intensidad de la marca para ChAT (Ward y Hagg, 2000).

La reducción en el tamaño somático de las interneuronas colinérgicas también podría reflejar el acortamiento de sus procesos causado por la pérdida rápida de conectividad con las aferencias dopaminérgicas. En apoyo a ello, se ha observado que el corte de la inervación preganglionar de los ganglios superiores cervicales en ratas al primer día postnatal, genera el retraso en el crecimiento del diámetro del cuerpo celular y en la longitud y extensión del árbol dendrítico en las células denervadas, el cual permanece desde el primer mes hasta la edad adulta (Voyvodic, 1987).

Existe la posibilidad de que el tiempo de nuestra evaluación fuese insuficiente para observar el incremento en el tamaño del soma colinérgico, y por ende, en el rebrote de sus dendritas, en ambos grupos de animales denervados.

Posibles efectos de la denervación dopaminérgica aguda y su repercusión en el daño a las interneuronas colinérgicas gigantes

Puesto que la inyección unilateral de 6-OHDA en el estriado de ratones genera la muerte de las neuronas dopaminérgicas nigrales y la deafferentación de la vía dopaminérgica nigro-estriatal en un tiempo corto (7 días posteriores a la lesión los niveles remanentes alcanzan 32.2% y 27.5%, respectivamente; Alvarez-Fisher et al., 2008), como consecuencia

de ello, el daño a las interneuronas colinérgicas gigantes podría observarse de forma más inmediata, explicando la disminución en el número y tamaño de las interneuronas colinérgicas en el núcleo caudado denervado en dopamina. En este sentido, el modelo de ratón hemiparkinsoniano empleado en este estudio difiere de la patología natural (EP), en la cual la muerte de las neuronas dopaminérgicas nigrales se presenta de forma progresiva y de larga duración, y las alteraciones motoras se manifiestan hasta que el 70% de esta población neuronal muere (etapas intermedias-tardías de la enfermedad) (Kish, et al., 1988; Lee et al., 2004; Hirsch, 2000; Bové et al., 2005; Hilker et al., 2005).

Tomando en consideración que en nuestro modelo el daño fue generado de forma aguda (14 días), no podemos prever si los cambios en el número, tamaño y morfología de las interneuronas colinérgicas gigantes observados, serán permanentes a largo plazo. En relación a ello, estudios en el estriado de ratas con lesiones unilaterales generadas mediante la inyección de 6-OHDA, muestran que la denervación dopaminérgica a corto y largo plazo genera cambios morfológicos estables (a partir de 12 días hasta 13.5 meses) en las neuronas espinosas de proyección (disminución en la densidad de espinas dendríticas, Ingham et al., 1993; disminución en el número de espinas dendríticas a 6-8 meses post-lesión, Nitsch y Riesenberg, 1995; disminución en la longitud y ramificaciones dendríticas, y en la densidad de espinas dendríticas a la semana 4 post-lesión Solis et al., 2007).

No obstante, en el caso de las interneuronas gabaérgicas, la denervación dopaminérgica estriatal a corto plazo (3 semanas) genera una reducción significativa en el porcentaje de interneuronas parvalbuminérgicas (gabaérgicas putativas) que hacen contacto con las neuronas espinosas de proyección estriato-nigrales, acompañado de una tendencia a la reducción en aquellas que establecen contactos con neuronas de proyección estriato-palidales (Salin et al., 2009). En tanto que, a largo plazo (6 a 8 meses), se ha reportado un incremento en el porcentaje de botones inmunorreactivos para GAD de interneuronas GABAérgicas putativas, los cuales establecen más contactos sinápticos múltiples con perfiles post-sinápticos independientes, sugiriendo el rebrote de terminales GABAérgicas

inducidas por la deafferentación dopaminérgica a tiempos mayores (pérdida estriatal de dopamina de 95%). Aunado a ello, el número de dendritas GAD+ se incrementa respecto al lado no lesionado, sugiriendo que las dendritas de las interneuronas GABAérgicas putativas tiende a elongarse y/o arborizarse (Nitsch y Riesenberg, 1995).

Tenemos en cuenta que el presente trabajo se desarrolló en ausencia de un grupo de ratones control para la cirugía; y en el futuro, estos resultados deberá ser ponderados para corroborar, ya que se sabe que el hemisferio contralateral a la lesión se daña de forma importante después de la lesión con 6-OHDA (Avila-Costa et al., 2008).

