

PEDECIBA-Biología

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Sub-área Neurociencias

**Estudio de la neuroprotección y plasticidad
inducida por agonismo nicotínico en un
modelo experimental de Enfermedad de
Parkinson**

Lic. Camila Mouhape

Departamento de Neuroquímica

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientador: Dra. Giselle Prunell

Tribunal Evaluador:

Dra. Alejandra Kun (Presidenta)

Dra. Silvia Olivera (Vocal)

Dra. Patricia Lagos (Vocal)

**23 de Diciembre de 2015
Montevideo, Uruguay**

Agradecimientos

A los integrantes del tribunal por sus aportes y correcciones.

A Giselle por enseñarme y apoyarme en cada etapa de este trabajo.

A Federico por abrirme las puertas de su Laboratorio y permitirme trabajar allí.

A mi familia por su apoyo incondicional en todo lo que hice y hago.

A mis compañeros de Neuroquímica por que siempre están dispuestos a ayudarme.

A Héctor, Carmen y Martin por su trabajo y cuidado con los animales.

Al Departamento de Neurofarmacología Experimental por prestarme su cuarto de comportamiento.

Al Laboratorio de Biología Celular que siempre están para darme una mano.

A todos los compañeros del IIBCE por que siempre hay buena disposición.

A mis amigas y amigos por su apoyo y aliento en todo momento.

Y a Nacho, por su cariño y por acompañarme siempre.

Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por alteraciones motoras que se deben principalmente a un deterioro extrapiramidal asociado a la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc). Estas neuronas proyectan sus axones rostralmente vía el haz medial del cerebro anterior (HMCA) hacia el Cuerpo Estriado (CE) formando la vía nigro-estriatal, por lo que en esta patología hay una disminución concomitante de dopamina (DA) en el CE. Los tratamientos disponibles son sintomáticos y no detienen el proceso neurodegenerativo. Por lo tanto la búsqueda de terapias efectivas para esta patología es una meta fundamental.

Estudios epidemiológicos indican que los fumadores de tabaco tienen menor incidencia de EP lo que podría atribuirse a la acción de la nicotina sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR).

Es sabido que existe un gran solapamiento anatómico y funcional entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico en la vía nigro-estriatal, la cual tiene un rol fundamental en la regulación de la fisiología de los Ganglio Basales y en la EP.

Varios estudios sugieren que drogas que interactúan con los nAChRs, como es la nicotina, podrían proteger contra el daño nigroestriatal. La administración crónica de nicotina en ratas se ha asociado con una potenciación en la liberación de DA evocada y a su vez una potenciación funcional de los nAChRs, ambos en el CE.

La hipótesis de este trabajo se centra en que el agonismo nicotínico crónico induce cambios en el sistema nigroestriatal que llevan a una prevención de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a diferentes agentes dañinos.

En este marco, el presente trabajo de maestría tiene como objetivo general estudiar en un modelo experimental de EP *in vivo* en ratas el posible efecto neuroprotector del agonismo nicotínico crónico intermitente sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y los axones dopaminérgicos en el CE.

Para ello, se indujo la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de ratas inyectando la toxina rotenona unilateralmente en el HMCA y se administró nicotina a los animales desde 5 días antes y hasta 30 días post lesión.

Los resultados muestran que los animales lesionados con rotenona y tratados con nicotina presentan más células dopaminérgicas remanentes en la SNpc y mayor número de axones dopaminérgicos en la zona del CE lateral del lado ipsi lateral a la lesión, en comparación a los animales lesionados y no tratados con nicotina. Estos resultados se asocian a mayores niveles de DA en el CE y a un mejor desempeño motor en el test del cilindro.

Por otro lado, los somas de las neuronas dopaminérgicas remanentes de los animales lesionados mostraron una menor expresión de la subunidad $\alpha 6$ de los nAChRs en comparación a los animales inyectados con el vehículo de la rotenona, lo cual fue prevenido por el tratamiento con nicotina. A nivel de los axones dopaminérgicos remanentes en el CE lateral, los animales lesionados mostraron una tendencia a disminuir la expresión de la subunidad $\alpha 6$, tendencia no observada en los animales tratados con nicotina. Sin embargo, el tratamiento con nicotina incrementó el área ocupada por esta subunidad en el CE lateral. Los estudios de la expresión de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 7$ no mostraron cambios en las neuronas dopaminérgicas remanentes con ninguno de los tratamientos evaluados.

Estos resultados evidencian un efecto neuroprotector inducido por agonismo nicotínico en un modelo de EP *in vivo* en ratas. Además, los cambios inducidos por el tratamiento con nicotina en la expresión de la subunidad $\alpha 6$ en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y en el CE lateral sugieren que esta subunidad podría participar de la neuroprotección observada y ser un blanco terapéutico para la EP.

SIGLAS

ACh- acetilcolina

ATV- Área Tegmental Ventral

CE- Cuerpo Estriado

CL- Cuerpos de Lewy

COMT- catecol-O-metiltransferasa

DA- dopamina

DAT- transportador de DA

DMSO/ Pgl - dimetil sulfoxido/ propilenglicol

Doi- densidad óptica integrada

DOPAC- ácido dihidroxifenilacético

EP- Enfermedad de Parkinson

EPC- estimulación profunda del cerebro

ERO- especies reactivas del oxígeno

GB- Ganglios Basales

GPi- Globo Pálido interno

GPe- Globo Pálido externo

HMCA- haz medial del cerebro anterior

HVA- Ácido Homovanílico

MAO- monoamina oxidasa

MPTP- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MSN - *medium spiny neurons* (del inglés)

nAChR- receptores Nicotínicos de ACh

NST- núcleo Subtalámico

SNpc- Sustancia Nigra pars compacta

SNpr -Sustancia Nigra pars reticulada

RE- retículo endoplásmico

6-OHDA- 6-hidroxydopamina

α -sin- α -sinucleína

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Rol de la DA en el funcionamiento de los GB	7
1.1.1 Ganglios Basales.....	7
1.1.2 Modulación de la eferencia del CE por DA.....	8
Recuadro 1: Dopamina y el SNC.....	9
1.2 Enfermedad de Parkinson.....	10
1.2.1 Síntomas motores y no motores.....	10
1.3. Mecanismos patogénicos de la EP.....	11
1.3.1 Causas y factores de riesgo de la EP.....	11
1.3.2 Patofisiología de la EP- Mecanismos de degeneración.....	11
Recuadro 2: Diferencia de vulnerabilidad de neuronas dopaminérgicas del ATV y la SNpc.....	13
1.4. Enfoques actuales de tratamiento de la EP.....	14
1.5. Agonismo Nicotínico como posible tratamiento para la EP.....	15
1.5.1 Estudios epidemiológicos.....	15
1.5.2 Receptores de ACh.....	16
1.5.3 Interrelación entre los sistemas Nicotínico Colinérgico y Dopaminérgico.....	17
1.5.4 Alteración de los nAChRs con el daño de la vía nigro-estriatal.....	19
Recuadro 2: Modelos experimentales de EP.....	21
1.5.5 Efectos de largos periodos de administración de Nicotina.....	22
1.5.6 Neuroprotección con Nicotina en modelos experimentales de EP.....	23
2. ANTECEDENTES PARTICULARES.....	25
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVO GENERAL.....	26
4.1 Objetivos específicos.....	26
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1 Animales.....	30
6.2 Inyección intracerebral de Rotenona y procedimiento quirúrgico.....	30
6.3 Administración de nicotina	30
6.4 Evaluación Morfológica: Inmunohistoquímica.....	30
6.5 Análisis de la SNpc (Inmunohistoquímica).....	32
6.6 Análisis del CE (Inmunohistoquímica).....	35
6.7 Cuantificación de niveles tisulares de DA.....	36
6.8 Metodología para el estudio comportamental.....	37
7. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	39
8.RESULTADOS.....	40
8.1. Análisis de la progresión de la lesión con rotenona.....	40
8.2. Análisis de la SNpc.....	41
8.2.1 Cuantificación del número de células TH-positivas 30 días post lesión.....	41
8.2.2 Intensidad de fluorescencia de la señal TH+.....	42
8.2.3 Intensidad de fluorescencia de las señales $\alpha 4+$, $\alpha 6+$ y $\alpha 7+$ en neuronas TH+.....	43
8.3. Análisis del Cuerpo Estriado.....	47
8.3.1 Niveles de DA 30 días post lesión	47

8.3.2 Cuantificación del % de área ocupada por la señal TH+ en el CE.-.....	48
8.3.3 Densidad Óptica Integrada de la señal TH+ en el CE.....	50
8.3.4 Doi de la señal $\alpha 4$ en el CE.....	51
8.3.5 Cuantificación del % área ocupada por la señal $\alpha 6$ en el CE.....	53
8.3.6 Doi de la señal $\alpha 6+$ en el CE.....	55
8.4 Evaluación de la función motora.....	57
8.4.1. Campo Abierto.....	57
8.4.2. Footprint test.....	59
8.4.3. Test del Cilindro.....	60
9. DISCUSIÓN.....	61
9.1 Modelo de EP experimental con rotenona.....	61
9.2 Neuroprotección	61
9.3 Receptores Nicotínicos (subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$)	65
9.4 Mecanismos de neuroprotección del Agonismo Nicotínico.....	68
9.5 Conclusiones generales.....	69
10. RESUMEN ESQUEMÁTICO DE LOS PRINCIPALES RESULTADOS.....	70
11. PERSPECTIVAS.....	72
12. ANEXO.....	73
13. REFERENCIAS.....	83

1. Introducción

1.1 Rol de la DA en el funcionamiento de los GB

1.1.1 Ganglios Basales

Los Ganglios Basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales que incluyen: el Cuerpo Estriado (CE) (núcleo Caudado y Putamen en primates), los segmentos externo e interno del Globo Pálido (GPe, GPi, respectivamente), el núcleo Subtalámico (NST), la Sustancia Nigra pars reticulada (SNpr) y Sustancia Nigra pars compacta (SNpc). En la figura 1 se muestra uno de los modelos que describe las conexiones entre estos núcleos [1]. Estos núcleos han sido relacionados con el control del movimiento a través de observaciones de la correlación directa entre lesiones de los GB y desorden del movimiento [1]. Los GB poseen los principales centros de integración del movimiento. Se ha postulado que la principal entrada de los GB se da a nivel del CE y proviene mayormente de la corteza cerebral (figura 2 A). Las conexiones entre el CE y núcleos de salida de los GB (GPi/SNpr) están organizados en dos vías, una directa y otra indirecta [2]. La vía directa es una proyección monosináptica entre el CE y GPi/SNpr, mientras que la vía indirecta es una conexión que involucra sinapsis entre neuronas intercaladas en el GPe y el NST. La salida de los GB se da directamente desde el GPi y la SNpr hacia el Tálamo y este último proyecta hacia la corteza motora primaria [3]. Dado que las neuronas de proyección del GPi y la SNpr utilizan GABA como neurotransmisor y tienen actividad tónica, mantienen al Tálamo bajo inhibición. Interrupciones en la salida de los GB desinhibe al tálamo facilitando el movimiento.

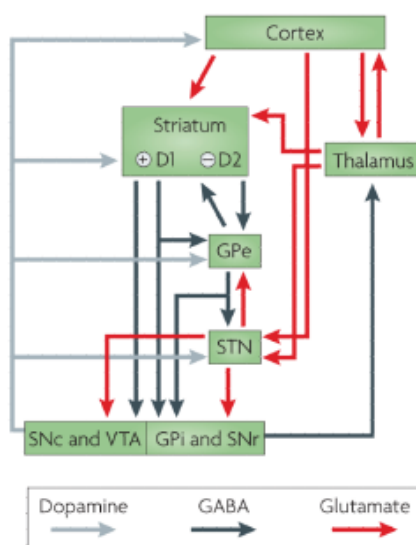


Figura 1: Esquema representativo de un modelo de funcionamiento de los GB, donde se observan las interconexiones entre los núcleos y los neurotransmisores involucrados. Cortex: Corteza, Striatum: CE, Thalamus: Tálamo, GPe: Globo Pálido externo, GPi: Globo Pálido interno, STN: Núcleo Sub Tálamico, SNc: Sustancia Nigra pars compacta, SNpr: Sustancia Nigra pars reticulada, VTA: Área Tegmental Ventral. (Imagen extraída de Redgrave P y cols 2010) [1].

1.1.2 Modulación de las eferencias del CE por DA

Dos tipos celulares principales están presentes en el CE, un 95% son neuronas gabaérgicas de proyección llamadas MSN (del inglés *medium spiny neurons*) y una pequeña población (5%) son interneuronas, de las cuales la mayoría son gabaérgicas y un tercio colinérgicas. Las MSN son la principal salida del CE, siendo claves en el procesamiento de información de los GB [4, 5].

La actividad de las MSN está modulada por la dopamina (DA) [ver Recuadro 1] proveniente de la SNpc. Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc proyectan sus axones rostralmente vía el haz medial del cerebro anterior (HMCA) hacia el CE formando la vía nigroestriatal, la cual tiene una función regulatoria crucial en el circuito motor de los GB [6] y es la principal vía que degenera en la Enfermedad de Parkinson (EP), la cual causa la mayoría de las deficiencias motoras en esta patología [6].

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc inervan dos poblaciones de neuronas MSN del CE:

- 1) Neuronas MSN que presentan los receptores dopaminérgicos del tipo D1 y proyectan a los núcleos del GPi y de la SNpr (vía directa). La estimulación de estos receptores proporcionan un efecto post sináptico excitatorio, facilitando la inhibición de las MSN sobre los núcleos de salida de los GB.

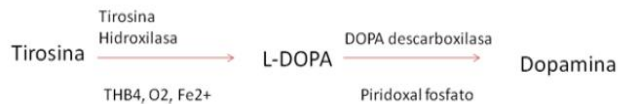
- 2) Neuronas MSN que presentan los receptores dopaminérgicos del tipo D2 y proyectan al núcleo del GPe (vía indirecta). La estimulación de estos receptores proporciona un efecto post sináptico inhibitorio, reduciendo la inhibición que ejercen estas neuronas sobre el GPe. La desinhibición del GPe inhibe el NST, el cual deja de estimular los núcleos de salida de los GB.

En condiciones normales la inervación dopaminérgica activa la vía directa e inhibe la vía indirecta disminuyendo las eferencias inhibitorias gabaérgicas de los GB. Como consecuencia, aumenta la salida excitatoria del Tálamo hacia la corteza motora, facilitando la selección de actos motores específicos.

Cuando las neuronas dopaminérgicas de la SNpc degeneran como ocurre en la EP, la eferencia inhibitoria gabaérgica de los GB es anormalmente alta debido a que no se encuentra regulada por la DA y por lo tanto es menos probable que se desarrolle la activación talámica y la estimulación de la corteza motora. Los trastornos hipocinéticos en EP son un síntoma que refleja la falta de desinhibición talámica que normalmente está mediada por los GB [5, 6].

Recuadro 1: Dopamina en el SNC

La DA es una catecolamina por presentar un grupo catecol en su estructura. La síntesis de DA se realiza en el citosol de las neuronas dopaminérgicas y comienza por la oxidación de la tirosina a 3,4-dihidroxy-L-fenilalanina (L-DOPA), por la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH), siendo éste el paso limitante. La descarboxilación de la L-DOPA por la enzima DOPA descarboxilasa genera la DA que es rápidamente incorporada en vesículas sinápticas.



Una vez liberada en la sinapsis, ejerce su acción a través de receptores específicos. Todos los subtipos de receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Existen cinco subtipos de receptores dopaminérgicos denominados D1 a D5, que se sub-dividen cada uno en dos grupos según sus diferencias en especificidad para drogas y mecanismos de señales. Receptores tipo D1 estimulan la actividad de la adenil ciclasa produciendo efectos post sinápticos excitatorios, mientras que los receptores tipo D2 inhiben la actividad de la adenil ciclasa produciendo efectos post sinápticos inhibitorios [7].

La acción de la DA termina a través de la re-captación pre-sináptica de las terminales dopaminérgicas por los Trasportadores de DA (DAT). La DA re-captada es reincorporada en vesículas sinápticas, o es metabolizada por la enzima citosólica la monoamina oxidasa (MAO) o la catecol-O-metiltransferasa (COMT), produciendo entre otros los metabolitos: ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y Ácido Homovanílico (HVA) [8,9].

En el Sistema Nervioso Central las neuronas dopaminérgicas están presentes y organizadas en 4 sistemas principales: Sistema nigro-estriatal, tubero- infundibular, mesolímbico, mesocortical.

***Sistema Nigro-estriatal:** Grupo de neuronas situadas en la SNpc y que proyectan hacia el CE transmitiendo DA. Esta vía se encarga del control motor e inicio de las respuestas motoras. La degeneración de esta vía genera los principales síntomas motores en la EP.

***Sistema Tubero-infundibular:** Grupo de neuronas situadas en el núcleo arcuato del hipotálamo que proyectan a la glándula hipófisis. Esta vía forma parte de sistema neuroendocrino.

***Sistema Meso-límbico:** Grupo de neuronas situadas en el Área Tegmental Ventral (ATV) y que proyectan hacia el sistema Límbico transmitiendo DA. El sistema mesolímbico tiene gran importancia en las emociones, memoria y en las alteraciones del pensamiento. Este sistema es importante en los síntomas positivos de la Esquizofrenia y en ciertos tipos de epilepsia psicomotora.

***Sistema Meso-cortical:** Grupo de neuronas situadas en el ATV y que proyecta hacia la Corteza Prefrontal transmitiendo DA. Este sistema participa en la organización temporal del comportamiento, la motivación, la planificación, la atención y la conducta social. Este sistema es importante en los síntomas negativos de la Esquizofrenia [7].

1.2 Enfermedad de Parkinson

1.2.1 Síntomas motores y no motores

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, luego de la enfermedad de Alzheimer, afectando a más de 6 millones de personas en el mundo [10].

Clínicamente la EP es caracterizada por temblor en reposo, escasez de movimientos espontáneos, bradiquinesia y aumento del tono muscular (rigidez) [11-15]. Estos síntomas comienzan siendo asimétricos y luego se expanden convirtiéndose en bilaterales. Otras características motoras incluyen alteraciones en el paso y la postura que se manifiestan como festinación (pasos cortos y rápidos con dificultad para pararse y postura flexionada hacia adelante al caminar), dificultades con el habla y deglución, y expresión facial anímica [17, 16].

Como ya se mencionó, estas deficiencias motoras se deben principalmente a un deterioro extrapiramidal asociado a la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [18-20] y por lo tanto a la degeneración de la vía nigroestriatal (figura 2), por lo que en esta patología existe una disminución concomitante de DA en el CE.

Es de destacar que la mayoría de los síntomas motores aparecen cuando más de un 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc ha degenerado y los niveles de DA en el CE se han reducido más de un 70% [21].

La degeneración de estas neuronas se asocia con gliosis y presencia de agregados proteicos llamados Cuerpos de Lewy (CL) en las neuronas dopaminérgicas remanentes, caracterizados por la acumulación anormal de filamentos proteicos de α -sinucleína (α -sin) [22-23].

Los síntomas motores son precedidos por otros como el déficit olfatorio, constipación (alteración autonómica) y alteraciones en el sueño REM que se presentan varios años antes [24].

Las neuronas dopaminérgicas no son la única población de células afectadas. La degeneración de neuronas en otras áreas como el locus coeruleus, núcleo dorsal del rafe, núcleo basal de Meynert y neuronas simpáticas post-ganglionares, podrían contribuir con muchos de los síntomas no motores de la EP, como la depresión, demencia, disfunción autonómica y deterioro cognitivo [25-26].

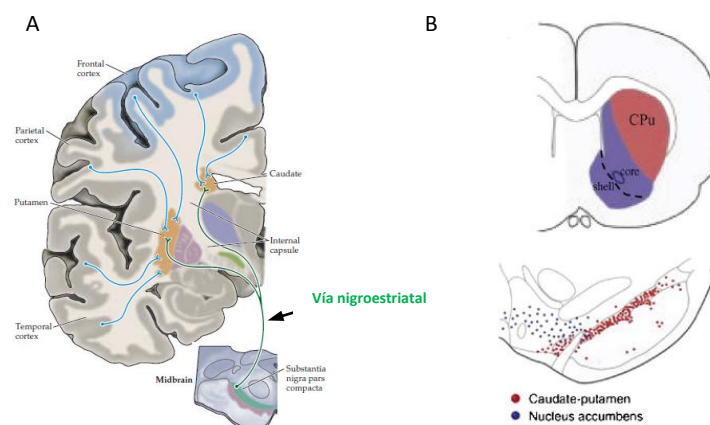


Figura 2: **A:** Esquema representativo de la organización anatómica de las entradas de los GB en cerebro humano. Se muestran las proyecciones desde la corteza cerebral (azul) y de la SNpc (verde) hacia el caudado y putamen. Se indica con una flecha la vía nigroestriatal. Imagen extraída de Purves y cols. 3ra edición 2004, capítulo 17 "Modulation of Movement by the Basal Ganglia" [28]. **B:** Esquema representativo de la inervación diferencial en las distintas zonas del CE de rata por la SNpc y el ATV. Imagen extraída de P. D. Livingstone y S. Wonnacott 2009 [6].

1.3 Mecanismos patogénicos de la EP

1.3.1 Causas y factores de riesgo de la EP

Actualmente se desconoce la etiología de la enfermedad [29]. El principal factor de riesgo de EP es la edad: afecta a 2% de la población mundial mayor de 60 años [30]. Aproximadamente un 10% de los casos de EP se asocian a formas familiares de la enfermedad causadas por mutaciones de genes individuales [31]. Hasta el momento se han identificado mutaciones en 17 genes asociadas a la enfermedad, como por ejemplo en genes que codifican las proteínas α -sin y parkina. Sin embargo, la mayoría de los casos de la EP son idiopáticos [1]. Se piensa que los casos esporádicos de EP son causados por una combinación de susceptibilidad genética asociada a estímulos ambientales. De hecho, factores ambientales como pesticidas, toxinas y metales, han sido identificados como factores de riesgo de la enfermedad y se cree que juegan un papel preponderante en su desarrollo [32, 33, 34, 35].

Muchos de los mecanismos de neurodegeneración asociados a EP familiares se superponen con los mecanismos patogénicos descubiertos en EP esporádicos, como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, y la falla del sistema de degradación de proteínas.

1.3.2 Patofisiología de la EP- Mecanismos de degeneración

En la EP, como en otras enfermedades neurodegenerativas, varios mecanismos patogénicos han sido implicados como posibles disparadores o contribuyentes al daño celular observado. Entre otros, ellos incluyen 1) la acumulación de proteínas anormales, principalmente α -sin, 2) alteración de la degradación proteica, 3) disfunción mitocondrial y 4) estrés oxidativo [36, 3]. A continuación se describen cada uno de estos mecanismos.

1) Acumulación anormal de proteínas

Una característica prominente de la EP es la presencia de agregados proteicos tipo CL en las neuronas dopaminérgicas remanentes [37]. Los CL se caracterizan principalmente por la acumulación anormal de filamentos proteicos, siendo la α -sin el principal componente. Por otra parte, mutaciones en esta proteína causan formas autosómicas dominantes de EP. La sobre-expresión de α -sin produce la muerte celular en varios sistemas experimentales, causando apoptosis y un aumento de la vulnerabilidad de las células a la toxicidad, siendo las células catecolaminérgicas las más sensibles. Animales que sobre-expresan α -sin "wild type" o mutada presentan degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Estas evidencias sugieren que un metabolismo alterado de esta proteína podría contribuir a la fisiopatología de la EP [38-40].

La α -sin es soluble en condiciones fisiológicas y se postula que podría estar relacionada con la regulación de la plasticidad sináptica, la neurotransmisión dopaminérgica, el tráfico del retículo endoplásmico (RE) al aparato de Golgi, así como actuar como proteína chaperona [41].

En condiciones patológicas, puede alterar su conformación formando protofibrillas y convertirse en fibrillas tipo amiloide, las cuales son insolubles y se asocian a los CL. Ha sido reportado que los oligómeros inducen la permeabilización de vesículas sinápticas, aumentando la DA libre intracelular, lo que resulta tóxico para la célula ya que su metabolización se asocia a un aumento en la producción de estrés oxidativo [41-43]. Por otra parte, se ha visto que la DA puede conjugarse a α -sin, formando un complejo resistente a la degradación y que es capaz de bloquear la degradación de otras proteínas, resultando en una acumulación de proteínas tóxicas en la célula [43, 184].

2) Alteración en mecanismos de degradación proteica

Sistema ubiquitin-proteosomal (SUP): Las células poseen varios mecanismos para controlar los plegamientos anormales de proteínas. Los proteosomas son grandes complejos multi-proteicos que degradan proteínas que fueron marcadas por enzimas ligasas (E1, E2 y E3) para la degradación por ubiquitina. Amplias evidencias sugieren una disfunción en SUP en la EP. Por ejemplo, se ha visto que los CL contienen múltiples componentes del SUP, como ser ubiquitina y subunidades de proteosoma. Por otro lado, en materiales de autopsia de pacientes con EP, se ha encontrado que existe un 40% de disminución de la actividad proteosomal selectivamente en la SNpc [45]. La actividad proteosomal también disminuye en pacientes con envejecimiento normal, particularmente en la SNpc, por lo tanto esto podría contribuir a la selectiva vulnerabilidad de esta región [46]. La enzima Parkina es una ligasa y mutaciones en ésta son relacionadas con EP donde existe una disminución en la actividad ligasa. Se piensa que el estrés oxidativo deteriora el SUP, a través de la oxidación de proteínas las cuales se vuelven más resistentes a la degradación proteosomal, posiblemente por la formación de agregados [47,36].

Vía Autofágica/ Lisosomal (VAL): Es sabido que la función basal de la VAL es importante para la función neuronal y en particular para la regulación de α -sin. La forma "wild type" de α -sin afecta su propia degradación por la VAL pero no afecta la función global de la vía. Sin embargo, los aductos de DA- α -sin bloquean la degradación de otros sustratos, sugiriendo un posible mecanismo en el que las células dopaminérgicas son más susceptibles a la toxicidad por α -sin [36].

3) Disfunción mitocondrial

La actividad mitocondria es crítica para el normal funcionamiento celular y es clave en la regulación de la apoptosis cuando el metabolismo celular se ve perturbado [36, 48].

Varios estudios evidencian que existe una disfunción del complejo I mitocondrial en SNpc de pacientes con EP [49]. Además, mutaciones en varias proteínas mitocondriales han sido asociadas con formas familiares de EP. Se cree que la reducción de la actividad del complejo I mitocondrial en EP, deriva en parte de acumulaciones de mutaciones en el ADN mitocondrial.

La disfunción mitocondrial puede conducir a una insuficiencia de producción de ATP y generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO), la cual podría inhibir las vías cito-protectoras dependientes de ATP, como es la vía proteosomal, actividad chaperona, y bombas de calcio que regulan los niveles de calcio celular [36, 48]. Bajos niveles de ATP pueden también afectar procesos transcripcionales y traduccionales, que producen enzimas como la superóxido dismutasa y catalasa, generando más estrés oxidativo por la falta de estas enzimas anti-oxidantes [50,51].

4) Estrés Oxidativo y DA

En los organismos aeróbicos la generación de ERO es una inevitable consecuencia de la dependencia de oxígeno para la respiración. Las ERO son generadas por una pérdida de electrones desde la cadena transportadora de electrones, lo cual resulta en una reducción parcial de la molécula de oxígeno en superóxido. El estrés oxidativo es causado por un desbalance entre la generación y detoxificación de ERO y especies reactivas del nitrógeno. Por lo tanto se define al estrés oxidativo como un desbalance entre pro-oxidantes y anti-oxidantes [43].

Además de la mitocondria, una fuente potencial de ERO que merece especial consideración en las neuronas dopaminérgicas, es la DA en sí misma. Normalmente la DA es efectivamente captada en vesículas sinápticas donde el pH bajo hace que sea poco reactiva. Sin embargo, la DA citosólica puede ser tóxica para las neuronas, ya que es una molécula altamente reactiva que puede ser oxidada y subsecuentemente reaccionar con componentes celulares para formar aductos o para formar más ERO tóxicos [111]. Por otra parte, el catabolismo de la DA citosólica por la monoamina oxidasa (MAO) genera H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) como bio-producto, el cual en presencia de hierro (Fe²⁺), puede ser convertido en radical hidroxilo, molécula altamente reactiva, a través de la reacción de Fenton: H₂O₂ + Fe²⁺ -----Fe³⁺ °OH + -OH. Es de destacar que en la SNpc hay altos niveles de Fe²⁺ asociados a la deposición de neuromelanina en las neuronas dopaminérgicas [51].

Numerosos estudios han confirmado aumento de niveles de varios marcadores de daño oxidativo en la SNpc de pacientes con EP: daño de ADN, peroxidación de lípidos, oxidación proteica, depleción de glutatión, y un aumento de deposición de hierro [36].

5) Otros mecanismos

Otros mecanismos implicados en la etiología de la EP incluyen un aumento de la neuroinflamación [29], alteraciones de señales de proteínas quinasas (Akt, Cdk5, LRRK2) y la pérdida de factores tróficos [52]. Este último mecanismo podría explicar los hallazgos de diferentes estudios sugiriendo que uno de los eventos patológicos más tempranos en la EP es la degeneración de los axones de las neuronas dopaminérgicas por falta de soporte trófico. Esta degeneración axonal ocurriría antes que la degeneración de sus somas. Esto ha llevado a proponer que la muerte de neuronas dopaminérgicas es una degeneración por muerte retrógrada [53, 36].

Una de las preguntas más recurrentes en la literatura relacionada con la EP es por qué las células dopaminérgicas de la SNpc degeneran en esta enfermedad. Diferentes estudios han señalado aspectos celulares y moleculares de estas células que las hacen altamente vulnerables [ver Recuadro 2].

Recuadro 2: Diferencia de vulnerabilidad de neuronas dopaminérgicas del ATV y la SNpc

Varios estudios han demostrado que las neuronas dopaminérgicas del ATV que se encuentran adyacentes a las de la SNpc son menos vulnerables que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. En pacientes con EP idiopático avanzado se ha visto que el % de muerte de neuronas dopaminérgicas comparado con controles es del 80% para la SNpc y 50% para ATV [54]. Por otro lado, estudios neuropatológicos de casos genéticos de la EP, han reportado pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc sin degeneración de neuronas en el ATV [54-57]. Grim y cols [58] han demostrado que muchos de los genes que codifican para proteínas que están involucradas en plasticidad sináptica, sobrevivencia celular (neuroprotección, detoxificación) o guiado axonal y migración celular, son mayormente expresadas en las neuronas dopaminérgicas del ATV en comparación a las de la SNpc [58]. Esto indica que las neuronas dopaminérgicas del ATV podrían ser menos vulnerables frente al daño en comparación a las dopaminérgicas de la SNpc. Por otro lado, se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc muestran mayores niveles de expresión de receptores dopaminérgicos y de DAT [59]. Esto podría provocar que estas neuronas sean más vulnerables al incrementar la re-captación de DA de la hendidura sináptica mediante los DAT e incrementar la DA libre en el citosol. La DA libre en el citosol es una molécula altamente reactiva que puede ser oxidada y subsecuentemente reaccionar con componentes celulares llevando al aumento del estrés oxidativo [36].

Continuación Recuadro 2: Diferencia de vulnerabilidad de neuronas dopaminérgicas del ATV y la SNpc

Otro punto importante que podría contribuir con la alta vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc comparadas con las del ATV, es su arquitectura y las necesidades metabólicas que estas neuronas requieren. Se estima que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc forman arborizaciones axonales mucho más grandes y un alto número de sinapsis, en comparación a las dopaminérgicas del ATV. Esto genera una redistribución pronunciada de mitocondrias en sus terminales axónicas y una gran elevación de las demandas energéticas, así como también de la susceptibilidad a insultos que ponen en peligro el suministro de energía metabólica [60-62].

Se ha sugerido durante mucho tiempo que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y ATV poseen actividad marcapaso [63,64]. Estudios de electrofisiología han demostrado que las neuronas dopaminérgicas adultas de la SNpc dependen de los canales de calcio tipo L para su actividad marcapaso, mientras que las neuronas dopaminérgicas del ATV dependen de canales de sodio voltaje dependientes [67]. Esta dependencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc con el calcio para el marcapaso parece resultar en un incremento de los niveles de calcio en el citosol llevando a una elevación de niveles de EO, lo que podría contribuir la alta vulnerabilidad de estas neuronas frente a insultos dañinos y degeneración en la EP [68].

1.4. Enfoques actuales de tratamiento de la EP

Los tratamientos clínicos disponibles (farmacológicos y no farmacológicos) para la EP son sintomáticos y no detienen la propagación de la enfermedad, por lo que es muy importante la búsqueda de terapias alternativas.

Tratamientos farmacológicos

Los tratamientos farmacológicos para enfermos de Parkinson apuntan a aumentar la transmisión dopaminérgica. Dado que la DA es incapaz de atravesar la barrera hemato-encefálica, la terapia con administración de DA a los pacientes con Parkinson no es viable.

El tratamiento más efectivo actualmente para los síntomas motores de la EP y que ha sido usado por más de 30 años, es la terapia de remplazo de DA con L-DOPA y/o agonistas dopaminérgicos (ej. Apomorfina). Estas drogas son particularmente beneficiosas para la mejora de los déficits motores de la EP, sin embargo, los efectos secundarios como es la inducción de movimientos involuntarios anormales (disquinesias) y alucinaciones, incrementan con el tiempo y la efectividad de la droga disminuye con la progresión de la lesión. A su vez, los síntomas no motores asociados a la EP, como ser demencia, déficit del sueño y depresión, no son mejorados con estas terapias farmacológicas [66, 67].

Inhibidores de la enzima COMT también son usados para el tratamiento de EP, generalmente en combinación con Levodopa. Esta enzima metaboliza las catecolaminas que se encuentran fuera de las neuronas por lo que sus inhibidores impiden la metabolización de la DA [67, 69].

Han sido propuestas como posibles agentes beneficiosos para esta patología muchas otras drogas, la mayoría de los cuales se encuentran en fase preclínica o en ensayos clínicos. Entre ellos, se encuentra la nicotina (agonista de receptor nicotínico de acetilcolina), quelantes de hierro, vitaminas A, C y E, drogas que reducen la agregación de la α -sin o que inhiben la apoptosis (propargylamina, inhibidor de caspasas), antioxidantes (tocoferol, flavonoides), drogas anti-inflamatorias (inhibidor de la ciclooxigenasa-2), también como antagonistas de receptores de glutamato para reducir la excitotoxicidad. En adición a éstos, factores tróficos y agentes protectores de la función mitocondrial también han sido

propuestos como agentes neuroprotectores. Todos estos compuestos proporcionan algún nivel de neuroprotección en estudios experimentales [67-70].

Trasplante de células

Uno de los tratamientos clínicos en fase exploratoria, es el trasplante de células que se diferencian a neuronas dopaminérgicas para reemplazar a las neuronas que degeneraron en la SNpc. Sin embargo, los resultados en estos estudios han sido controversiales. Por ejemplo, estudios post mortem en pacientes con EP han revelado que las células madre de embriones implantados son tan propensas a degenerar como las neuronas nativas en el área del cerebro afectada destacando la necesidad de superar el obstáculo de la degeneración neuronal para mantener la eficacia de la terapia de trasplante de células [71].

Terapia quirúrgica

La estimulación profunda del cerebro (EPC) es una técnica quirúrgica que involucra la implantación de electrodos en núcleos de los GB. La EPC es utilizada para tratar pacientes con síntomas motores persistentes a pesar del tratamiento farmacológico [72,73]. Las áreas más comunes que reciben implantación de electrodos son el NST o el GPi [72]. Se ha postulado que la interrupción del patrón de disparo del NST o GPi podría mejorar los síntomas de los pacientes con Parkinson, mediante la normalización de la neurotransmisión a lo largo de la salida de los GB [74]. Sin embargo, a pesar de estos cambios eléctricos, químicos y físicos, no está claro los mecanismos por los que la EPC mejora los síntomas de la EP [72]. Por otro lado, esta técnica quirúrgica ha generado eventos adversivos en pacientes como ser: hemorragias intracraneales, infecciones y convulsiones post-operativas [75-77]. Deficiencias en la marcha al caminar, en el equilibrio y la velocidad han sido reportadas en pacientes con EP implantados, mostrando incluso en algunos casos empeoramiento motor. Además, se han reportado otros efectos secundarios como ser: deterioro cognitivo, déficit de memoria, deterioro fisiológico, depresión, apatía, manía, ansiedad y pánico [78].

Durante los últimos 25 años, la EPC se ha convertido en una terapia establecida y efectiva para el tratamiento de la EP, sin embargo se necesita continuar con las investigaciones en este campo para lograr nuevos desarrollos y tecnologías que puedan eliminar los efectos secundarios de esta intervención.

A pesar de la gran variedad de tratamientos clínicos mencionados, no existen hasta el momento un tratamiento que detenga efectivamente la progresión de esta enfermedad. Debido a esto, es muy importante la exploración de terapias alternativas para el tratamiento de la EP y para esto es fundamental la comprensión de los mecanismos de muerte celular involucrados así como las bases neurobiológicas de la enfermedad.

