

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1287-1307

————— *Artículo original* —————

## Heterogeneidad morfológica de la porción posterior del estriado humano

Recibido el 19 de octubre de 2007

JAVIER BERNÁCER<sup>1</sup>, LUCÍA PRENSA<sup>2</sup> Y JOSÉ MANUEL GIMÉNEZ-AMAYA<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratorio de Neuromorfología Funcional. Clínica Universitaria, Universidad de Navarra. Avenida Pío XII, 36. 31080 Pamplona (España)*

<sup>2</sup>*Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Arzobispo Morcillo, s/n. 28029. Madrid (España)*

### RESUMEN

El estriado (núcleo caudado, NC, y putamen, Put) forma parte de los ganglios basales, un conjunto de núcleos subcorticales cuya principal función es la planificación y ejecución de los movimientos voluntarios. La información nerviosa procedente de la corteza cerebral alcanza el estriado formando tres canales distintos, denominados asociativo, sensorimotor y límbico. La parte posterior del estriado, que incluye el cuerpo, el giro y la cola del NC, además del último tercio del Put postcomisural, ha recibido una escasa atención en cuanto a sus características químicas y composición celular. El presente trabajo tiene como objetivo analizar la distribución de dos poblaciones de interneuronas (nitrérgicas y colinérgicas) en

---

\* **Información de contacto:** José Manuel Giménez-Amaya. Despacho A-39, Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. C/ Arzobispo Morcillo s/n, 28029 – Madrid (España). Teléfono: 91 497 5323; fax: 91 497 5353; correo electrónico: josemanuel.gimenezamaya@uam.es

**Lista de abreviaturas:** **ABC**, complejos avidina-biotina-peroxidasa; **ca**, comisura anterior; **ChAT**, colina acetiltransferasa; **DAB**, 3,3'-diaminobenzidina; **ENK**, encefalina; **F**, femenino; **M**, masculino; **NADPH-d**, NADPH-diaforasa; **NC**, núcleo caudado; **PB**, tampón fosfato; **PBS**, tampón fosfato salino; **postcom.**, postcomisural; **precom.**, precomisural; **Put**, putamen.

la parte posterior del estriado. Según nuestros resultados, ambas poblaciones presentan una mayor densidad en la parte posterior del estriado que en la parte anterior, siendo más abundantes en el NC que en el Put. La región más densamente poblada por las neuronas nitrérgicas es el giro del NC, mientras que las neuronas colinérgicas son especialmente abundantes en el cuerpo de dicho núcleo. Además, la organización de los dos grupos neuronales con respecto al compartimento estriosomal es diferente en la parte posterior del estriado que en las regiones anteriores, y también varía según se trate de las neuronas nitrérgicas o de las colinérgicas. En definitiva, nuestro estudio demuestra que la porción posterior del estriado puede llevar a cabo un procesamiento de la información tanto o más complejo que la parte anterior.

**Palabras clave:** ganglios basales, interneuronas, estriosomas, acetilcolina, NADPH-diaforasa.

### ABSTRACT

#### **Morphological heterogeneity of the human posterior striatum**

The striatum (caudate nucleus, NC and putamen, Put) is a main part of the basal ganglia, a group of subcortical nuclei whose main function is the planning and execution of voluntary movements. Nervous inputs from the cerebral cortex are divided into three different channels in the striatum, termed associative, sensorimotor and limbic. The posterior aspect of the striatum comprises the body, gyrus and tail of the NC, and the postcommissural Put, and has been very much left out of most of chemical and cellular studies. The present work is aimed at analyzing the distribution of two populations of interneurons (nitregic and cholinergic) in those striatal regions. According to our results, both populations are more abundant in the posterior striatum than in its anterior aspects, with a higher density in the NC than in the Put. The gyrus of NC is the most populated region by nitregic cells, whereas cholinergic interneurons are especially abundant in the body of NC. Furthermore, the organization of both interneuronal groups regarding the striosomal compartment is different in the posterior striatum with respect to its anterior aspects, and this organization also varied when nitregic or cholinergic interneurons were analyzed. Overall, our study demonstrates that the posterior aspect of the striatum might carry out a more complex processing of the information than its anterior counterpart.

**Key words:** basal ganglia, interneurons, striosomes, acetylcholine, NADPH-diaforase.

## INTRODUCCIÓN

El estriado forma parte de un grupo de núcleos subcorticales denominados ganglios basales. En principio, se creyó que estos núcleos tenían como única función la transmisión de la información desde unas zonas corticales a otras, pasando por el tálamo. Sin embargo, diversos hallazgos demostraron que ciertas alteraciones de los componentes de los ganglios basales daban lugar a diferentes patologías con una sintomatología característica, y que podían afectar a funciones cognitivas, emotivas o motoras.