Dado que no se efectuó la evaluación de edema celular, un factor que podría contribuir al incremento en el tamaño del soma, este aspecto deberá ser ponderado en evaluaciones a futuro.

Debemos reconocer la posibilidad de daño secundario, generado de forma inherente a este modelo. Se ha reportado que la infusión estriatal de 6-OHDA en ratas, produce una liberación inmediata de los neurotransmisores dopamina y glutamato dentro del estriado lesionado, sugiriendo la generación de un ambiente excitatorio que podría afectar a las neuronas estriatales (Tobón-Velasco et al., 2010).

Evidencias que apoyan la posibilidad del incremento en la liberación de acetilcolina por las interneuronas colinérgicas estriatales

Bajo este contexto los resultados obtenidos en nuestro modelo de deafferentación dopaminérgica estriatal no apoyan la idea de que la hiperinervación estriatal presumiblemente generada por las interneuronas colinérgicas gigantes, pudiera ser la causa del aumento en la transmisión colinérgica a corto plazo. Esta idea, sin embargo, a futuro deberá ser confirmada mediante microdiálisis y HPLC (DeBoer et al., 1993). No obstante, estudios en ratas con lesiones totales, que documentan la actividad de las neuronas colinérgicas a tiempos de lesión similares y posteriores, apoyan la posibilidad del incremento en la liberación de acetilcolina por estas interneuronas, debido a la

desinhibición generada por la pérdida de dopamina y sus aferencias *nigro*-estriatales. Estudios de microdiálisis *in vivo* en ratas adultas con lesiones unilaterales y bilaterales, muestran que la deaferentación dopaminérgica, a las semanas 2 a 4, incrementan la liberación de acetilcolina estriatal, la cual es inhibida mediante la administración sistémica del agonista dopaminérgico directo bromocriptina (DeBoer et al., 1993). Estudios en rebanadas estriatales, obtenidas de ratas, muestran que la deaferentación dopaminérgica a tiempos posteriores (4-8 semanas) incrementa la continuidad y el grado de disparo de las interneuronas colinérgicas estriatales durante la excitación sostenida, hecho que ha sido relacionado con el estado de hipercolinergia (Sanchez et al., 2011).

Además del control inhibitorio ejercido por la dopamina secretada desde las aferencias *nigro*-estriatales, la liberación de acetilcolina también es en parte controlada mediante auto-receptores presinápticos muscarínicos tipo-M2 abundantes en las interneuronas colinérgicas (Galarraga et al., 1990; Calabresi et al., 2006); y en estudios *in vitro* el bloqueo farmacológico de auto-receptores tipo-M2 incrementa la liberación de acetilcolina endógena en el neostriado de ratas sanas (Galarraga et al., 1999,). Con relación a la expresión de receptores muscarínicos, en cortes estriatales de ratas, la deaferentación dopaminérgica genera una tendencia a la disminución gradual en la expresión de receptores muscarínicos a partir de las semanas 1 a 8 (Araki et al., 2000), la cual se exagera y es significativa tanto en los receptores tipo-M1 y no-M1 a largo plazo (a 12-14 meses, en ratas con denervación total; Dawson et al., 1991). Puesto que entre estos receptores podrían encontrarse auto-receptores tipo-M2 (Dawson et al., 1991), se ha propuesto que la hiperactividad de las interneuronas colinérgicas puede causar el descenso en la expresión de receptores muscarínicos (Dawson et al., 1991).

Aunado a lo anterior, la enzima acetilcolinesterasa (AChE por sus siglas en inglés) encargada de degradar la acetilcolina (Purves et al., 2008) podría contribuir a la hipercolinergia. Además de ser sintetizada por las interneuronas colinérgicas estriatales, evidencias experimentales en ratas sugieren que la AChE también es producida por las neuronas dopaminérgicas *nigro*-estriatales, y en animales con deaferentación dopaminérgica total de 8 semanas, la liberación espontánea de AChE en la sustancia *nigra*

compacta y en el núcleo caudado son reducidas (Greenfield et al., 1983). Esta reducción en la concentración de acetilcolinesterasa estriatal, acompañada del incremento en la concentración de acetilcolina estriatal, también han sido reportadas en ratas con deafferentación dopaminérgica aguda (4 días), sugiriendo que la inhibición de la acetilcolinesterasa podría participar en la hipercolinergia observada (Kim, 1973).