1.5. Agonismo Nicotínico como posible tratamiento para la EP

1.5.1 Estudios epidemiológicos

Hace más de medio siglo que existen estudios epidemiológicos que muestran que el hábito de fumar tabaco se relaciona inversamente con la EP y otras patologías relacionadas con los Cuerpos de Lewy [80-89]. Aunque nunca puede haber una justificación para fumar, estos datos son útiles para poder proporcionar información sobre los mecanismos subyacentes a esta correlación negativa entre el hábito de fumar tabaco y la incidencia de la EP (50% menos de incidencia de EP), con el fin de lograr estrategias

efectivas que reduzcan la incidencia y progresión de esta patología. Esto ha impulsado el estudio del papel neuroprotector de la nicotina, alcaloide natural y componente mayoritario del tabaco, como el compuesto mediador de este efecto beneficioso.

Una primera pregunta de la baja incidencia de EP relacionado con el hábito de fumar tabaco, es si esto es debido a un incremento en el riesgo de mortalidad asociado con fumar. Esto no parecería ser el caso, ya que los datos obtenidos de los estudios epidemiológicos, muestran que la mortalidad en pacientes con EP no fue influenciada con el hábito de fumar tabaco. La correlación inversa entre el hábito de fumar tabaco y la EP es dosis dependiente con una disminución de la incidencia de la patología tanto con el aumento en la intensidad de fumar (numero de cigarrillos fumados por día) y el número de años que la persona fuma.

Diferentes estudios in vitro e in vivo, incluyendo investigaciones de nuestro laboratorio, han mostrado que el tratamiento con nicotina es beneficioso en diferentes modelos experimentales de neurodegeneración y específicamente en la EP [90-93].

1.5.2 Receptores de Acetilcolina

La ACh posee dos tipos de receptores blanco, uno es la familia de Receptores Muscarínicos y el otro es la familia de los receptores Nicotínicos de Acetilcolina (nAChRs).

Receptores Muscarínicos

Se han descrito 5 tipos de receptores muscarínicos que se designan de M1 a M5 y se dividen en 2 grupos, los subtipos M1 (M1, M3 y M5) y los M2 (M2 y M4) [94].

Estos receptores están acoplados a una proteína G la cual ejerce una influencia moduladora activando a través del sub tipo de receptor M1 e inhibiendo a través del M2, localizados ambos en pre-sinapsis de aferencias corticoestriatal y nigroestriatal y somatodendríticamente en las MSN del CE. Autoreceptores muscarínicos se encuentran presentes en interneuronas colinérgicas para regular la liberación de ACh [95]. En la EP, el antagonismo muscarínico ha sido uno de los primeros tratamientos para la EP y continúa siendo utilizado como tratamiento complementario. Su eficacia se atribuye a la reducción de: la sobreactividad de las interneuronas colinérgicas y la hiperactividad de la neurotransmisión glutamatergica corticoestriatal que se potencia luego de la degeneración nigroestriatal [94,96]. Si bien los antagonistas de los receptores muscarínicos proporcionan algunos beneficios para el tratamiento de la EP, presentan efectos secundarios que incluyen deterioro cognitivo [96].

Receptores de Acetilcolina Nicotínicos Neuronales

Los nAChRs son una familia de canales pentaméricos transmembrana permeables al Na^+ , K^+ y en variados niveles al Ca^{+2} . Se conforman por el ensamblaje de cinco cadenas polipépticas dispuestas en forma simétrica alrededor de un eje perpendicular a la superficie de la membrana. Dichas subunidades se han clasificado según su peso molecular creciente en alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) y épsilon (ϵ) [97, 98]. A su vez, existen diferentes subunidades de cada tipo y diferentes combinaciones de éstas determinan las propiedades de cada sub-tipo de nAChR, como ser el tiempo de apertura del canal, permeabilidad iónica, selectividad iónica, tasa de desensibilización, la sensibilidad a su agonista y su distribución celular [95, 99, 100].

Las subunidades más abundantes y de más amplia distribución en el Sistema Nervioso Central (SNC) son $\beta 2$, $\alpha 4$ y $\alpha 7$. Otros tipos de receptores presentan una distribución más restringida, por ejemplo la expresión de subunidad $\alpha 6$ y $\beta 3$ están principalmente limitadas a las neuronas catecolaminérgicas [95].

El sitio de unión al agonista está presente en la subunidad α (sitio principal de unión) en la interfase con la subunidad adyacente β que también contribuye complementariamente con residuos de unión (sitio

complementario de unión), en el caso de los receptores heteroméricos [99, 101]. Por otro lado, en el SNC también existe un subtipo de receptor monomérico compuesto únicamente por cinco subunidades $\alpha 7$ [102].

Se ha sugerido que drogas que interactúan con nAChR, como es la nicotina, podrían proteger contra el daño nigroestriatal. A su vez, la nicotina y compuestos similares alivian algunos de los efectos secundarios asociados con las terapias de remplazo de DA en pacientes con EP y estudios recientes sugieren que también podría tener efectos pro-cognitivos y antidepresivos [96].

La nicotina es un agonista de los nAChR, sugiriendo que el agonismo de estos receptores podría ser un blanco terapéutico para la EP.

1.5.3 Interrelación entre los sistemas Nicotínico Colinérgico y Dopaminérgico

Es sabido actualmente que existe un gran solapamiento anatómico y funcional entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico en la vía nigro-estriatal, la cual tiene un rol fundamental en la regulación de la fisiología de los GB y en la EP [96].

Cuerpo Estriado

El CE está dividido en dos áreas, dorsal y ventral, asociadas a funciones diferentes. El CE dorsal recibe principalmente innervación dopaminérgica desde la SNpc con una pequeña contribución del ATV. La innervación dopaminérgica del CE ventral (conocido como Núcleo Accumbens) llega desde el ATV, con algunas entradas desde la SNpc (figura 2 B) [103, 6].

En la EP, el CE dorsal está afectado en un alto grado, reflejando la degeneración de la vía nigro-estriatal, mientras que la proyección mesolímbica desde el ATV es menos afectada (figura 2). Uno de los mayores niveles de DA y ACh en el cerebro se encuentran en el CE.

El principal blanco de las terminales dopaminérgicas en el CE son las neuronas gabaérgicas MSN de proyección [4]. La ACh en el CE deriva de una población de interneuronas colinérgicas gigantes, cuyo diámetro alcanzan los 40 μ m. Si bien, esta población representa menos del 2% del total de la población de neuronas en el CE, estas neuronas presentan una extensa red de procesos que le permiten afectar la actividad de todo el CE [130, 95]. Se ha estimado que existen 40.000 interneuronas colinérgicas en cada CE de rata, pero cada una de estas neuronas forma medio millón de varicosidades en un área de hasta 1mm de diámetro [104]. Por lo tanto, a lo largo del CE existe un extenso solapamiento de estas interneuronas con la arborización dopaminérgica, lo que facilita su interacción [105].

La descarga de las neuronas dopaminérgicas en el CE está acompañada del silenciamiento de las interneuronas colinérgicas, por lo tanto la liberación de ACh cesa cuando aumenta la liberación de DA. Esta respuesta recíproca coordinada se basa en los inputs nigroestriatal y talámico hacia el CE, lo que enfatiza aún más la compleja inter-relación entre los sistemas dopaminérgicos y colinérgicos en el CE [104].

SNpc

Las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc hacia el CE son principalmente responsables de la modulación de las funciones motoras y aspectos cognitivos del aprendizaje motor [106]. Además de su innervación estriatal, algunas neuronas de la SNpc inervan áreas corticales y límbicas. La DA es también liberada localmente en la SNpc y ATV; esta liberación somatodendrítica puede ser modulada por los nAChRs [107]. La arborización dendrítica de la SNpc se extiende a la subyacente SNpr, cuya principal población son neuronas gabaérgicas. Esta liberación dendrítica de DA puede influenciar la actividad de las mismas neuronas dopaminérgicas de proyección a través de los autoreceptores somatodendríticos y la actividad gabaérgica dentro de la SNpr, la cual forma parte de la salida de los circuitos de la vía directa e indirecta de los GB hacia el tálamo [108].

La SNpc contiene interneuronas gabaérgicas, así como también aferencias gabaérgicas desde el CE, GP y la SNpr, que actúan como un freno en la activación celular dopaminérgica. Tanto las neuronas gabaérgicas como las dopaminérgicas presentan nAChRs [109].

La entrada colinérgica a la SNpc proviene desde el núcleo Pedúnculo Pontino (PPT) situado en tegmento pontomesencefálico en su región dorsolateral. El PPT proporciona tanto entradas colinérgicas como glutamatérgicas que hacen sinapsis con las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [110]. Estudios han mostrado que la estimulación del PPT provoca el disparo en ráfagas de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y provoca liberación de DA en el CE, la cual es inhibida con la aplicación tanto de antagonistas de receptores nicotínicos o glutamatérgicos, en la SNpc [110, 111].

Subtipos de nAChR en la SNpc

Por lo tanto, en la SNpc las neuronas dopaminérgicas que proyectan al CE son moduladas por aferencias glutamatérgicas, colinérgicas y gabaérgicas, así como también interneuronas gabaérgicas.

En los somas de las neuronas dopaminérgicas está presentando los subtipos $\alpha 4\beta 2^*$ y $\alpha 6\beta 2^*$ (donde el asterisco indica la posible presencia de otro tipo de subunidad), que pueden ser diferentes a los expresados en las terminales dopaminérgicas en el CE (figura 3) [60, 75, 118]. El subtipo de receptor monomérico $\alpha 7$ está presente en bajas concentraciones en los cuerpos celulares pero no en las terminales dopaminérgicas del CE (figura 3) [6, 96, 97]. Las interneuronas gabaérgicas de la SNpc expresan nAChR heteroméricos $\alpha 4\beta 2^*$ que también pueden estar presentes en aferencias gabaérgicas, por ejemplo desde la SNpr. Las aferencias glutamatérgicas pueden presentar tanto $\alpha 7$ y como otros nAChR, pero las aferencias colinérgicas desde el PPT parecerían estar desprovistas de nAChRs [96, 6].

Subtipos de nAChR en el CE

Las terminales dopaminérgicas en el CE presentan una variedad de subtipos de receptores $\alpha 4\beta 2^*$ y $\alpha 6\beta 2^*$. Se ha propuesto que los nAChR $\alpha 7$ residen en las terminales glutamatérgicas presentes en el CE provenientes de la Corteza. Las terminales de las interneuronas gabaérgicas expresan únicamente los subtipos $\alpha 4\beta 2^*$ (figura 3) [96, 112].

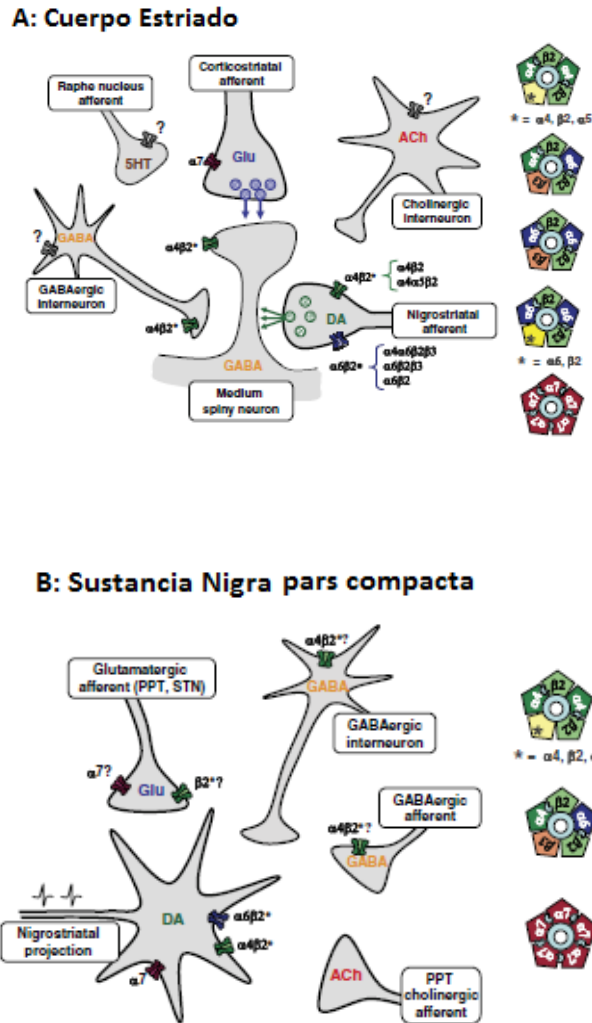


Figura 3: Esquema representativo de la localización celular de los subtipos de nAChRs en a) CE y b) SNpc. Imagen adaptada de Maryka Quik and Susan Wonnacott 2009 [96].

1.5.4 Alteración de los nAChRs con el daño de la vía nigro-estriatal

Cuerpo Estriado

Se ha visto que luego del daño experimental de la vía nigroestriatal, tanto con la toxina MPTP como 6-OHDA [ver Recuadro 3], existe una dramática disminución de los niveles del subtipo $\alpha 6 \beta 2^*$ en el CE y esta disminución se correlaciona con la disminución de los DAT [113, 114]. Por otro lado, los subtipos $\alpha 4 \beta 2^*$ se ven menos afectados [115]. Una posible explicación se podría deber a que en el CE la expresión de la subunidad $\alpha 6$ se restringe únicamente a terminales dopaminérgicas, mientras que la subunidad $\alpha 4$ se expresa tanto en las terminales dopaminérgicas como también en terminales gabaérgicas, interneuronas gabaérgicas y aferencias serotoninérgicas. Por lo tanto, al lesionar la vía nigroestriatal, se verían más afectados receptores del subtipo $\alpha 6 \beta 2^*$ ya que la subunidad $\alpha 4$ se presenta también en otros tipos celulares [96, 115].

Estudios que evalúan los efectos del daño de la vía nigroestriatal en los subtipos de receptores $\alpha 7$ en el CE, han mostrado dificultades debido a los bajos niveles de expresión de la subunidad $\alpha 7$ en el CE de rata, mono y humano. Estos estudios sugieren que los niveles de expresión de $\alpha 7$ no parecerían cambiar con el daño de la vía nigroestriatal, este resultado es congruente con el concepto de que los receptores

nAChR $\alpha 7$ están presentes en terminales no-dopaminérgicas, incluyendo aferencias glutamatérgicas en el CE [117, 116].

SNpc

En la SNpc existe una pronunciada disminución del subtipo $\alpha 6\beta 2^*$ comparada con los $\alpha 4\beta 2^*$ luego del daño de la vía nigroestriatal. Los receptores $\alpha 4\beta 2^*$ están presentes en neuronas dopaminérgicas, interneuronas gabaérgicas y aferencias desde la SNpr [113, 114]. Por lo tanto, luego de la lesión en la vía nigroestriatal, los subtipos de nAChR más afectados son aquellos presentes principalmente en neuronas dopaminérgicas, o sea los subtipos $\alpha 6\beta 2^*$. Por otro lado, no se observan cambios en el subtipo $\alpha 7$ [113, 114, 96].

Los datos mencionados acerca de los cambios de nAChR en la SNpc y CE luego de la lesión de la vía nigroestriatal son estudios donde se analizan las regiones en su totalidad, sin discriminar las alteraciones por tipos celulares. Sería de gran importancia determinar con más precisión los efectos de la lesión en los nAChRs de los diferentes fenotipos celulares, y especialmente, de las neuronas dopaminérgicas que sobreviven luego de la lesión.

Recuadro 3: Modelos experimentales de EP

Varios modelos animales de EP se han empleado para el estudio de las bases neurobiológicas de la enfermedad y explorar potenciales terapias neuroprotectoras. Estos modelos clásicamente se basan en la aplicación de neurotoxinas que dañan selectivamente las neuronas dopaminérgicas de la SNpc e imitan algunas características morfológicas y bioquímicas de la enfermedad, permitiendo estudiar los procesos celulares que llevan a la degeneración neuronal. En la última década, se han sumado también diferentes modelos de animales transgénicos [32].

A continuación se describen algunos de los modelos más utilizados in vivo con neurotoxinas y genéticos.

Modelos con neurotoxinas

Los modelos experimentales de EP in vivo más utilizados se basan en el uso de compuestos neurotóxicos, que dañan selectivamente las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Dentro de estos compuestos los más populares son: 6-hidroxydopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y rotenona [118].

Estas neurotoxinas pueden ser administradas por distintas vías como ser: inyecciones intracraneales mediante estereotaxia en la SNpc, CE o en el HMCA, inyección de toxinas por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, oral e intranasal [32]. Algunos de los modelos experimentales más utilizados es el de daño unilateral de la función dopaminérgica estriatal con déficit contralateral de actividad motora [119-123, 92]. Actualmente los modelos bilaterales no son utilizados ya que son incompatibles con el bienestar del animal [123].

MPTP

En ratones la MPTP es típicamente administrada de forma sistemática, la cual una vez en el sistema es tomada primero por los astrocitos y convertida a su metabolito tóxico, MPP+. El MPP+ es captado por neuronas dopaminérgicas a través del DAT, donde ejerce su efecto tóxico inhibiendo el complejo I mitocondrial, causando la degeneración de las neuronas. Esta toxina es ampliamente usada en estudios experimentales en ratones y monos, sin embargo no se puede utilizar en ratas porque son insensibles a la misma. La utilización de esta toxina requiere medidas importantes de protección por parte del experimentador ya que atraviesa la barrera hematoencefálica [124]. Por otra parte, la lesión causada en la SNpc no se acompaña de la formación de inclusiones celulares tipo CL, característica distintiva de la EP.

6-OHDA

La 6-OHDA es un análogo hidroxilado de la DA que comparte algunas similitudes estructurales con la DA y noradrenalina, exhibiendo una alta afinidad por el transportador transmembrana catecolaminérgico. La 6-OHDA puede ingresar tanto en neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas e inducir daño celular por una combinación de efectos de ERO y quinonas tóxicas (producto de su propia degradación). Esta toxina cruza débilmente la barrera hematoencefálica, por lo tanto para obtener una lesión cerebral, debe ser inyectada directamente en el cerebro por estereotaxia [90-93].

El laboratorio de Neuroquímica del IIBCE cuenta con gran experiencia en el uso de la 6-OHDA administrada en la SNpc de la rata como modelo de EP, para estudiar la fisiopatología de esta enfermedad y explorar potenciales agentes neuroprotectores [90-93]. Sin embargo, al igual que el MPTP, no induce la formación de estructuras tipo CL por lo que no reproduce un aspecto importante de la enfermedad.

Continuación Recuadro 3: Modelos experimentales de EP

Rotenona

La rotenona es una molécula citotóxica natural que pertenece a la familia de las isoflavonas, extraída de la familia de las plantas *Leguminosas*. La rotenona es un conocido plaguicida y ha sido asociado a la aparición de EP en personas que han tenido exposición a esta toxina [127,128]. La rotenona cruza las membranas celulares y afecta la fosforilación oxidativa inhibiendo el Complejo I mitocondrial, reduciendo la actividad de la enzima nicotinamida adenina dinucleotido reductasa [118]. Además de esta acción sobre la respiración mitocondrial, la rotenona también inhibe la formación de microtúbulos. Este efecto es importante para el mecanismo de neurodegeneración debido a que el exceso de monómeros de tubulina es tóxico para la célula [118].

En relación al valor de la utilización de rotenona como modelo para la EP, diversos estudios han demostrado que la inhibición sistemática del Complejo I por rotenona reproduce varias características de la enfermedad incluyendo un aumento del estrés oxidativo, inhibición de la actividad proteosomal, la degeneración de neuronas dopaminérgicas y la formación de agregados proteicos tipo CL ricos en α -sin [128, 129]

Varios trabajos han demostrado que la administración de rotenona de forma sub-cutánea produce un severo daño en órganos periféricos. Por lo tanto para evitar estos efectos secundarios la rotenona es administrada de forma directa en el CE, el HMCA o la SNpc [130, 131].

Tanto rotenona como 6-OHDA y MPTP inducen estrés oxidativo y degeneración de las neuronas dopaminérgicas, sin embargo diversos estudios han demostrado que la agregación de la proteína α -sin únicamente se observa con rotenona sugiriendo que su mecanismo de acción se asemejaría mejor a los mecanismos fisiopatológicos de la EP [118].

Modelos genéticos

Se ha estimado que aproximadamente un 10-15% de todas las EP son causadas por alteraciones genéticas [132]. En la última década se han hecho grandes avances en la identificación de genes responsables de la EP familiar. Basados en estos descubrimientos de mutaciones en genes humanos causantes de EP familiar, se han desarrollado varios modelos de animales transgénicos, que intentan reproducir las características de la enfermedad, entre ellos el gen de α -sin [133]. Sin embargo, el costo de estos modelos hace que en muchos laboratorios no puedan ser implementados.

1.5.5 Efectos de largos periodos de administración de Nicotina

La administración de largos periodos de nicotina (inyección, mini-bombas, en el agua de beber o auto-administración), induce aumento de expresión de nAChR $\alpha 4\beta 2$ en cerebros en modelos animales y en humanos [162-167].

Por otro lado, la exposición a nicotina por tiempos prolongados afecta la expresión de los subtipos de nAChR $\alpha 6\beta 2^*$ presentes en el CE [139].

El subtipo $\alpha 7$ presenta una baja expresión en el CE y SNpc de rata, mono y humanos. Sin embargo, en el CE de ratón este subtipo $\alpha 7$ es fácilmente detectable y se ha observado que con la administración de nicotina su expresión no se modifica o se observa un aumento [138]. La nicotina es la principal sustancia responsable de la adicción al tabaco, unas de las principales causas de muerte a nivel mundial [140]. Los mecanismos subyacentes a la adicción de nicotina son complejos, e involucran procesos celulares y moleculares, así como también remodelación de circuitos neuronales. La nicotina es un agonista clásico que promueve la activación y desensibilización de los nAChRs [141]. Además la nicotina puede aumentar la expresión de sus propios receptores fenómeno conocido como “up-regulation” [142], el cual se

corresponde con un incremento en el número de receptores de alta afinidad. Es un proceso bastante paradójico en el campo de receptores, ya que usualmente la disminución en el número de receptores ocurre como un proceso de sobre-estimulación. Ha sido demostrado que la “up-regulation” de los nAChR ocurre en el cerebro de fumadores de tabaco [142, 143]. La administración crónica de nicotina a ratas se ha asociado con una potenciación en la liberación de DA evocada por la nicotina. Esta potenciación ha sido correlacionada con la “up-regulation” de sitios de unión en diferentes regiones del cerebro [144], indicando que es funcional y se ha asociado con cambios significativos en las propiedades funcionales de los receptores [145] como ser incremento en la sensibilidad a la acetilcolina (ACh) y una disminución de la cinética de desensibilización [146]. La “up-regulation” de los nAChR inducido por la nicotina, es un mecanismo post traduccional. Tratamientos crónicos de nicotina no alteran la internalización de receptores superficiales desde la membrana plasmática, ni el tráfico post-endocítico ni la degradación lisosomal. El punto de acción de la nicotina en la “up-regulation” de estos receptores radica en un aumento del transporte de nAChR desde la vía secretora hacia la membrana plasmática [145]. El modelo planteado (figura 4), establece que la nicotina penetra en la célula y actúa como chaperona facilitando la maduración de los péptidos precursores de los nAChRs en el RE. Esto podría ser un posible constituyente de nuevos mecanismos de plasticidad neuronal, tanto en condiciones normales como patológicas [146].

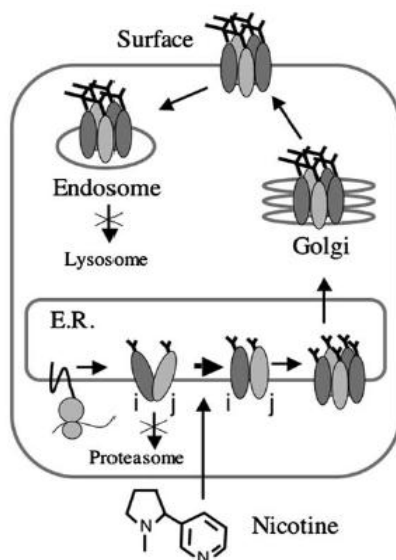


Figura 4: Esquema representativo de la maduración de los nAChR inducido por la nicotina. Luego de la síntesis de las subunidades en el RE, la nicotina induce la maduración de las subunidades y el ensamblaje de estas formando receptores pentaméricos. Los receptores pentaméricos son exportados a la superficie celular vía el Aparato de Golgi donde se recortan y procesan los azúcares. Extraído de Corringer y cols 2006 [146].

1.5.6 Neuroprotección con Nicotina en modelos experimentales de EP

Una aproximación para evaluar los efectos neuroprotectores de la nicotina, ha sido trabajar con modelos animales de daño nigroestriatal [ver Recuadro 3]. Los estudios de los efectos del tratamiento con nicotina en modelos de EP en animales han mostrado que el agonismo nicotínico tiene efectos positivos sobre la funcionalidad de la vía nigroestriatal luego de la lesión. Estos trabajos evalúan el daño neuronal utilizando marcadores de integridad dopaminérgica estriatal, como son los niveles de DA y sus metabolitos, la TH, el DAT y Transportador Vesicular de Monoaminas (VMAT). Los estudios de neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc han dado variados resultados y solo se ha observado prevención de la muerte neuronal en algunos estudios en ratones. Hasta el momento no se ha observado neuroprotección en modelos in vivo en otros mamíferos [147- 152].

Teniendo en cuenta la literatura acerca de los efectos positivos del agonismo nicotínico en la vía nigroestriatal en modelos de EP se podría decir que la eficacia del tratamiento depende de diferentes variables:

- 1) **Grado de lesión:** Se ha observado que el grado del efecto positivo del agonismo nicotínico es mayor si la lesión es moderada.
- 2) **Dosis de nicotina:** La nicotina exhibe una curva dosis-respuesta de forma de U, en donde la máxima protección se observa con regímenes intermediarios de nicotina [92, 153, 154].
- 3) **Régimen de tratamiento con nicotina:** Es necesario un pre-tratamiento con nicotina previo a la lesión. Se ha visto que un régimen de nicotina de 2 a 3 semanas, previo al daño de la vía nigroestriatal aumenta los niveles de DAT en el CE de ratas lesionadas en comparación a animales que no recibieron régimen de nicotina. Sin embargo, no se han visto cambios en los niveles de DAT cuando la nicotina es administrada (durante el mismo intervalo de tiempo) luego de la lesión nigroestriatal. Estos resultados sugieren que la acción primaria de la nicotina es protección contra la degeneración que está en curso, más que la restauración del daño neuronal [155].
- 4) **Especie animal utilizada:** Diferencias en las especies de animales utilizadas para los modelos de EP podrían afectar los efectos del tratamiento con nicotina. Modelos de EP en ratones han mostrado muchas variaciones en los resultados, mientras que los resultados en monos y ratas parecerían ser más consistentes [156]. Esto podría deberse a que, por ejemplo, la vida media de la nicotina en plasma de ratones es de 5-10 minutos, mientras que en humanos, monos y ratas es de 1-2 horas, esto llevaría a que la nicotina no estuviera el tiempo necesario en el plasma de ratones para lograr inducir los efectos deseados. Por otro lado, los deterioros comportamentales en monos y ratas causados por daño nigroestriatal están más próximos a parecerse a los deterioros presentes en los pacientes con EP, en comparación a lo observado en los ratones. Por analogía, el circuito estriatal en ratas y monos podría parecerse más al circuito estriatal en humanos [156].
- 5) **Toxina utilizada en el modelo:** La toxina utilizada para inducir daño nigroestriatal podría ser una variable importante. La nicotina podría proteger más fácilmente contra daño inducido por 6OHDA, metanfetamina y paraquat, en comparación del daño inducido por MPTP. Esto es debido a que podrían haber interacciones entre la nicotina y agentes neurotóxicos como es el MPTP, y esto podría resultar en un incremento de la toxicidad [156]. Los estudios en modelos in vivo utilizando la toxina rotenona son muy escasos, por lo tanto, no están reportadas aún las diferencias en modelos con rotenona y el efecto de la nicotina con respecto al resto de los modelos.
- 6) **Distribución de los nAChRs:** Existen variaciones en la distribución de los subtipos de nAChRs entre las distintas especies, lo que podría resultar en las diferencias observadas en los efectos mediados por la nicotina mediante los nAChRs. Por ejemplo, la densidad de los nAChR $\alpha 7$ es relativamente alta en CE de ratones, y baja en el CE de humanos, monos y ratas.

Por lo tanto, el modelo más adecuado para evidenciar un efecto neuroprotector del agonismo nicotínico sería: un tratamiento crónico e intermitente de nicotina a una dosis media que comience antes de la lesión y continúe durante el proceso degenerativo, sumado a una lesión progresiva y moderada.

2. Antecedentes Particulares

Desde hace varios años, el Departamento de Neuroquímica del IIBCE lleva a cabo una línea de investigación relacionada con el estudio de agonistas de nAChR como estrategia experimental para el tratamiento de la EP.

Utilizando el modelo de EP de lesión unilateral de SNpc con la neurotoxina 6-OHDA en ratas, se demostró que el agonismo nicotínico previene la disminución de los niveles de DA y TH, y mejora la disponibilidad de DA a ser liberada en los terminales del CE. Esta mejora metabólica de los terminales dopaminérgicos no se acompaña de neuroprotección, ya que no se observó una prevención de la muerte de las células dopaminérgicas de la SNpc [90-93].

El modelo de EP con 6OHDA es ampliamente usado, pero como se mencionó previamente, no reproduce la formación de agregados de α -syn tipo CL, característica de la EP. Por el contrario, la administración de la toxina rotenona in vivo, genera agregado de α -syn y por ello ha sido sugerido que los modelos de EP utilizando esta toxina, serían más adecuados para estudios de mecanismos y posibles terapias para esta enfermedad ya que reproducirían mejor los eventos fisiopatológicos [Recuadro 3] [32, 130].

Por ello, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc por rotenona podría ser un mejor modelo para estudiar un posible efecto neuroprotector del agonismo nicotínico.

En mi tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica, realizamos una evaluación de la inyección intracerebral de distintas dosis de rotenona localmente en la SNpc y en el HMCA de ratas como modelo de EP.

A partir de esto, pudimos concluir que, la inyección de 1 μ l de rotenona directamente en la SNpc (dosis evaluadas: 12, 9, 7, 5 y 3 μ g/ μ l), causa una muerte celular rápida e inespecífica en el lugar de administración de la toxina, por lo que no parecería ser un modelo apropiado para estudiar mecanismos neuroprotectores.

Por otro lado, los resultados mostraron que la inyección de rotenona en el HMCA (dosis evaluadas: 1 y 0,5 μ g/ μ l) provoca una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc [157].

La rotenona es una molécula altamente lipofílica, y es capaz de atravesar fácilmente las membranas biológicas, incluida la barrera hemato-encefálica, por lo tanto, su ingreso a la célula es independiente de un transporte específico [158]. Por ello, la rotenona no parecería ser una toxina selectiva de las neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, diferentes estudios sugieren que las neuronas dopaminérgicas serían más sensibles a esta toxina. En el presente modelo de EP, la inyección de 1 μ g/ μ l de rotenona inyectada en el HMCA indujo una degeneración del 62% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc evaluada al mes post lesión [157]. Por lo tanto esta dosis de la toxina inyectada en el HMCA parecería ser un adecuado modelo de EP y genera la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en un porcentaje que es el deseable para poder evidenciar si un tratamiento es neuroprotector.

Dado que la administración de la toxina se realiza en el HMCA, es probable que induzca la muerte de las neuronas de forma más progresiva que la muerte inducida por la administración de neurotoxinas directamente en la SNpc, modelo utilizado previamente por nuestro laboratorio.

En este sentido podría ser un modelo más adecuado para evaluar la posible neuroprotección por agonismo nicotínico. Al generar una muerte más lenta se estaría aumentando la ventana temporal para que la estimulación de los nAChRs ejerzan un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas. La evaluación de este aspecto importante del modelo fue uno de los objetivos abordados en la presente tesis.

3. Hipótesis

La hipótesis de este trabajo se centra en que el agonismo nicotínico crónico induce cambios en el sistema nigroestriatal que llevan a una prevención de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a diferentes agentes dañinos como por ejemplo la toxina rotenona.

4. Objetivo general

En este marco, el presente trabajo de maestría tiene como objetivo general estudiar en un modelo experimental de EP in vivo por administración de rotenona en el HMCA, el posible efecto neuroprotector del agonismo nicotínico crónico intermitente sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y los axones dopaminérgicos en el CE, y evaluar la posible participación de los subtipos de nAChRs presentes en dichas estructuras como mediadores de este efecto.

4.1 Objetivos específicos

1) Evaluación de la progresión de la lesión en el modelo de EP con rotenona:

- a) Cuantificación del número de neuronas TH-positivas en la SNpc por inmunohistoquímica a los 8 y 30 días post lesión.

2) Estudiar el posible efecto neuroprotector del tratamiento crónico de nicotina sobre la vía nigroestriatal en el modelo de EP en ratas, evaluando:

- a) A nivel de la SNpc: El número de neuronas TH-positivas en la SNpc y la expresión de la enzima TH en las neuronas dopaminérgicas remanentes a la lesión.
- b) A nivel del CE: Los niveles tisulares de DA en el CE, el número de axones dopaminérgicos remanentes a la lesión y la expresión de la enzima TH en axones dopaminérgicos remanentes a la lesión.
- c) La función motora de los animales mediante diferentes test comportamentales (footprint test, cylinder test y campo abierto) en diferentes tiempos luego de la lesión.

3) Estudiar los cambios de los nAChRs en el modelo de EP en ratas y los efectos del agonismo nicotínico sobre estos receptores:

- a) Estudiar la expresión de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ de nAChR en los somas neuronales dopaminérgicos remanentes a la lesión en la SNpc.
- b) Estudiar la expresión de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ en los axones dopaminérgicos remanentes a la lesión en el CE.

5. Estrategia Experimental

Modelo de EP experimental con rotenona

Para evaluar la progresión de la lesión en el modelo de EP con rotenona se inyectaron los animales con 1 μl de la toxina rotenona a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en el HMCA mediante estereotaxia y se sacrificaron 8 días después. El número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc se cuantificó por inmunohistoquímica y se los comparó con el número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc a los 30 días post lesión evaluado durante mi trabajo de grado. También se realizó la cuantificación en animales inyectados con el vehículo de la rotenona y animales controles.

Evaluación de neuroprotección por agonismo nicotínico en el modelo de EP

Para cumplir con el objetivo de estudiar el posible efecto neuroprotector del tratamiento crónico con nicotina en el modelo de EP, se administró nicotina durante 5 días previos y hasta 30 días después de la lesión y se analizaron los efectos inducidos sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y sobre los axones dopaminérgicos en el CE (figura 5). También se realizaron test comportamentales para evaluar el desempeño motor de los animales.

Para esto y para el resto de las actividades se trabajó con los siguientes **grupos experimentales**:

- 1- **Grupo Rot + Nic**: estos animales recibieron una inyección de $1\mu\text{l}$ de rotenona a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en el HMCA y tratamiento diario con nicotina (0.4 mg/kg) durante 5 días previos y hasta 30 días después de la lesión. El protocolo de administración de nicotina presentó tres variables que consideramos importantes para potenciar el posible efecto protector del agonismo nicotínico: la administración previa a la lesión, la administración crónica intermitente y la dosis intermedia de nicotina [166].
- 2- **Grupo Rot + Sal**: estos animales recibieron una inyección de rotenona en el HMCA y fueron inyectados diariamente con salino (vehículo de la nicotina) en un régimen igual al de nicotina.
- 3- **Grupo DMSO/PGL + Sal**: estos animales fueron inyectados con $1\mu\text{l}$ de DMSO/PGL a una concentración de [1:1] (vehículo de la rotenona) en el HMCA y recibieron una dosis diaria de salino en un régimen igual al de nicotina.
- 4- **Grupo Control**: a estos animales no se les realizó ningún tipo de tratamiento o intervención quirúrgica.

Cabe destacar que no se realizó un grupo experimental tratado solo con nicotina (sin lesión con rotenona) dado que el diseño experimental permite evaluar los efectos de la administración de nicotina en los parámetros evaluados en el hemisferio contralateral a la lesión de los animales que reciben la toxina y el agonista nicotínico.

En cada experimento cada **grupo experimental** estuvo representado por un número de 4-6 animales. Los animales fueron sacrificados a los 32 días luego de la inyección intracerebral de rotenona o DMSO/PGL. Los estudios que se hicieron en los diferentes animales están detallados en el anexo.

Los animales del grupo Nic + Rot recibieron la última inyección de nicotina 48 horas antes del sacrificio con el objetivo de obtener resultados que evidencien los cambios inducidos por el tratamiento crónico de nicotina y no un efecto agudo de la inyección del agonista. Los animales controles fueron sacrificados cuando estaban en edad comparable con los animales tratados.

Para el análisis a nivel de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc se cuantificó:

- 1) el número de neuronas TH-positivas en la SNpc por inmunohistoquímica para determinar si el tratamiento con nicotina previene la muerte de estas neuronas.

- 2) la expresión de la enzima TH mediante inmunofluorescencia por determinación del promedio de la intensidad de fluorescencia (“mean grey value”) en las neuronas dopaminérgicas remanentes a la lesión. El objetivo de este estudio fue evaluar si la expresión de la enzima TH en las neuronas remanentes se afecta con los tratamientos.