El estriado dorsal se compone de dos núcleos: el núcleo caudado (NC) y el putamen (Put). En ambos núcleos, así como en cualquier otra estructura nerviosa, se pueden distinguir dos tipos de neuronas en atención a la diana de su axón; así, las neuronas de proyección inervan otros núcleos distintos de aquél en el que se encuentran, mientras que el axón de las interneuronas permanece en el mismo núcleo en el que se encuentra su soma. Existe un gran número de clasificaciones de los tipos neuronales del estriado (1-5), y todas ellas coinciden en observar la presencia de espinas sinápticas en las dendritas de las neuronas de proyección, y la ausencia de las mismas en las interneuronas. Uno de los aspectos más llamativos acerca de estas dos poblaciones de neuronas estriatales es la variación de su proporción según se asciende en la escala filogenética. Así, mientras el porcentaje de las neuronas de proyección es de alrededor del 95% en roedores (5), en humanos esta cifra cae hasta el 75% (6, 7). Esta diferencia parece indicar la importancia de las interneuronas en la organización integradora y funcional del estriado de los primates. Existen seis poblaciones distintas de interneuronas estriatales según los neurotransmisores y las sustancias neuroactivas que contienen: **1)** interneuronas nitrérgicas con neuropéptido Y, somatostatina y GABA (8, 9); **2)** interneuronas colinérgicas (10); **3)** interneuronas con calbindina (11); interneuronas gabaérgicas con **4)** calretinina (11, 12) y **5)** parvalbúmina (11, 13); y, finalmente, **6)** neuronas dopaminérgicas (14-17).

Desde que en 1978 Graybiel y Ragsdale describieran la presencia de los estriosomas, multitud de estudios han analizado la anatomía química del estriado (18-21). El compartimento estriosomal es un conjunto de laberintos tridimensionales situados en el estriado con

unas características químicas y conectivas distintas del resto del tejido estriatal, denominado matriz. En general, los estriosomas son ricos en encefalina (ENK), sustancia P y proteína de membrana ligada al sistema límbico, mientras que tienen una cantidad inferior con respecto a la matriz de las enzimas acetilcolinesterasa, calbindina y parvalbúmina. En el año 1999, Prensa y colaboradores demostraron que el compartimento estriosomal era heterogéneo en sí mismo, observándose en él una periferia con distinto marcaje que el centro, con algunos marcadores (20). En cuanto a sus características hodológicas, se ha demostrado que los estriosomas están relacionados con el sistema límbico (22-24).

En el presente trabajo, nos proponemos describir la distribución y organización compartimental de los dos grupos de interneuronas considerados más importantes, las neuronas nitrérgicas y las colinérgicas, en la porción posterior del estriado. Nuestra hipótesis de trabajo es comprobar si esta zona estriatal tiene una complejidad neuronal similar a la de la parte anterior, y de esta manera valorar su importancia en los procesos cognitivos, emotivos y motores que lleva a cabo el estriado, así como en las distintas enfermedades neurológicas y psiquiátricas que afectan a este núcleo de los ganglios basales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación del tejido

El material biológico post mórtem empleado en este estudio fue obtenido a partir de 9 adultos de ambos sexos sin evidencias clínicas o patológicas de haber padecido alteraciones neurológicas o psiquiátricas (Tabla 1). Este tejido fue donado por el Banco de Tejidos Neurológicos de Navarra (Clínica Universitaria and CIB), el Departamento de Anatomía Patológica de la Clínica Universitaria de Navarra, y el del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. En el momento del fallecimiento, se requirió la autorización de los parientes para realizar la autopsia médica. Tras ello, varias muestras biológicas fueron anonimadas y mantenidas en el hospital para emplearlas en investigación. Las muestras biológicas anónimas usadas en el presente estudio fueron proporcionadas por los Departamentos citados des-

pués de la aprobación de nuestro Proyecto por los correspondientes Comités Éticos de los hospitales donde se recogieron las muestras (Clínica Universitaria y Universidad Autónoma de Madrid). Todos los casos empleados en este estudio fueron recogidos entre 2001 y 2004.

TABLA 1. *Datos clínicos de los casos empleados en este estudio.*

Caso	Sexo	Edad (años)	Tiempo post mórtem (h)	Causa del fallecimiento
1	M	35	4	Ataque cardíaco
2	F	58	6	Hemorragia gastrointestinal
3	M	66	17	Adenocarcinoma gástrico
4	M	67	4,5	Neumonía bilateral
5	M	74	7	Sarcoma gástrico
6	M	63	12	Cáncer de próstata
7	F	20	2	Fibrosis quística
8	M	78	6	Cáncer de pulmón
9	M	50	6	Enfermedad pulmonar

*F, femenino; M, masculino*

El hemisferio cerebral, una vez extraído y pesado, fue cortado en bloques de un grosor aproximado a 1 cm, que fueron fijados en una solución constituida por paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (PB) con un 0,2% de ácido pícrico, a 4°C y durante cerca de 10 días. Estos bloques fueron sumergidos en sacarosa al 15% diluida en PB a 4°C durante al menos 7 días antes de ser cortados. Aquellos bloques que no fueron cortados inmediatamente se almacenaron en una solución constituida por sacarosa (15%), azida sódica (0,1%) y PB. El corte fue realizado en sentido coronal en un microtomo de congelación, a 50  $\mu$ m, recogiendo cada sección con un pincel humedecido, y almacenando el tejido en una solución crioprotectora formada por etilenglicol (30%) y glicerol (30%) en PB 0,05 M.