¿Cómo es que estos cambios en las interneuronas colinérgicas estriatales afectan a otros sistemas de neurotransmisión estriatal?

El incremento en la actividad glutamatérgica córtico-estriatal afecta la actividad de las neuronas colinérgicas y espinosas GABAérgicas

Los datos morfológicos y el incremento en la liberación basal de glutamato estriatal, reportados en el neostriado dorsolateral de ratas con denervación y pérdida dopaminérgica *nigro*-estriatal a corto plazo (1 mes), sugerirían que las terminales córtico-estriatales están más activas (Meshul et al., 1999); en tanto que en rebanadas cerebrales de ratas hemiparkinsonicas al aumento en el tono glutamatérgico incrementa la actividad espontánea y la sincronía en el disparo de las neuronas estriatales (Jáidar et al., 2010). No obstante la reducción en el tamaño de los somas colinérgicos encontrado en nuestro estudio, el incremento en la actividad glutamatérgica podría afectar la actividad de las interneuronas colinérgicas gigantes. En apoyo a ello, estudios *in vitro* en ratas con denervación dopaminérgica a corto plazo (4-8 semanas), muestran que las interneuronas colinérgicas estriatales disparan más continuamente y en mayor grado durante la excitación sostenida (Sanchez et al., 2011). En el caso de las neuronas espinosas GABAérgicas de proyección estriatales, la denervación y depleción dopaminérgica *nigro*-estriatal en ratas, induce una disminución en la densidad de espinas y longitud dendrítica a corto plazo (10 días, Azdad et al., 2009; 4 semanas, Solis et al., 2007; 12 días hasta 13.5 meses, Ingham et al., 1993); no obstante, sus sinapsis remanentes inicialmente requieren un alto nivel de estimulación para evocar la primer respuesta postsináptica y posteriormente un menor nivel de estimulación es suficiente para iniciar un potencial de acción (Azzad et al., 2009). En esta población neuronal, la denervación dopaminérgica a

tiempos posteriores (1 a 3 meses), genera incremento de GABA en las terminales simétricas del estriado dorsolateral (Meshul et al., 1999). En conjunto, estas evidencias sugieren que la ausencia de aferencias dopaminérgicas genera el incremento en la actividad GABAérgica eferente.

Propuestas experimentales

Para mostrar las alteraciones en la funcionalidad y morfología de las interneuronas colinérgicas gigantes, generadas como resultado de la deaferentación dopaminérgica estriatal a corto y largo plazo, proponemos la evaluación en la distribución de sitios de recaptura de colina de alta afinidad (Araki et al., 2000) y el empleo de ratones transgénicos adultos con expresión incrementada de la proteína verde fluorescente (EGFP) bajo el promotor de ChAT [Mesnage et al., 2011] para las evaluaciones morfológicas.

Las pruebas correspondientes se efectuarían en 3 grupos de ratones: intactos, control cirugía e inyectados unilateralmente en el estriado con 6-OHDA, a corto (14, 28, 56 días; Alvarez-Fischer et al., 2008) y largo plazo (6 y 12 meses), empleando un grupo de 10 ratones (5 ratones para la prueba de funcionalidad y 5 restantes para el análisis morfológico) en cada punto de evaluación.

Los cambios en la funcionalidad serían evaluados usando el ensayo de unión a [³H] hemicolino-3 y autorradiografía en cortes cerebrales estriatales (Araki et al., 2000). El incremento en la recaptura de [³H]hemicolino-3 en el estriado dorsolateral de ratas con deaferentación dopaminérgica estriatal puede ser detectado a partir de 1 a 8 semanas posteriores a la lesión (Araki et al., 2000), así como en el estriado de individuos con EP, demostrando la hiperactividad en el sistema de recaptura colina y en la síntesis de acetilcolina asociados a la pérdida de terminales dopaminérgicas estriatales (Rodríguez-Puertas et al., 1994).