Para el análisis a nivel de los axones dopaminérgicos en el CE se cuantificó:

- 1) los niveles tisulares de DA por cromatografía líquida de alta performance con detección electroquímica (HPLC-DE)
- 2) el porcentaje del área ocupada por la señal TH-positiva por inmunofluorescencia para evaluar la densidad de axones dopaminérgicos remanentes en el CE. Para estos estudios se subdividió el CE en 4 regiones (Medial, Lateral, Dorsal y Ventral) para poder discriminar entre las regiones que reciben principalmente aferencias dopaminérgicas provenientes de la SNpc, de la VTA o ambas.
- 3) la intensidad de la señal TH+ por inmunofluorescencia (densidad óptica integrada) en las cuatro regiones mencionadas en el CE como medida de la cantidad de la enzima.

Para evaluar los efectos funcionales del tratamiento de nicotina frente a la lesión con rotenona, se realizaron evaluaciones de la función motora de los animales mediante diferentes test comportamentales. Estas evaluaciones se realizaron a los 4-6 días (lesión no establecida) y a los 30 días (lesión establecida) luego de la inyección intracerebral.

Se utilizó el modelo de campo abierto para evaluar la actividad motora general de los animales, el footprint test para evaluar el patrón locomotor de los animales y el test del cilindro para evaluar la unilateralidad en el uso de las patas delanteras de cada animal en un ambiente novedoso.

Los animales del grupo Rot + Nic recibieron la inyección diaria de nicotina luego de finalizados los tests comportamentales para que el efecto agudo del agonista no afecte su desempeño motor.

Evaluación de posibles cambios inducidos por el agonismo nicótico sobre los nAChRs

Para cumplir con el objetivo de estudiar los posibles cambios inducidos por el agonismo nicótico sobre los nAChRs en el modelo de EP se realizaron cuantificaciones de las diferentes subunidades α de los nAChRs sobre las neuronas dopaminérgicas en la SNpc y sobre el CE.

Las subunidades α de los nAChRs son las más ubicuas en el Sistema Nervioso y en particular los nAChRs que presentan la subunidad $\alpha 6$ se encuentran únicamente en las neuronas catecolaminérgicas.

A nivel de la SNpc se cuantificó la expresión de los subtipos $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ de subunidades por inmunofluorescencia determinando la intensidad de fluorescencia (“mean grey value”) de la señal en los somas neuronales dopaminérgicos remanentes a la lesión. A nivel del CE se cuantificó la densidad óptica integrada (doi) de la señal $\alpha 4$ y $\alpha 6$ por inmunofluorescencia. En esta región no se evaluó la subunidad $\alpha 7$ de los nAChR ya que la misma no se encuentra presente en los axones dopaminérgicos.

Además, se cuantificó el % de área ocupada por la señal $\alpha 6+$ en el CE con el objetivo de poder comprobar si esta subunidad está presente únicamente en las neuronas catecolaminérgicas.

Análisis de datos

La inyección unilateral de neurotoxinas para inducir el daño unilateral de la vía dopaminérgica nigro-estriatal es un abordaje ampliamente usado en la literatura de la temática [90-93, 159-164].

Además de una mínima mortalidad de los animales luego de la operación, la lesión unilateral presenta otras ventajas frente a la lesión bilateral, incluyendo asimetría comportamental y la posibilidad de usar el lado no lesionado como control interno. Esto último tiene la ventaja de atenuar las interferencias causadas por la variación intrínseca entre animales y procedimientos experimentales, evitando sesgos

metodológicos [159-161]. Por ello, los resultados se expresan habitualmente como un porcentaje del parámetro evaluado del lado inyectado intracerebralmente con la toxina respecto al lado contralateral a la inyección intracerebral [90-93, 159-164]. Este abordaje para analizar los datos fue el utilizado en la presente tesis.

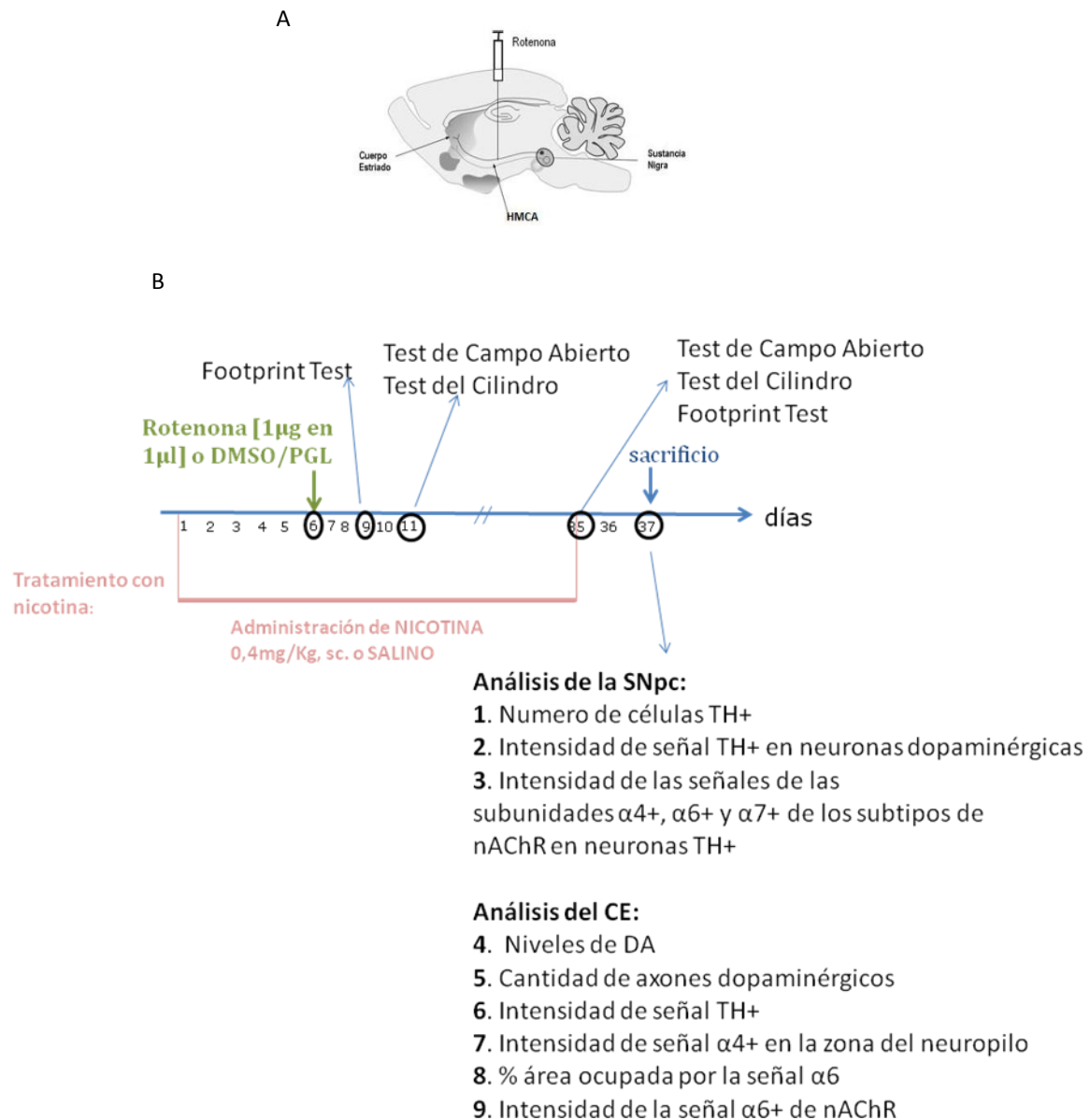


Figura 5: **A: Modelo de EP experimental:** Se indujo la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc inyectando unilateralmente por estereotaxia la toxina rotenona (1 μ g en 1 μ l) en el HMCA de las ratas utilizando las coordenadas (en mm): AP: -3,5 / L: -1,5 / V: -7,8 según el atlas de Paxinos y Watson [165]. Otro grupo de animales se inyectó en el HMCA con el vehículo de la rotenona (DMSO/PGL, 1:1, 1 μ l) **B: Protocolo experimental:** Se muestra: 1) el protocolo de administración de nicotina o salino a los animales durante 35 días, 2) los tiempos en los que se realizaron todos los análisis y test comportamentales, la inyección intracerebral de rotenona y el sacrificio de los animales.

6. Materiales y Métodos

6.1 Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (Tabla 1) de 230-260g, criadas y mantenidas en el bioterio del IIBCE en un microambiente con temperatura controlada (20-22°C), ciclo luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso al agua y alimento. Los protocolos utilizados con los animales de experimentación han sido aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE.

6.2 Inyección intracerebral de Rotenona y procedimiento quirúrgico

La cirugía estereotáxica es un tipo de intervención quirúrgica que utiliza un sistema de coordenadas tridimensional para localizar pequeñas estructuras dentro del cuerpo. En investigación se utiliza la estereotáxica para estudios con animales de experimentación. El principal uso es para la introducción de fármacos en puntos específicos del cerebro, que de otra manera no serían capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. En roedores, la aplicación más común es la introducción directa de fluidos, o bien implantación de una cánula o un aparato de microdiálisis.

Los animales fueron anestesiados con Ketamina/ Xilasina (80 y 5 mg/kg i.p, respectivamente) y colocados en un aparato estereotáxico (D. Kopf) para inyectar 1µl en 1µg de la toxina rotenona (Sigma) en el HMCA del lado derecho del animal y dejando el lado izquierdo como control sin lesión (figura 5 A). Para esto se realizó una perforación en el cráneo y se introdujo una jeringa Hamilton acoplada a una unidad de micro-inyección (D. Kopf) utilizando las siguientes coordenadas (en mm) a partir de Bregma de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson [165]: AP: -3,5/ L: -1,5/ y V: -7,8. En todos los grupos experimentales, el volumen total de inyección fue de 1µl. Como vehículo de rotenona, se utilizó dimetil sulfoxido (DMSO) (Carlo Erba)/propilenglicol (Pgl) (Droguería Industrial Uruguaya), (1:1).

Luego de la cirugía, los animales fueron suturados y mantenidos bajo observación hasta que se recuperaron de la anestesia antes de ser trasladados al bioterio del IIBCE y monitoreados diariamente hasta el momento de su sacrificio a los 32 días pos lesión.

Como ya se mencionó, luego de los 32 días de la inyección de rotenona en el HMCA hay una muerte de 55% de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc, un porcentaje de muerte adecuado para poder estudiar el potencial de posibles agentes neuroprotectores.

6.3 Administración de nicotina

La nicotina fue administrada una vez al día (0,4mg/Kg, subcutáneo) comenzando 5 días antes de la lesión con rotenona y hasta 48 horas antes del sacrificio (figura 5). Como ya se mencionó, este protocolo incluye tres variables que consideramos importantes para potenciar el posible efecto protector del agonismo nicotínico: la administración previa a la lesión, la administración crónica intermitente y la dosis intermedia de nicotina [166]. Todos los animales menos los del grupo control recibieron una inyección diaria de nicotina o de salino para que la manipulación no sea una variable diferencial entre los grupos experimentales tratados.

6.4 Evaluación Morfológica: Inmunohistoquímica

Procesamiento del tejido

32 días luego de la administración de rotenona los animales fueron anestesiados con uretano (2ml/Kg) por vía intraperitoneal y se procedió a la perfusión transcardiaca. Para ello, se inyectó en el ventrículo izquierdo del corazón 0.1ml de anticoagulante heparina (al 50%) y utilizando una bomba de perfusión (Masterflex L/S) se perfundió a través del ventrículo izquierdo con solución salina (60ml) para lavar la sangre seguido paraformaldehído (PFA) al 4 % (250ml) para fijar el tejido, con sucrosa al 5% como

criopreservante. Posteriormente se disecó el cerebro y se pos-fijó por inmersión en PFA 4% con sucrosa 5% durante 2 horas a 4°C, seguido de crioprotección en sucrosa al 15% durante 24 horas y al 30% durante 48 horas a 4 °C.

Los cerebros fueron mantenidos a -80°C hasta ser seccionados en cortes coronales de 20µm de espesor en crióstato (Slee Mainz, MEV) a -22°C. Los cortes se recogieron en portaobjetos gelatinizados a la altura de las siguientes coordenadas según el atlas de Paxinos y Watson: CE: desde +0,7 a -0,26mm y SNpc: desde -4,8 a -6,4 mm. Los cortes se conservaron a -21°C hasta el momento de su uso.

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica utilizada para detectar antígenos tisulares mediante la reacción antígeno-anticuerpo. Para detectar esta reacción el anticuerpo específico (inmunotinción directa) o el anti-anticuerpo (inmunotinción indirecta) deben estar marcados con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración. En nuestro caso utilizamos inmuno-tinción indirecta con marcación por fluoróforos.

Protocolo

Los cortes seleccionados según las coordenadas a estudiar, fueron incubados durante 30 minutos a 37°C con una solución de permeabilización que contiene buffer fosfato salino pH= 7,3 (PBS), D-L-lisina 0,0054M (Sigma) y tritón x100 0,1% (Sigma). Luego se incubó con buffer de bloqueo (PBS, DL-Lisina 0,1% y 5% de suero de cabra) para enmascarar los sitios de unión inespecíficos durante 30 minutos en cámara húmeda. Posteriormente los cortes fueron incubados toda la noche en cámara húmeda a temperatura ambiente con diferentes anticuerpos específicos en buffer de incubación (PBS, DL-Lisina 0,1% y Suero de Cabra 5%). Al final del periodo de incubación los cortes fueron lavados en PBS para eliminar los anticuerpos no unidos al antígeno. Posteriormente se incubó el anti-anticuerpo conjugado a los diferentes fluorocromos (alexa 488 o alexa 543), diluido 1:800 en PBS, durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes fueron lavados con PBS para eliminar los anti-anticuerpos que no se unieron a los anticuerpos específicos. Por último se procedió al montaje de los cortes con una solución de glicerol al 70% en PBS 1x y se sellaron los cubre objetos al porta objeto con esmalte transparente.

Para los estudios de cuantificación de neuronas dopaminérgicas en la SNpc se utilizó una sola marcación con TH y para las inmunofluorescencia de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ de los nAChRs se realizaron co-inmunomarcaciones con TH. Para detectar la subunidad $\alpha 7$ de los nAChR se incubó con α -bungarotoxina conjugada a alexa 488 y se comarcó con TH para inmunofluorescencia (Tabla 1).

Tabla 1: Lista de anticuerpos y marcadores específicos utilizados en los ensayos histoquímicos.

Antígeno	Tipo	Especie en la que se generó	Dilución utilizada	Fabricante
TH	Policlonal	conejo	1:1000	Thermo
TH	Monoclonal	ratón	1:1000	Millipore
$\alpha 4$ nAChR	Policlonal	conejo	1:800	Alomone labs
$\alpha 6$ nAChR	Policlonal	conejo	1:500	Alomone labs
$\alpha 7$ nAChR	Bungarotoxina-conjugada a 488		1:500	Molecular Probes

Tabla 2: Lista de anticuerpos secundarios utilizados

Anti-anticuerpo específico	Especie en la que se generó	Especie inmunoreactiva	Dilución utilizada
Alexa 488	Cabra	conejo	1:800
Alexa 546	Cabra	ratón	1:800
Alexa 488	Cabra	ratón	1:800
Alexa 546	Cabra	conejo	1:800

Los resultados se analizaron en imágenes obtenidas utilizando un microscopio Confocal, (Leica, TCS SP2) provisto de láseres que emiten a una longitud de onda de 488 y 543nm (Tabla 2).

Todas las imágenes utilizadas en este estudio fueron de plano focal único y adquiridas con una resolución de 1024 x 1024 píxeles, utilizando un lente objetivo de 40x (UPlanFLN AN=0,75, Olympus) o un lente objetivo de inmersión de 60x.

En cada ensayo se realizaron los controles negativos incubando los cortes omitiendo los anticuerpos específicos para establecer los niveles de “background” del tejido y la especificidad de los anticuerpos específicos.

6.5 Análisis de la SNpc

Cuantificación del número de neuronas TH positivas

Para este análisis se utilizó N=6 animales por condición experimental y se tomaron **6 cortes** por rata abarcando desde la coordenada -4,84 a la -5,22mm (SNpc) desde Bregma y se inmunomarcaron con TH. Se utilizó microscopia confocal para capturar las imágenes y luego se procedió al conteo de neuronas TH-positivas en la SNpc de ambos hemisferios de cada animal, el cual se realizó de forma manual utilizando la herramienta *cell counter* del programa ImageJ. Se contaron todas las neuronas marcadas en las 4 regiones mostradas en la figura 6 y luego se sumaron obteniéndose el número total de neuronas de cada SNpc (hemisferio derecho e izquierdo) por corte (figura 6). Los cortes seleccionados por cada rata fueron: un corte a la altura de la SNpc anterior (coordenada aproximada -4,84mm), dos cortes a la altura de la SNpc medial (coordenada aproximada -4,96; -5,00 mm), dos cortes a la altura de la SNpc medial-posterior (coordenada aproximada -5,12; -5,16mm) y un corte a la altura de la SNpc posterior (coordenada aproximada -5,22mm).

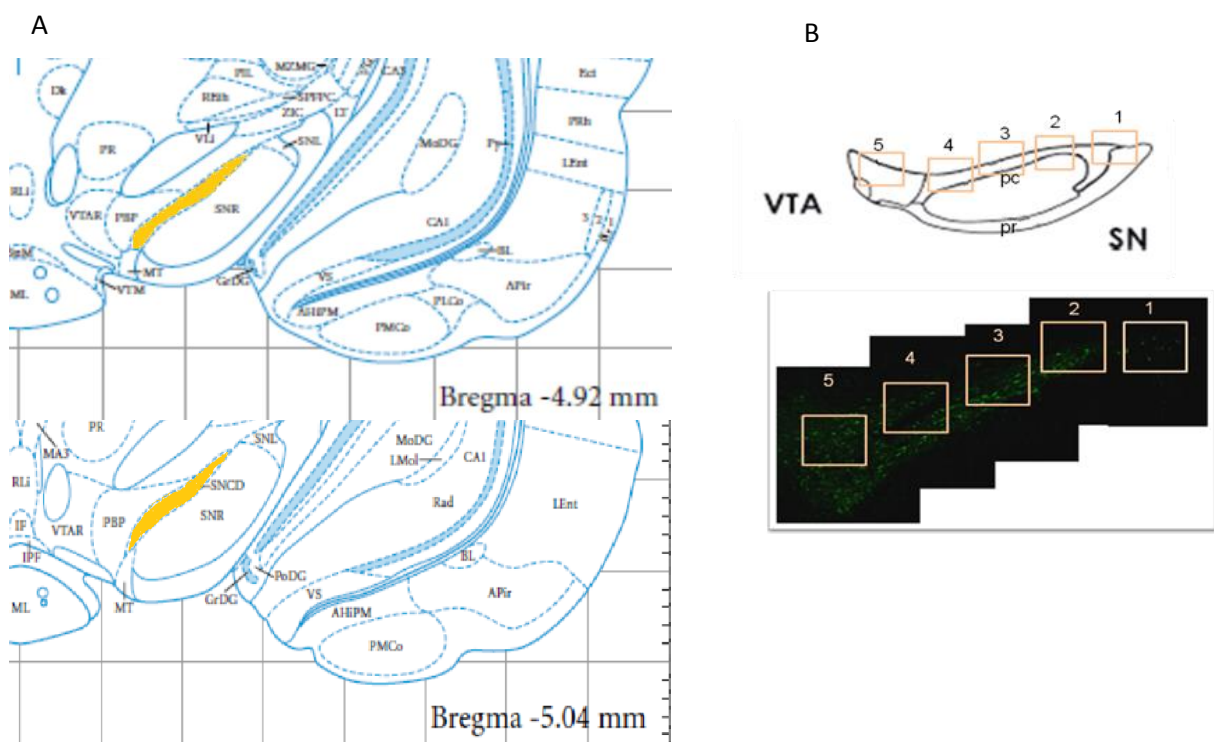


Figura 6: **A:** Imágenes extraídas del Atlas de Paxinos y Watson [21]. Se muestran dos de las coordenadas aproximadas en las que se realizaron los análisis de la SNpc. Se indica en color naranja el área de la SNpc del lado de uno de los hemisferios del cerebro de rata. **B:** Imagen representativa de la SNpc donde se muestran las diferentes áreas de cuantificación del número de neuronas TH-positivas, el área 5 corresponde al ATV la cual no fue cuantificada.

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la señal TH+ en neuronas dopaminérgicas de la SNpc

Para este análisis se utilizó N=5 animales por condición experimental y se tomaron **4 cortes** por rata abarcando las coordenadas anterior, medial, medial-posterior y posterior de la SNpc desde Bregma (aprox. -4,8; -5,00; -5,16mm de Bregma). Estos cortes fueron inmunomarcados con TH para cuantificar la intensidad de fluorescencia de la señal TH-positiva de las neuronas dopaminérgicas remanentes. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de cada fluoróforo en el área seleccionada se realizó utilizando el parámetro “mean gray value” del programa ImageJ el cual se define como la suma de los valores grises de todos los píxeles en la zona seleccionada dividido por el número de píxeles.

Utilizando la herramienta *ROI Manager* del programa ImageJ se procedió a cuantificar la intensidad de fluorescencia/área seleccionada de cada neurona ajustando el umbral cambiando los colores de la figura a escala de blancos y negros y luego se seleccionó el contorno de cada neurona con la herramienta *wand tracing*, omitiendo el núcleo de ésta (figura 7).

Cuantificación de la señal de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ de los nAChR en las neuronas TH+

Para este análisis se utilizó N=5 animales por condición experimental y se tomaron **4 cortes** por rata abarcando las coordenadas anterior, medial, medial-posterior y posterior de la SNpc desde Bregma (aprox. -4,8; -5,00; -5,16mm de Bregma). Con el objetivo de poder cuantificar la intensidad de fluorescencia/área seleccionada de cada subunidad ($\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$) en las neuronas dopaminérgicas (TH+), se realizaron co-marcaciones para cada subunidad ($\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$) de los nAChRs y para la enzima TH, Con el programa ImageJ utilizando las coordenadas tomadas de la imagen para la señal TH+ se traspasaron esas coordenadas hacia la imagen tomada para la señal $\alpha 4+$ o $\alpha 6+$ o $\alpha 7+$ y se cuantificó la intensidad de fluorescencia/área seleccionada para esa señal en cada neurona TH+ (figura 7).

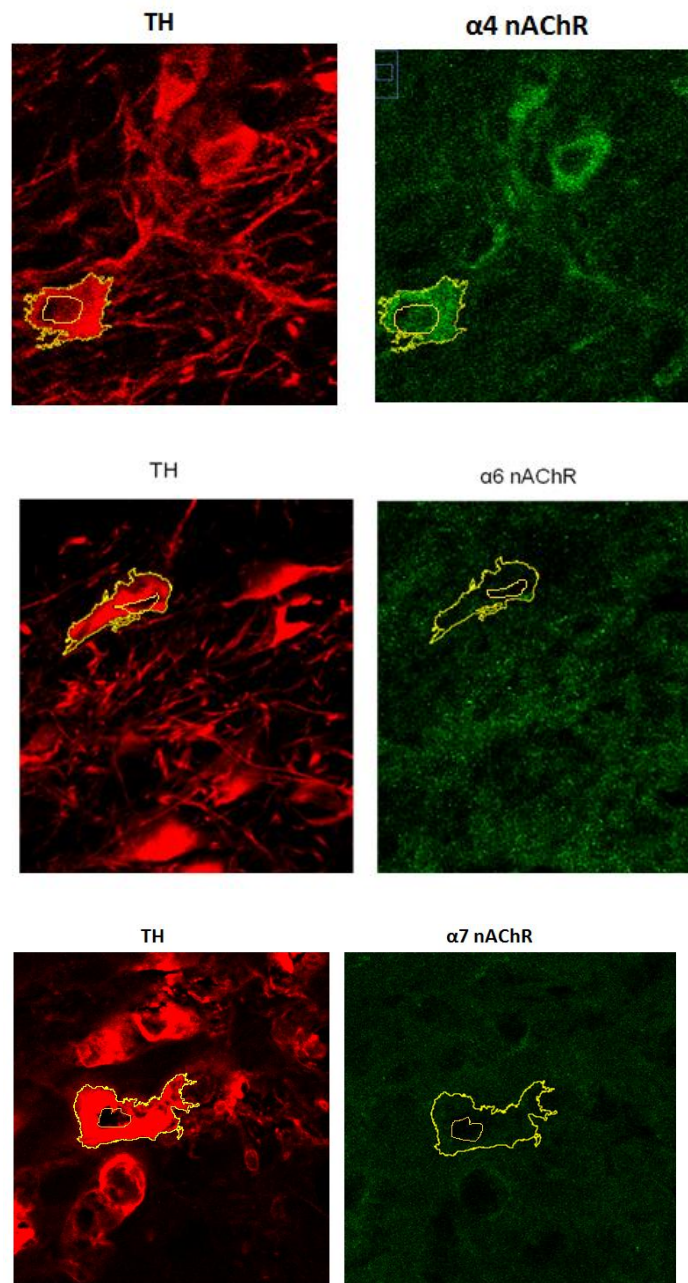


Figura 7: Imágenes representativas de las co-marcaciones para las neuronas dopaminérgicas TH+ y las distintas subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ de los nAChR en la SNpc. En amarillo se muestra la delineación de las neuronas TH+ en la SNpc con omisión del núcleo y la misma coordenada llevada a las figuras de las distintas subunidades de los nAChRs.

6.6 Análisis del CE

Para los análisis en el CE se utilizó N=5 animales por condición experimental y se tomaron **3 cortes** por rata abarcando las coordenadas aproximadas +0,22, +0,16, +0,1mm desde Bregma.

Para el estudio del CE, se dividió el CE en 4 áreas como muestra la figura 8 A, con el objetivo de estudiar cada área por separado ya que cada área del CE es innervada de forma diferente por las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y el ATV (Figura 2 y 8).

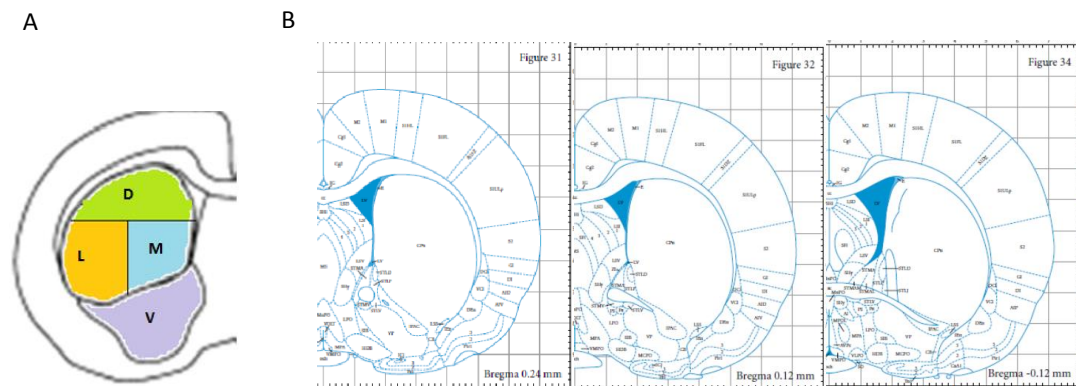


Figura 8: **A:** Dibujo representativo de las 4 áreas analizadas en el CE. M: CE Medial, V: CE Ventral, D: CE Dorsal y L: CE Lateral. **B:** Se muestran las coordenadas aproximadas en las que se realizaron los análisis del CE en uno de los hemisferios del cerebro de rata. Imágenes extraídas del Atlas de Paxinos y Watson [165] de las coordenadas aproximadas analizadas a nivel del CE.

Cuantificación de la disminución de axones dopaminérgicos (porcentaje área ocupada por la señal TH+) y de densidad óptica integrada de la señal TH+ en CE

Como una aproximación para evaluar la degeneración de axones dopaminérgicos, se realizó la cuantificación de la disminución de axones dopaminérgicos remanentes en el CE, mediante la utilización de imágenes de inmunofluorescencia para TH y se cuantificó el porcentaje de área ocupada por la señal TH+ con respecto a un área de tejido seleccionada. En cada medida se cuantificó también la densidad óptica integrada (doi) de la señal TH+ en el CE. La doi se define como la suma de los valores de los píxeles en la imagen o en el área seleccionada, lo que es equivalente al producto del área seleccionada y el "mean gray value".

Utilizando el programa ImageJ se seleccionó el área de tejido a cuantificar y para esto se dibujó un rectángulo de aproximadamente $3,94 \mu\text{m}^2$ el cual fue utilizado para todas las medidas en cada imagen. Una vez seleccionada el área a medir abarcando todo el tejido de la imagen pero evitando las zonas de estriaciones, se ajustó el umbral de la imagen a escala de blancos y negros y se obtuvo el porcentaje de área ocupada por la señal TH+ y la doi de la señal TH+, ambos parámetros con respecto al área de tejido delimitado por el rectángulo. Se cuantificaron 14 áreas por imagen, cubriendo un total de $47,28 \mu\text{m}^2$ con respecto al total del área de la imagen ($198,34 \mu\text{m}^2$) (figura 9).

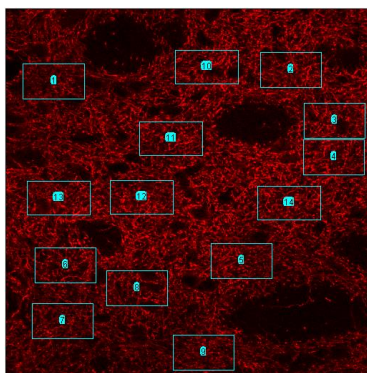


Figura 9: Imagen de inmunomarcación con TH de axones dopaminérgicos en el CE. Se muestra una representación de las 14 áreas seleccionadas arbitrariamente para realizar: 1) la cuantificación de axones dopaminérgicos calculado como el porcentaje de área ocupada por la señal TH+ y 2) la doi de la señal TH+.

Cuantificación del porcentaje de área ocupada por la señal $\alpha 6+$ y la intensidad de la señal $\alpha 6+$ en el CE

Para este análisis se utilizaron las mismas imágenes que para el análisis de la expresión de TH en el CE, ya que se realizaron co-marcaciones para la subunidad $\alpha 6$ de los nAChRs y para la enzima TH.

Se realizó la cuantificación del porcentaje de área ocupada por la señal $\alpha 6+$ respecto a un área de tejido seleccionada y en cada medida se cuantificó también la doi de la señal $\alpha 6+$.

Con el programa ImageJ utilizando las coordenadas tomadas de la imagen para la señal TH+ se traspasaron esas coordenadas hacia la imagen tomada para la señal $\alpha 6+$ y se cuantificó el porcentaje de área ocupada por la señal $\alpha 6+$ con respecto al área de tejido seleccionado con el rectángulo ($3,94 \mu\text{m}^2$) y la doi de la señal $\alpha 6+$. En todas las imágenes se utilizó el mismo rectángulo. Se cuantificaron 14 áreas por imagen, cubriendo un total de $47,28 \mu\text{m}^2$ con respecto al total del área de la imagen ($198,34 \mu\text{m}^2$).

Cuantificación de la intensidad de la señal $\alpha 4+$ en la zona del neuropilo en el CE

Para este análisis se utilizaron las mismas imágenes que para el análisis de la expresión de TH en el CE, ya que se realizaron co-marcaciones para la subunidad $\alpha 4$ de los nAChRs y para la enzima TH.

Se realizó la cuantificación de la de intensidad de la señal $\alpha 4+$ mediante la doi.

Con el programa ImageJ utilizando las coordenadas tomadas de la imagen para la señal TH+ se traspasaron esas coordenadas hacia la imagen tomada para la señal $\alpha 4+$ y se cuantificó la doi de la señal $\alpha 4+$ en la zona del neuropilo en el CE. En todas las imágenes se utilizó mismo rectángulo ($3,94 \mu\text{m}^2$) para realizar la cuantificación. Se cuantificaron 14 áreas por imagen, cubriendo un total de $47,28 \mu\text{m}^2$ con respecto al total del área de la imagen ($198,34 \mu\text{m}^2$).

6.7 Cuantificación de niveles tisulares de DA

La cromatografía es un método de separación física, en la cual, la separación de los distintos componentes de una mezcla, se basa en las diferentes retenciones que experimentan los componentes de la misma al pasar a través de una fase estacionaria, cuando la muestra es eluída por una fase móvil líquida. Así, la separación de los componentes de la muestra se produce debido a sus interacciones entre una fase líquida y una fase estacionaria sólida, contenida en una columna cromatográfica. En este trabajo se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (del inglés: High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, HPLC-ED). Se utilizó la separación por fase reversa en la cual la separación consiste en una fase estacionaria no polar y una fase

móvil polar. Aquí las moléculas se unen hidrofólicamente a ligandos no polares en presencia de un solvente polar y los analitos más polares son los que eluyen primero. Se utilizó un detector electroquímico que se basa en la medición de la corriente eléctrica resultante de la conversión oxidativa o reductiva de un analito en la superficie del electrodo. La DA es una molécula altamente oxidable, que puede ser fácilmente detectada con un detector electroquímico midiendo la corriente eléctrica que se genera cuando ésta se oxida [167].

Para la cuantificación de DA en el cerebro, los animales fueron sacrificados a los 32 días después de la inyección de rotenona o vehículo. Los cerebros se removieron rápidamente, luego se disecó el CE (derecho e izquierdo) y se mantuvieron a -80°C hasta su posterior análisis.

Para determinar los niveles tisulares de DA las muestras fueron pesadas, sonicadas en ácido perclórico 0.1M (1000 μl para el CE) y centrifugadas (15000 g) por 15 minutos a 4°C . Se inyectaron 50 μl del sobrenadante en un HPLC-ED con una columna C-18 (partículas 5 μm , poros 100 Å , 150 mm X 4.6 mm; Phenomenex, USA) y un detector electroquímico (LC-4C BAS) con potencial oxidativo de +0.65 V (electrodo de trabajo de carbón vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl). La fase móvil utilizada estaba compuesta por ácido cítrico (0.15 M), octil-sulfato de sodio (0.6 mM), 4% de acetonitrilo y 1.5% de tetrahidrofurano, pH=3, tasa de flujo 1.2 ml/min. Para cuantificar los niveles de DA se comparó la altura del pico del analito con la de un estándar de concentración conocida. N= 6 ratas por condición experimental.

6.8 Metodología para los estudios comportamentales:

Se evaluó el desempeño motor de los animales utilizando el modelo de campo abierto, el footprint test y el test del cilindro [196, 197, 198].

El footprint test se le realizó a un grupo de animales conformado por N=6 animales por condición, mientras que el campo abierto y el test del cilindro se les realizó a el mismo grupo de animales conformado también por N=6 animales por condición (ver anexo).

Modelo de Campo Abierto

El campo abierto es un modelo ampliamente utilizado para evaluar la actividad locomotora general de los animales [171-173]. Para esto cada animal fue colocado en una caja de 60 x 60 cm con paredes de acrílico rojo de 40 cm de altura y una cámara de video colocada encima del campo abierto, para filmar la conducta de los animales durante 15 minutos. Los animales fueron evaluados a los 6 y 30 días post-lesión en el cuarto de experimentación del Laboratorio de Farmacología Experimental del IIBCE.

Utilizando un programa de video seguimiento Ethovision XP (Noldus) se cuantificaron los siguientes parámetros: distancia recorrida, velocidad, tiempo en movimiento y tiempo en no-movimiento (figura 11 B).

Footprint test

El footprint test se realizó a los 4 como a los 30 días post lesión con el objetivo de evaluar el patrón que tiene cada animal al caminar, se determinó: 1. Distancia entre la pata izquierda y derecha traseras 2. Distancia del paso al caminar y 3. Distancia entre centros de las patas izquierda y derecha traseras (figura 10).

Para ello, se pintaron con pintura no toxica las patas traseras derecha e izquierda y se registraron las huellas de cada pata que el animal deja al caminar por un pasillo de 1 metro de largo y 10 cm de ancho colocando en el piso un papel para registro de las huellas. En todos los casos se toman las medidas de las pasadas en donde los animales lograron caminar sin interrupciones en el andar. Se promediaron las medidas de 6 pasadas por animal.

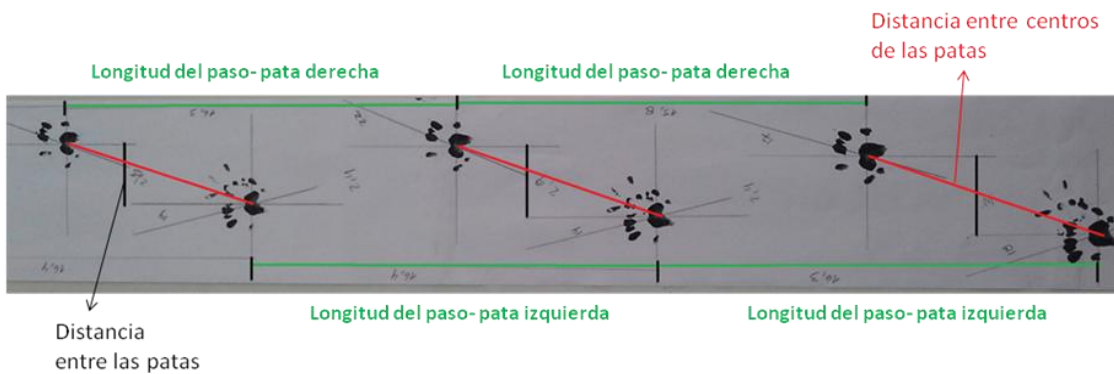


Figura 10: Esquema representativo de las medidas que se realizan en el "Footprint test". 1. las distancias entre la pata izquierda y derecha traseras 2. Distancia del paso al caminar y 3. Distancia entre centros de las patas izquierda y derecha traseras. Imagen representativa del registro de huellas.