## **Técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas**

### *Técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa (NADPH-d)*

Varios cortes seleccionados en distintos niveles anteroposteriores del estriado humano fueron procesados para la visualización de la actividad enzimática de la NADPH-d, según hemos explicado anteriormente (9). Después, los cortes fueron lavados en PB y montados en portas gelatinizados. Tras dejarlos secar al aire durante una noche, fueron deshidratados mediante pasos sucesivos en alcoholes de concentración creciente, aclarados en tolueno y cubiertos con DPX. Algunos cortes sirvieron como controles negativos, incubándolos en un medio carente de  $\beta$ -NADPH, sin mostrar ningún tipo de marcaje.

### *Técnica inmunohistoquímica simple*

Otra serie de cortes que abarcaba los distintos niveles estriatales fue tratado inmunohistoquímicamente para visualizar las neuronas colinérgicas por medio de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Después de tres lavados de 10 minutos en PB salino (PBS), los cortes fueron tratados con una solución formada por un tercio de etanol y dos tercios de agua oxigenada al 3% en PBS durante 30 minutos, con el fin de inactivar la actividad de la peroxidasa endógena. Tras otros tres lavados en PBS, los cortes fueron incubados en una solución con su anticuerpo primario (1:500, 2 noches) generado en cabra, incluyendo PBS como tampón y Tritón X-100 al 0,1%. Después de varios lavados en PBS, los cortes fueron de nuevo incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente en la solución que contenía el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Ig G anti-cabra generado en conejo; Vector Labs, Burlingame, EE UU), a una dilución 1:250. Después, y tras varios lavados en PBS, los cortes fueron sumergidos durante 90 minutos a temperatura ambiente en una solución al 1:125 de complejos avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector Labs). Los cortes fueron revelados al situarlos en un medio con un 0,05% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) y un 0,003% de  $H_2O_2$  en tampón Tris al 0,05 M, pH 7,6. Algunos cortes sirvieron como control negativo omitiendo el anticuerpo primario o el secundario en las distintas soluciones.

*Técnica combinada histoquímica e inmunohistoquímica*

Algunos cortes pertenecientes a todos los niveles estriatales fueron seleccionados para visualizar en la misma preparación la distribución de las interneuronas NADPH-d respecto a los distintos compartimentos estriatales. Después de tratar los cortes para la técnica histoquímica de la NADPH-d descrita anteriormente, fueron lavados abundantemente en PBS durante 2 horas. Después, se realizó la técnica inmunohistoquímica de la ENK, empleando un anticuerpo generado en ratón (Medicorp, Montreal, Canadá) a una concentración 1:50 durante 2 noches, deteniendo la reacción de revelado lo antes posible para evitar un exceso de fondo que dificultara la observación de las neuronas.

*Técnica de doble inmunohistoquímica*

Algunos cortes fueron procesados inmunohistoquímicamente para la visualización simultánea de las interneuronas colinérgicas y del compartimento estriosomal (ChAT y ENK). Para ello, tras varios lavados en PBS y la inactivación de la peroxidasa endógena, los cortes se incubaron durante dos noches en una solución compuesta por Tritón X-100 al 0,1%, seroalbúmina bovina al 10%, y los anticuerpos anti-ChAT y anti-ENK. Posteriormente, los cortes fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente a la ChAT, la solución ABC como se describió anteriormente, y se reveló con DAB. Tras ello, los cortes se lavaron durante 30 minutos en PBS, y se incubaron con el anticuerpo secundario específico para la ENK, la solución de ABC, y se revelaron en una solución constituida por un 0,3% de sulfato amónico de níquel (Fluka, Buchs, Suiza), 0,025% de DAB, y 0,0015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón Tris pH 7,6. Se obtuvo un precipitado gris oscuro que contrastaba con el color marrón de la DAB. Algunos cortes fueron procesados sin el anticuerpo primario o el secundario de la ChAT o la ENK, sirviendo como controles negativos.

## **Análisis de los datos**

### *División del estriado*

Para realizar un análisis topográficamente estandarizado, tanto el NC como el Put fueron divididos en distintos territorios en el eje anteroposterior (Figura 1). En primer lugar, empleamos la aparición de la comisura anterior para dividir el estriado precomisural y postcomisural. El primero incluía la cabeza precomisural del NC, y el Put precomisural (Figura 1A). El estriado postcomisural quedó formado por la cabeza postcomisural, el cuerpo, el giro y la cola del NC, y el Put postcomisural (Figura 1B-E). El comienzo del cuerpo del NC se estableció en aquel nivel en el que desaparecían los cuerpos mamilares hipotalámicos, y el del giro cuando el cuerpo y la cola se unían.