Los cambios en las intersecciones, longitud y complejidad dendríticas, así como el área somática de las interneuronas colinérgicas estriatales, serían evaluados a partir de fotografías de neuronas individuales ChAT-EGFP obtenidas a diferentes profundidades

mediante microscopia confocal. En una serie de cortes cerebrales alternados de 500 micras y mediante microscopía de epifluorescencia, se efectuará la identificación de 10 somas colinérgicos ChAT-EGFP en 4 regiones estriatales (dorso-medial, dorso-lateral, ventro-medial, y ventro-lateral; Rea y Simon, 1981) para los hemisferios lesionado y no lesionado. La introducción celular de biocitina por electroporación en cada soma colinérgico garantizaría el marcaje a lo largo de las dendritas y terminales colinérgicas, y permitiría corroborar que el rebrote de las neuritas evaluadas proviene de interneuronas colinérgicas estriatales. A partir de imágenes de neuronas completas, se efectuaría el trazado y la reconstrucción tridimensional de las neuronas empleando el programa NeuroLucida (MBF Bioscience). Mediante el mismo software se efectuaría la evaluación del área somática empleando la herramienta suma de contornos. El número de intersecciones de los procesos dendríticos y su longitud total serían evaluados mediante el análisis de Sholl (círculos concéntricos de 10 micras; Solis et al., 2007). La complejidad dendrítica sería evaluada mediante el análisis Convex Hull (en donde el área del árbol dendrítico es interpretada como un objeto sólido y cuantificada como un polígono convexo conectado por las puntas de sus dendritas distales; Stereo Investigator users guide, 2009; Mesnage et al., 2011). Las regiones inervadas y denervadas en dopamina, serían corroboradas en cortes cerebrales de 50 micras mediante inmunohistoquímica para la enzima TH. Las evaluaciones mencionadas quedan a consideración para experimentos futuros.

CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros datos indican que al menos de manera aguda, no existe un aumento en el área somática de las interneuronas colinérgicas gigantes estriatales; por el contrario, la deafferentación dopaminérgica en el núcleo caudado, a partir de una lesión con 6-OHDA en el estriado, causa una disminución en el área somática de éstas interneuronas.

Puesto que el daño fue generado de forma aguda, no nos es posible saber si los cambios en el tamaño y número de las interneuronas colinérgicas gigantes permanecerán estables a tiempos posteriores, asegurando la conservación de la totalidad de las interneuronas colinérgicas estriatales. Con ello, estas observaciones sugieren que si los mecanismos de plasticidad mal adaptativa juegan un papel en la fisiopatología de la enfermedad, esto podría ocurrir en el largo plazo, por lo que la muerte neuronal es el proceso fisiopatológico principal durante las fases “tempranas” del padecimiento. Debemos reconocer, sin embargo, que el modelo utilizado brinda resultados irregularmente reproducibles y probablemente muestra características que difieren significativamente de la patología natural, por lo que esta conclusión no debe ser considerada como definitiva.

REFERENCIAS

Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM and Wiegand SJ. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 1997; 389:856-870.

Altar C.A and DiStefano P.S. Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends of Neuroscience* 1998; 21:433–437.

Alvarez-Fisher D, Hhenze C, Strenzke C, Westrich J, Ferger B, Höglinger GU, Oertel WH and Hartmann A. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α -synuclein-deleted mice. *Experimental Neurology* 2008; 210:182-193.

Anglade P, Tsuji S, Agid Y and Hirsch EC. Neuronal plasticity and Parkinson disease. *Molecular and Chemical Neuropathology* 1995; 24:251-255.

Anglade P, Tsuji S, Javoy-Agid F, Agid Y and Hirsch EC. Plasticity of nerve afferents to nigrostriatal neurons in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 1995a; 37:265-272.

Anglade P, Mouatt-Prigent A, Agid Y and Hirsch EC. Synaptic Plasticity in the Caudate Nucleus of Patients with Parkinson's Disease. *Neurodegeneration* 1996; 5:121-128.

Araki T, Tanji H, Fujihara K, Kato H, Imai Y, Mizugaki M and Itoyama Y. Sequential changes of cholinergic and dopaminergic receptors in brains after 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle in rats. *Journal of Neural Transmission* 2000; 107:873-884.

Avila-Costa MR, Gutierrez-Valdez AL, Ordoiez-Librado JL, Anaya-Martinez V, Colin-Barenque L, Espinosa-Villanueva J, Aley-Medina P, Montiel-Flores E, Velazquez-Mata A and Machado-Salas JP. Time course changes of the striatum neuropil after unilateral

dopamine depletion and the usefulness of the contralateral striatum as a control structure. *Neurological Research* 2008; 30:1068-1074.