Test del Cilindro

Este test nos permitió evaluar la unilateralidad en el uso de las patas delanteras de cada animal en un ambiente novedoso, donde solo pueden explorar de forma vertical realizando los que se conoce como "rearings" [170].

Para ello, se colocó cada animal en un cilindro de 60cm de altura y 15cm de diámetro durante 3 minutos y se filmó el animal desde la parte superior del cilindro. Se realizó este test tanto a los 6 como 30 días post lesión. Luego se determinó en las filmaciones el número de veces que el animal apoyó cada pata delantera cuando se pone erguido en el cilindro ("rearing"). Estos estudios se realizaron en el cuarto de comportamiento del Laboratorio de Farmacología Experimental del IIBCE. Los datos se expresaron como la cantidad de veces que el animal utiliza su pata afectada por la lesión (pata izquierda) en función de las veces que utiliza su pata no afectada por la lesión (pata derecha) (figura 11 A).

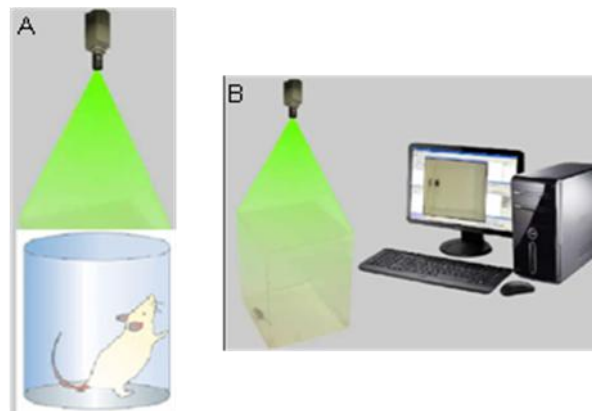


Figura 11: Dibujo representativo de: **A:** Test del Cilindro, se muestra el cilindro y la cámara de video que registra la exploración del animal. **B:** Se muestra el Modelo de Campo Abierto acoplado a una cámara de video y la PC que posee el software de video-seguimiento Ethovision XP.

7. Análisis de los datos

Cuantificación del número de neuronas TH+ en la SNpc

Para este análisis se utilizó N=6 animales por condición experimental y se tomaron **6 cortes** por rata abarcando desde la coordenada -4,84 a la -5,22mm (SNpc) desde Bregma y se inmunomarcaron con TH. Los resultados fueron expresados como la media de la relación entre el número de células TH-positivas en el lado ipsilateral y el contralateral a la lesión \pm el desvío estándar (DE). Para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales se realizó el test de ANOVA de una cola seguido por el test de Tukey.

Cuantificación de la intensidad de la señal de TH y de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ de los nAChRs en las neuronas dopaminérgicas remanentes a la lesión en SNpc

Para este análisis se utilizó N=5 animales por condición experimental y se tomaron **4 cortes** por rata abarcando las coordenadas anterior, medial, medial-posterior y posterior de la SNpc desde Bregma (aprox. -4,8; -5,00; -5,16mm de Bregma).

En todos los casos se cuantificó la intensidad de fluorescencia ("mean gray value") de la TH o de las distintas subunidades ($\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$) en la SNpc de ambos hemisferios en cada animal. En cada coordenada se cuantificó la intensidad de fluorescencia en las células en cada área de la SNpc (figura 6), luego se realizó un promedio de la intensidad de fluorescencia en las células por área. Por último se realizó un promedio entre todas las áreas de la SNpc medidas. El mismo análisis se realizó para el caso de la intensidad de fluorescencia de la señal de las distintas subunidades ($\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$).

Los resultados fueron expresados como la media de la relación entre la intensidad de fluorescencia de cada señal en el lado ipsi y el contralateral a la lesión \pm DE. Para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales se realizó el test de ANOVA de una cola seguido por el test de Tukey.

Cuantificación de la doi de TH y de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ de los nAChRs en los axones dopaminérgicos remanentes en el CE.

Para los análisis en el CE se utilizó N=5 animales por condición experimental y se tomaron **3 cortes** coronales por rata abarcando las coordenadas aproximadas +0,22, +0,16, +0,1mm desde Bregma. Se cuantificó la doi de la señal TH+ o $\alpha 6+$ o $\alpha 4+$ en las diferentes áreas del CE (figura 9).

Luego se realizó un promedio de la doi de cada señal y se realizó este análisis en cada área del CE por separado y se promedió el resultado de los 3 cortes por animal. Los resultados fueron expresados como la media de la relación entre la doi de cada señal analizada en el lado ipsi y el contralateral a la lesión \pm DE. Para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales se realizó el test de ANOVA de una cola seguido por el test de Tukey.

Análisis de los datos de la cuantificación de los niveles de DA en el CE

Para los análisis en el CE se utilizó N=6 animales por condición experimental.

Los resultados fueron expresado como ng de DA por gramo de tejido (ng/g tejido).

Los resultados fueron expresados como porcentaje de los niveles de DA del lado ipsilateral (derecho) con respecto al lado contralateral a la lesión (izquierdo) (%D/I). Para evidenciar diferencias entre los grupos, los datos fueron analizados mediante el test ANOVA de una cola seguido por el test de Tukey.

Análisis de datos de los test funcionales

Para el caso de los tres test comportamentales utilizados, los datos fueron expresados como la media \pm DE. Para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales se realizó el test de ANOVA de una cola seguido por el test de Tukey.

8. Resultados

8.1. Análisis de la progresión de la lesión con rotenona

La EP es una patología progresiva, por lo tanto esta característica es deseable en un modelo experimental en donde se estudian tanto las bases neurológicas de la patología como posibles blancos terapéuticos. Para realizar el análisis de la progresión de la lesión en nuestro modelo de EP se inyectaron animales con rotenona (1µg en un volumen final de 1µl) o vehículo de la toxina (1 µl de DMSO/PGL) en el HMCA y se sacrificaron a los 8 días luego de la inyección intracerebral.

El tejido fue procesado para inmunofluorescencia junto con el de animales controles y se procedió a la cuantificación del número de células TH-positivas en la SNpc.

La cuantificación del número de células TH-positivas en la SNpc a los 8 días post inyección intracerebral de rotenona o su vehículo se comparó con la cuantificación realizada a los 30 días post inyección en el trabajo de mi tesis de grado en Licenciatura (ver antecedentes particulares). Los resultados muestran que a los 8 días luego de la inyección de rotenona hay un 30% de muerte de células TH-positivas, en el lado ipsilateral a la lesión con respecto al lado contralateral. Esta disminución del número de células TH-positivas a los 8 días post lesión no es significativa con respecto a los animales controles. La disminución de células TH+ a los 30 días post lesión (62% de muerte) fue significativa con respecto a los 8 días post lesión (figura 12).

La inyección intracerebral de DMSO/PGL (vehículo de la rotenona) mostró una pequeña tendencia a disminuir el número de células TH-positivas en el tiempo, pero que no llega a ser significativa entre los grupos analizados 8 y 30 días post inyección o cuando se compara con los valores de animales controles.

Por otro lado, el número de células TH-positivas a los 30 días luego de la administración de rotenona es significativamente diferente con respecto al número de células de los animales inyectados con DMSO/PGL y analizados luego de 30 días.

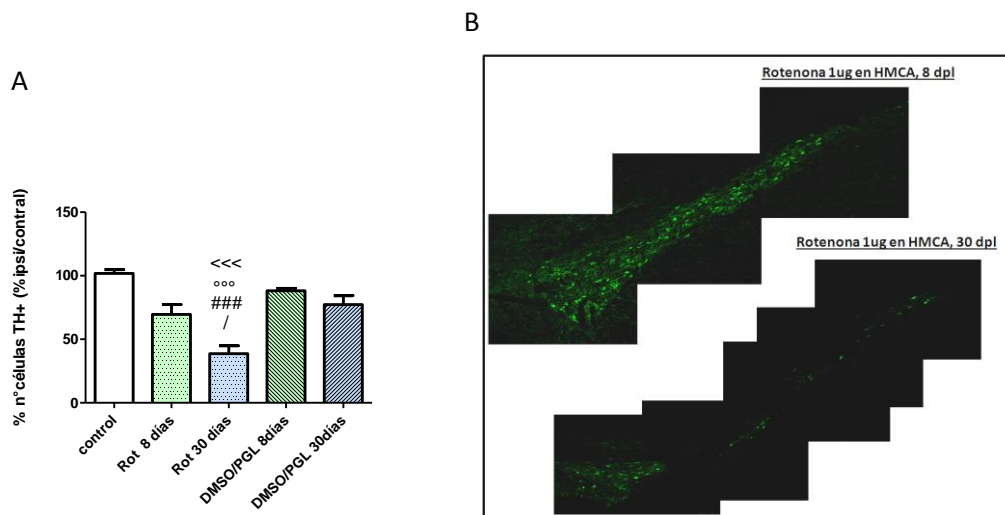


Figura 12: Progresión de la lesión con rotenona inyectada en el HMCA: A: Cuantificación del número de células TH-positiva en la SNpc a los 8 días, comparado con el número a los 30 días post inyección (antecedentes particulares). Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre el número de células TH-positivas en el lado ipsilateral y el contralateral a la inyección intracerebral. ### = $p < 0.0001$ con respecto al control, *** = $p < 0.0001$ con respecto a dmsO/pgl 30 días, <<< = $p < 0.0001$ con respecto a DMSO/PGL 8 días y /= $p < 0.05$ con respecto a Rotenona 8 días. Test de ANOVA seguido por test de Tukey. N = 6 animales por grupo experimental **B:** Imágenes representativas de neuronas TH+ (en verde) en cortes coronales de SNpc. Se muestra arriba: SNpc de animal inyectado con rotenona luego de 8 días, abajo: SNpc de animal inyectado con rotenona luego de 30 días. N = 6-7 animales por condición experimental.

8.2. Análisis de la SNpc

Para estudiar los efectos del tratamiento con nicotina en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemisferio lesionado, se cuantificó el número de células TH-positivas, la intensidad de la señal TH-positiva y la intensidad de la señal de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ del nAChR en las células dopaminérgicas remanentes de la SNpc ipsilateral a la inyección intracerebral, en animales controles, inyectados con el vehículo de rotenona en el HMCA, inyectados con rotenona en el HMCA con y sin tratamiento con nicotina. Estos estudios se realizaron a los 32 días luego de las inyecciones intracerebrales.

8.2.1 Cuantificación del número de células TH-positivas

La administración de rotenona en el HMCA causó una disminución significativa del 55% en el número de neuronas TH-positiva de la SNpc en el lado ipsilateral con respecto al lado contralateral a los 32 días post inyección. Esta disminución fue prevenida significativamente en los animales que recibieron el tratamiento con nicotina (figura 13).

No se observaron diferencias significativas en el número de células TH+ en la SNpc de los hemisferios contralaterales entre los diferentes grupos experimentales (Anexo, figura1).

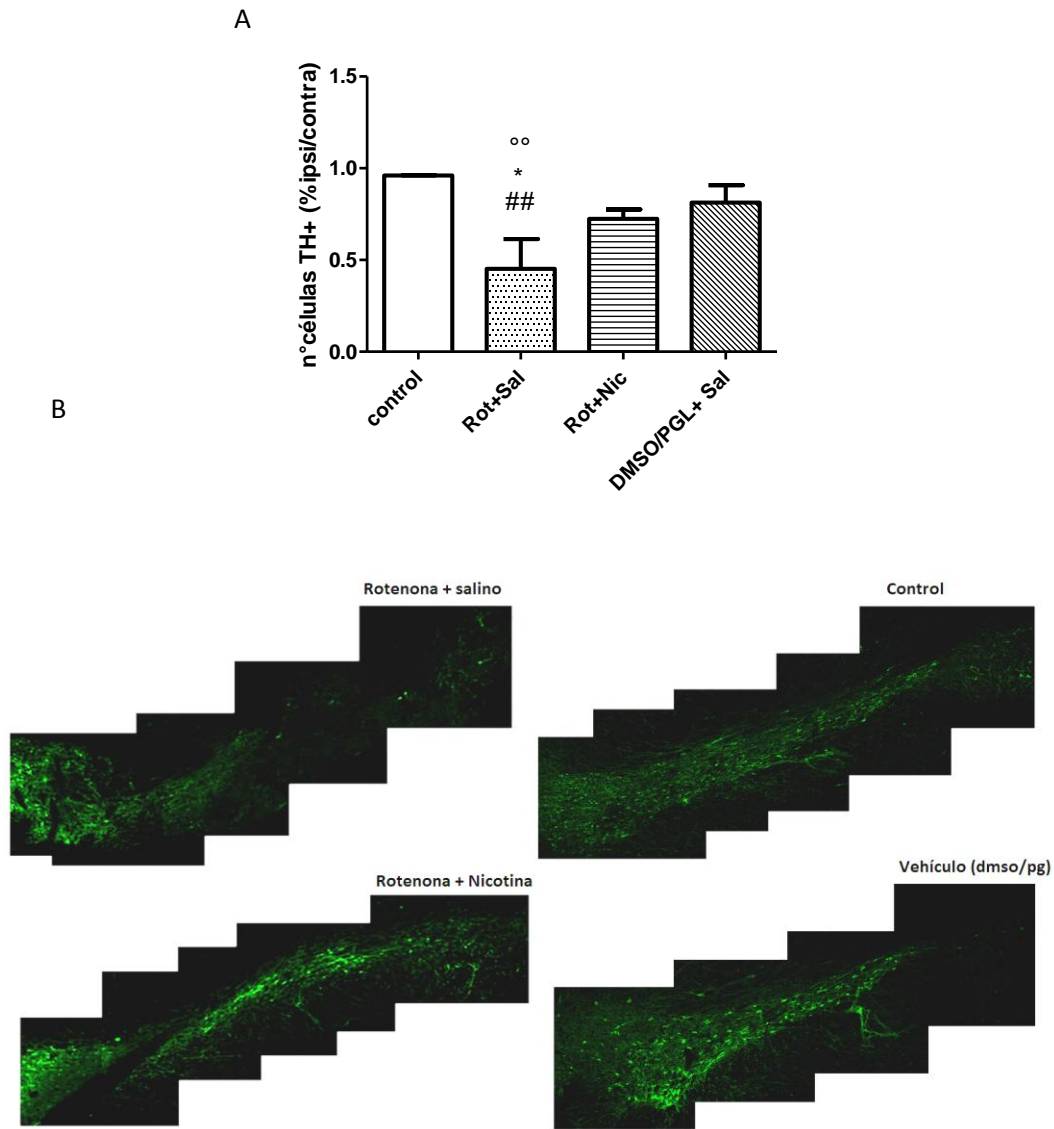


Figura 13: Efecto del tratamiento con nicotina sobre el número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc. **A:** Cuantificación del número de células TH-positivas en la SNpc de los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre el número de células TH-positivas en el lado ipsilateral y el contralateral a la inyección intracerebral. ## = $p < 0,001$ con respecto al Control, $^{\circ\circ}$ = $p < 0,001$ con respecto a dms0/pgl y * = $p < 0.05$ con respecto a Rot+Nic. Test de ANOVA seguido por test de Tukey **B:** Imágenes representativas de la SNpc ipsilateral a la inyección en los diferentes grupos experimentales. Se observan las neuronas TH-positivas (verde) de cortes coronales. Microscopía confocal 20x. N = 4-6 animales por condición experimental.

8.2.2 Cuantificación de la intensidad de la señal TH+ en neuronas remanentes de la SNpc

Para estudiar si la expresión de la enzima TH se modifica luego de la lesión con rotenona y con el tratamiento con nicotina, se determinó la intensidad de la señal TH en las neuronas dopaminérgicas en los diferentes grupos experimentales. La señal de la expresión de la enzima TH en las neuronas dopaminérgicas remanentes en la SNpc, no parecería estar afectada por la lesión con rotenona, su vehículo o el tratamiento con nicotina (figura 14).

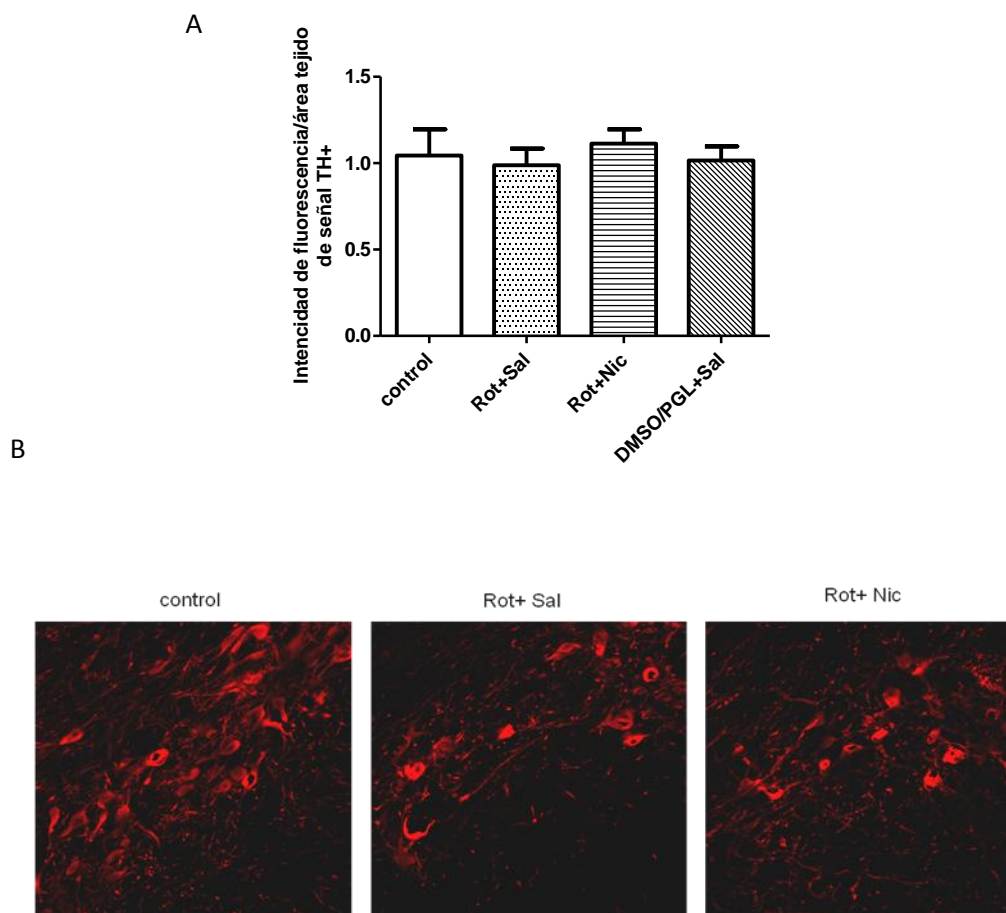


Figura 14: Intensidad de fluorescencia de la señal TH+ en neuronas TH **A:** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la señal TH+ en neuronas TH. Los datos son expresados como la media de la relación entre la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de a señal TH+ del lado ipsilateral a la lesión y el lado contralateral \pm DE. **B:** Imágenes representativas de la SNpc ipsilateral a la lesión. Se observan las neuronas dopaminérgicas TH+ (rojo) de la SNpc, de cortes coronales. Las imágenes fueron tomadas utilizando Microscopía confocal con un aumento de 40x. N= 4-5 animales por condición experimental.

No se observaron diferencias significativas en la intensidad de la señal TH en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de los hemisferios contralaterales entre los diferentes grupos experimentales (Anexo, figura 2).

8.2.3 Cuantificación de la intensidad de las señales de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ de los nAChR en las neuronas dopaminérgicas remanentes de la SNpc

Se determinó la intensidad de la señal $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ en las neuronas TH-positivas en los diferentes grupos experimentales.

La expresión de la subunidad $\alpha 4+$ de los nAChRs en las neuronas remanentes TH+ de la SNpc, no mostró alteraciones con ninguno de los tratamientos (Figura 15).

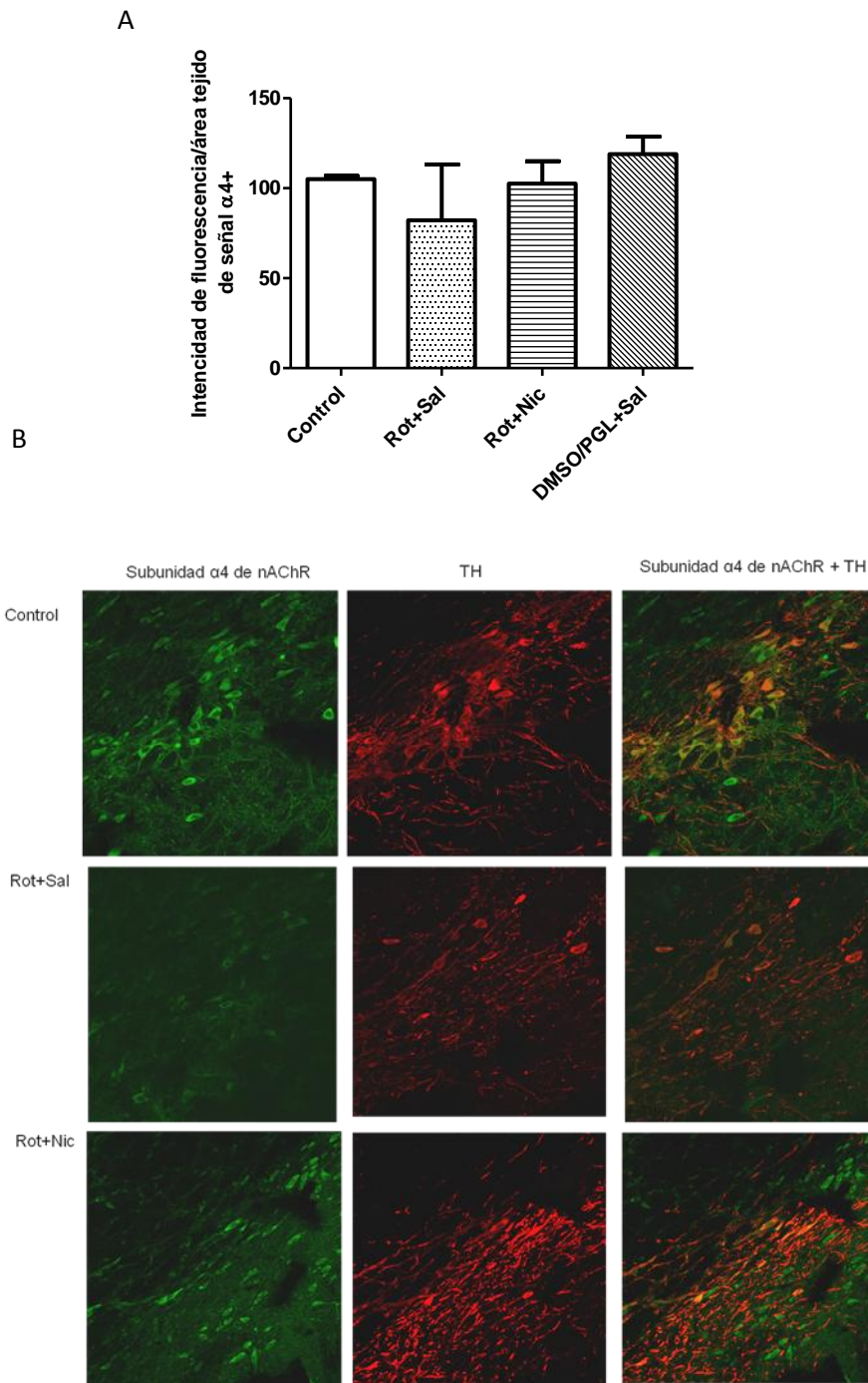


Figura 15: Efecto de los tratamientos sobre la expresión de la subunidad $\alpha 4$ de los nAChR en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc **A:** Cuantificación de la intensidad de la señal de la subunidad $\alpha 4$ de nAChR en neuronas TH+ en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre la cuantificación del valor promedio de la intensidad de fluorescencia (“mean grey value”) del lado ipsilateral a la lesión y el contralateral. **B:** Imágenes representativas de la co-inmunomarcación para TH y $\alpha 4$ de la SNpc ipsilateral a la inyección intracerebral. Se observan las neuronas dopaminérgicas TH+ en color rojo y la subunidad $\alpha 4$ de nAChR en verde. Las imágenes fueron tomadas utilizando Microscopía confocal con un aumento de 40x. N= 4-5 animales por condición experimental.

Por otro lado, los animales inyectados con rotenona presentaron una disminución significativa de la expresión de la subunidad $\alpha 6+$ de los nAChRs en las neuronas TH+ con respecto a los animales inyectados con el vehículo de la rotenona (pero no con respecto a los animales controles). Esta

disminución se pierde cuando los animales son lesionados con rotenona y tratados con nicotina (Figura 16).

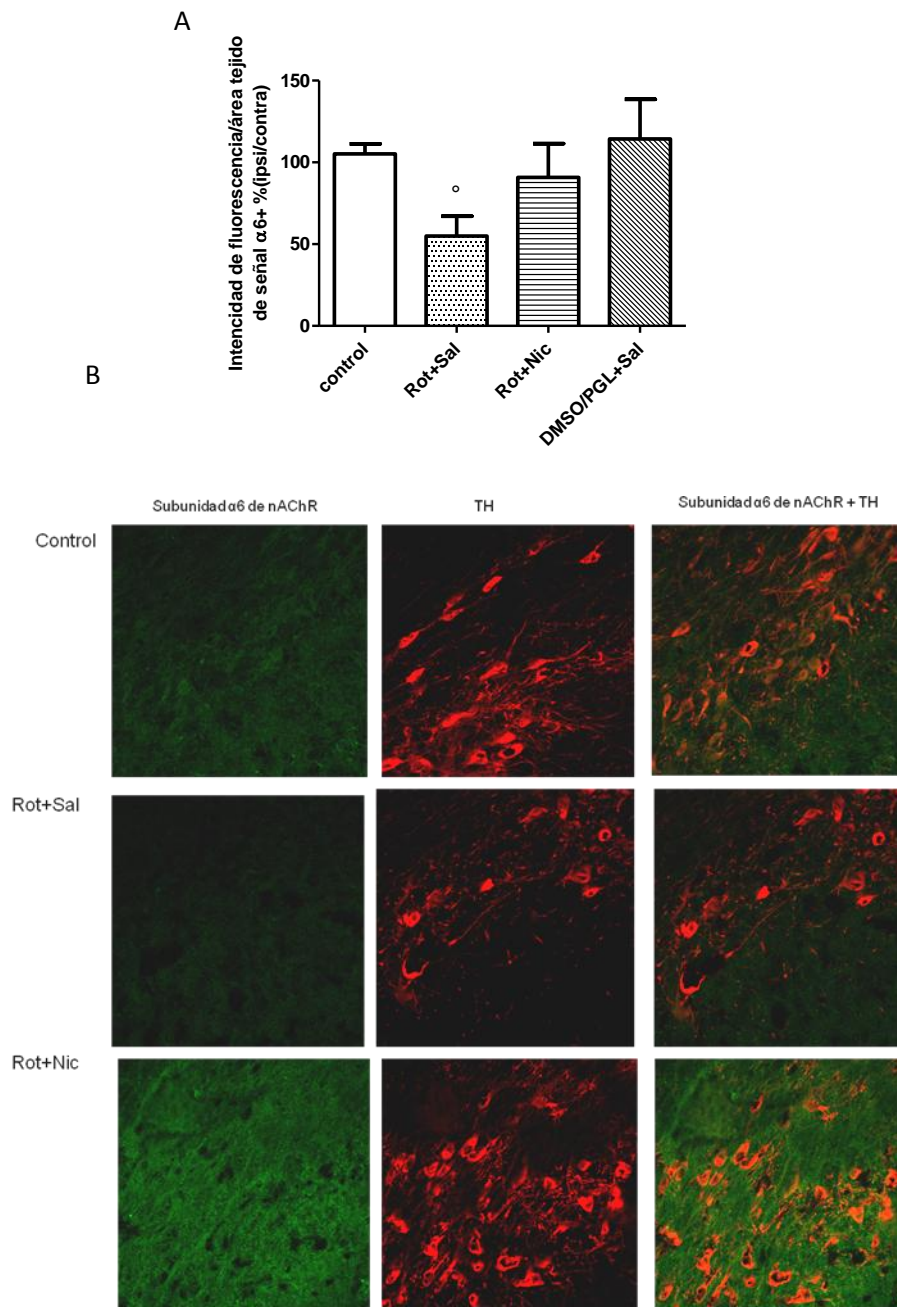


Figura 16: Efecto de los tratamientos sobre la expresión de la subunidad $\alpha 6$ de los nAChR en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. **A:** Cuantificación de la intensidad de la señal de la subunidad $\alpha 6$ de nAChR en neuronas TH+ en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre la cuantificación del valor promedio de la intensidad de fluorescencia ("mean grey value") del lado ipsilateral a la lesión y el contralateral. Test de ANOVA seguido por test de Tukey. **B:** Imágenes representativas de la co-inmunomarcación para TH y $\alpha 6$ de la SNpc ipsilateral a la inyección intracerebral. Se observan las neuronas dopaminérgicas TH+ en color rojo y la subunidad $\alpha 6$ de nAChR en verde. Las imágenes fueron tomadas utilizando Microscopía confocal con un aumento de 40x. N= 4-5 animales por condición experimental.

La expresión de la subunidad $\alpha 7$ de los nAChR en las neuronas TH+ remanentes de la SNpc fue similar en todos los grupos experimentales (figura 17).

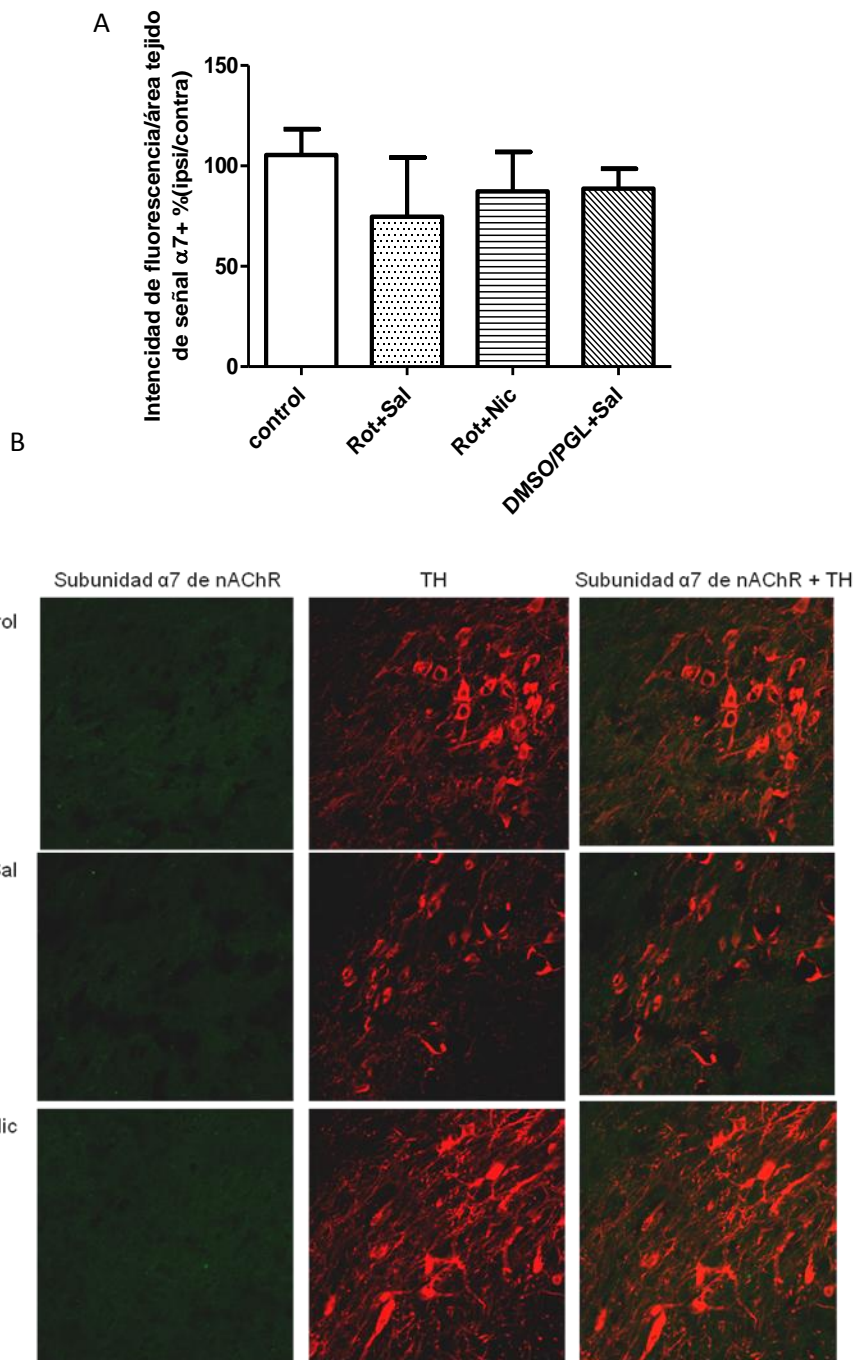


Figura 17: Efecto de los tratamientos sobre la expresión de la subunidad $\alpha 7$ de los nAChR en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. **A:** Cuantificación de la intensidad de la señal de la subunidad $\alpha 7$ de nAChR en neuronas TH+ en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre la cuantificación del valor promedio de la intensidad de fluorescencia ("mean grey value") del lado ipsilateral a la lesión y el contralateral. Test de ANOVA seguido por test de Tukey. **B:** Imágenes representativas de la co-inmunomarcación para TH y $\alpha 7$ de la SNpc ipsilateral a la inyección intracerebral. Se observan las neuronas dopaminérgicas TH+ en color rojo y la subunidad $\alpha 7$ de nAChR en verde. Las imágenes fueron tomadas utilizando Microscopía confocal con un aumento de 40x. N= 4-5 animales por condición experimental.

No se observaron diferencias significativas en la intensidad de la señal para $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de los hemisferios contralaterales entre los diferentes grupos experimentales (Anexo, figura 3).

8.3. Análisis del Cuerpo Estriado

Para estudiar los efectos del tratamiento con nicotina sobre los axones dopaminérgicos en el CE lesionado, se determinaron los niveles tisulares de DA, la densidad de axones dopaminérgicos, la intensidad de fluorescencia de la señal TH+ y de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ de los nAChR en el CE ipsilateral a la inyección intracerebral en todos los grupos experimentales. Estos estudios se realizaron a los 32 días luego de las inyecciones intracerebrales.

8.3.1 Cuantificación de los niveles tisulares de DA en el CE

Se evaluó el efecto de la lesión con rotenona y del tratamiento de nicotina sobre los niveles de DA en el CE cuantificados por HPLC en todos los grupos experimentales.

En los animales lesionados con rotenona, los niveles remanentes de DA fueron significativamente menores que los controles (23% y 101% para rotenona y controles, respectivamente). El tratamiento con nicotina previno significativamente la disminución de DA del lado lesionado: los niveles de DA en el CE lesionado de este grupo experimental mostraron un 60% de DA remanente en el CE, valor muy similar a los animales tratados con DMSO/PGL. Los animales que fueron inyectados con el vehículo de la rotenona (DMSO/PGL) mostraron una tendencia a presentar menos DA en el CE que no fue significativa con respecto al grupo control (figura 18).

No se observaron diferencias significativas en los niveles de DA en el CE de los hemisferios contralaterales entre los diferentes grupos experimentales (Anexo, figura 4).

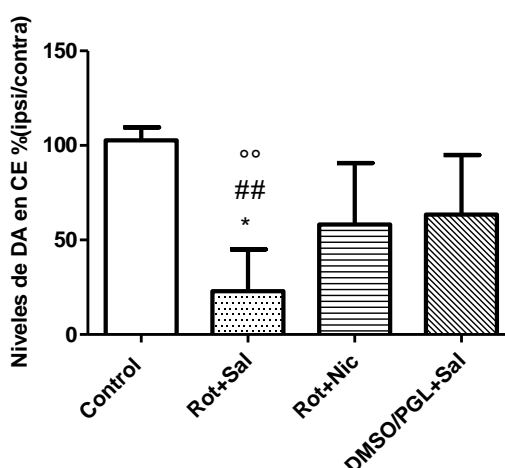


Figura 18: Cuantificación de los niveles tisulares de DA en el CE. Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre los niveles de DA del lado ipsilateral y contralateral a la inyección intracerebral. ## = $p < 0.001$ con respecto al control, °° = $p < 0.001$ con respecto a DMSO/PGL+Sal * = $p < 0.05$ con respecto a Rot+Nic. Test de ANOVA seguido por test de Tukey. N = 4-6 animales por condición experimental.

8.3.2 Cuantificación de la densidad de los axones dopaminérgicos en el CE

Para evaluar si la lesión con rotenona causa una disminución del número de axones dopaminérgicos en el CE y estudiar el efecto del tratamiento con nicotina en este parámetro se realizó la cuantificación del porcentaje de área ocupada por la señal TH+ en las distintas zonas del CE en los cuatro grupos experimentales. Los resultados muestran que de las cuatro zonas del CE analizadas (figura 8), la lesión con rotenona afectó significativamente la zona del CE lateral causando una disminución del 44% del área ocupada por la señal TH+. El tratamiento con nicotina previno significativamente esta disminución (figura 19 y 20). Los animales tratados con el vehículo de la rotenona no mostraron alteraciones.