Para analizar todo este material experimental, hemos empleado los siguientes atlas del cerebro humano: Schaltenbrand & Wahren, Mai et al., y Nowinski et al. (25-27).

### *Distribución celular y recuentos neuronales*

La densidad neuronal de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas fue realizada con técnicas estereológicas. Para realizar un estudio lo más completo posible de los distintos territorios, establecimos una fracción de muestreo del 15% del total de cortes que componían el estriado humano en cada cerebro, obteniendo así cerca de 50 preparaciones coronales por cerebro. Estos cortes fueron escogidos de modo sistemático con comienzo al azar.

La densidad de las interneuronas fue analizada por medio de la técnica del disector óptico (9), empleando un microscopio Olympus (Olympus Optical Co. Europe GmbH, Hamburgo, Alemania). Este microscopio, provisto de una platina motorizada, tenía acoplada a una videocámara (JVC España, Barcelona, España), conectada a un ordenador Dell OptiPlex. El programa empleado fue CAST (Visio-pharm, Hørsholm, Dinamarca). El volumen del disector ( $V_{dis}$ ) fue calculado a partir del área del mismo y la profundidad del corte. El muestreo de los disectores fue realizado con la misma fracción a lo

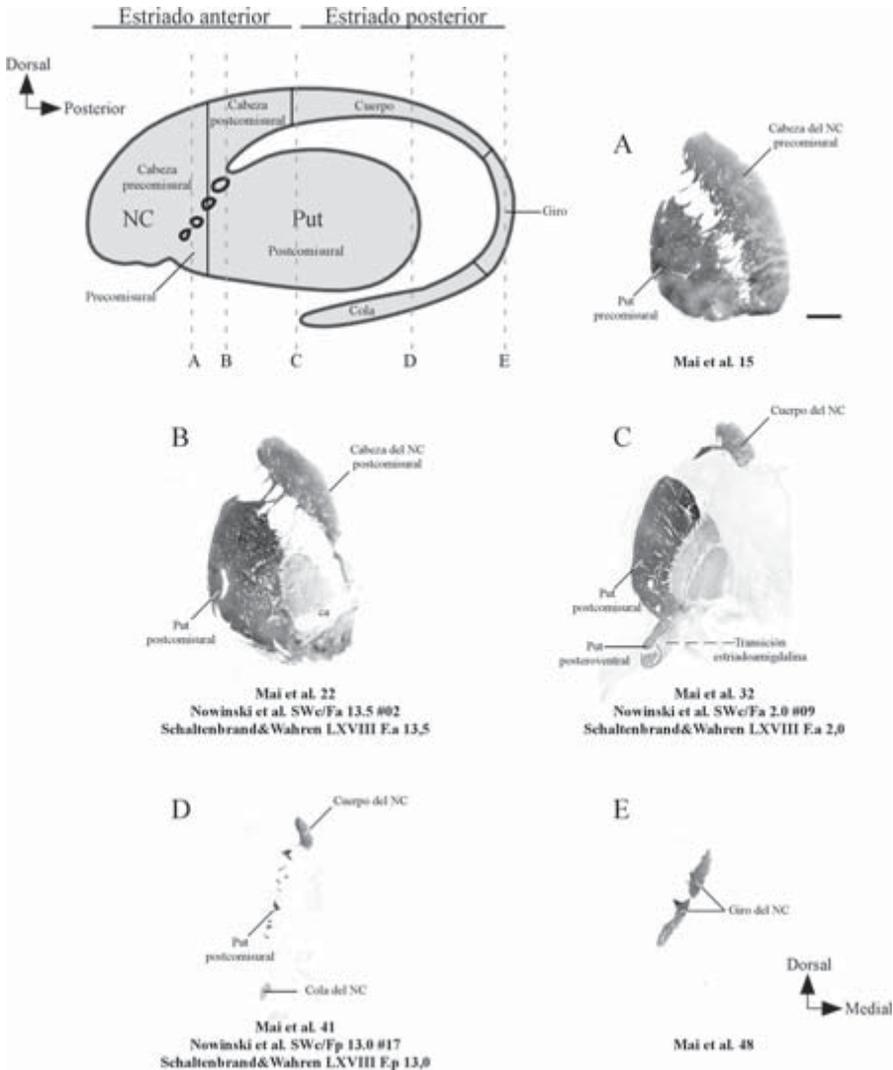


FIGURA 1. **División del estriado humano en el eje anteroposterior.** Esquema sagital del NC y del Put que ilustra las diferentes regiones en las que estos núcleos fueron divididos. Las líneas continuas indican los límites entre las diferentes regiones, mientras que las discontinuas representan los niveles de los cortes mostrados en A-E. Éstos son secciones coronales en las que se indican las diferentes regiones estriatales contenidas en cada nivel. Además, debajo de cada corte se señala el nivel correspondiente de los atlas empleados en este estudio. **Abreviaturas:** ca, comisura anterior; NC, núcleo caudado; Put, putamen. **Barra de calibración:** 5 mm.