Azdad K, Chávez M, Bishop PD, Wetzelaer P, Marescau B, De Deyn PP, Gall D, Schiffmann SN. Homeostatic plasticity of striatal neurons intrinsic excitability following dopamine depletion. *PLoS ONE* 2009; 4:e6908,1-12.

Baker SA, Baker KA and Hagg T. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *European Journal of Neuroscience* 2004; 20:575-579.

Barbeau A. The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Canadian Medical Association Journal* 1962; 87:802-807.

Bata-García JL, Villanueva-Toledo J, Gutiérrez-Ospia G, Álvarez-Cervera FJ, Heredia-López F, Góngora-Alfaro JL. Sustained improvement of motor function in hemiparkinsonian rats chronically treated with low doses of caffeine or trihexyphenidyl. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2007; 86:68-78.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* 2000; 3:1301-1306.

Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou MF, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM.. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 2001; 65:135–172.

Bové J, Prou D, Perier C, and Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 2005; 2:484–494.

Calabresi P, Picconi B, Parnetti L, Di Filippo M. A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurology* 2006; 5:974–983.

Cenci MA and Lundblad M. Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Current Protocols in Neuroscience* 2007; 41:9.25.1-9.25.23.

Dawson TM, Dawson VL, Gage FH, Fisher LJ, Hunt MA and Wamsley JK. Downregulation of muscarinic receptors in the rat caudate-putamen after lesioning of the ipsilateral nigrostriatal dopamine pathway with 6-hydroxydopamine (6-OHDA): normalization by fetal mesencephalic transplants. *Brain Research* 1991; 540:145-152.

DeBoer P, Abercrombie ED, Heeringa M and Westerink BHC. Differential effect of systemic administration of bromocriptine and L-DOPA on the release of acetylcholine from striatum of intact and 6-OHDA-treated rats. *Brain Research* 1993; 608:198-203.

Deumens R, Blokland A and Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology* 2002; 175:303-317.

Deutch AY, Colbran RJ, Winder DJ. Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism. *Parkinsonism and Related Disorders* 2007; 13:S251-258.

Dimova R, Vuillet J, Nieoullon A and Goff KL. Ultrastructural features of the choline acetyltransferase-containing neurons and relationships with general nigral dopaminergic and cortical afferent pathways in the rat striatum. *Neuroscience* 1993; 53:1059-1071.

Duvoisin RC. Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism. *Archives of Neurology* 1967; 17:124-125.

Espay AJ and Henderson KK. Post-encephalitic parkinsonism and basal ganglia necrosis due to Epstein-Barr virus infection. *Neurology* 2011; 76:1259.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia *nigra* regional selectivity. *Brain* 1991; 114:2283-2301.

Flor H, Nikolajsen L and Jensen TS. Phantom limb pain: a case of maladaptive CNS plasticity? *Nature Reviews Neuroscience* 2006; 7:873-881.

Franklin and Paxinos. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Inc, USA 2007; 351 pp.

Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, and Bargas J. Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *The Journal of Neuroscience* 1999; 19:3629-3638.

Greenfield SA, Grunewald RA, Foley P, and Shaw SG. Origin of various enzymes released from the substantia nigra and caudate nucleus: effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-striatal pathway. *The Journal of Comparative Neurology* 1983; 214:87-92.

Gutiérrez-Ospina G, Martínez-Martínez E, Hernández-Echeagaray E, Toscano-Márquez B, Aldama-Saiz A, Padilla P, Hernández LR (2011). Reflexiones en torno a la plasticidad cerebral. Pp 155-168. En: Fisiología Veterinaria. Eds. Caballero Chacon SC, Villa-Godoy A. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Hilker R, Schweitzer K, Coburger S, Ghaemi M, Weisenbach S, Jacobs AH. Nonlinear progression of Parkinson disease as determined by serial positron emission tomographic imaging of striatal fluorodopa F 18 activity. *Archives of Neurology* 2005; 62:378-382.

Hirsch EC, Graybiel AM, Duyckaerts C, and Javoy-Agid F. Neuronal loss in the pedunculo-pontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *PNAS* 1987; 84:5976-5980.