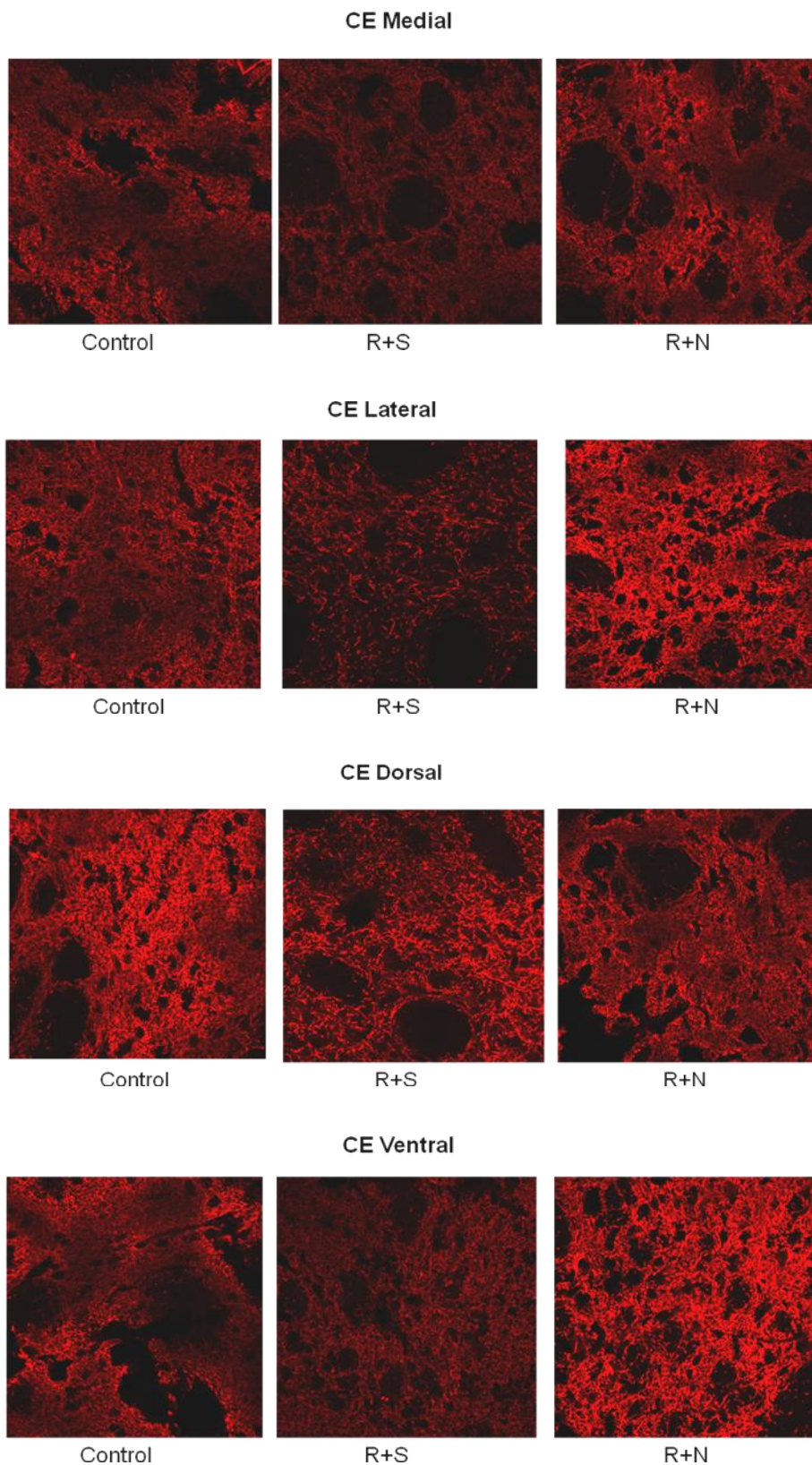


Figura 19: Imágenes representativas de cortes coronales del CE ipsilaterales a la inyección intracerebral inmunomarcados para TH. Se observan los axones dopaminérgicos TH+ (rojo) en las diferentes regiones del CE analizadas (Medial, Lateral, Dorsal y Ventral). Las imágenes fueron tomadas utilizando Microscopía confocal con un aumento de 40x.

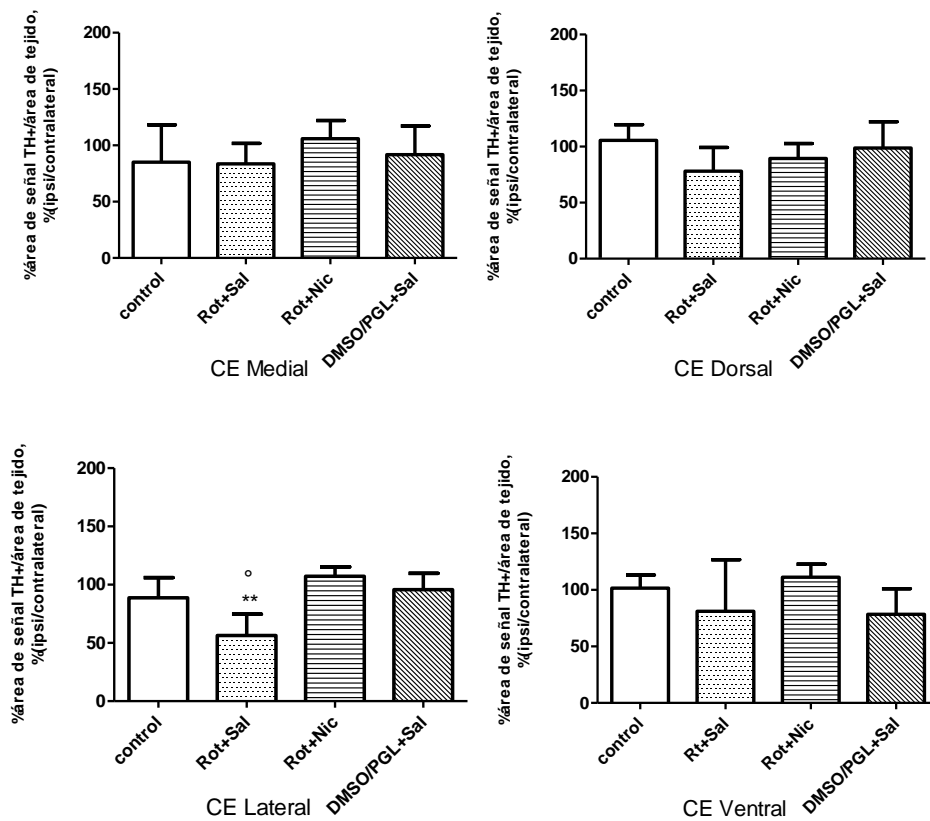


Figura 20: Cuantificación del % de área ocupada por la señal TH-positiva en las diferentes zonas del CE analizadas. Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre el % de área ocupada por la señal TH-positiva del lado ipsi y contralateral a la lesión. ** = $p < 0.001$ con respecto a Rot+ Nic y $^{\circ}$ = $p < 0.05$ con respecto a DMSO/PGL+Sal. Test de ANOVA seguido por test de Tukey. N=4-5 animales por condición experimental.

No se observaron diferencias significativas en el % de área ocupada por la señal TH en las diferentes regiones analizadas del CE de los hemisferios contralaterales entre los diferentes grupos experimentales (Anexo, figura 5).

8.3.3 Cuantificación de la intensidad de la señal TH+ en el CE

Para evaluar si la lesión con rotenona o el tratamiento con nicotina afectan los niveles de TH en el CE, se evaluó la intensidad de la señal de TH en las 4 zonas del CE. Los resultados muestran que la lesión con rotenona disminuyó un 49% la intensidad de la señal de TH+ en el CE lateral, disminución significativa con respecto a los animales controles. Esta disminución fue prevenida significativamente por el tratamiento de nicotina (figura 21).

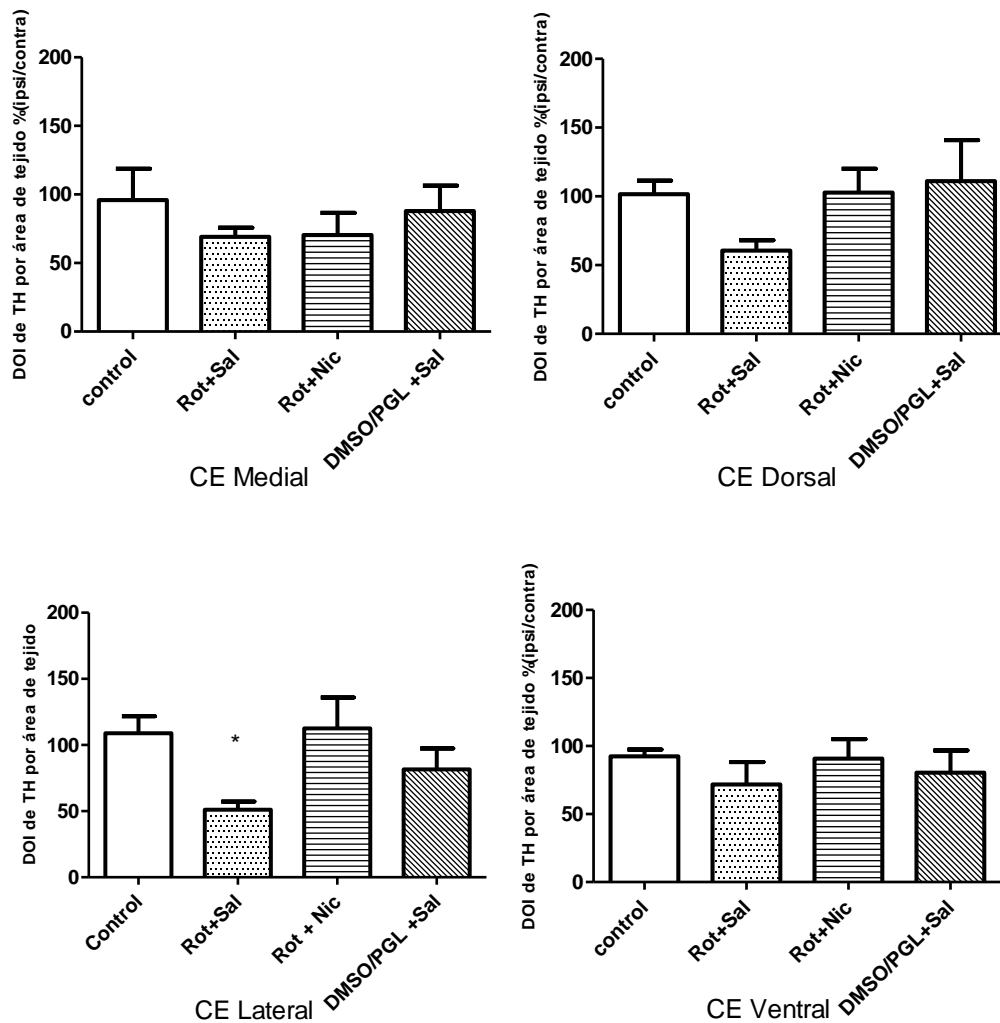


Figura 21: Cuantificación de la señal TH-positiva en las diferentes regiones del CE analizadas (Medial, Lateral, Dorsal y Ventral). Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre la cuantificación la densidad óptica integrada (DOI) del lado ipsilateral a la lesión y el contralateral. * = $p < 0.05$ con respecto a Rot+ Nic. Test de ANOVA seguido por test de Tukey. N=4- 5 animales por condición experimental.

No se observaron diferencias significativas en la intensidad de la señal TH en las diferentes regiones analizadas del CE de los hemisferios contralaterales entre los diferentes grupos experimentales (Anexo, figura 6).

8.3.4 Cuantificación de la intensidad de la señal $\alpha 4+$ en la zona del neuropilo en el CE

Para evaluar si la lesión con rotenona afecta la expresión de la subunidad $\alpha 4$ de los nAChR en el CE y estudiar el efecto del tratamiento con nicotina en este parámetro se realizó la cuantificó la señal $\alpha 4$ el neuropilo de las distintas zonas del CE en los cuatro grupos experimentales. Los resultados muestran que la lesión con rotenona no afecta la intensidad de señal de esta subunidad en ninguna de las áreas evaluadas. Por otro, lado el tratamiento de nicotina indujo una tendencia a incrementar la intensidad de

la señal de esta subunidad en la zona del CE lateral y dorsal comparado con los controles que no es significativa (figura 22 y 23).

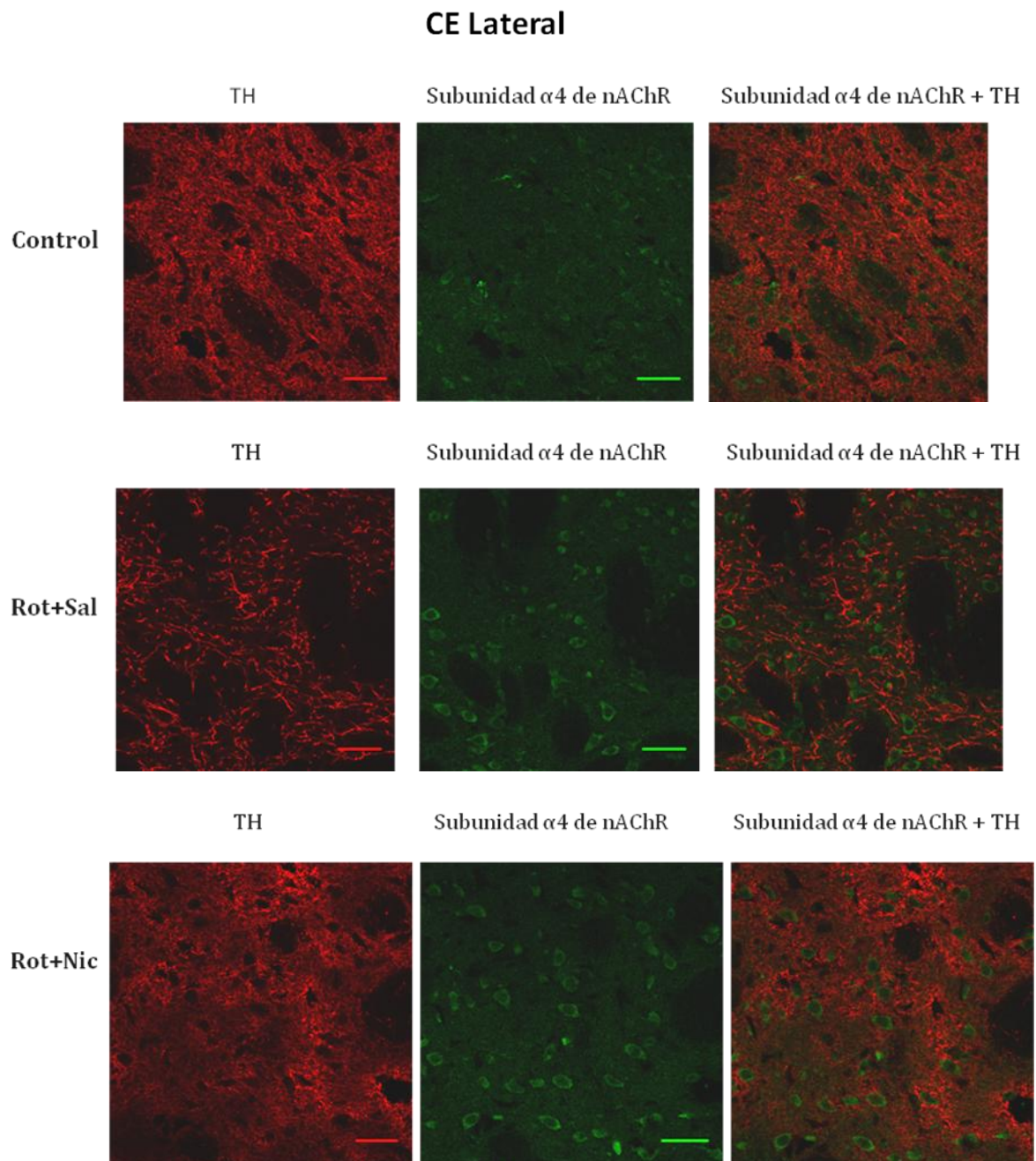


Figura 22: Imágenes representativas de cortes coronales del CE lateral hemisferio ipsilateral a la inyección intracerebral inmunomarcados para TH (rojo) (izquierda), $\alpha 4$ (verde) (medio) y superposición de ambas fotos (derecha). Las imágenes fueron tomadas utilizando Microscopía confocal con un aumento de 40x. Escala=50 μ m.

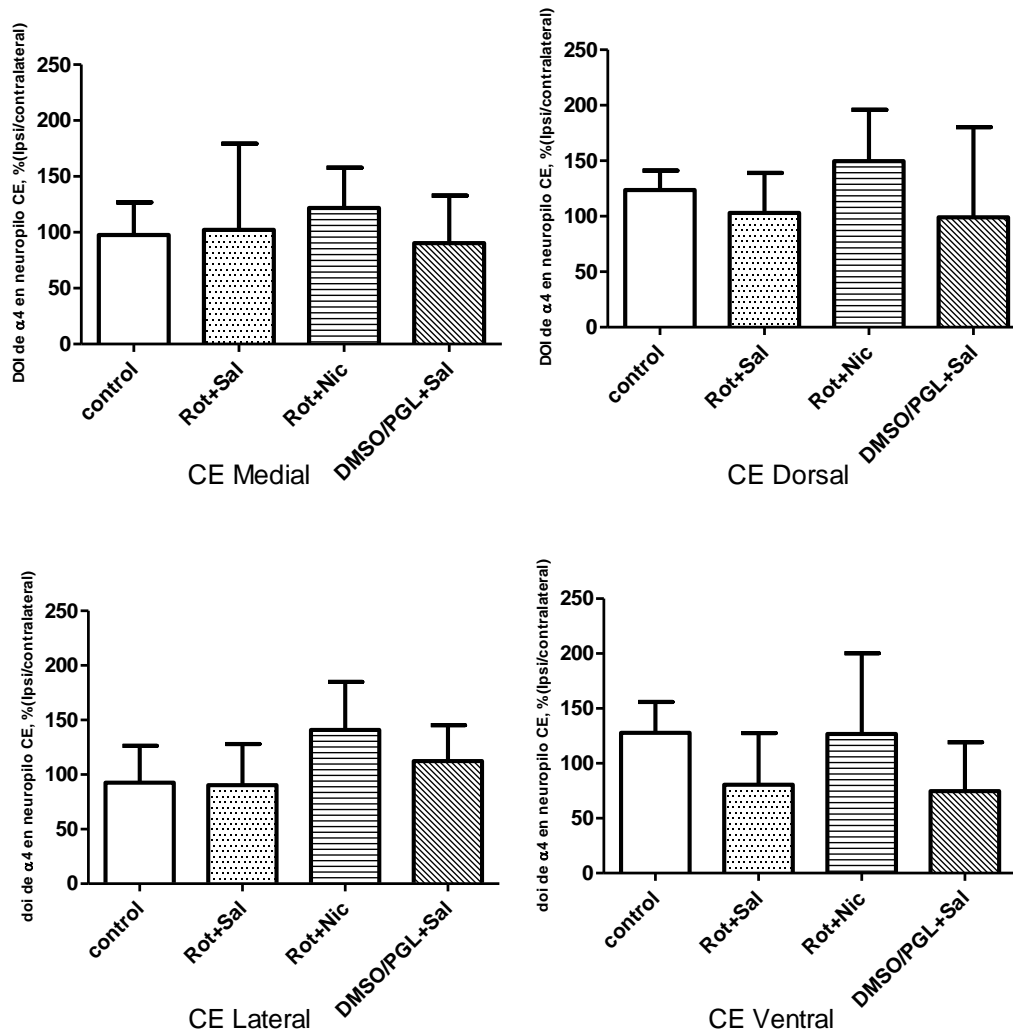


Figura 23: Cuantificación de la intensidad de la señal $\alpha 4$ en la zona del neuropilo en las diferentes regiones del CE analizadas (Medial, Lateral, Dorsal y Ventral). Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre la cuantificación la densidad óptica integrada (DOI) del lado ipsilateral a la lesión y el contralateral. N=4- 5 animales por condición experimental.

No se observaron diferencias significativas en la intensidad de la señal $\alpha 4$ en las diferentes regiones analizadas del CE de los hemisferios contralaterales entre los diferentes grupos experimentales (Anexo, figura 7).

8.3.5 Cuantificación del porcentaje de área ocupada por la señal $\alpha 6$ en el CE

Se cuantificó el porcentaje del área ocupada por la señal $\alpha 6+$ en las diferentes zonas del CE analizadas en los 4 grupos experimentales. Los resultados muestran que de las cuatro zonas analizadas, la lesión con rotenona afectó únicamente la zona del CE lateral causando una tendencia a disminuir 32% del área ocupada por la señal $\alpha 6+$ tendencia que es prevenida por el tratamiento con nicotina. A su vez, el tratamiento con nicotina también fue capaz de inducir un aumento significativo en el % del área ocupada por la señal $\alpha 6+$ con respecto al grupo control, el inyectado con DMSO/PGL y el inyectado con rotenona (figura 24).

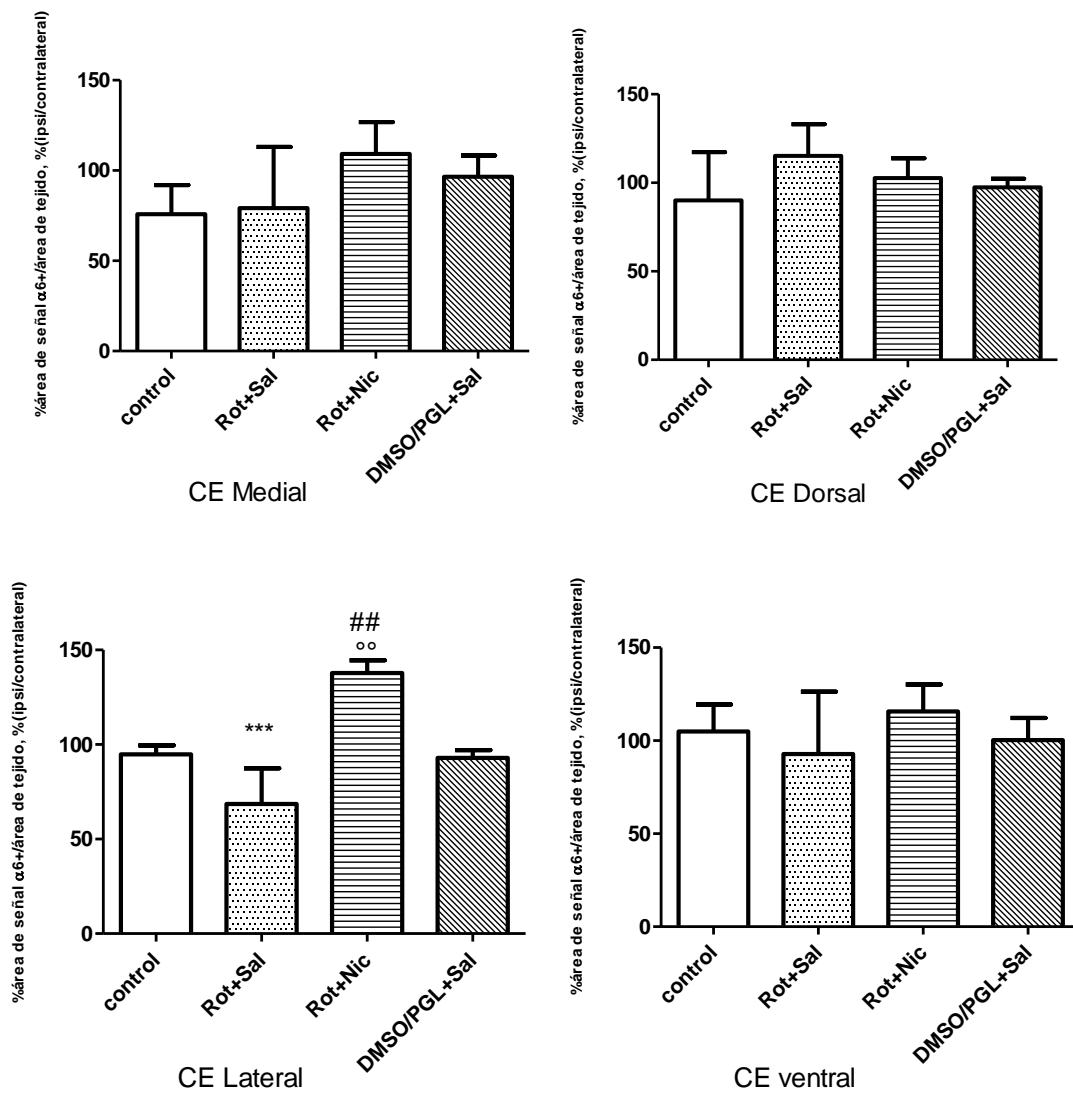


Figura 24: Cuantificación del % del área ocupada por la señal de la subunidad $\alpha 6$ de nAChR en las diferentes regiones del CE analizadas (Medial, Lateral, Dorsal y Ventral). Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre la cuantificación del % del área ocupado por la señal del lado ipsilateral a la lesión y el. *** = $p < 0.0001$ con respecto a Rot+Nic, ## = $p < 0.001$ con respecto al control y °° = $p < 0.001$ con respecto a DMSO/PGL+Sal (vehículo de la rotenona). Test de ANOVA seguido por test de Tukey. N=4- 5 animales por condición experimental.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de área ocupada por la señal $\alpha 6$ en las diferentes regiones analizadas del CE de los hemisferios contralaterales entre los diferentes grupos experimentales (Anexo, figura 8).

8.3.6 Cuantificación de la intensidad de la señal $\alpha 6+$ de nAChR en el CE

La cuantificación de la intensidad de la señal para la subunidad $\alpha 6$ de nAChR en el CE mostró que para la zona del CE lateral la rotenona induce una tendencia a disminuir la expresión de esta subunidad. Por otro lado, el tratamiento con nicotina parecería inducir una tendencia a prevenir la disminución de esta subunidad (figura 25).

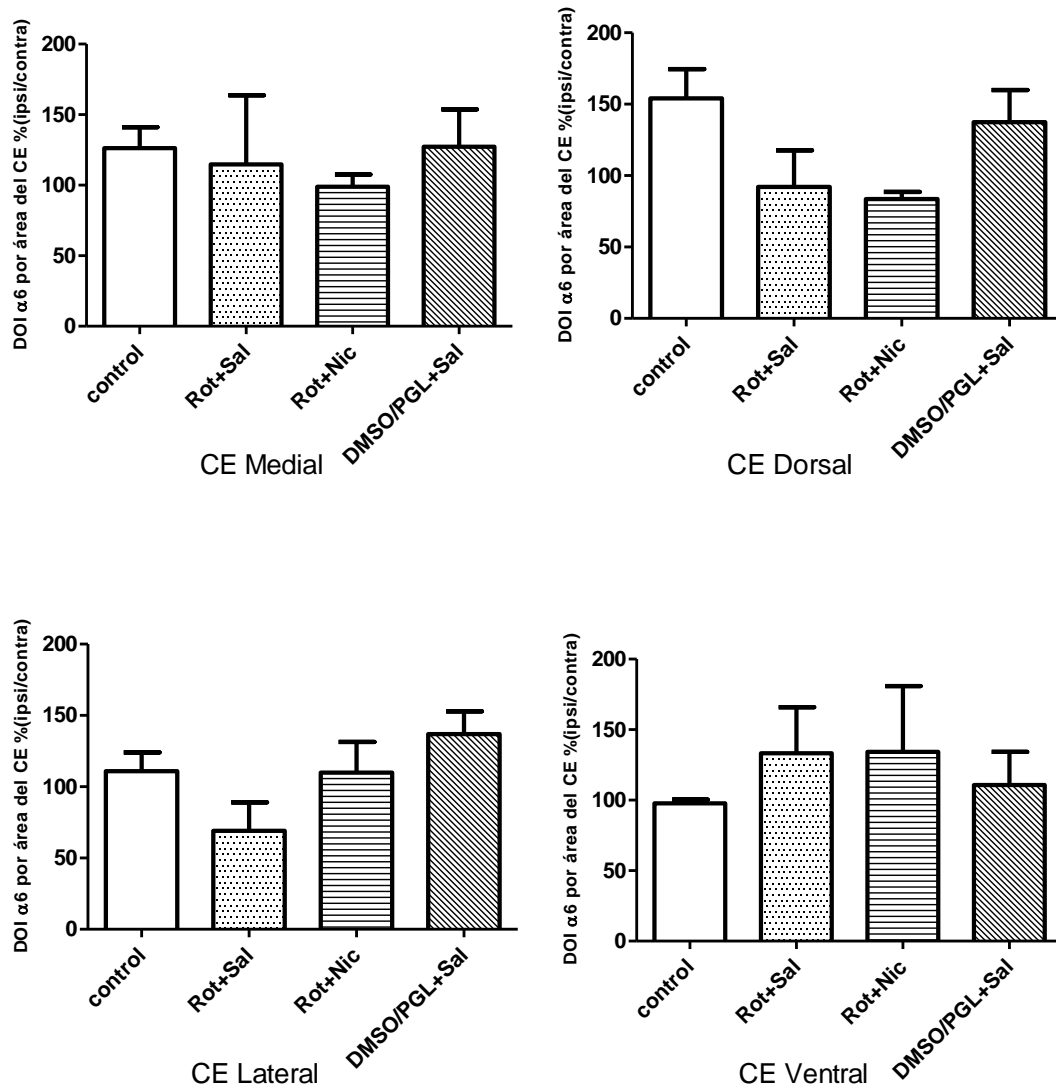


Figura 25: Cuantificación de la intensidad de la señal de la subunidad $\alpha 6$ de nAChR en las diferentes regiones del CE analizadas (Medial, Lateral, Dorsal y Ventral). Los datos son expresados como la media \pm DE de la relación entre la cuantificación de doi de la señal del lado ipsilateral a la lesión y el contralateral. N=4- 5 animales por condición experimental.

No se observaron diferencias significativas en la intensidad de la señal $\alpha 6$ en las diferentes regiones analizadas del CE de los hemisferios contralaterales entre los diferentes grupos experimentales (Anexo, figura 9).

CE Lateral

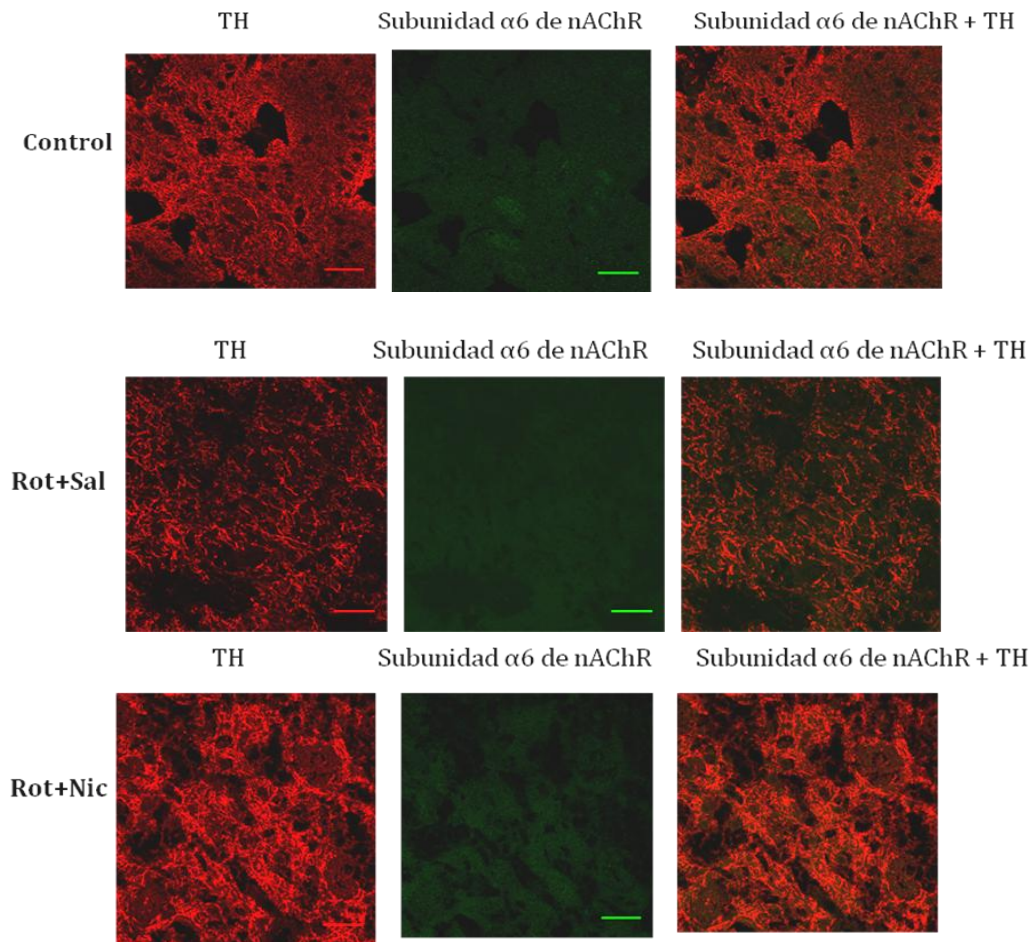


Figura 26: Imágenes representativas de cortes coronales del CE lateral hemisferio ipsilateral a la inyección intracerebral. Se observa la señal de la inmuno-marcación para TH (rojo) (izquierda), $\alpha 6$ (verde) (medio) y superposición de ambas fotos (derecha). Las imágenes fueron tomadas utilizando Microscopía confocal con un aumento de 40x. Escala=50 μ m.

8.4. Evaluación de la función motora

Para estudiar si los cambios inducidos por el tratamiento con nicotina tendientes a normalizar las alteraciones causadas por la lesión con rotenona en las neuronas dopaminérgicas se veían reflejadas en mejoras funcionales, realizamos evaluaciones de la función motora a los animales de los diferentes grupos experimentales utilizando 3 tests comportamentales: campo abierto, footprint test y test del cilindro.

8.4.1. Campo Abierto

Los resultados de la medición de los diferentes parámetros de actividad locomotora horizontal en campo abierto (velocidad, el tiempo en movimiento, tiempo en no movimiento y distancia recorrida) no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales tanto a los 6 como a los 30 días post lesión (figura 27).

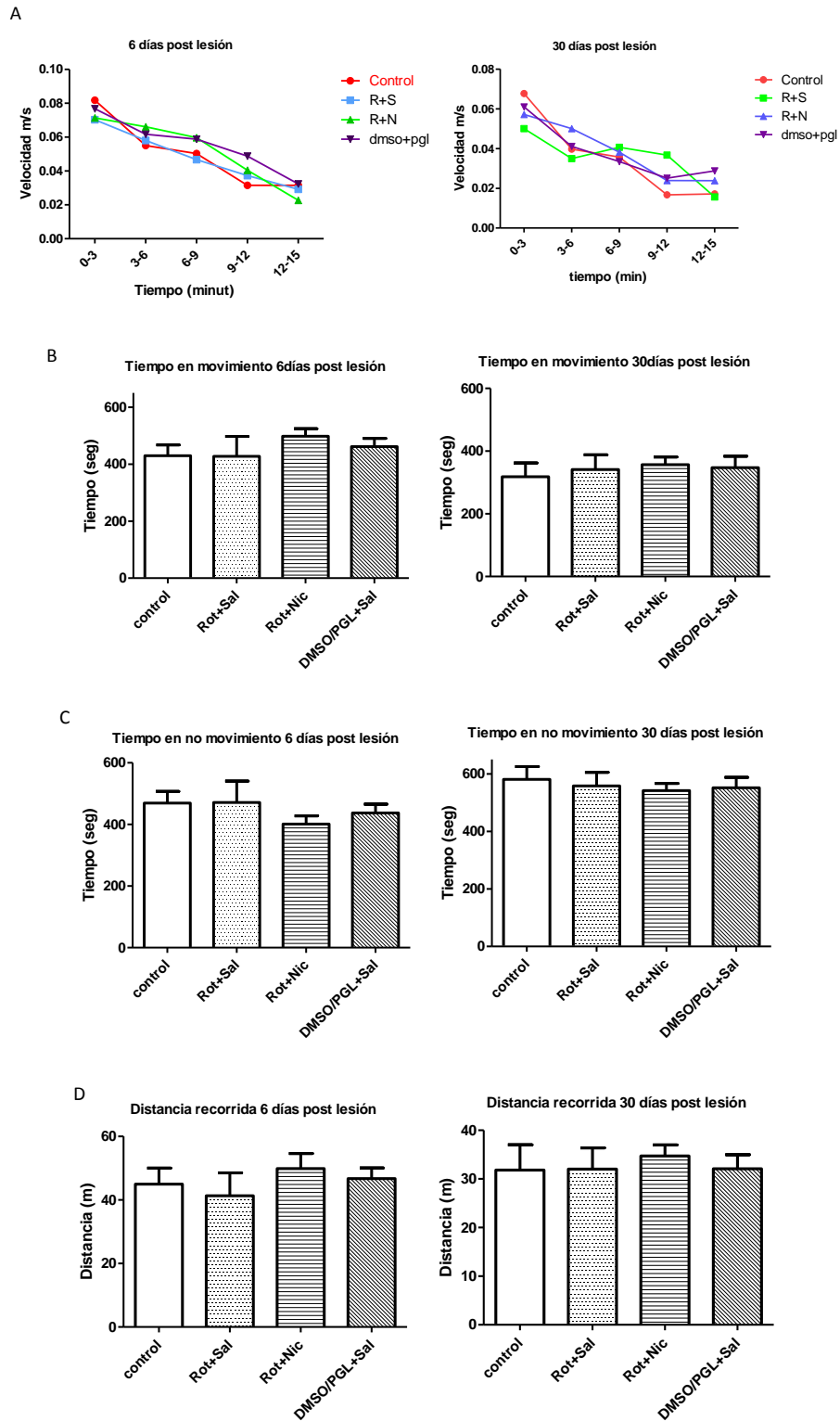


Figura 27: Estudio de la actividad locomotora en campo abierto utilizando el programa Etho-Vision. A: velocidad de exploración, B: tiempo en movimiento, C: tiempo en no movimiento y D: distancia recorrida. Todos los parámetros fueron evaluados a los 6 y 30 días post lesión. N=4- 6 animales por condición experimental.