largo de todos los territorios estriatales (1% en el caso de las neuronas nitrérgicas, y 3,25% en el caso de las colinérgicas). La suma de todos los somas contados en cada disector dio como resultado el parámetro  $\Sigma Q_d^-$ , y la densidad neuronal ( $N_v$ ) fue calculada por medio de la fórmula:

$$N_v = \Sigma Q_d^- / \Sigma V_{dis} \text{ (células/mm}^3\text{)}$$

### *Distribución compartimental*

La presencia de las interneuronas dentro de los estriosomas y en la matriz circundante fue dibujada por medio de una cámara clara acoplada a un microscopio, a 5 aumentos. Una vez las neuronas fueron punteadas, se pudo establecer su morfología a aumentos superiores.

## RESULTADOS

### **Distribución de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas**

Las neuronas NADPH-d positivas aparecían ampliamente distribuidas en todas las regiones del estriado analizadas (Figura 2; Tabla 2). El estudio estereológico llevado a cabo demostró que la región con una mayor densidad neuronal fue el giro del NC. El resultado de la prueba *ANOVA* al comparar las distintas regiones estriatales en el eje anteroposterior proporcionó diferencias muy significativas ( $P=0,005$ ). El resultado de la prueba a posteriori reveló que la significación de *ANOVA* aparecía al compararse el giro con la cabeza precomisural del NC ( $P=0,006$ ) y con el Put precomisural ( $P=0,006$ ).

Acerca de las interneuronas colinérgicas, la región estriatal más densamente poblada por estas interneuronas resultó ser el cuerpo del NC (Figura 2; Tabla 3). La probabilidad asociada al *ANOVA* en este caso fue 0,005, por lo que se concluyó que existían diferencias muy significativas entre las distintas regiones. La prueba a posteriori demostró que existían diferencias muy significativas cuando el Put postcomisural era comparado con el cuerpo del NC ( $P=0,005$ ).

## Relación de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas con el compartimento estriosomal en la porción posterior del estriado

En la parte anterior del cuerpo del NC, se encontraron algunos somas dentro de los estriosomas, situados principalmente cerca de los bordes de los mismos, pero apenas aparecían interneuronas en la matriz circundante al compartimento estriosomal y en el límite entre los estriosomas y la matriz (Figura 5). Sin embargo, en la parte posterior del cuerpo y en el giro del NC no se encontraron apenas interneuronas en el interior de los estriosomas, y apareció un número considerable de somas entre la matriz y el compartimento estriosomal (Figuras 3, 4 y 5). En la cola del NC no se encontró ningún estriosoma en este apartado del estudio.

TABLA 2. *Valores medios de la densidad de las neuronas nitrérgicas (neuronas/mm<sup>3</sup>) en las distintas regiones y sectores en los que se dividió el estriado humano<sup>1</sup>.*

	dm	dl	vm	vl	Total
Cabeza precom.	527 ± 46	419 ± 37	620 ± 97	497 ± 44	494 ± 24
Cabeza postcom.	871 ± 145	925 ± 114	615 ± 122	776 ± 145	820 ± 66
Cuerpo					962 ± 169
Giro	<i>Dorsal</i>		<i>Ventral</i>		
	1153 ± 174		653 ± 107		1060 ± 142
Cola					845 ± 319
Putamen precom.	421 ± 45	628 ± 71	350 ± 46	434 ± 48	490 ± 38
Putamen postcom.	492 ± 48	626 ± 62	538 ± 61	678 ± 74	638 ± 127

<sup>1</sup>Para cada uno de estos sectores, se indica la media ± SEM de la densidad. dl, dorsolateral; dm, dorsomedial; NC, núcleo caudado; Put, putamen; vl, ventrolateral; vm, ventromedial.

La mayoría de los estriosomas encontrados en toda la extensión anteroposterior del Put presentaban una clara distinción entre el centro y la periferia. La presencia de interneuronas nitrérgicas en el interior de los estriosomas (centro y periferia) y en los bordes entre