Hirsch E. Nigrostriatal system plasticity in Parkinson's disease: effect of dopaminergic denervation and treatment. *Annals of Neurology* 2000; 47:S115-121.

Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Gesine P. Behavioral characterization of unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behavioural Brain Research* 2005; 162:1-10.

Ingham CA, Hood SH, van Maldegem B, Weenink A, Arbuthnott GW. Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. *Experimental Brain Research* 1993; 93:17-27.

Izzo PN and Bolam JP. Cholinergic synaptic input to different parts of spiny striatonigral neurons in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 1988; 269:219-234.

Jackson D, Abercrombie ED, and Zigmond MJ. Impact of L-DOPA on striatal acetylcholine release: effects of 6-hydroxydopamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993; 267:912-918.

Jáidar O, Carrillo-Reid L, Hernandez A, Drucker-Colín R, Bargas J, and Hernandez-Cruz A. Dynamics of the parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network State. *The Journal of Neuroscience* 2010; 30:11326-11336.

Jenner P and Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology* 2006; 66:524-36.

Jowaed A, Ina Schmitt I, Kaut O, and Wüllner U. Methylation Regulates Alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patient's brains. *The Journal of Neuroscience* 2010; 30:6355-6359.

Karl A, Birbaumer N, Lutzenberger W, Cohen LG and Flor H. Reorganization of motor and somatosensory cortex in upper extremity amputees with phantom limb pain. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21:3609-3618.

Kim JS, 1973. Effects of 6-hydroxydopamine on acetylcholine and GABA metabolism in rat striatum. *Brain Research* 1973; 55:472-475.

Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *The New England Journal of Medicine* 1988; 318:876-880.

Kohama I, Ishikawa K and Kocsis JD. Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervations of lamina II neurons by A β afferents. *The Journal of Neuroscience* 2000; 20:1538–1549

Koós T and Tepper JM. Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22:529–535.

Larch, B., Grimes, D., Benoit, B., and Minkiewicz-Janda, A. Caudate nucleus pathology in Parkinson's disease: ultrastructural and biochemical findings in biopsy material. *Acta Neuropathologica* 1992; 83:352-360.

Lee CS, Schulzer M, de la Fuente-Fernandez R, Mak E, Kuramoto L, Sossi V. Lack of regional selectivity during the progression of Parkinson disease: implications for pathogenesis. *Archives of Neurology* 2004; 61:1920–1925.

Lebouvier T, Neunlist M, Bruleydes SV, Coron E, Drouard A, N’Guyen JM, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flam M, Galmiche JP, Damier P, Derkinderen P. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson’s disease and its relationship with symptoms. *PLoS ONE* 2010; 5:e12728.

Matsumoto L, Takuma H, Tamaoka A, Kurisaki H, Date H, Tsuji S, Iwata A. CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson’s disease. *PLoS ONE* 2010; 5:e15522.

McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte T, Gavett BE, Budson AE, Santini VE, Lee HS, Kubilus CA, Stern RA. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy following repetitive head injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2009; 68:709-735.

Mensah PL. Distribution of the largest neuron in mouse caudate-putamen nucleus: its position in large-cell - medium-cell clusters. *Experimental Brain Research* 1980; 38:267-271.

Mesnager B, Gaillard S, Godin AG, Rodeau JL, Hammer M, Von Engelhardt J, Wiseman PW, De Koninck Y, Schlichter R, and Cordero-Erausquin M. Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 2011; 519:3139-3158.

Meshul CK, Emre N, Nakamura CM, Allen C, Donohue MK and Buckman JF. Time dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 1999; 88:1-16.

Migliore L and Coppedé F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutation Research* 2009; 667:82–97.

Nitsh C and Reisenberg R. Synaptic reorganization in the rat striatum after dopaminergic deafferentation: An ultrastructural study using glutamate decarboxylase immunocytochemistry. *Synapse* 1995; 19:247-263.

Ohama E and Ikuta F. Parkinson's disease: distribution of Lewy bodies and monoamine neuron system. *Acta Neurophatologica* 1976; 34:311-319.

Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakayashi K, and Takahash H. Axonal α -synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 2008; 131:642-650.