8.4.2. Footprint test

Los resultados evidenciaron que la lesión genera que los animales acorten el paso a los 4 días post lesión (parámetro 2: distancia del paso al caminar) significativamente con respecto a los animales control, sin embargo se pierde esta diferencia a los 30 días post lesión. Esta alteración no se observa en los animales lesionados y tratados con nicotina a los 4 días ni a los 30 días post lesión. En los otros parámetros evaluados (distancias entre la pata izquierda y derecha traseras y distancia entre centros de las patas izquierda y derecha traseras), no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales (Tabla 3).

Tabla 3: Evaluación motora utilizando el Footprint Test. En este test se evaluaron los siguientes parámetros: **1.** la distancia del paso de cada pata trasera (izquierda y derecha) **2.** Distancia entre patas (izquierda y derecha traseras) y **3.** Distancia entre centros de las patas izquierda y derecha traseras.

4 días post-lesión	Paso pata I ± SD (cm)	Paso pata D ± SD (cm)	Distancia entre patas I-D ± SD (cm)	Distancia entre centros ± SD (I-D) (cm)
R+Sal	12,8 [#] ± 1,13	12,61 [#] ± 1,17	3,55 ± 0,44	7,24 ± 0,4
R+Nic	13,64 ± 0,71	13,74 ± 0,67	3,60 ± 0,38	7,65 ± 0,25
DMSO/PGL+Sal	14,12 ± 1,18	14,05 ± 1,3	3,74 ± 0,31	8,10 ± 0,92
Control	14,47 ± 0,76	14,38 ± 0,66	3,95 ± 0,39	8,30 ± 0,41
30 días post-lesión	Paso pata I ± SD (cm)	Paso pata D ± SD (cm)	Distancia entre patas I-D ± SD (cm)	Distancia entre centros ± SD (I-D) (cm)
R+Sal	14,70 ± 1,48	14,60 ± 1,55	3,52 ± 0,49	7,95 ± 0,57
R+Nic	15,38 ± 1,33	15,39 ± 1,09	3,53 ± 0,31	8,51 ± 0,51
DMSO/PGL+Sal	15,47 ± 1,41	15,09 ± 1,48	3,84 ± 0,19	8,62 ± 1,08
Control	16,14 ± 0,95	15,96 ± 1,11	3,52 ± 8,69	8,69 ± 0,39

Los datos son expresados como la media ± DE. # = $p < 0.05$ con respecto al control a los 4 días post lesión. Test de ANOVA seguido por test de Tukey. N=4- 6 animales por condición experimental.

8.4.3. Test del Cilindro

A los 6 días luego de la inyección intracerebral no se observaron alteraciones motoras en el test del Cilindro en ninguno de los grupos experimentales (igual porcentaje de uso de ambas patas delanteras). Sin embargo, a los 30 días post lesión, los animales lesionados con rotenona mostraron una preferencia en el uso de la pata derecha (pata no afectada por la lesión) en comparación al uso de la pata izquierda (pata afectada, 28% de uso). Esta lateralidad en el uso de las patas es prevenida en los animales tratados con nicotina, evidenciada por la utilización indistinta de ambas patas para la exploración en el grupo de animales que recibieron el agonista (pata afectada por la lesión, 90% de uso). Los animales controles y los inyectados con el vehículo de la rotenona no mostraron preferencia por el uso de las patas delanteras para explorar (figura 28).

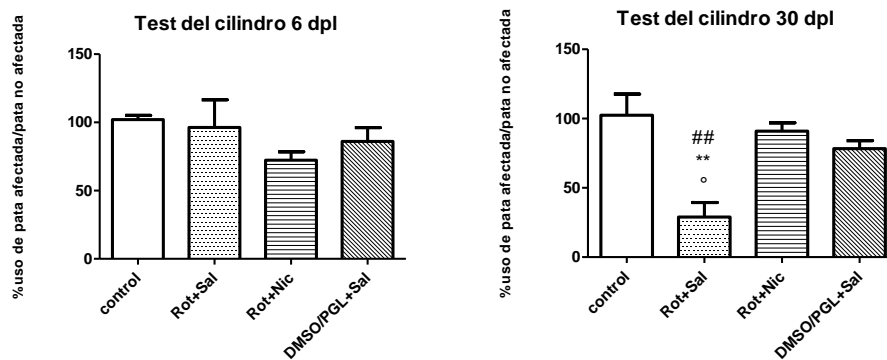


Figura 28: Evaluación de la función motora mediante el test del cilindro: Se muestra el desempeño motor en el Test del cilindro evaluado a los 6 y 30 luego de la inyección intracerebral. Los datos son expresados como el % de la media de la relación entre el la pata afectada por la lesión y la pata no afectada \pm DE. ** = $p < 0.001$ con respecto a Rot+Nic, ## = $p < 0.001$ con respecto al control y ° = $p < 0.05$ con respecto a dmsO/pgl. Test de ANOVA seguido por test de Tukey. N= 4-6 animales por condición experimental.

9. Discusión

En el presente trabajo de Maestría se evaluó la posible neuroprotección mediante un tratamiento crónico intermitente de nicotina en un modelo de EP en ratas. Así mismo, se estudiaron los efectos que este tratamiento tiene sobre los nAChRs en las neuronas remanentes en la SNpc con el fin de contribuir con el conocimiento de posibles mecanismos de neuroprotección.

9.1 Modelo de EP experimental con rotenona

La evaluación del modelo de EP con rotenona inyectada en el HMCA, mostró tener una muerte lenta y progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (figura 12) ya que a los 8 días de administración la toxina solo se observó un 30% comparado con un 62% de muerte a los 30 días.

Esto lo hace un excelente modelo para el estudio del posible tratamiento neuroprotector planteado. Además, esta toxina causa una lesión oxidativa [174] y tiene la ventaja frente a otras toxinas utilizadas como la 6-OHDA y MPTP, que induce la formación de agregados de α -sin tipo CL [174, 128, 129]. Esto último ha llevado a plantear que los modelos de EP con rotenona se asemejan mejor la fisiopatología de la enfermedad.

En relación al valor de la utilización de rotenona como modelo para la EP, se ha visto que la mejor forma de utilizarla es inyectándola localmente, ya que la administración sistémica (ej vía sub-cutánea) produce un severo daño en órganos periféricos [130].

9.2 Neuroprotección

Como primera aproximación para evaluar el posible efecto neuroprotector del agonismo nicotínico, se cuantificó el número de células TH-positivas en animales lesionados con rotenona y tratados con nicotina. Este análisis evidenció un efecto neuroprotector inducido por el agonista frente a la lesión generada por la toxina, ya que previno la muerte de las neuronas dopaminérgicas (figura 13). El protocolo de administración de nicotina de una dosis diaria desde 5 días antes y hasta 30 días post lesión fue capaz de prevenir significativamente la muerte de neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Este efecto positivo del tratamiento crónico de nicotina se observa también sobre los niveles de DA en el CE total (figura 18). Los estudios de la TH en los axones dopaminérgicos indican que el aumento de DA en el CE luego del tratamiento con nicotina, se podría deber a una mayor cantidad de terminales dopaminérgicas en el CE.

El análisis a nivel del CE mostró que únicamente en el CE lateral se observa una disminución de axones dopaminérgicos con la lesión y esta disminución es prevenida significativamente con el tratamiento de nicotina (figura 19 y 20). El resto de las áreas del CE analizadas no mostraron ser afectadas a nivel de terminales dopaminérgicos por la lesión. Como se mencionó en la introducción, el HMCA es un haz de axones que proyecta rostralmente desde la SNpc y ATV hacia distintas áreas del CE. La SNpc proyecta principalmente hacia el CE lateral y dorsal, mientras que el ATV proyecta hacia el CE ventral (Núcleo Accumbens) y medial (figura 2). Si bien la inyección de rotenona se realiza en el HMCA, los resultados del análisis del CE mostraron que no parecería haber lesión en el CE ventral, lo que indicaría que no habría lesión en las neuronas dopaminérgicas del ATV. Por otro lado, la lesión se concentra en la zona del CE que es principalmente inervada por las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (CE lateral), lo que se corresponde con la muerte de neuronas dopaminérgicas observada en la SNpc. El hecho de que no parecería haber lesión en las neuronas dopaminérgicas del ATV, se puede deber a la diferencia en la vulnerabilidad entre las neuronas dopaminérgicas del ATV y las de la SNpc [ver Recuadro 2].

Como enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas, la TH es el principal punto de control en la neurotransmisión en las neuronas catecolaminérgicas, y es sujeto de diversos mecanismos de regulación [42,43]. El análisis de la intensidad de la señal TH-positiva en las neuronas dopaminérgicas remanentes, mostró que la expresión de la enzima TH en el soma no se modifica con la lesión. Sin embargo la expresión de TH en los axones dopaminérgicos remanentes en la zona del CE lateral de animales lesionados presenta una tendencia a disminuir, probablemente por la pérdida de axones dopaminérgicos.

El tratamiento de nicotina previene significativamente la disminución de los niveles de TH en los axones dopaminérgicos del CE (figura 21). Este efecto probablemente se corresponda con el mayor número de axones observados en el CE lateral luego del tratamiento con nicotina. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que el agonismo nicotínico también induzca un incremento de la expresión de la enzima TH, efecto que ha sido bien estudiado. Tratamientos prolongados de nicotina son capaces de incrementar la concentración del mRNA de la enzima TH y consecuentemente incrementar la actividad de esta enzima tanto in vivo como in vitro [175, 177]. Este efecto es calcio- dependiente y es mediado por la proteína Kinasa A [176]. La nicotina es capaz de inducir la expresión de los genes que codifican para TH y esta inducción requiere de incrementos en la concentración de calcio, la activación de canales dependientes de los reservorios de calcio y de las vías ERK/MAPK [19]. Por otro lado, existen evidencias en modelos de EP, que han mostrado que la nicotina estimula la síntesis de TH en las terminales dopaminérgicas generando aumento en los niveles de DA en el CE, aumento que no está asociado con la prevención de la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc [93].

Se necesitan más estudios para poder dilucidar si el incremento evidenciado con el tratamiento de nicotina de la expresión de la enzima TH en el CE lateral se debe únicamente a que hay una mayor cantidad de axones dopaminérgicos en comparación a los animales lesionados o a que además existe un incremento de la enzima TH en los axones dopaminérgicos remanentes.

Para estudiar los efectos de la lesión y el tratamiento con nicotina sobre el desempeño motor de los animales se utilizaron 3 test comportamentales: actividad locomotora, footprint test y test del cilindro. Cada uno de estos test funcionales es capaz de evaluar diferentes tipos de movimientos que están mediados por diferentes circuitos cerebrales. Mientras que el modelo de campo abierto de actividad locomotora y el Footprint test evalúa movimientos aprendidos, automáticos, el test del cilindro evalúa movimientos espontáneos/voluntarios. Los movimientos aprendidos/ automáticos involucran el sistema global sensorio-motor que incluye la corteza motora, cerebelo y circuitos de estriado/ganglios basales. Por otro lado, los movimientos espontáneos/voluntarios requieren de finos movimientos de miembros individuales que son primeramente mediados por circuitos estriales [57].

Los diferentes parámetros evaluados de actividad locomotora horizontal en campo abierto, no mostraron diferencias entre los grupos experimentales. Este test nos permitió evaluar la performance general de los animales, como ser la velocidad de exploración y el tiempo en movimiento (figura 27). Los datos indican que la lesión unilateral moderada con rotenona no induce un deterioro general de los animales. En el mismo sentido, no se observaron alteraciones en el peso de los animales luego de la lesión, otro parámetro indicador del estado fisiológico general (datos no mostrados).

La evaluación del paso de los animales con el footprint test mostró que a los 4 días post lesión existe un acortamiento del paso en los animales lesionados con respecto a los controles, mientras que los animales lesionados y tratados con nicotina no presentaron esta alteración. A los 30 días post lesión (cuando la lesión está establecida) no existen diferencias significativas en los distintos parámetros en la locomoción entre los grupos experimentales (Tabla 3). Este acortamiento del paso de los animales lesionados a los 4 días post lesión, no se correlaciona con muerte de neuronas dopaminérgicas en la

SNpc, por lo tanto no parecería ser un déficit funcional debido a la neurodegeneración de la vía nigroestriatal podría ser un efecto inflamatorio agudo de la administración de rotenona [206]. Estos resultados muestran que no hubo alteraciones en la locomoción de los animales con la lesión. La locomoción es un movimiento aprendido, automático y es probable que los otros circuitos involucrados sean suficientes para no evidenciar alteraciones en este comportamiento.

La evaluación de las patas delanteras de los animales evidenciada mediante el test del cilindro, mostró que a los 6 días post lesión, no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en el uso de las patas delanteras para realizar la exploración vertical (“rearing”) de las paredes del cilindro. Sin embargo, a los 30 días post lesión (cuando la lesión ya está establecida) si existe una preferencia en el uso de la pata no afectada por la lesión para realizar la exploración vertical en el cilindro (figura 28) indicando una alteración en el procesamiento motor.

Por lo tanto, se podría decir que los resultados obtenidos en el test del cilindro muestran una progresión funcional de la lesión que se correlaciona con el grado de muerte y progresión de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (grafico 28 y 12). Por otro lado, los animales lesionados y que recibieron el tratamiento con nicotina, utilizan ambas patas indistintamente para la exploración vertical de las paredes del cilindro a los 30 días post lesión. Este resultado indica que la protección inducida por el agonismo nicotínico a nivel celular y bioquímico de la vía nigroestriatal resulta en una mejor performance motora del animal. En nuestro modelo la zona del CE lateral es la más afectada, que según Cho y cols [207], es la zona junto con el CE ventral, en donde están representadas las patas delanteras, las cuales mostraron un déficit unilateral con la lesión evidenciada con el test del cilindro. Por otro lado la zona del CE dorsal no parecería estar afectada por la lesión, en esta zona se encuentran representadas las patas traseras de los roedores, lo que es congruente con los resultados del footprint test, en donde no se evidenció un déficit de las patas traseras por la lesión [37, 78].

El test del cilindro está evidenciando la muerte del sistema nigroestriatal unilateral, indicando que es un test más sensible para evaluar la función de los GB en comparación a los otros test empleados.

Conclusión de la neuroprotección evidenciada

En conclusión este modelo experimental de EP parecería presentar un daño selectivo y moderado de la vía nigroestriatal, que es adecuado para evidenciar los efectos beneficiosos de la nicotina. En este modelo de EP el agonismo nicotínico indujo neuroprotección a nivel del soma neuronal y terminales dopaminérgicas, así como también una prevención en la disminución de los niveles de DA y su enzima de síntesis TH, en el CE. Además se evidenció una mejora funcional con el tratamiento de nicotina que se correlaciona con la neuroprotección evidenciada.

Hasta el momento los estudios que evidencian neuroprotección por agonismo nicotínico a nivel de prevención de muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc en modelos in vivo de EP, son muy pocos. Si bien, uno de los trabajos en donde se evidencia prevención de muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc es en un modelo en ratón, los estudios de mejoras en la integridad estriatal por agonismo nicotínico en modelos de daño nigroestriatal en ratones son contradictorios [156].

Parecería ser que los modelos parkinsonianos en ratas y monos son más robustos para este tipo de estudios, indicando que estos modelos son preferibles para estudiar posibles drogas neuroprotectoras. En particular la mejora funcional de la vía nigroestriatal inducida por nicotina en modelos de EP en ratas

parecería ser independiente del tipo de lesión, pero no así del tamaño de la lesión, donde se obtiene un gran nivel de mejora en la integridad estriatal con lesiones menos severas [92]. Sin embargo, en modelos en ratas hasta el momento no se ha evidenciado prevención de muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc con el agonismo nicotínico.

El régimen de tratamiento de nicotina influye en los resultados. La administración aguda de nicotina activa los nAChRs, mientras que la administración continua puede desensibilizar e inactivar los nAChRs [180]. Por ejemplo, la infusión de nicotina a través de minibombas osmóticas, un tratamiento que desensibiliza significativamente los nAChRs, no solo que no es protector frente a la neurotoxicidad inducida por MPTP sino que a su vez incrementa esta toxicidad [181-183]. Por otro lado, altas dosis de nicotina también contribuyen a incrementar el estrés oxidativo [184, 185]. Este efecto tóxico de la nicotina generado por tratamientos, podría deberse a que induce la liberación exacerbada de calcio dentro de la célula y agravar más que proteger contra la muerte celular. En general, exposiciones continuas de nicotina son menos efectivas en neuroprotección en comparación a exposición a nicotina aguda o crónica intermitente [181-183].

Existen otras variables relacionadas con la administración de nicotina que podría afectar la neuroprotección. Por ejemplo, pre-tratamientos de nicotina son más eficientes que post-tratamientos, indicando que el efecto de la nicotina sería una atenuación del progreso de la lesión más que un efecto neuro-restaurativo [27]. Además, la dosis de nicotina ha mostrado ser muy relevante para la neuroprotección, en donde se ha visto que se da una reducida neuroprotección tanto con dosis muy bajas como excesivas [28], mientras que dosis intermedias de nicotina protegen significativamente las terminales dopaminérgicas estriales. La nicotina exhibe una curva dosis-respuesta de forma de U, en donde la máxima protección se observa con regímenes intermedios de nicotina [92, 153, 154].

Por lo tanto, parecería ser que la regulación y función de los nAChR in vivo está afectada no solo por la dosis de nicotina, sino que también por la duración (agudo vs crónico) y el método de tratamiento (continuo vs intermitente) [186,187], estos factores podrían potencialmente influir en la capacidad neuroprotectora in vivo de la nicotina.

La mayoría de los trabajos de modelos de EP in vivo reportan mejoras de la función de la vía nigroestriatal por agonismo nicotínico basándose en marcadores de integridad estriatal dopaminérgica, como ser niveles de DA y sus metabolitos, TH, DAT y transportador vesicular de monoaminas. Sin embargo los trabajos que describen neuroprotección previniendo la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc son muy pocos [147-152]. Una de las diferencias principales entre los modelos que muestran mejora de integridad estriatal pero sin impedimento de muerte celular por agonismo nicotínico, y el modelo utilizado en el presente trabajo, es sin duda el tamaño y la progresión de la lesión. La mayoría de los trabajos que, por ejemplo, inducen muerte nigroestriatal inyectando la toxina 6OHDA en el HMCA, inyectan dosis mucho más altas (6µg/µl) que las utilizadas en nuestro trabajo (1µg/µl). Sin embargo es difícil comparar dosis de toxinas diferentes, ya que cada una podrían tener eficacias y mecanismos de acción diferente.

En conclusión, la neuroprotección evidenciada en el modelo de EP con rotenona en el presente trabajo, se puede deber a varios factores: inyectar la toxina en el HMCA a la dosis usada induce una muerte lenta y progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, que podría ser una muerte retrograda. Esto hace que la nicotina tenga más chances de actuar para contrarrestar el daño que frente a una muerte aguda que se da cuando se inyecta la toxina directamente en la SNpc o cuando se trabajan con dosis mayores de toxina. Otro factor fundamental que ya se mencionó es la dosis de nicotina y el protocolo de administración. Este protocolo contiene un tratamiento de nicotina previo a la lesión durante 5 días que quizá podría estar induciendo cambios celulares que permiten que las neuronas sean menos sensibles a

la toxina. Luego se continúa con el tratamiento de nicotina durante 30 días post lesión, generando que la duración del tratamiento sea suficiente para atenuar el progreso de la lesión. Las inyecciones realizadas de nicotina son inyecciones diarias únicas por lo tanto se genera una administración crónica intermitente de pulsos de nicotina. Este tipo de tratamiento se ha visto que genera una disminución de la cinética de desensibilización de los nAChRs y una “up-regulation” de los nAChR, que se corresponde con un incremento en el número de receptores de alta afinidad que se ha visto que es funcional [142-143]. Por último la dosis de nicotina utilizada es una dosis intermedia (0,4mg/Kg, subcutáneo) que ya ha sido utilizada y ha mostrado tener efectos beneficiosos en otros modelos de EP [118]. Debido a la conjunción de todos estos factores es que se podría explicar la neuroprotección por agonismo nicotínico evidenciada en nuestro trabajo y no en los reportados por otros autores.

9.3 Receptores Nicotínicos (subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$)

Con el objetivo de poder tener una aproximación de cuáles son los subtipos de receptores nicotínicos que podrían estar siendo involucrados en el efecto neuroprotector observado, se procedió a determinar si los niveles de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ de los nAChRs se alteran en las neuronas dopaminérgicas luego de la lesión por rotenona y si estas alteraciones son prevenidas con el tratamiento con nicotina.

Como ya se mencionó, la exposición repetida a nicotina induce un aumento de la expresión de los nAChRs que se asocia con cambios significativos en las propiedades funcionales de estos receptores, aumentando la sensibilidad del receptor a su agonista y disminuyendo la cinética de desensibilización del receptor.

Es importante destacar que este estudio se realizó cuantificando la intensidad de la señal de las diferentes subunidades de los nAChRs en somas de neuronas dopaminérgicas y en la zona de los terminales dopaminérgicos. La mayoría de los trabajos que cuantifican niveles de subunidades de los nAChRs, se realizan en tejido total sin discriminar el tipo celular en el que se está haciendo la cuantificación. Esta estrategia metodológica permite identificar en el foco de lesión, específicamente en las neuronas dopaminérgicas que han sobrevivido, los cambios en las subunidades de los nAChR inducidos por la lesión y los efectos del tratamiento de nicotina que podrían asociarse con la neuroprotección evidenciada.

Subunidad $\alpha 4$ y $\alpha 6$ en somas y terminales dopaminérgicas

Ni la lesión de rotenona ni el tratamiento con nicotina, afectaron la expresión de la subunidad $\alpha 4$ a nivel de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (figura 15) o el CE (figura 22). A nivel del CE este análisis se realizó en el neuropilo donde además de los axones dopaminérgicos, los axones de interneuronas gabaérgicas y dendritas de neuronas MSN presentan nAChR con esta subunidad. Por lo tanto es posible que si los axones dopaminérgicos presentaban un cambio pequeño de los niveles de la subunidad $\alpha 4$, el mismo se viera enmascarado por la señal proveniente de otras fuentes. Es necesario un estudio más específico a nivel de los axones dopaminérgicos en el CE para poder evidenciar si la lesión con rotenona y el tratamiento con nicotina inducen cambios en ellos.

La lesión con rotenona causa una disminución significativa de la expresión de la subunidad $\alpha 6$ de los nAChRs en los somas neuronales dopaminérgicos de la SNpc, mientras que en el CE, induce, una tendencia a disminuir su expresión. Dado que la subunidad $\alpha 6$ en el CE está presente únicamente en los axones dopaminérgicos, es probable que la tendencia a la disminución observada se deba a la

degeneración de los mismos. Sin embargo, el hecho de que no sea una disminución significativa como lo es la pérdida de axones, sugiere que los axones dopaminérgicos remanentes podrían estar compensando la pérdida de esta subunidad expresando más cantidad de esta. Se necesitan más estudios (por ejemplo incrementando el número de animales) para poder confirmar este resultado.

Todas estas alteraciones en la expresión de la subunidad $\alpha 6$ causadas por la lesión fueron prevenidas por el tratamiento de nicotina (figura 25 y 26).

Los resultados sugieren que la nicotina podría estar induciendo una regulación positiva o impidiendo la disminución de la expresión de la subunidad $\alpha 6$ de los nAChR en las neuronas dopaminérgicas afectadas por la lesión. Este efecto del tratamiento con nicotina sobre la expresión de esta subunidad podría estar involucrado en los mecanismos subyacentes a la neuroprotección observada

Un dato interesante es que el tratamiento con el agonista nicotínico fue capaz de inducir un aumento significativo en el porcentaje del área ocupada por la señal $\alpha 6+$ con respecto al control y el vehículo de la rotenona en el CE lateral. Si bien se ha postulado que esta subunidad de los nAChRs en el CE está presente únicamente en axones dopaminérgicos, este resultado podría estar evidenciando la expresión de esta subunidad en otro tipo celular inducido por el tratamiento de nicotina en el lado lesionado. Esto podría ser un mecanismo compensatorio frente a la lesión (figura 24).

En modelos de toxicidad inducida con paraquat en ratones se ha visto que el subtipo $\alpha 6\beta 2^*$ de nAChR podría estar involucrado en la protección por nicotina (prevención de: muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y de disminución de DAT en CE) ya que se han evidenciado cambios en la expresión de estos subtipos de receptores que se correlacionan con protección [188].

Los resultados obtenidos de la cuantificación de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ en el CE lateral, sugieren que el la nicotina podría estar induciendo un aumento de la subunidad $\alpha 6$ y no así de la subunidad $\alpha 4$. Esto sugiere que podría ser que son los receptores de nAChR que presentan la subunidad $\alpha 6$, los que están mediando los efectos neuroprotectores en los axones dopaminérgicos del CE.

Picciotto 2008 [123] ha sugerido que la subunidad $\alpha 6$ (y $\beta 3$) son selectivamente transportadas a los terminales de las neuronas dopaminérgicas, mientras que la subunidad $\alpha 4$ (y $\beta 2$ y $\alpha 5$) de nAChR podrían estar más concentradas en los somas neuronales. Estos dos tipos de nAChR podrían tener diferentes roles en la función de las neuronas dopaminérgicas: el subtipo $\alpha 6$ estaría involucrado en incrementar la liberación de DA desde las terminales dopaminérgicas y el subtipo $\alpha 4$ podría estar aumentando la frecuencia de disparo actuando a nivel del soma neuronal. Estos roles diferenciales posiblemente podrían tener diferentes efectos sobre la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas. De acuerdo con la idea de que las subunidades $\alpha 6/\beta 2/\beta 3$ podrían ser particularmente importantes para el mantenimiento de la función dopaminérgica, se ha visto que en modelos de EP la exposición a L-DOPA rescata preferencialmente los nAChR que presentan subunidades $\alpha 6$ en paralelo con el rescate del comportamiento fenotípico luego del tratamiento con MPTP en primates no humanos [189]. Otro reporte interesante que apoya este resultado [191] muestra que la administración mediante mini-bombas osmóticas de la hebra anti-sentido para la subunidad $\alpha 6$ dentro del cerebro de rata reduce los efectos positivos en la actividad locomotora generados con tratamiento de nicotina. Estos resultados sugieren que los nAChRs que contengan la subunidad $\alpha 6$ podrían estar involucrados en parte en los efectos inducidos por la nicotina sobre el sistema dopaminérgico [190]. Todos estos estudios han llevado a sugerir que los nAChR que contengan la subunidad $\alpha 6$ podrían ser importantes blancos para el desarrollo de drogas para el tratamiento de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas [192].

Estudios en registros electrofisiológicos, han mostrado que la “up-regulation” de los nAChR inducida por la nicotina, ha sido asociada con cambios significativos en las propiedades funcionales de estos

receptores. Por otro lado, existen evidencias que sugieren que esta “up-regulation” de los nAChRs se da concomitantemente con una alteración en la estequiometría del receptor asociado con un aumento en la proporción de la subunidad β por cada receptor [146]. Por lo tanto, basándonos en la evidencia anterior, el hecho de que en el presente trabajo se haya obtenido una tendencia a aumentar la expresión de la subunidad $\alpha 6$, nos podría estar sugiriendo que hay un aumento en la cantidad de receptores, más que un aumento de subunidades por receptor. Sin embargo, como perspectiva se debería cuantificar la subunidad $\beta 2$ de los nAChRs en CE y SNpc.

Subunidad $\alpha 7$ en somas dopaminérgicas

La cuantificación de la subunidad $\alpha 7$ de nAChR en las neuronas dopaminérgicas remanentes, no mostró alteraciones en esta subunidad con la lesión ni el tratamiento de nicotina (figura 17). El receptor monomérico $\alpha 7$ de nAChR exhibe un alto grado de permeabilidad relativa al calcio y es capaz de inducir liberación de calcio desde los reservorios intracelulares [207, 208, 193]. Estas características le adjudican a este receptor un posible rol en la plasticidad sináptica [60, 193]. Sin embargo, en la SNpc de ratas se ha evidenciado bajos niveles de expresión del nAChR $\alpha 7$ en comparación por ejemplo con los niveles en el ATV [195, 196]. Los resultados de trabajos in vivo en los que se cuantifica la expresión de subunidad $\alpha 7$ de nAChR en la SNpc de esta especie, han sido controversiales y se le ha adjudicado esta controversia a la baja expresión del receptor $\alpha 7$ de nAChR en la SNpc.

Resultados obtenidos utilizando varios abordajes experimentales incluidos el uso de antagonistas para los nAChR monomérico $\alpha 7$ y modelos en ratones knockout para la subunidad $\alpha 7$ han mostrado la implicancia fundamental del $\alpha 7$ nAChR en la neuroprotección frente a diferentes daños en múltiples sistemas neuronales [197, 198]. Recientemente se ha reportado la preservación de la integridad dopaminérgica estriatal luego de lesión de la vía nigroestriatal por 6-OHDA por la administración de un agonista selectivo para el nAChR $\alpha 7$ [211].

Estudios en cultivos primarios de neuronas mesencefálicas en un modelo de degeneración espontánea de neuronas dopaminérgicas indican que la neuroprotección de estas células por nicotina mediada por $\alpha 7$ nAChR involucra un incremento del influjo de calcio vía $\alpha 7$ nAChR y vía canales de calcio voltaje-dependientes [106]. Este aumento de calcio intracelular puede resultar en la activación de vías de sobrevida como ser proteínas calmodulina, fosfatidilinositol-3 quinasa, AKT-fosforilada, con el subsecuente incremento de la expresión de Bcl-2 (factor anti-apoptótico) [106]. Además, los nAChR $\alpha 7$ han sido identificados en astrocitos y se ha mostrado que estos podrían contribuir en los efectos protectores frente al daño nigroestriatal a través de la movilización de calcio intracelular [107, 108, 198]. Se ha evidenciado que los nAChR monomérico $\alpha 7$ están implicados en la activación de la expresión de los genes que codifican para la enzima TH [209], punto clave en el control de la neurotransmisión catecolaminérgica y son capaces de influenciar la liberación de DA en el CE [120].

Además, frente a alteraciones estructurales en la morfología de las espinas dendríticas en el CE, la nicotina mediante la activación de los nAChR $\alpha 7$ es capaz de inducir el desarrollo de formación de nuevas espinas o generar la pérdida o inducir cambios morfológicos de espinas aberrantes existentes. Estos cambios inducidos por la nicotina generan una mejor transmisión sináptica [210, 187, 188].

En conclusión parecería ser que este subtipo de receptor, podría tener un rol importante en la neuroprotección mediada por nicotina. Sin embargo la SNpc de ratas presenta bajos niveles de expresión del nAChR $\alpha 7$ en comparación por ejemplo con los niveles en el ATV [211, 213].

Por lo tanto, surgen algunas preguntas sobre el rol de $\alpha 7$ nAChR en la SNpc. El hecho de que en el presente trabajo no se haya evidenciado un cambio en la expresión en la subunidad $\alpha 7$ no significa que este receptor no esté participando en la protección del daño nigroestriatal. El uso metodologías más sensibles quizá puedan evidenciar posibles cambios en estos receptores de tan baja expresión.

9.4 Mecanismos de neuroprotección del Agonismo Nicotínico

Los diferentes subtipos de nAChRs son permeables tanto al sodio y (en diferentes grados dependiendo del subtipo) al calcio, lo que conduce a la depolarización de membrana celular y al aumento de niveles de calcio citoplasmático. Varios trabajos han demostrado que la neuroprotección mediada por nAChR parecería requerir de aumentos citoplasmáticos de los niveles de calcio en las células blanco [199-202]. La entrada de calcio puede ocurrir directamente a través de los nAChRs [203, 204], particularmente a través de los nAChR $\alpha 7^*$ los cuales presentan una gran conductancia al calcio [205], pero también los niveles de calcio pueden ser incrementados indirectamente a través de la activación de canales de calcio voltaje-dependientes o liberación de calcio desde los reservorios intracelulares [201, 206, 214, 215]. Un aumento de calcio controlado es capaz de activar una gran variedad de cascadas moleculares calcio-dependientes y procesos celulares [206] que pueden promover a la supervivencia celular y neuroprotección.

La neuroprotección mediada por nicotina parece involucrar modulación de vías de señalización apoptóticas en algunos tipos celulares. Por ejemplo, la nicotina disminuye la activación de caspasa 3, 8 y 9 [209], disminuye la activación de efectores de muerte celular activados por JNK quinasa [210] y disminuye la liberación de citocromo C [216-218], al mismo tiempo que aumenta la expresión de la proteína de supervivencia Bcl-2 (figura 29) [219].

Trabajos recientes han descrito la presencia de nAChRs en la membrana mitocondrial externa de cerebro de ratones principalmente los subtipos $\alpha 7\beta 2^*$ y $\alpha 4\beta 2^*$ y que su estimulación previene la liberación del citocromo C de la mitocondria frente a estímulos dañinos [210]. Por otro lado, trabajos de Gergalova y cols, sugieren que la presencia de los subtipos de nAChR $\alpha 7^*$ en la mitocondria, podría explicar porque bajas dosis de agonistas nicotínicos son suficientes para activar estos receptores y atenuar la liberación de citocromo C [210, 221]. Parecería ser que la presencia de los subtipos de nAChRs en la mitocondria son relevantes para defender de forma más eficiente este organelo de las diferentes influencias nocivas. Factores de crecimiento son también factores relacionados con la neuroprotección mediada por estimulación de los nAChR. Se ha descrito que el tratamiento con nicotina aumenta la expresión y liberación del factor de crecimiento FGF-2. Se ha visto que FGF-2 es inducido como un resultado de la estimulación de receptores nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ en corteza, hipocampo, SNpc y CE de ratas [221-223]. Por otro lado, la expresión del receptor de neurotrofinas trk A es incrementada a través de la activación del subtipo de nAChR $\alpha 7^*$. En adición, la nicotina puede aumentar la expresión del factor NGF y su receptor trkB en el hipocampo (figura 29) [225].

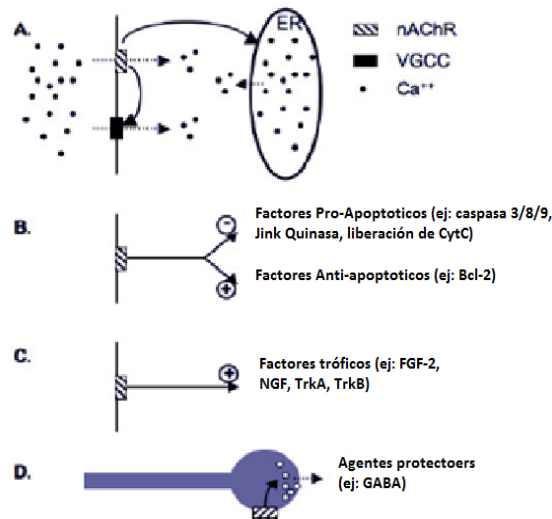


Figura 29: Mecanismos potenciales subyacentes a la neuroprotección mediada por nicotina. A: Nicotina puede activar diferentes clases de nAChRs resultando tanto en una entrada directa de calcio o llevando a una despolarización de membrana llevando a la entrada de calcio a través de canales de calcio voltaje- dependientes. B: La nicotina puede disminuir los niveles o actividad de factores pro-apoptóticos como ser caspasas, JNK quinasa o citocromo y puede incrementar los niveles o actividad de factores anti-apoptóticos como ser Bcl-2. C: La nicotina puede incrementar la síntesis y liberación de factores de crecimiento como ser NGF y FGF-2 y aumentar los niveles de receptores neurotróficos Trk A y Trk B. D: La nicotina puede tener efectos más indirectos en la supervivencia neuronal causando la liberación de neurotransmisores que disminuyen la excitabilidad, como ser GABA, de población de neuronas vecinas. Imagen extraída de Picciotto M y Zoli M 2008 [123].

Por todo lo expuesto parecería claro que la nicotina induce efectos de larga duración sobre señales neuronales que contribuyen con los efectos neuroprotectores. Vías anti-apoptóticas, señales de calcio y señales de factores de crecimiento, han mostrado responder a la administración de nicotina, conduciendo a la posibilidad de que la nicotina es protectora debido a que es capaz de estimular la convergencia de múltiples vías que previenen la muerte celular. Estos efectos podrían también magnificarse debido a que la nicotina puede activar múltiples subtipos de nAChRs con diferentes roles en el desencadenamiento de señales intracelulares en las neuronas y modular estas múltiples vías de señalización post-receptor. Definir e identificar cuáles de estos mecanismos desencadenados por la nicotina, es esencial para los efectos neuroprotectores observados e identificar los componentes de la nicotina que están mediando estos efectos, queda aún por resolver [123].