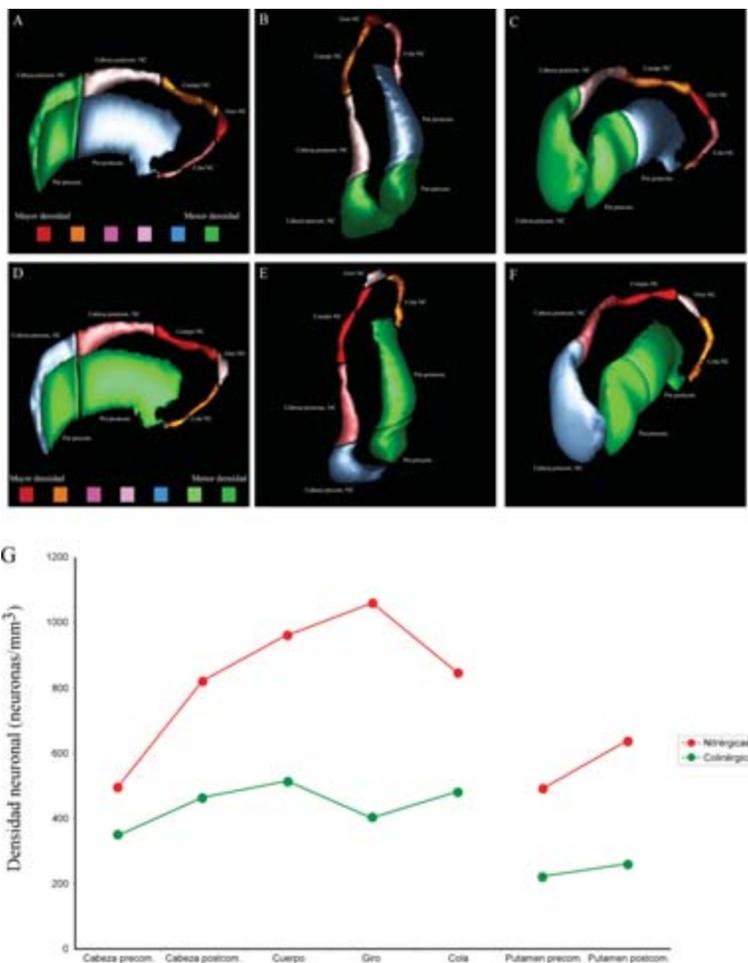


FIGURA 2. *La distribución de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas es heterogénea en el estriado humano. A-F, esquemas tridimensionales que muestran la distribución selectiva de las interneuronas nitrérgicas (A-C) y colinérgicas (D-F) a lo largo del eje anteroposterior del estriado. A-C, en el caso de las nitrérgicas, el giro del NC es la región más densamente poblada, seguida del cuerpo, la cola y la cabeza postcomisural de dicho núcleo, el Put postcomisural, y los territorios precomisurales de la cabeza del NC y del Put. D-F, en cuanto a las colinérgicas, el cuerpo del NC es la región más densamente poblada, seguido de la cola, la cabeza postcomisural, el giro, y la cabeza precomisural de dicho núcleo, el Put postcomisural y el precomisural. G, gráficos de líneas que ilustran la densidad de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas en las distintas regiones del estriado. Abreviaturas: NC, núcleo caudado; postcom., postcomisural; precom., precomisural; Put, putamen.*

los distintos compartimentos fue mayor en el Put postcomisural que en el precomisural (Figuras 3, 4 y 5).

TABLA 3. *Valores medios de la densidad de las neuronas colinérgicas (neuronas/mm<sup>3</sup>) en las distintas regiones y sectores en los que se dividió el estriado humano<sup>1</sup>.*

	dm	dl	vm	vl	Total
Cabeza precom.	489 ± 23	284 ± 22	370 ± 25	248 ± 21	349 ± 14
Cabeza postcom.	649 ± 68	433 ± 56	377 ± 48	402 ± 43	462 ± 32
Cuerpo					513 ± 63
Giro	<i>Dorsal</i>		<i>Ventral</i>		400 ± 61
	351 ± 73		459 ± 84		
Cola					481 ± 223
Putamen precom.	162 ± 22	277 ± 26	168 ± 27	224 ± 26	219 ± 19
Putamen postcom.	291 ± 27	325 ± 25	215 ± 21	275 ± 29	258 ± 17

<sup>1</sup>Para cada uno de estos sectores, se indica la media ± SEM de la densidad. dl, dorsolateral; dm, dorsomedial; postcom., postcomisural; precom., precomisural; vl, ventrolateral; vm, ventromedial.

En cuanto a las neuronas colinérgicas, en el cuerpo del NC las interneuronas tendían a alejarse de los estriosomas, una tendencia que ya empezaba a aparecer en la parte posterior de la cabeza postcomisural. Así, en muchos estriosomas del cuerpo apenas aparecían 1 o 2 interneuronas colinérgicas en su interior y en el borde del compartimento estriosomal. En el giro del NC, esta tendencia llegó al extremo (Figuras 3 y 4). No se encontró ningún estriosoma que contuviera alguna interneurona colinérgica, que tampoco poblaron los límites entre ambos compartimentos (Figura 5).