Perry EK, Curtis M, Dick DJ, Candy JM, Atack Jr, Bloxham CA, Blessed G, Fairbairn A, Tomlinson BE, Perry RH. Cholinergic correlates of cognitive impairment in Parkinson's disease: comparisons with Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1985; 48:413-421.

Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G and Calabresi P. Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 2003; 45:45-56.

Purves D. Body and brain: A tropic theory of neural connections. Harvard University Press 1990. United States of America, 230 pp.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM. Neurociencia.. Editorial Médica Panamericana 2008. 3a edición. España, 856 pp.

Rea MA and Simon JR. Regional distribution of cholinergic parameters within the rat striatum. *Brain Research* 1981; 219:317-326.

Riederer P and Foley P. Mini-Review: Multiple developmental forms of parkinsonism. The basis for further research as to the pathogenesis of parkinsonism. *Journal of Neural Transmission* 2002; 109:1469-1475.

Rite, I, Venero, JL, Tomas-Camardiel M., Machado, A.and Cano J. Expression of BDNF mRNA in substantia *nigra* is dependent on target integrity and independent of neuronal activation. *Journal of Neurochemistry* 2003; 10:709-720.

Rite I, Machado A, Cano J, Venero JL. Divergent regulatory mechanisms governing BDNF mRNA expression in cerebral cortex and substantia *nigra* in response to striatal target ablation. *Experimental Neurology* 2005; 192:142-155.

Rodríguez-Puertas R, Pazos A, Pascual J. Cholinergic markers in degenerative parkinsonism: autoradiographic demonstration of high-affinity choline uptake carrier hyperactivity. *Brain Research* 1994; 636:327-32.

Rylander D, Parent M, O'Sullivan SS, Dovero S, Lees AJ, Bezard E, Descarries L MD, Cenci MA. Maladaptive plasticity of serotonin axon terminals in levodopa-induced dyskinesia. *Annals of Neurology* 2010; 68:619-628.

Salin P, López IP, Kachidian P, Barroso-Chinea P, Rico AJ, Gómez-Bautista V, Coulon P, Kerkerian-Le Goff L, Lanciego JL. Changes to interneuron-driven striatal microcircuits in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 2009; 34:545-552.

Sanchez G, Rodriguez MJ, Pomata P, Rela L, and Murer MG. Reduction of an afterhyperpolarization current increases excitability in striatal cholinergic interneurons in rat parkinsonism. *The Journal of Neuroscience* 2011; 31:6553-6564.

Schmidt ML, Murray J, Lee M-Y, Hill WD, Wertkin A and Trojanowski JQ. Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies. *American Journal of Pathology* 1991; 139:53-65.

Simola N, Morelli M and Carta AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 2007; 11:151-167.

Solis O, Limón DL, Flores-Hernández J and Flores G. Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse* 2007; 61:450-458.

Spehlmann R and Stahl SM. Dopamine acetylcholine imbalance in Parkinson's disease. Possible regenerative overgrowth of cholinergic axon terminals. *The Lancet* 1976:724-726.

Steece-Collier K, Maries E and Kordower JH. Etiology of Parkinson's disease: genetics and environment revisited. *PNAS* 2002, 99:13972-13974.

Stereo Investigator Users Guide, Version 9. MicroBrightField, Inc., 2009. U.S.A. pages, 481-482, 485-486, 501-502.

Tepper JM and Bolam JP. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology* 2004; 14:685-692.

Tobón-Velasco JC, Silva-Adaya D, Carmona-Aparicio L, García E, Galván-Arzate S, Santamaría A. Early toxic effect of 6-hydroxydopamine on extracellular concentrations of neurotransmitters in the rat striatum: an *in vivo* microdialysis study. *Neurotoxicology* 2010; 31:715–723.

Van Kampen JM, Hagg T, Robertson HA. Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. *European Journal of Neuroscience* 2004; 19:2377-2387.

Voyvodic JT. Development and regulation of dendrites in the rat superior cervical ganglion. *The Journal of Neuroscience* 1987; 7:904-912.

Ward NL and Hagg T. BDNF is need for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons *in vivo*. *Experimental Neurology* 2000; 162:297-310.

Zhou FM, Wilson CJ, Dani JA. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *Journal of Neurobiology* 2002; 53:590-605.

Zhou FM, Liang Y and Dan JA. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nature Neuroscience* 2001; 4:1224-1229.