9.5 Conclusiones generales

El presente trabajo de Maestría en Neurociencias evidenció protección de la vía nigroestriatal por agonismo nicotínico frente a un daño por rotenona:

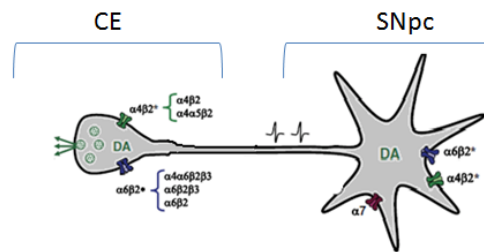
- 1- Protección de neuronas dopaminérgicas: más somas dopaminérgicas en la SNpc y más axones dopaminérgicos en el CE.
- 2- Preservación del metabolismo dopaminérgico en los axones de estas neuronas: mayores niveles de TH y de DA en el CE.
- 3- Mejoras en el desempeño motor de los animales: prevención de la asimetría en el uso de patas delanteras en el test del cilindro.

Cabe destacar que es la primera evidencia de prevención de muerte de neuronas dopaminérgicas en un modelo de EP en rata.

Dadas las semejanzas biológicas que existen entre las ratas y humanos, a nivel de circuitos estriatales, vida media de la nicotina en plasma y alteraciones del comportamiento causadas por daños de la vía nigroestriatal, nuestro paradigma experimental podría ser un buen punto de partida para profundizar en los mecanismos subyacentes a la neuroprotección por nicotina observada y para la búsqueda de blancos terapéuticos para el tratamiento de esta patología.

En particular, el conocimiento que se obtuvo de las diferencias en la expresión de los subtipos de subunidades de nAChR por agonismo nicotínico en el modelo de EP podría contribuir con el diseño de terapias para la EP dirigidas a poblaciones de nAChR del subtipo específico $\alpha 6\beta 2^*$.

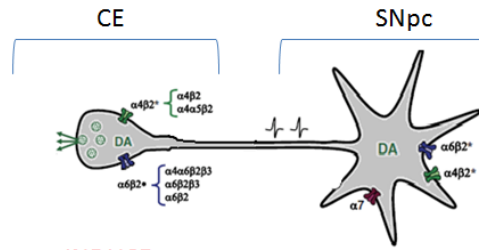
10. Resumen esquemático de los principales resultados



Lesión con rotenona

Tratamiento con Nicotina + Lesión con rotenona

Neuronas dopaminérgicas SNpc	Neuronas dopaminérgicas SNpc
Muerte de neuronas DAérgicas	Previene la muerte de neuronas DAérgicas
CE Lateral	CE Lateral
Disminución de niveles de TH	Previene disminución de niveles de TH
Disminución de niveles de DA	Previene disminución de niveles de DA
Degeneración de axones dopaminérgicos	Previene degeneración de axones dopaminérgicos



Lesión con rotenona INDUCE

Tratamiento con Nicotina + Lesión con rotenona

Neuronas dopaminérgicas SNpc	Neuronas dopamineérgicas SNpc
Disminución de subunidad $\alpha 6$ en neuronas DAérgicas	Prevención de disminución de subunidad $\alpha 6$ en neuronas DAérgicas
CE Lateral	CE Lateral
Disminución de subunidad $\alpha 6$	Prevención de la disminución de subunidad $\alpha 6$

11. Perspectivas

A corto plazo

- Estudiar en detalle la expresión de la enzima TH y las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ en las fibras dopaminérgicas remanentes en el CE.
- Estudiar la expresión de la subunidad $\alpha 7$ con métodos más sensibles.
- Determinar si los cambios en las subunidad $\alpha 6$ subyace el efecto neuroprotector evidenciado.
- Confirmar si la administración de rotenona en el HMCA en nuestro paradigma experimental no afecta las neuronas dopaminérgicas del ATV.

A largo plazo

- Estudiar los posibles efectos sobre las subunidades β de los nAChRs en las células dopaminérgicas.
- Estudiar el posibles rol de los nAChRs mitocondriales en los efectos neuroprotectores inducidos por el agonismo nicotínico.

12. Anexo

Análisis de los efectos de los tratamientos en el lado contralateral a la inyección intracerebral.

La aproximación de análisis de datos empleada en esta tesis, donde el hemisferio contralateral a la inyección intracerebral de cada animal se usa como control interno, tiene la ventaja de atenuar las interferencias causadas por la variación intrínseca entre animales y procedimientos experimentales [90-93, 159-164]. Sin embargo, para que el lado contralateral sea un buen control interno, los parámetros a evaluar no deben estar afectados por los tratamientos en este hemisferio.

Como se muestra a continuación, el análisis del lado contralateral a la inyección intracerebral mostró que no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los parámetros estudiados:

1. Cuantificación del número de células TH-positivas

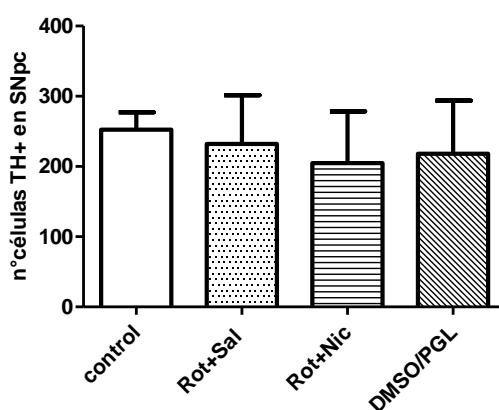


Figura 1: Cuantificación del número de células TH+ en la SNpc de animales controles y de los hemisferios contralaterales luego de 32 días de la inyección intracerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DS del número total de células TH-positivas cuantificadas. No se observan diferencias significativas según test de ANOVA. El número de animales utilizado en este experimento fue de 6 animales por condición.

2. Cuantificación de la intensidad de la señal TH+ en las neuronas dopaminérgicas remanentes de la SNpc

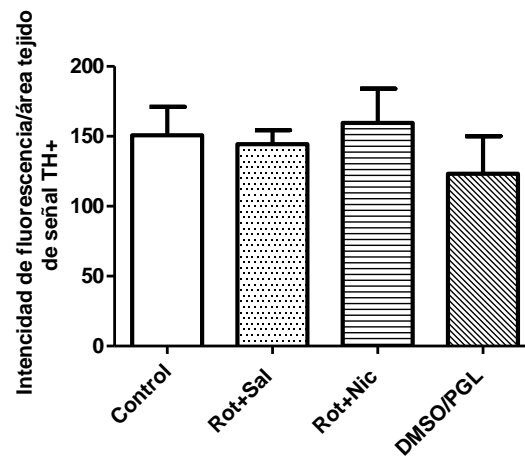


Figura 2: Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la señal TH+ en la SNpc de animales controles y de los hemisferios contralaterales luego de 32 días de la inyección intracerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DS del valor promedio de la intensidad de fluorescencia ("mean grey value"). No se observan diferencias significativas según test de ANOVA.

3. Cuantificación de la intensidad de la señal de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ de los de nAChR en las neuronas dopaminérgicas remanentes de la SNpc

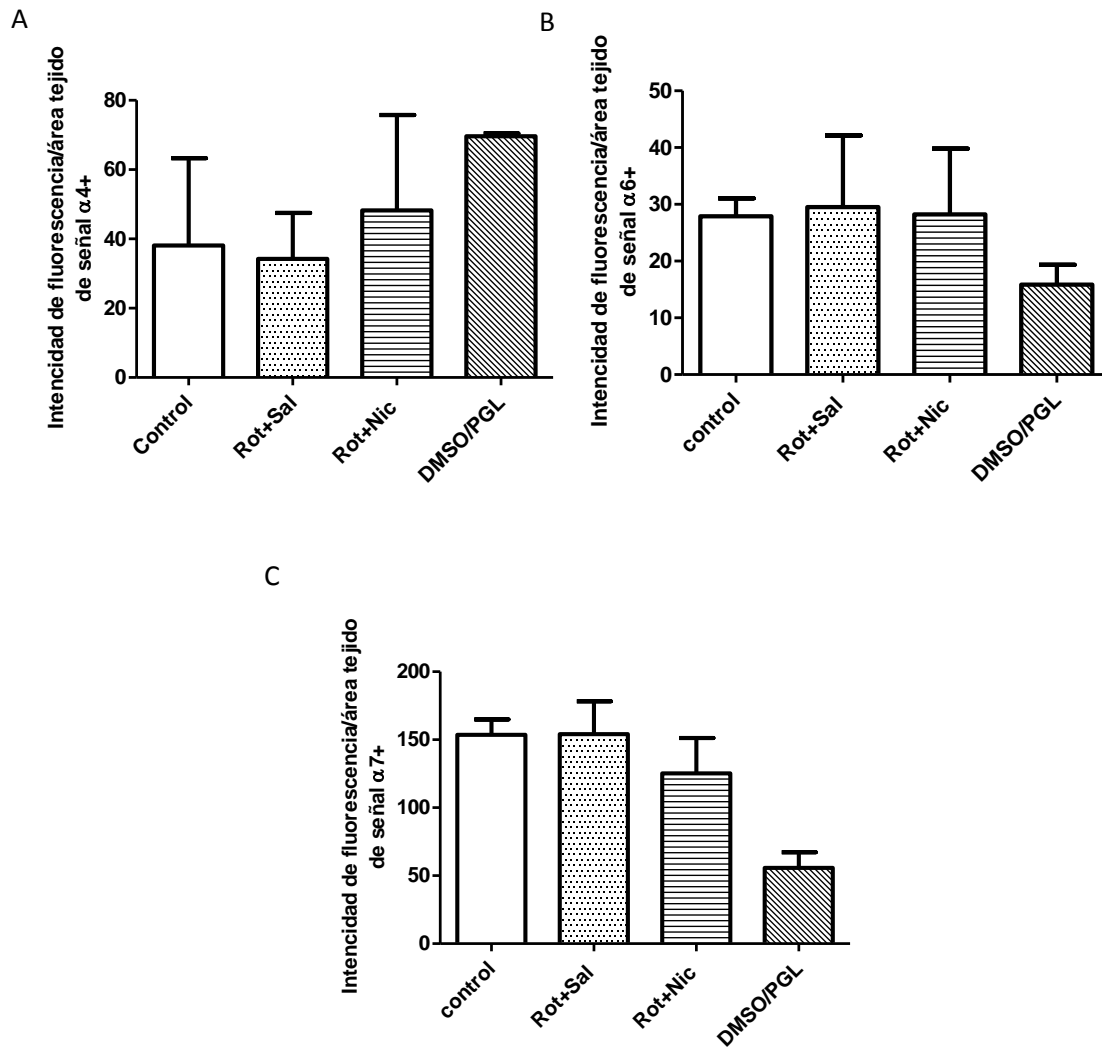


Figura 3: Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la señal de las subunidades $\alpha 4$ (A), $\alpha 6$ (B) y $\alpha 7$ (C) de los de nAChR en las neuronas TH+ de la SNpc de animales controles y de los hemisferios contralaterales luego de 32 días de la inyección intracerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DS del valor promedio de la intensidad de fluorescencia ("mean grey value"). No se observan diferencias significativas según test de ANOVA. [€]

4. Niveles de DA en el CE

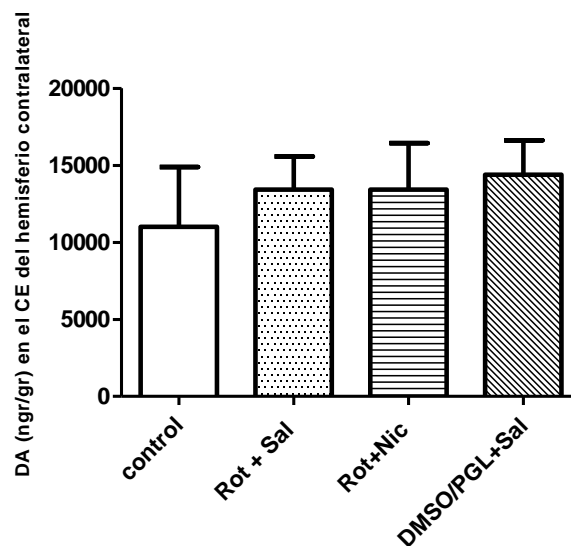


Figura 4: Cuantificación de los niveles tisulares de DA en el CE de animales controles y de los hemisferios contralaterales luego de 32 días de la inyección intracerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DS del valor promedio de los ng/gr de tejido. No se observan diferencias significativas según test de ANOVA. El numero de animales utilizados en este experimento fue de 6 animales por condición.

5. Cuantificación del área ocupada por la señal TH-positiva en el CE

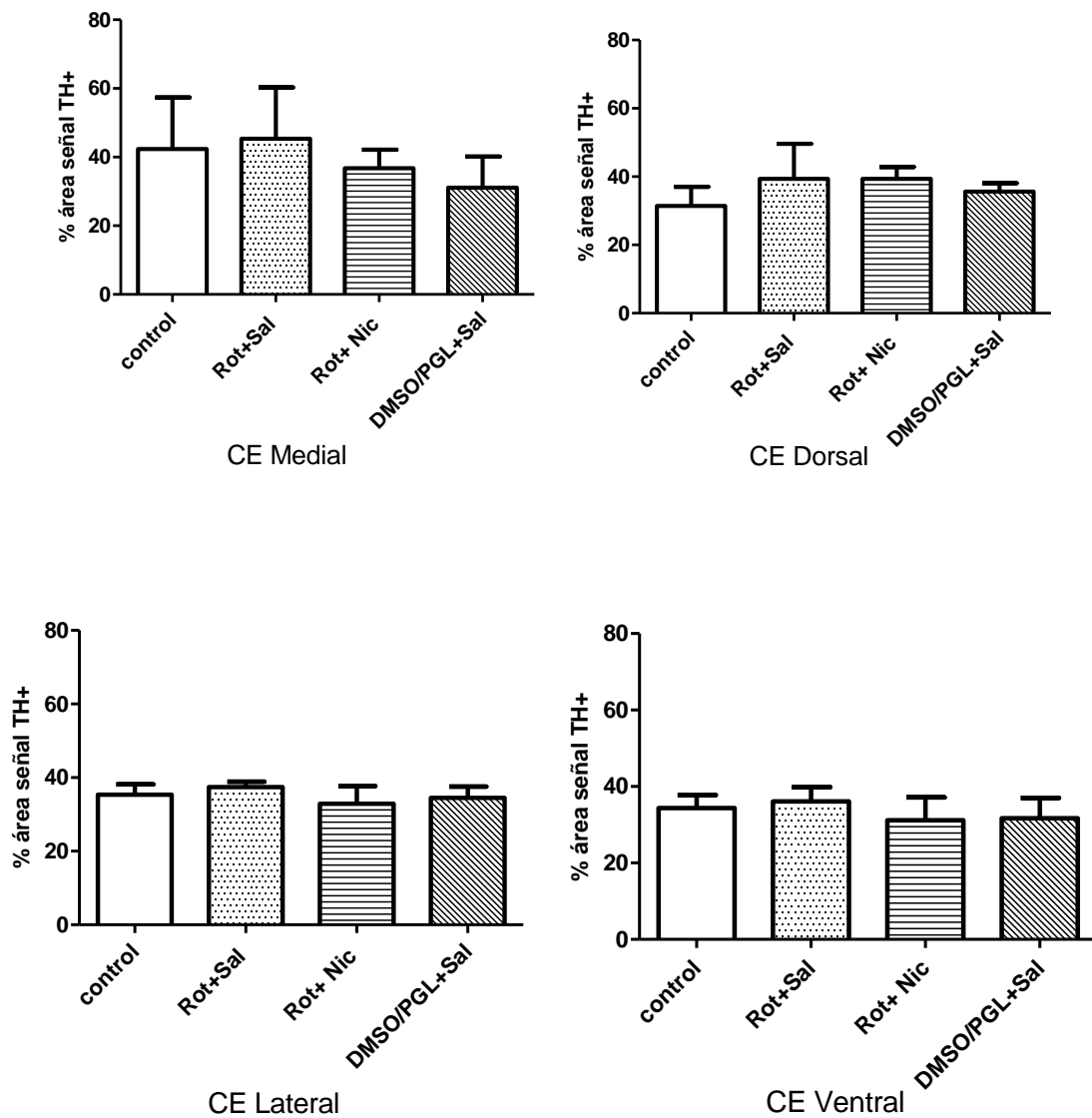


Figura 5: Cuantificación del área ocupada por la señal TH en el CE medial (A), dorsal (B), lateral (C) y ventral (D) de animales controles y de los hemisferios contralaterales luego de 32 días de la inyección intracerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DS del valor promedio del % de área ocupada por la señal TH+. No se observan diferencias significativas según test de ANOVA. El número de animales utilizados en este experimento fue de 5 animales por condición.

6. Cuantificación de la intensidad de la señal TH+ en el CE

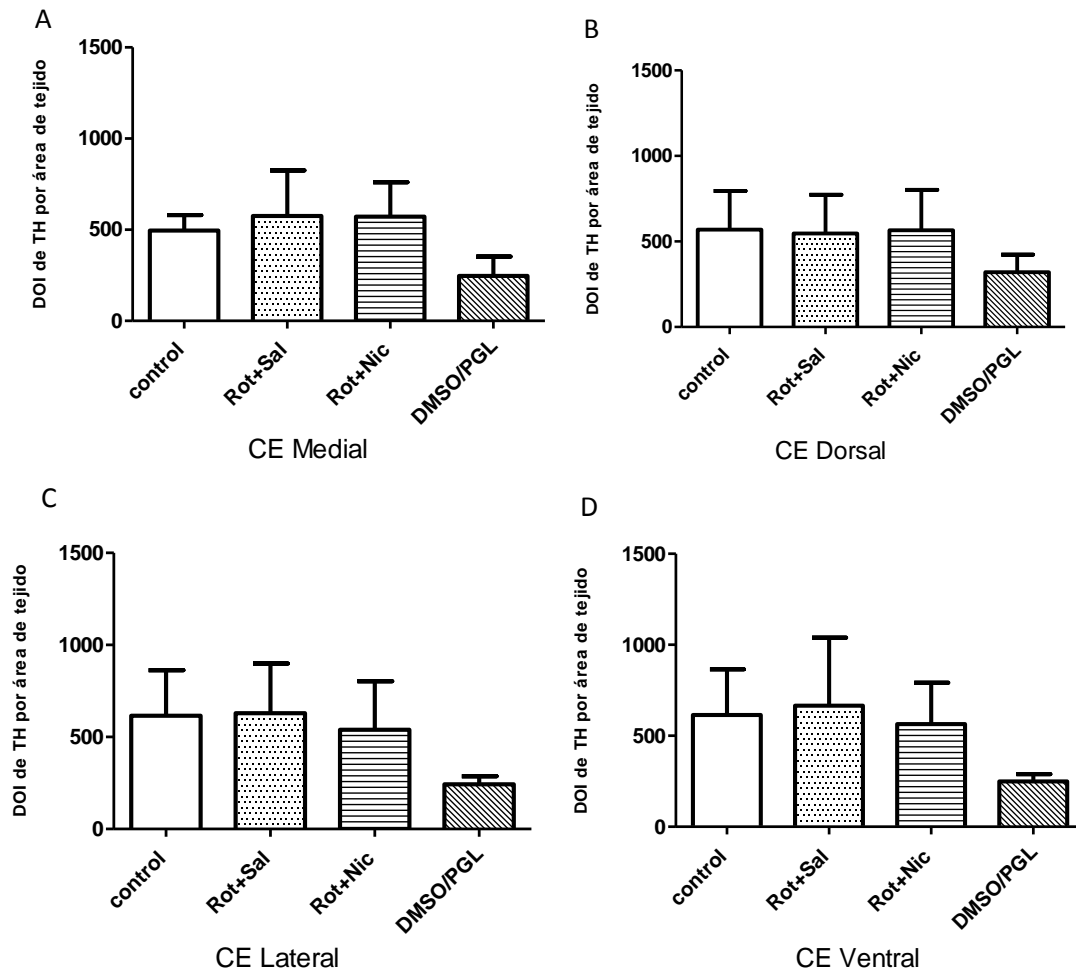


Figura 6: Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la señal TH+ en el CE medial (A), dorsal (B), lateral (C) y ventral (D) de animales controles y de los hemisferios contralaterales luego de 32 días de la inyección intracerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DS de la densidad óptica integrada (DOI) en el área evaluada. No se observan diferencias significativas según test de ANOVA. [€] El número de animales utilizados en este experimento fue de 5 animales por condición.

7. Cuantificación de la intensidad de la señal de la subunidad $\alpha 4$ de los nAChR en la zona del neuropilo en el CE

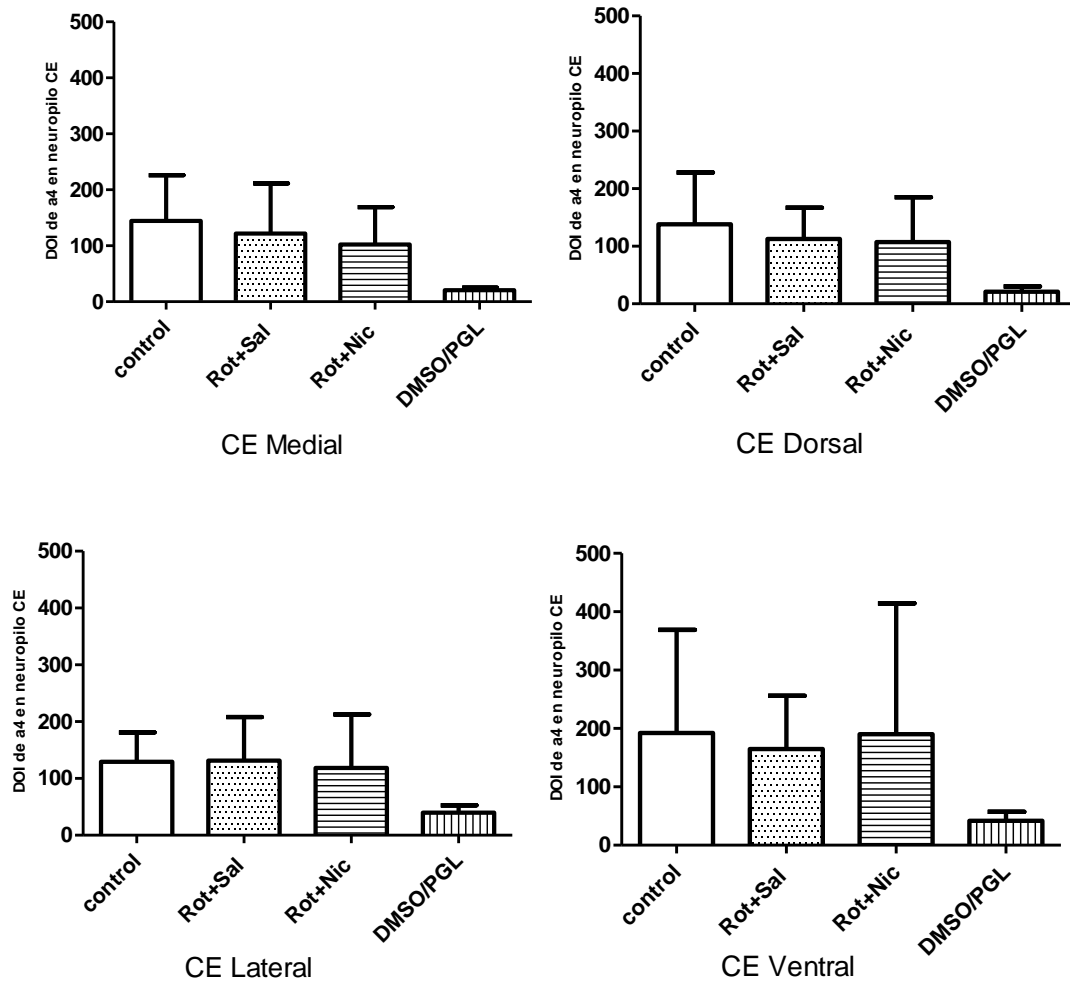


Figura 7: Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la de la subunidad $\alpha 4$ de los nAChR en el CE medial (A), dorsal (B), lateral (C) y ventral (D) de animales controles y de los hemisferios contralaterales luego de 32 días de la inyección intracerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DS de la densidad óptica integrada (DOI) en el área evaluada. No se observan diferencias significativas según test de ANOVA. €

8. Cuantificación del área ocupada por la señal de la subunidad $\alpha 6$ de los nAChR en el CE

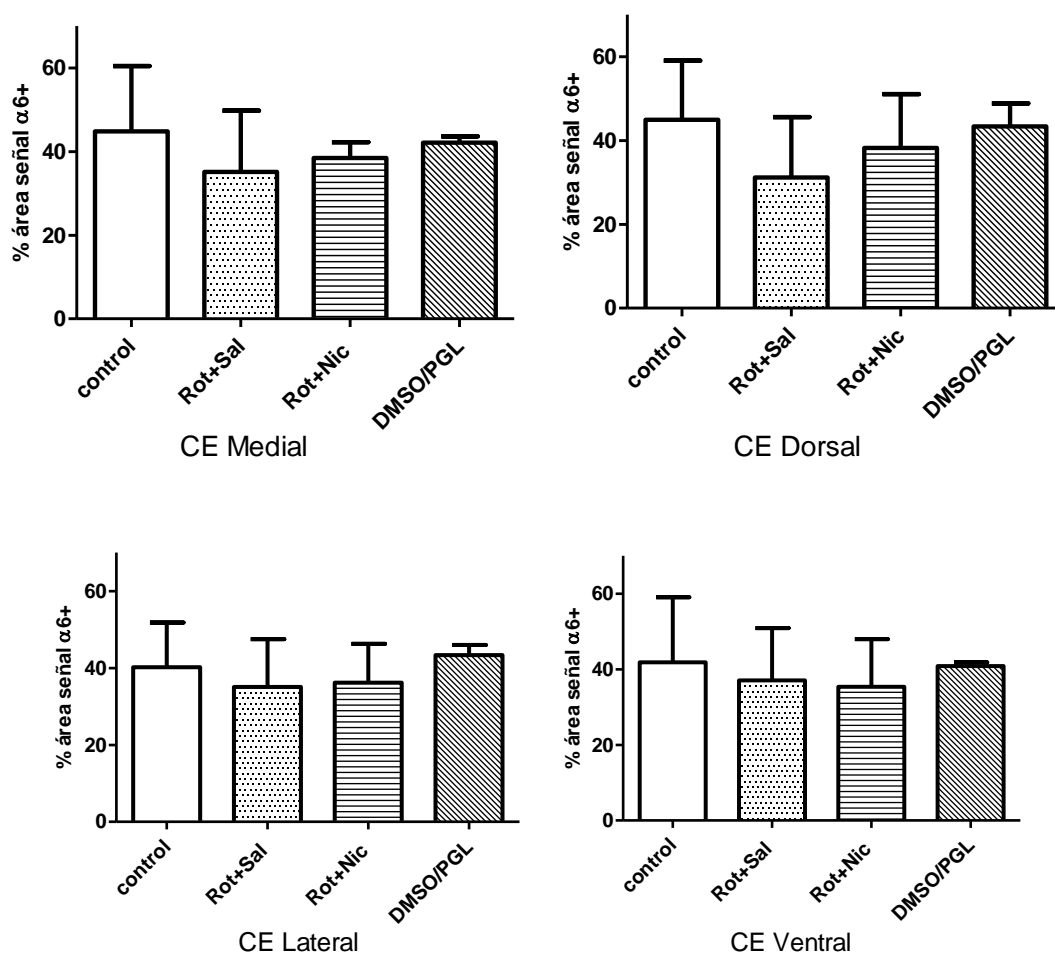


Figura 8: Cuantificación del % de área ocupada por la señal de la subunidad $\alpha 6$ de los nAChR en el CE medial (A), dorsal (B), lateral (C) y ventral (D) de animales controles y de los hemisferios contralaterales luego de 32 días de la inyección intracerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DS del % de área ocupada por la señal $\alpha 6$. No se observan diferencias significativas según test de ANOVA. [€] El número de animales utilizados en este experimento fue de 5 animales por condición.

9. Cuantificación de la intensidad de la señal de la subunidad $\alpha 6$ de los nAChR en el CE

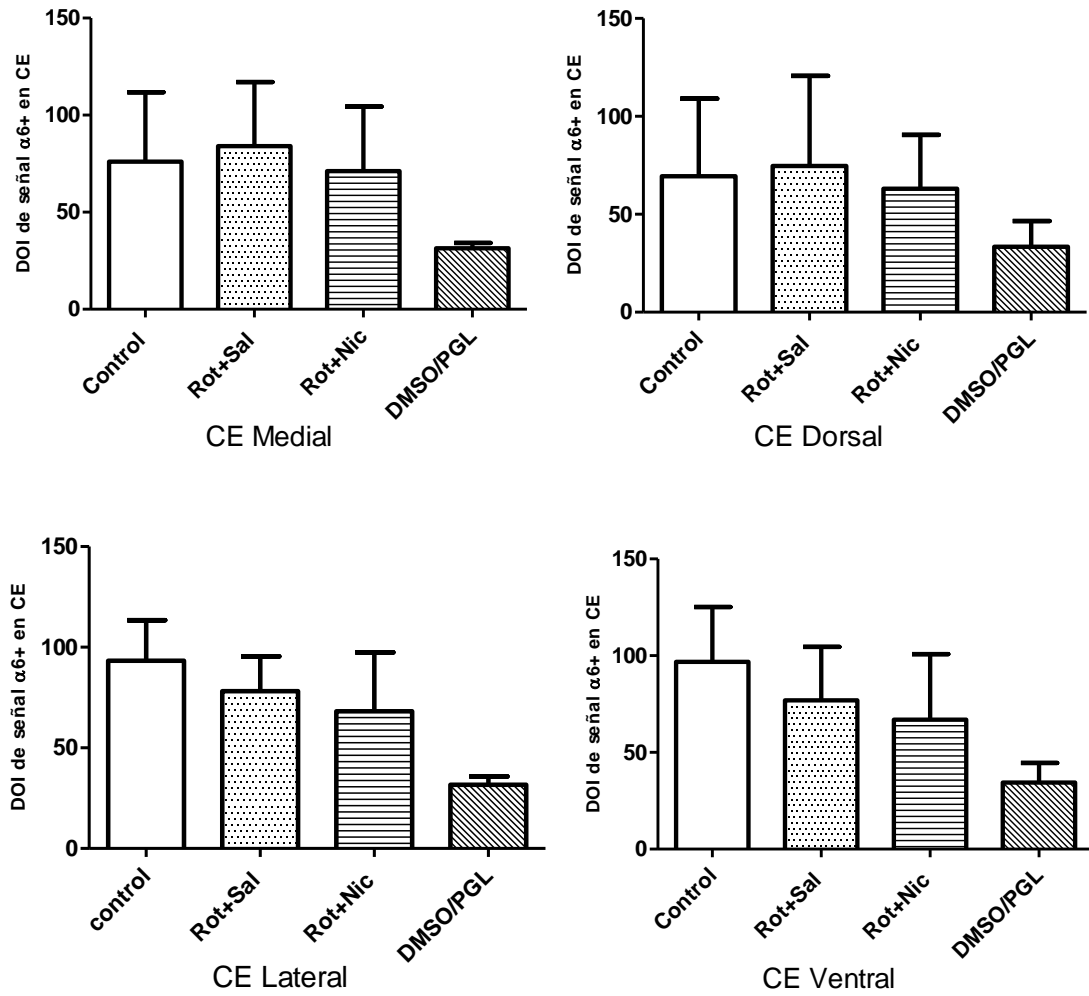


Figura 9: Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la de la subunidad $\alpha 6$ de los nAChR en el CE medial (A), dorsal (B), lateral (C) y ventral (D) de animales controles y de los hemisferios contralaterales luego de 32 días de la inyección intracerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos son expresados como la media \pm DS de la densidad óptica integrada (DOI) en el área evaluada. No se observan diferencias significativas según test de ANOVA. €

Destino de los grupos de animales en cada experimento

1. Grupo con destino: cuantificación de neuronas TH+ en la SNpc. N=6 animales por condición experimental.
2. Grupo con destino: cuantificación de niveles de DA y realización de footprint test a los 4 y 30 días post inyección intracerebral. N= 6 animales por condición experimental.
3. Grupo con destino: cuantificación de la actividad de la enzima TH en el CE y realización del test del cilindro y campo abierto a los 6 y 30 días post inyección intracraneal. (No se obtuvieron resultados de la cuantificación de la actividad de la enzima TH debido a un problema del reactivo utilizado).
4. Grupo con destino: cuantificación de la intensidad de la señal de fluorescencia de la TH y la subunidad $\alpha 4$ en la SNpc y CE.
5. Grupo con destino: cuantificación de la intensidad de la señal de fluorescencia de la TH y las subunidades $\alpha 6$ y $\alpha 7$ en la SNpc y CE.

€ Es importante indicar que las inmunofluorescencias correspondientes al grupo control y a los grupos de animales inyectados intracerebralmente con rotenona con y sin tratamiento con nicotina se realizaron en forma conjunta, mientras que el grupo inyectado intracerebralmente con DMSO/PGL se procesó diferido en el tiempo

13. Referencias

- [1] Peter Redgrave, Manuel Rodriguez, Yoland Smith, Maria C. Rodriguez-Oroz, Stephane Lehericy, Hagai Bergman, Yves Agid, Mahlon R. DeLong, and Jose A. Obeso. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease *Nat Rev Neurosci*. 2010 November ; 11(11): 760–772. doi:10.1038/nrn2915.
- [2] Alexander GE, and Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*. 13:266-271, 1990.
- [3] Siegel G; Albers W; Btady S (2006). Capítulo: 46 "Neurotransmitters and Disorders of Basal Ganglia" *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7a edición). Elsevier Academic Press: London UK
- [4] Obeso JA, Olanow CW, and Nutt JG (2000) Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23:S2–S7.
- [5] Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, and Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196:527–542.
- [6] Phil D. Livingstone, Susan Wonnacott Nicotinic acetylcholine receptors and the ascending dopamine pathways. *Biochemical Pharmacology* 78 (2009) 744–755
- [7] Siegel G; Albers W; Btady S (2006). Capítulo: 12 "Catecholamines" *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7a edición). Elsevier Academic Press: London UK
- [8] Feldman R., Meyer J. (1997) Catecholamines (cap 8), en Feldman R. *Principes of Neuropsychopharmacology*. (277-343) Sunderland: Sinauer Associates, Inc
- [9] Siegel G; Albers W; Btady S (2006). Capítulo: 12 "Catecholamines" *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7a edición). Elsevier Academic Press: London UK
- [10] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 2003;39:889–909. [PubMed: 12971891]
- [11] Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, and Halliday G (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med* 16:653–61.
- [12] Lang AE (2009) When and how should treatment be started in Parkinson disease? *Neurology* 72:S39–S43.
- [13] Tolosa, E., Wenning, G., & Poewe, W. (2006). The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5(1), 75–86
- [14] Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(4), 368–376.

- [15] Pahwa, R., & Lyons, K. E. (2010). Early diagnosis of Parkinson's disease: Recommendations from diagnostic clinical guidelines. *Am J Manag Care*(16 Suppl), S94–S99 (Implications: S94-9).
- [16] F.I. Tarazi, Z.T. Sahli, M.Wolny, S.A. Mousa bEmerging therapies for Parkinson's disease: From bench to bedside. *Pharmacology & Therapeutics* 144 (2014) 123–133.
- [17] Jankovic, J Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79:368–376; 2008.
- [18] Toulouse A, Sullivan AM. Progress in Parkinson's disease-where do we stand? *Prog Neurobiol* 2008;85:376–92. [PubMed: 18582530]
- [19] Obeso JA, Marin C, Rodriguez-Oroz C, Blesa J, Benitez-Temino B, Mena-Segovia J, et al. The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Ann Neurol* 2008;64 (Suppl 2):S30–46. [PubMed: 19127584]
- [20] Davie CA. A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull* 2008;86:109–27. [PubMed: 18398010]
- [21] Olanow CW (2004) The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. *Annu Rev Med* 55:41–60.
- [22] Cookson M. α -Synuclein and neuronal cell death. *Molecular Neurodegeneration* 2009, 4:9 doi:10.1186/1750-1326-4-9
- [23] Jellinger K.A. Formation and development of Lewy pathology: a critical update. *J Neurol.* 256: S270-S279
- [24] Muzerengi, S.; Contrafatto, D.; Chaudhuri, K.R. Non-motor symptoms: identification and management. *Parkinsonism Relat. Disord.* 13(Suppl. 3): S450–S456; 2007.
- [25] Langston, J.W. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann. Neurol.* 59:591–596; 2006.
- [26] Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197–211. [PubMed: 12498954]
- [28] Purves y cols. 3ra Edición 2004, capítulo 17 “*Modulation of Movement by the Basal Ganglia.*
- [29] Jenner, P. Current Concepts on the Etiology and Pathogenesis of Parkinson Disease. In: Fahn, S.; Jankovic, J., editors. *Principles and Practice of Movement Disorders*: Churchill Livingstone. 2007. p. 672
- [30] de Rijk, M.C., et al., Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology*, 2000. 54(11 Suppl 5): p. S21-3.
- [31] Bekris, L.M., Mata, I. F., & Zabetian, C. P. (2010). The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23(4), 228–242

- [32] Bové, J and Perier, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *neuroscience* 211 (2012) 51–76.
- [33] Todd B. Sherer, Richardson J, Testa C, Seo B, Panov A, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Miller G and Greenamyre J. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 2007, 100, 1469-1479.
- [34] DeYoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., & Ellisen, L. W. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 22(2), 239–251.
- [35] Jenner, P., & Olanow, C.W. (2006). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology* 66(10 Suppl. 4), S24–S36.
- [36] Levy O, Malagelada C, and Greene L. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*. 2009 April ; 14(4): 478–500. doi:10.1007/s10495-008-0309-3. NIH Public Access.
- [37] Cookson M. α -Synuclein and neuronal cell death. *Molecular Neurodegeneration* 2009, 4:9 doi:10.1186/1750-1326-4-9
- [38] Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA. Expression of A53T mutant but not wildtype alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci* 2001;21:9549–9560. [PubMed: 11739566]
- [39] Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, et al. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 2001;10:919–926. [PubMed: 11309365]
- [40] Xu J, Kao S-Y, Lee FJS, Song W, Jin L-W, Yankner BA. Dopamine-dependent neurotoxicity of [alpha]-synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* 2002;8:600–606. [PubMed: 12042811]
- [41] Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry* 2007;103:17–37. [PubMed: 17623039]
- [42] Wakamatsu M. Accumulation of Phosphorylated α -Synuclein in Dopaminergic Neurons of Transgenic mice That Express Human α -Synuclein. *Journal of Neuroscience*. 85: 1819-1825. 2007
- [42] Siegel G; Albers W; Btady S (2006). Capítulo: 45 “Neurodegenerative α -Synucleinopathies and Tauopathies” *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7a edición). Elsevier Academic Press: London UK
- [43] Tsang A and Chung K. Oxidative and nitrosidative stresses in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, 643-650
- [44] Hammond C, Bergman H, Brown P. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci* 2007;30:357–64.