Por último, en el Put postcomisural el número de somas en el compartimento rico en ENK fue bastante elevado, en ocasiones similar al de la matriz (Figuras 3 y 4). De los 17 estriosomas analizados, sólo uno homogéneo y otro heterogéneo aparecieron completamente despoblados de interneuronas colinérgicas. La presencia de neuronas en el centro estriosomal fue baja, aunque la proporción de estriosomas con interneuronas en la región estriosomal pobre en ENK fue la más elevada de todos los territorios del estriado. En la

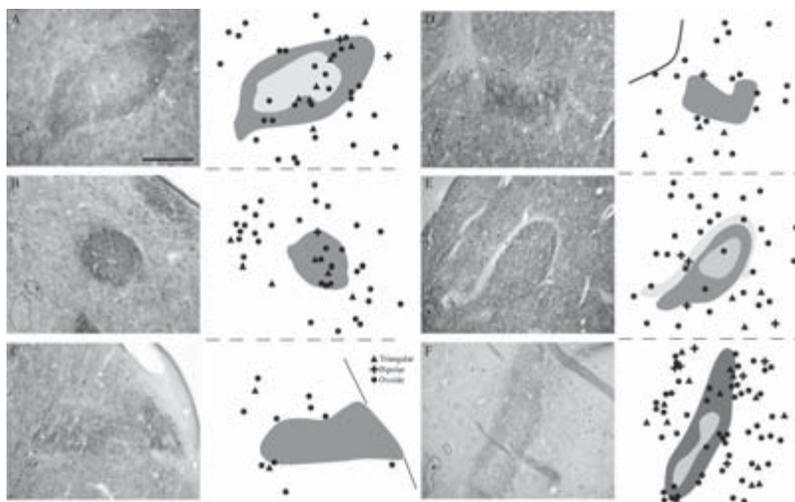


FIGURA 3. **Organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas.** Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de los distintos grupos morfológicos de interneuronas nitrérgicas con respecto a los estriosomas, en la cabeza precomisural (A) y postcomisural (B), en el cuerpo (C) y giro (D) del NC, y en el Put precomisural (E) y postcomisural (F). **Barra de calibración:** 200  $\mu\text{m}$  (A, B, E y F), 100  $\mu\text{m}$  (C y D).

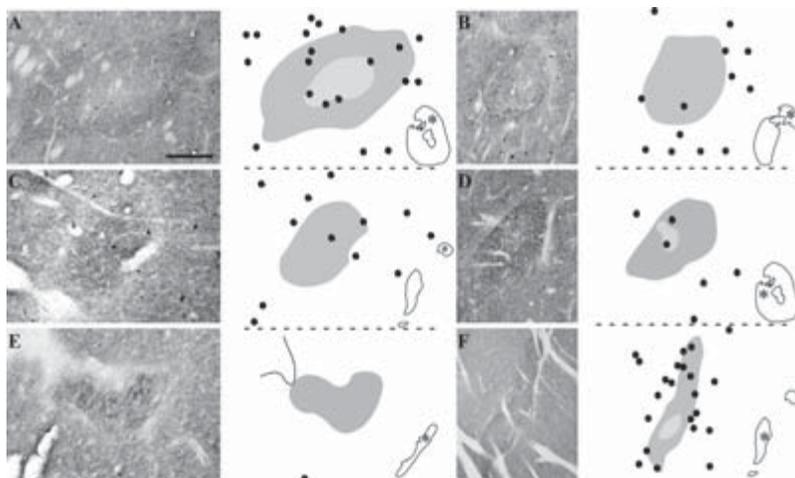


FIGURA 4. **Organización compartimental de las interneuronas colinérgicas.** Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de las interneuronas colinérgicas con respecto a los estriosomas, en la cabeza precomisural (A) y postcomisural (B), en el cuerpo (C) y giro (D) del NC, y en el Put precomisural (E) y postcomisural (F). **Barra de calibración:** 750  $\mu\text{m}$  (A), 800  $\mu\text{m}$  (B), 260  $\mu\text{m}$  (C), 1 mm (D y F), 1,5 mm (E).