- [45] McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001;297:191–194. [PubMed: 11137760]
- [46] Zeng BY, Medhurst AD, Jackson M, Rose S, Jenner P. Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age. *Mech Ageing Dev* 2005;126:760–766. [PubMed: 15888331]
- [47] Chung KK, Thomas B, Li X, Plethikova O, Troncoso J, Marsh J, Dawson V and Dawson T. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* 2004;304:1328–1331. [PubMed: 15105460]
- [48] Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Krige D, Jenner PJ, Marsden CD. Mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 1992;32(Suppl):S116–124. [PubMed: 1510369]
- [49] Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci*. 10;26(19):5256-64. 2006
- [50] Facecchia K, Fochesato L, Ray S, Stohs S and Pandey S. Oxidative Toxicity in Neurodegenerative Diseases: Role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies. *Journal of Toxicology* vol. 2011, Article ID 683728, 12 pages. doi: 10.1155/2011/683728.
- [51] Keane P, Kurzawa M, Blain P and Morris C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* vol. 2011, Article ID 716871, 18 pages. doi: 10.4061/2011/716871.
- [52] Varsha S, Santosh M y Harish P. Oxidative stress in neurodegeneration. *Advances in pharmacological sciences*. 2011 572634 doi: 10.1155/2011/572634
- [53] Robert E. Burke and O'Malley K. Axon degeneration in Parkinson's disease. *Experimental Neurology* (2012), doi: 10.1016/j.expneurol.2012.01.011
- [54] Hirsch, E., Graybiel, A.M., and Agid, Y.A. (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334, 345–348. doi:10.1038/334345a0
- [55] Hasegawa, K., Stoessl, A.J., Yokoyama, T., Kowa, H., Wszolek, Z.K., and Yagishita, S. (2009). Familial parkinsonism: study of original Sagami-hara PARK8 (I2020T) kindred with variable clinic pathologic outcomes. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, 300–306. doi:10.1016/j.parkreldis.2008.07.010
- [56] Mori, H., Kondo, T., Yokochi, M., Matsumine, H., Nakagawa-Hattori, Y., Miyake, T., et al. (1998). Pathologic and biochemical studies of juvenile Parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 51, 890–892. doi:10.1212/wnl.51.3.890
- [57] Pramstaller, P.P., Schlossmacher, M.G., Jacques, T.S., Scaravilli, F., Eskelson, C., Pepivani, I., et al. (2005). Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann. Neurol.* 58, 411–422. doi:10.1002/ana.20587

- [58] [82] Grimm, J., Mueller, A., Hefti, F., and Rosenthal, A. (2004). Molecular basis for catecholaminergic neurodiversity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101, 13891–13896. doi:10.1073/pnas.0405340101
- [59] Li, L.B., Chen, N., Ramamoorthy, S., Chi, L., Cui, X.N., Wang, L.C., et al. (2004). The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J. Biol.Chem.* 279, 21012–21020. doi:10.1074/jbc.m311972200
- [60] Surmeier, D.J., Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J., and Goldberg, J.A. (2010). What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Prog.Brain Res.* 183, 59–77. doi:10.1016/s0079-6123(10)83004-3
- [61] Bolam, J.P., and Pissadaki, E.K. (2012). Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. *Mov.Disord.* 27, 1478–1483. doi:10.1002/mds.25135
- [62] Lars Brichta and Paul Greengard Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. doi: 10.3389/fnana.2014.00152
- [63] Mercuri, N.B., Bonci, A., Calabresi, P., Stratta, F., Stefani, A., and Bernardi, G. (1994). Effects of dihydropyridine calcium antagonists on rat midbrain dopaminergic neurones. *Br.J.Pharmacol.* 113, 831–838. doi:10.1111/j.1476-5381.1994.tb17068.x
- [64] Nedergaard, S., Flatman, J.A., and Engberg, I. (1993). Nifedipine-and omega-conotoxin-sensitive Ca²⁺ conductance in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones. *J. Physiol.* 466, 727–747.
- [66] Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Kondapalli, J., Ilijic, E., Schumacker, P.T., et al. (2010). Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468, 696–700. doi:10.1038/nature09536
- [67] Chan, C.S., Guzman, J.N., Ilijic, E., Mercer, J.N., Rick, C., Tkatch, T., et al. (2007). 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447, 1081–1086. doi:10.1038/nature05865
- [66] Linazasoro, G. (2005) New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 391–397
- [67] Talene A. Yacoubian, David G. Standaert Targets for neuroprotection in Parkinson's disease *Biochimica et Biophysica Acta* 1792 (2009) 676–687
- [68] Dexter D y Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* 62 (2013) 132-144.
- [69] Tarazi F.I, Sahli Z.T., Wolny M, Mousa S.A. Emerging therapies for Parkinson's disease: From bench to bedside *Pharmacology & Therapeutics* 144 (2014) 123–133
- [70] Doua, H, Bavelaar, BM, Pellikaan, H, Olivier, B and Pieters, T. Neuroprotection in Parkinson's Disease: A Systematic Review of the Preclinical Data *The Open Pharmacology Journal*, 2012, 6, 12-26

- [71] Ren, Z., & Zhang, Y. (2009). Cells therapy for Parkinson's disease—so close and so far away. *Sci China C Life Sci* 52(7), 610–614.
- [72] Okun, M. S. (2012). Deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 367(16), 1529–1538.
- [73] Favre, E., Ballanger, B., Thobois, S., Broussolle, E., & Boulinguez, P. (2013). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus, but not dopaminergic medication, improves proactive inhibitory control of movement initiation in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 10(1), 154–167.
- [74] Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000, July). Neurotransmitters. *Principles of Neural Science* (pp. 280–297) (4th ed.). McGraw-Hill Medical
- [75] Voges, J., Waerzeggers, Y., Maarouf, M., Lehrke, R., Koulousakis, A., Lenartz, D., et al. (2006). Deep-brain stimulation: Long-term analysis of complications caused by hardware and surgery—experiences from a single centre. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77(7), 868–872
- [76] Sillay, K. A., Larson, P. S., & Starr, P. A. (2008). Deep brain stimulator hardware-related infections: Incidence and management in a large series. *Neurosurgery* 62(2), 360–366 (discussion 366–7).
- [77] Coley, E., Farhadi, R., Lewis, S., & Whittle, I. R. (2009). The incidence of seizures following deep brain stimulating electrode implantation for movement disorders, pain and psychiatric conditions. *Br J Neurosurg* 23(2), 179–183.
- [78] Temel, Y. (2010). Limbic effects of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Vitam Horm* 82, 47–63.
- [79] Griffiths, J. and Marley, P.D. (2001) Ca²⁺-dependent activation of tyrosine hydroxylase involves MEK1. *NeuroReport* 12, 2679–2683
- [80]. Thacker EL, O'Reilly EJ, Weisskopf MG, Chen H, Schwarzschild MA, McCullough ML, et al. Temporal relationship between cigarette smoking and risk of Parkinson disease. *Neurology* 2007;68:764–8. [PubMed: 17339584]
- [81]. Ritz B, Ascherio A, Checkoway H, Marder KS, Nelson LM, Rocca WA, et al. Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2007;64:990–7. [PubMed: 17620489]
- [82]. O'Reilly EJ, McCullough ML, Chao A, Henley SJ, Calle EE, Thun MJ, et al. Smokeless tobacco use and the risk of Parkinson's disease mortality. *Mov Disord* 2005;20:1383–4. [PubMed: 16007624]
- [83]. Allam MF, Campbell MJ, Hofman A, Del Castillo AS, Fernandez-Crehuet Navajas R. Smoking and Parkinson's disease: systematic review of prospective studies. *Mov Disord* 2004;19:614–21. [PubMed: 15197698]
- [84]. Tanner CM, Goldman SM, Aston DA, Ottman R, Ellenberg J, Mayeux R, et al. Smoking and Parkinson's disease in twins. *Neurology* 2002;58:581–8. [PubMed: 11865136]
- [85] Ross GW, Petrovitch H. Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. *Drugs Aging* 2001;18:797–806. [PubMed: 11772120]

- [86]. Hernan MA, Zhang SM, Rueda-deCastro AM, Colditz GA, Speizer FE, Ascherio A. Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Ann Neurol* 2001;50:780–6. [PubMed: 11761476]
- [87]. Gorell JM, Rybicki BA, Johnson CC, Peterson EL. Smoking and Parkinson's disease: a dose-response relationship. *Neurology* 1999;52:115–9. [PubMed: 9921857]
- [88]. Baron JA. Beneficial effects of nicotine and cigarette smoking: the real, the possible and the spurious. *Br Med Bull* 1996;52:58–73. [PubMed: 8746297]
- [89]. Morens DM, Grandinetti A, Reed D, White LR, Ross GW. Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology* 1995;45:1041–51. [PubMed:7783862]
- [90] Abin-Carriquiry JA, Costa G, Urbanavicius J, Cassels BK, Rebolledo-Fuentes M, Wonnacott S, Dajas F. In vivo modulation of dopaminergic nigrostriatal pathways by cytosine derivatives: implications for Parkinson's Disease. *Eur J Pharmacol.*1-3:80-84, 2008.
- [91] Abin-Carriquiry J.A, Mcgregor-Armas R, Costa G, Urbanavicius J and Dajas F. Presynaptic Involvement in the Nicotine Prevention of the Dopamine Loss Provoked by 6-OHDA Administration in the Substantia Nigra. *Neurotoxicity Research.* 4:133-139, 2002.
- [92] Costa G, Abin-Carriquiry JA, Dajas F. Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra. *Brain Res.* 2001; 888:336–342. [PubMed: 11150495]
- [93] Urbanavicius, J, Ferreira, M, Costa, G, Abin-Carriquiry, JA, Wonnacott, S y Dajas, F. Nicotine induces tyrosine hydroxylase plasticity in the neurodegenerating striatum. *Journal of Neurochemistry*, 2007, 102, 723–730.
- [94] Conn PJ, Jones CK, and Lindsley CW (2009) Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 30:148–155.
- [95] Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, and Bernardi G (2000) Acetylcholinemediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23:120–126.
- [96] Maryka Quik and susan wonnacott $\alpha\beta 2^*$ and $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors as drug targets for parkinson's disease. *pharmacol rev* 63:938–966, 2011
- [97] Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F, and Zoli M (2007) Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 74:1102–1111.
- [98] Gotti C, Riganti L, Vailati S, and Clementi F (2006) Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. *Curr Pharm Des* 12:407–428.
- [99] Millar NS and Gotti C (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56:237–246

- [100] Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, and Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89:73–120.
- [101] Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, and Sixma TK (2004) Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 41:907–914
- [102] Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, and Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic ation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596–604
- [103] Bjo“rklund A and Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194–202.
- [128] Wilson CJ and Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599–615.
- [104] Zhou FM, Wilson CJ, and Dani JA (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol* 53:590–605.
- [105] Descarries L, Gisiger V, and Steriade M (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* 53:603–625.
- [106] Kreitzer AC and Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543–554.
- [107] Cheramy A, Leviel V, and Glowinski J (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289:537–542.
- [108] Robertson HA (1992) Dopamine receptor interactions: some implications for the treatment of Parkinson’s disease. *Trends Neurosci* 15:201–206.
- [109] Misgeld U (2004) Innervation of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318:107–114. [137] Mena-Segovia J, Winn P, and Bolam JP (2008) Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. *Brain Res Rev* 58:265–271.
- [110] Lokwan SJ, Overton PG, Berry MS, and Clark D (1999) Stimulation of the pedunculo pontine tegmental nucleus in the rat produces burst firing in A9 dopaminergic neurons. *Neuroscience* 92:245–254
- [111] Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, and Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6:968–973.
- [112] Gotti C, Guiducci S, Tedesco V, Corbioli S, Zanetti L, Moretti M, Zanardi A, Rimondini R, Mugnaini M, Clementi F, et al. (2010) Nicotinic acetylcholine receptors in the mesolimbic pathway: primary role of ventral tegmental area alpha6beta2* receptors in mediating systemic nicotine effects on dopamine release, locomotion, and reinforcement. *J Neurosci* 30:5311–5325.

- [113] Quik M, Polonskaya Y, McIntosh JM, and Kulak JM (2002) Differential nicotinic receptor expression in monkey basal ganglia: effects of nigrostriatal damage. *Neuroscience* 112:619–630.
- [114] Quik M, Campos C, Parameswaran N, Langston JW, McIntosh JM, and Yeluashvili M (2010) Chronic nicotine treatment increases nAChRs and microglial expression in monkey substantia nigra after nigrostriatal damage. *J Mol Neurosci* 40:105–113.
- [115] Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, and Changeux JP (2001) Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21:1452–1463.
- [116] Quik M, Polonskaya Y, Gillespie A, K Lloyd G, and Langston JW (2000a) Differential alterations in nicotinic receptor alpha6 and beta3 subunit messenger RNAs in monkey substantia nigra after nigrostriatal degeneration. *Neuroscience* 100: 63–72.
- [117] Quik M, Sum JD, Whiteaker P, McCallum SE, Marks MJ, Musachio J, McIntosh JM, Collins AC, and Grady SR (2003) Differential declines in striatal nicotinic receptor subtype function after nigrostriatal damage in mice. *Mol Pharmacol* 63:1169–1179.
- [118] Bové J, Prou D, Perier C and Przedborski S. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc. 2: 484-494, 2005 2
- [119] Belluardo N, Mudo` G, Blum M, and Fuxe K (2000) Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav Brain Res* 113:21–34
- [120] O'Neill MJ, Murray TK, Lakics V, Visanji NP, and Duty S (2002) The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:399–411.
- [121] Quik M, O'Neill M, and Perez XA (2007b) Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *Trends Pharmacol Sci* 28:229–235.
- [122] Cenci MA and Lundblad M (2007) Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 9:Unit 9.25.
- [123] Marina R. Picciotto¹, Michele Zoli². Neuroprotection via nAChRs: The role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease *Frontiers in Bioscience* 13, 492-504, January 1, 2008
- [124] Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini A, Jakowec M, Petzinger G, Miller R and Akram M. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *Journal of Neurochemistry*,(2001), 76, 1265±1274.
- [125] Blum D., Torch S., Lambeng N. (2001) *Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease.* *Progress in Neurobiology.* 65: 135-172.
- [126] Deumens R., Blokland A. and Prickaerts J. (2002) *Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway.* Elsevier Science.14: 4886-4902.

[127] Francesca Cicchetti, Janelle Drouin-Ouellet and Robert E. Gross Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? Trends in Pharmacological Sciences Vol.30 No.9 doi:10.1016/j.tips.2009.06.005

[128] Sherer T.B, Richardson J.R, Testa C.M, Sea B.B, Panov A.V, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Miller G. W and Greenamyre J.T. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's diseases. Journal of Neurochemistry. 100: 1469-1479, 2007.

[129] Varsha S, Santosh M y Harish P. Oxidative stress in neurodegeneration. Advances in pharmacological sciences. 2011 572634 doi: 10.1155/2011/572634

[130] Ravenstijn G.M., Merlini M, Hameetman .M, Murray T.K., Ward M. A, Lewis .H, Ball .G, Mottart. C, Ville de Goyet .Ch, Lemarchand .T, van Belle . K, O'Neil .M, Danhof .M and Lange .E. The exploration of rotenone as a toxin for inducing Parkinson's disease in rats, for application in BBB transport and PK-PD experiments. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 57 (2008) 114-130.

[131] Betarbet, R. et al. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. Nat Neurosci 3, 1301–1306

[132] Antony P, Diederich N and Balling R. Parkinson's disease mouse models in translational research. Mamm Genome (2011) 22:401–419. DOI 10.1007/s00335-011-9330-x

[133] Terzioglu, M., Galter, D., 2008. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. FEBS J. 275, 1384–1391

[134] Marks MJ, Burch JB, and Collins AC (1983) Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 226:817– 825.

[135] Schwartz RD and Kellar KJ (1983) Nicotinic cholinergic receptor binding sites in the brain: regulation in vivo. *Science* 220:214–216.

[136] Benwell ME, Balfour DJ, and Anderson JM (1988) Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[3H]nicotine binding sites in human brain. *J Neurochem* 50:1243–1247.

[137] Perry DC, Da'vila-García MI, Stockmeier CA, and Kellar KJ (1999) Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1545–1552.

[138] Moretti M, Mugnaini M, Tessari M, Zoli M, Gaimarri A, Manfredi I, Pistillo F, Clementi F, and Gotti C (2010) A comparative study of the effects of the intravenous self-administration or subcutaneous minipump infusion of nicotine on the expression of brain neuronal nicotinic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 78:287–296.

[139] Perez XA, Bordia T, McIntosh JM, Grady SR, and Quik M (2008) Long-term nicotine treatment differentially regulates striatal $\alpha 6\alpha 4\beta 2^*$ and $\alpha 6(\text{non}\alpha 4)\beta 2^*$ nAChR expression and function. *Mol Pharmacol* 74: 844–853.

[140] Peto, R., Lopez, AD, Boreham, J., Thun, M., Heath Jr., C., 1992. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet* 339, 1268–1278.

- [141] Changeux, J.P., Edelstein, S.J., 1998. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* 21, 959–980
- [142] Benwell, M.E., Balfour, D.J., Anderson, J.M., 1988. Evidence that tobacco smoking increases the density of (–)-[3H]nicotine binding sites in human brain. *J. Neurochem.* 50, 1243–1247.
- [143] Perry, D.C., Davila-Garcia, M.I., Stockmeier, C.A., Kellar, K.J., 1999. Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1545–1552.
- [144] Rowell, P.P., Wonnacott, S., 1990. Evidence for functional activity of upregulated nicotine binding sites in rat striatal synaptosomes. *J. Neurochem.* 55, 2105–2110
- [145] Darsow, T., Booker, T.K., Pina-Crespo, J.C., Heinemann, S.F., 2005. Exocytic trafficking is required for nicotine-induced upregulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 18311–18320.
- [146] Corringier P,J, Smallette, J y Changeux, JP. Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: A novel mechanism of neuronal plasticity? *Jornal of Phisiology- Paris* (2006) 162-171.
- [147] R. Maggio, M. Riva, F. Vaglini, F. Fornai, R. Molteni, M. Armogida, G. Racagni, and G.U. Corsini: Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J Neurochem* 71(6), 2439-2446 (1998)
- [148] A.M. Janson, K. Fuxe, and M. Goldstein: Differential effects of acute and chronic nicotine treatment on MPTP-(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons in the black mouse. *Clin Investig* 70(3-4), 232-238 (1992)
- [149] K. Parain, V. Marchand, B. Dumery, and E. Hirsch: Nicotine, but not cotinine, partially protects dopaminergic neurons against MPTP-induced degeneration in mice. *Brain Res* 890(2), 347-350 (2001)
- [150] K. Parain, C. Hapdey, E. Rousset, V. Marchand, B. Dumery, and E.C. Hirsch: Cigarette smoke and nicotine protect dopaminergic neurons against the 1-methyl-4- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Parkinsonian toxin. *Brain Res* 984(1-2), 224-232 (2003)
- [151] Manindra NathTiwari a,1, SwatiAgarwal a,c,1, PriyankaBhatnagar b,1, Naveen KumarSinghal a, ShashiKantTiwari a,c, PradeepKumar b, LalitKumarSinghChauhan a, DevendraKumarPatel a, RajnishKumarChaturvedi a,c,n, MahendraPratapSingh a,n, Kailash Chand Gupta a,b,n Nicotine-encapsulatedpoly(lactic-co-glycolic)acidnanoparticles improveneuroprotectiveefficacy againstMPTP-inducedparkinsonism. *FreeRadicalBiologyandMedicine*65(2013)704–718
- [152] Mirium Khwaja, Alison McCormack, J. Michael McIntosh, Donato A. Di Monte and Maryka Quik Nicotine partially protects against paraquat-induced nigrostriatal damage in mice; link to a6b2* nAChRs. *Journal of Neurochemistry*, 2007, 100, 180–190. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04177.x 180 *Journal*
- [153] Ryan RE, Ross SA, Drago J, Loiacono RE. Dose-related neuroprotective effects of chronic nicotine in 6-hydroxydopamine treated rats, and loss of neuroprotection in alpha4 nicotinic receptor subunit knockout mice. *Br J Pharmacol.* 2001; 132:1650–1656. [PubMed: 11309235]
- [154] Soto-Otero R, Me´ndez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Lo´pez-Real AM, and Labandeira- Garcıa JL (2002) Effects of (–)-nicotine and (–)-cotinine on 6-hydroxydopamine- induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson’s disease. *Biochem Pharmacol* 64:125–135.

[155] Huang LZ, Parameswaran N, Bordia T, Michael McIntosh J, and Quik M (2009) Nicotine is neuroprotective when administered before but not after nigrostriatal damage in rats and monkeys. *J Neurochem* 109:826–837.

[156] Maryka Quik, Michael O'Neill y Xiomara A. Perez. Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2007 Vol.28 No.5 doi:10.1016/j.tips.2007.03.001

[157] Mouhape C. 2012. Evaluación de la administración intracerebral de rotenona como modelo experimental de enfermedad de Parkinson. Tesina de Grado de Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Udelar

[158] Martinez TN, Greenamyre JT. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2012;16:920–34.

[159] Giovanna Levandis, Eleonora Bazzini, Marie-Thérèse Armentero, Giuseppe Nappi, and Fabio Blandini. Systemic administration of an mGluR5 antagonist, but not unilateral subthalamic lesion, counteracts L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease *Neurobiology of Disease* 29 (2008) 161–168.

[160] Armentero, M.T., Fancellu, R., Nappi, G., Bramanti, P., Blandini, F., 2006. Prolonged blockade of NMDA or mGluR5 glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration while inducing selective metabolic changes in the basal ganglia circuitry in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 22, 1–9.

[161] Blandini, F., Armentero, M.T., Fancellu, R., Blaugrund, E., Nappi, G., 2004. Neuroprotective effect of rasagiline in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 187, 455–459.

[162] Rosario Sánchez-Pernaute, Andrew Ferree, Oliver Cooper, Meixiang Yu, Anna-Liisa Brownell and Ole Isacson. Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease *Journal of Neuroinflammation* 2004, 1:6

[163] G. Ambrosi, M.T. Armentero, G. Levandis, P. Bramanti, G. Nappi, F. Blandini. Effects of early and delayed treatment with an mGluR5 antagonist on motor impairment, nigrostriatal damage and neuroinflammation in a rodent model of Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin* 82 (2010) 29–38

[164] M. Decressa, B. Mattsson, A. Björklund Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 235 (2012) 306–315

[165] Paxinos, G, Watson, G. 1986. Rat brain in stereotaxic coordinates, 2^a ed. Academic Press., Australia.

[166] Maryka Quik, Michael O'Neill y Xiomara A. Perez. Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2007 Vol.28 No.5 doi:10.1016/j.tips.2007.03.001

[167] Snyder .L, Kirkland .J and Glajch .J Practical HPLC method development. 2nd ed. Jhon Wiley and Sons, INC. 1997

[168] Klein A, Wessolleck. J, Papazoglou A, Metz. G, Nikkhah G. Walking pattern analysis after unilateral 6-OHDA lesion and transplantation of foetal dopaminergic progenitor cells in rats.

- [169] Hsieh T, Chen J, Chen L, Chiang P, Lee H. Time-course gait analysis of hemiparkinsonian rats following 6-hydroxydopamine lesion. *Behavioural Brain Research* 222 (2011) 1-9.
- [170] Kelly E, Glajch, Sheila M. Fleming, D. James Surmeier, Pavel Osten. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* (2012), doi:10.1016/j.bbr.2011.12.007
- [171] Archer J. Test for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.* 1973, 21(2).205-235.
- [172] Lamprea MR, Cardenas FP, Setem J, Marato S. Thigmotactic responses in an open-field. *Braz. J. Med Res.* 2008, 41(2): 135-140.
- [173] Montgomery KC, Monkman JA. The relation between fear and exploratory behavior. *J Comp. Physiol. Psychol.* 1955, 48(2): 132-136.
- [174] Norazit, A, Meedeniya, CB, Nguyen, MN y Mackay-Sim, A. Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. *Brain Research* 1360 (2010) 119-129.
- [175] Kumer, S.C. and Vrana, K.E. (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J. Neurochem.* 67, 443-462
- [176] Gueorguiev, V.D. et al. (1999) Differing temporal roles of Ca²⁺ and cAMP in nicotine-elicited elevation of tyrosine hydroxylase mRNA. *Am. J. Physiol.* 276, C54-C65
- [177] Quik, M, Polonskaya, Y, Gillespie, P, Lloyd, GK and Langston, JW. Differential alterations in nicotinic receptor $\alpha 6$ and $\beta 3$ subunit messenger RNAs in monkey substantia nigra after nigrostriatal degeneration *neuroscience* vol. 100, no. 1, pp. 63-72, 2000
- [178] Klintwortha H, Gardenb G and Xiaa Z. Rotenone and Paraquat do not Directly Activate Microglia or Induce Inflammatory Cytokine Release. *Neurosci Lett.* 2009 October 2; 462(1): 1-5. doi:10.1016/j.neulet.2009.06.065.
- [179] Cho J, West MO. Distributions of single neurons related to body parts in the lateral striatum of the rat. *Brain Res* 1997;756:241-6.
- [180] M.W. Quick and R.A. Lester: Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53(4), 457-478 (2002)
- [181] R.A. Behmand and S.I. Harik: Nicotine enhances 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *J Neurochem* 58(2), 776-779 (1992)
- [182] A.M. Janson, P.B. Hedlund, M. Hillefors, and G. von Euler: Chronic nicotine treatment decreases dopamine D2 agonist binding in the rat basal ganglia. *Neuroreport* 3(12), 1117-1120 (1992)
- [183] M. Hadjiconstantinou, J.P. Hubble, T.A. Wemlinger, and N.H. Neff: Enhanced MPTP neurotoxicity after treatment with isofluorophate or cholinergic agonists. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 270(2), 639-644 (1994)
- [184] R. Soto-Otero, E. Mendez-Alvarez, A. Hermida- Ameijeiras, A.M. Lopez-Real, and J.L. Labandeira-Garcia: Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacology* 64(1), 125-135 (2002)

- [185] Z.-Z. Guan, W.-F. Yu, and A. Nordberg: Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochem Int* 43(3), 243-249 (2003)
- [186] Marshall, D.L., Redfern, P.H. & Wonnacott, S. (1997). Presynaptic nicotinic modulation of dopamine release in the three ascending pathways studied by *in vivo* microdialysis: comparison of naive and chronic nicotine-treated rats. *J. Neurochem.*, 68, 1511 ± 1519.
- [187] Rowell, P.P. & Li, M. (1997). Dose-Response Relationship for Nicotine-Induced Up-Regulation of Rat Brain Nicotinic Receptors. *J. Neurochem.*, 68, 1982 ± 1989.
- [188] Khwaja M, McCormack A, McIntosh JM, Di Monte DA, Quik M. Nicotine partially protects against paraquat-induced nigrostriatal damage in mice; link to alpha6beta2* nAChRs. *J Neurochem.* 2007; 100:180–190. [PubMed: 17227438]
- [189] M. Quik, T. Bordia, M. Okihara, H. Fan, M.J. Marks, J.M. McIntosh, and P. Whiteaker: L-DOPA treatment modulates nicotinic receptors in monkey striatum. *Mol Pharmacology* 64(3), 619-628 (2003)
- [190] Quik, M, Polonskaya, Y, Gillespie, P, Lloyd, GK and Langston, JW. Differential alterations in nicotinic receptor a6 and b3 subunit messenger RNAs in monkey substantia nigra after nigrostriatal degeneration *neuroscience* vol. 100, no. 1, pp. 63–72, 2000
- [191] Le Novere N., Zoli M., Lena C., Ferrari R., Picciotto M. R., Merlo-Pich E. and Changeux J.-P. (1999) Involvement of a6 nicotinic receptor subunit in nicotine-elicited locomotion, demonstrated by *in vivo* antisense oligonucleotide infusion. *NeuroReport* 10, 2497–2501.
- [192] M. Quik and J.M. McIntosh: Striatal alpha6* nicotinic acetylcholine receptors: potential targets for Parkinson's disease therapy. *J Pharm Exp Therap* 316(2), 481-489 (2006)
- [193] Fucile, S. (2004) Ca2p permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35, 1–8
- [194] Mansvelder, H.D. and McGehee, D.S. (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27, 349–357
- [195] Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, and Dani JA (2003) Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 23:3176–3185
- [196] Keath JR, Iacoviello MP, Barrett LE, Mansvelder HD, and McGehee DS (2007) Differential modulation by nicotine of substantia nigra versus ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol* 98:3388–3396.
- [197] J. Qian, J.M. Zhang, L.L. Lin, W.Z. Dong, Y.Q. Cheng, D.F. Su, et al., A combination of neostigmine and anisodamine protects against ischemic stroke by activating alpha7nAChR, *Int. J. Stroke* (2015).
- [198] Maryka Quik *, Danhui Zhang, Matthew McGregor, Tanuja Bordia Alpha7 nicotinic receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.06.014>
- [199] D.L. Donnelly-Roberts, I.C. Xue, S.P. Arneric, and J.P. Sullivan: *In vitro* neuroprotective properties of the novel cholinergic channel activator (ChCA), ABT-418. *Brain Res* 719(1-2), 36-44 (1996)

- [200] S. Kaneko, T. Maeda, T. Kume, H. Kochiyama, A. Akaike, S. Shimohama, and J. Kimura: Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res* 765(1), 135-140 (1997)
- [201] T.R. Stevens, S.R. Krueger, R.M. Fitzsimonds, and M.R. Picciotto: Neuroprotection by nicotine in mouse primary cortical cultures involves activation of calcineurin and L-type calcium channel inactivation. *J Neurosci* 23(31), 10093-10099 (2003)
- [201]. P.A. Ferchmin, J. Hao, D. Perez, M. Penzo, H.M. Maldonado, M.T. Gonzalez, A.D. Rodriguez, and J. de Vellis: Tobacco cembranoids protect the function of acute hippocampal slices against NMDA by a mechanism mediated by alpha4beta2 nicotinic receptors. *J Neurosci Res* 82(5), 631-641 (2005)
- [202]. E. Arias, E. Ales, N.H. Gabilan, M.F. Cano-Abad, M. Villarroya, A.G. Garcia, and M.G. Lopez: Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 46(1), 103-114 (2004)
- [203]. S. Vernino, M. Amador, C.W. Luetje, J. Patrick, and J.A. Dani: Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 8(1), 127-134 (1992) 126. M.M. Rathouz, S. Vijayaraghavan.
- [204]. C. Mulle, D. Choquet, H. Korn, and J.P. Changeux: Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons - its relevance to cellular regulation. *Neuron* 8(1), 135-143 (1992)
- [205]. M.M. Rathouz, S. Vijayaraghavan, and D.K. Berg: Elevation of intracellular calcium levels in neurons by nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Neurobiol* 12(2), 117-131 (1996)
- [206] K. Ren, V. Puig, R. Papke, Y. Itoh, J. Hughes, and E. Meyer: Multiple calcium channels and kinases mediate alpha7 nicotinic receptor neuroprotection in PC12 cells. *J Neurochem* (Epub ahead of print) (2005)
- [207] Tsuneki, H. et al. (2000) Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2475–2485
- [208] Dajas-Bailador, F y Wonnacott, S. Nicotine acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences* vol.25 N°6 June 2004.
- [209] Gueorguiev, V.D. et al. (2000) Involvement of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in activation of tyrosine hydroxylase and dopamine b-hydroxylase gene expression in PC12 cells. *J. Neurochem.* 75, 1997–2005
- [210] Blum, M., Wu, G., Mudo, G., Belluardo, N., Andersson, K., Agnati, L.F. & Fuxe, K. (1996). Chronic continuous infusion of (7) nicotine reduces basic fibroblast growth factor messenger RNA levels in the ventral midbrain of the intact but not of the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Neurosci.*, 70, 169 ± 177.
- [211] Bordia T, McGregor M, Papke RL, Decker MW, McIntosh JM, Quik M. The alpha7 nicotinic receptor agonist ABT-107 protects against nigrostriatal damage in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Exp Neurol.* 2015 Jan; 263:277-84. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.09.015. Epub 2014 Sep 28.
- [212] Keath JR, Iacoviello MP, Barrett LE, Mansvelder HD, and McGehee DS (2007) Differential modulation by nicotine of substantia nigra versus ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol* 98:3388–3396

- [213] Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, and Dani JA (2003) Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 23:3176–3185.
- [214]. F.A. Dajas-Bailador, P.A. Lima, and S. Wonnacott: The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca(2+) dependent mechanism. *Neuropharmacology* 39(13), 2799- 2807 (2000)
- [215]. M.L. Messi, M. Renganathan, E. Grigorenko, and O. Delbono: Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor promotes survival of spinal cord motoneurons. *FEBS Letters* 411(1), 32-38 (1997)
- [216]. R. Garrido, A. Malecki, B. Hennig, and M. Toborek: Nicotine attenuates arachidonic acid-induced neurotoxicity in cultured spinal cord neurons. *Brain Res* 861(1), 59-68 (2000)
- [217]. M. Toborek, R. Garrido, A. Malecki, S. Kaiser, M.P. Mattson, B. Hennig, and B. Young: Nicotine attenuates arachidonic acid-induced overexpression of nitric oxide synthase in cultured spinal cord neurons. *Experimental Neurology* 161(2), 609-620 (2000)
- [218]. R. Garrido, M.P. Mattson, B. Hennig, and M. Toborek: Nicotine protects against arachidonic-acidinduced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. *Journal of Neurochemistry* 76(5), 1395-1403 (2001)
- [219] Kihara T., Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, and Akaike, A: alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Biol Chem* 276(17), 13541-13546 (2001)
- [220] Galyna Gergalova¹, Olena Lykhmus¹, Olena Kalashnyk¹, Lyudmyla Koval¹, Volodymyr Chernyshov¹, Elena Kryukova², Victor Tsetlin², Sergiy Komisarenko¹, Maryna Skok¹ Mitochondria Express a7 Nicotinic Acetylcholine Receptors to Regulate Ca²⁺ Accumulation and Cytochrome c Release: Study on Isolated Mitochondria PLoS ONE February 2012 | Volume 7 | Issue 2 | e31361
- [221] Gergalova G, Lykhmus O, Skok M (2011) Possible influence of a7 nicotinic acetylcholine receptor activation in the mitochondrial membrane on apoptosis development. *Neirofiziologia/Neurophysiology* 43(3): 225–228
- [222] Maggio, R, Riva, M, Vaglini, F, Fornai, F, Racagni, G, and Corsini, G.U: Striatal increase of neurotrophic factors as a mechanism of nicotine protection in experimental parkinsonism. *J Neural Transm* 104, 1113- 1123 (1997)
- [223]. N. Belluardo, M. Blum, G. Mudo, B. Andbjør, and K. Fuxe: Acute intermittent nicotine treatment produces regional increases of basic fibroblast growth factor messenger RNA and protein in the tel- and diencephalon of the rat. *Neuroscience* 83(3), 723-740 (1998)
- [224] N. Belluardo, G. Mudo, M. Blum, N. Itoh, L. Agnati, and K. Fuxe: Nicotine-induced FGF-2 mRNA in rat brain is preserved during aging. *Neurobiol Aging* 25(10), 1333- 1342 (2004)
- [225] Jonnala R.R., Terry, A.V, and Buccafusco J.J: Nicotine increases the expression of high affinity nerve growth factor receptors in both *in vitro* and *in vivo*. *Life Sciences* 70(13), 1543-1554 (2002)