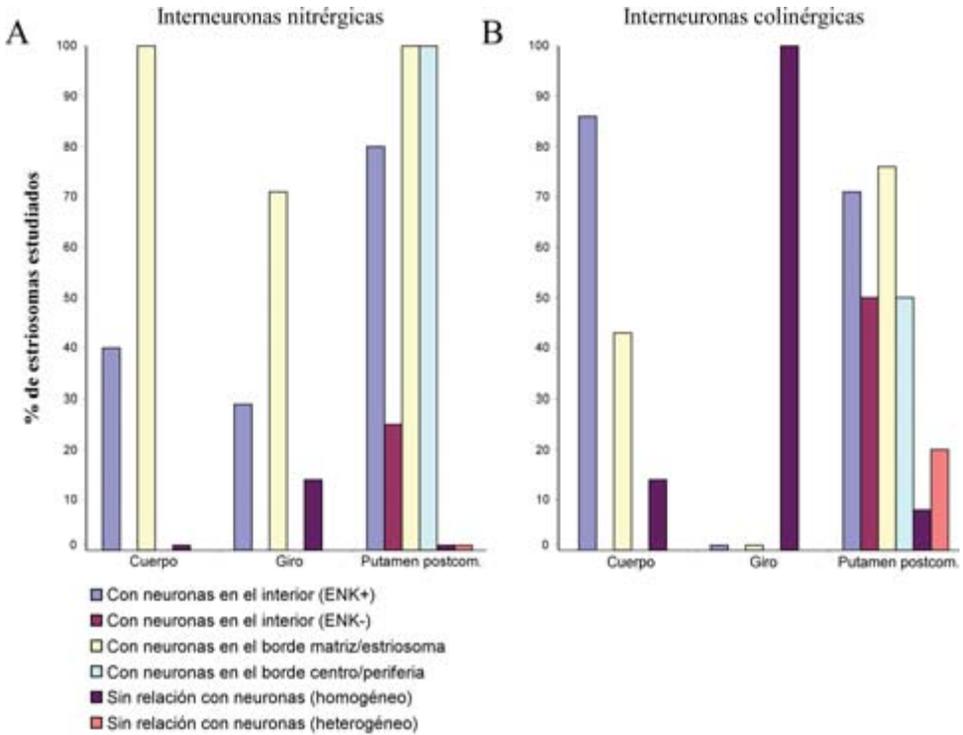


FIGURA 5. *Análisis cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas nitrgicas y colinérgicas.* Gráficos de barras que indican, para el estriado posterior, el porcentaje de estriosomas que cumplieron cada una de las condiciones citadas en la leyenda. **A**, el Put postcomisural es la región que presenta un mayor porcentaje de estriosomas en relación con las interneuronas nitrgicas, especialmente en los bordes entre los distintos compartimentos. Por otra parte, el cuerpo y el giro del NC tienen pocos estriosomas con neuronas dentro, y la mayoría de ellos contienen somas en sus bordes. **B**, las interneuronas colinérgicas aparecen especialmente en el compartimento ENK positivo en todas las regiones excepto en el giro del NC, donde no se observa ningún estriosoma que contenga interneuronas. Las neuronas colinérgicas pueblan preferentemente el borde entre la matriz y el estriosoma, aunque también aparecen entre el centro y la periferia. **Abreviaturas:** ENK, encefalina; postcom., postcomisural; precom., precomisural.

mayoría de los estriosomas analizados apareció al menos un soma en el límite entre el compartimento estriosomal y la matriz. Su presencia en el borde centro/periferia de los estriosomas fue más reducida (Figura 5).

## DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra que la porción posterior del estriado humano tiene una mayor densidad de interneuronas nitrérgicas y colinérgicas que la porción anterior. Debido a que la proporción de interneuronas tiende a aumentar según se avanza en la escala filogenética, una mayor abundancia de interneuronas en ciertas regiones del estriado podría implicar una especial complejidad en la integración de la información nerviosa en dichas zonas. Además, el estudio demuestra que la relación de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas con el compartimento estriosomal varía a lo largo de toda la extensión anteroposterior del estriado, y por lo tanto la integración de los distintos tipos de información que procesan la matriz y los estriosomas parece ser distinta según la región estriatal analizada.

Las interneuronas estriatales podrían representar uno de los factores reguladores y responsables de la organización de la información en el estriado y, por lo tanto, en los ganglios basales y en sus estructuras relacionadas. Así, se ha visto que están implicadas en el aprendizaje y en la plasticidad de la respuesta estriatal (28-31), y se ha comprobado su alteración numérica, morfológica o funcional en procesos patológicos que afectan a actividades motoras, cognitivas o emocionales (32-38). Por lo tanto, pensamos que las interneuronas estriatales podrían jugar un importante papel en la integración de la información que fluye a través de los ganglios basales.

Teniendo en cuenta los resultados del presente estudio, la mayor densidad interneuronal en el NC con respecto al Put podría implicar la existencia de un mayor número de circuitos funcionales en este núcleo estriatal, algo que requeriría una mayor presencia de interneuronas para conseguir altos niveles de integración nerviosa de diversos tipos. Esto mismo se daría también en el estriado posterior con respecto al anterior. El grado de diversidad de las proyecciones corticoestriatales en una determinada región del estriado puede condicionar la presencia de un mayor número de interneuronas que integren la información de las distintas regiones corticales. Por lo tanto, la abundancia de interneuronas en un determinado territorio estriatal indicaría una gran variedad de proyecciones corticales en esa región.

Las características químicas de los estriosomas del estriado posterior coinciden a grandes rasgos con las de aquéllos del estriado

anterior (19, 20). La principal diferencia entre las regiones anteriores y posteriores radica en que en estas últimas los estriosomas son de menor tamaño y la heterogeneidad estriosomal es menor, ya que prácticamente desaparece en los niveles más posteriores (9, 20). En términos generales, podría decirse que la heterogeneidad estriosomal es directamente proporcional al tamaño del estriosoma. Sin embargo, no se puede descartar que los pequeños «parches» homogéneos que se observan en el estriado posterior sean la parte final de grandes estriosomas que se han formado en niveles más anteriores. Según nuestras propias observaciones, no ilustradas en este trabajo, en la porción más anterior del estriado todos los estriosomas parecen ser homogéneos. De esta manera, los estriosomas podrían ser vistos tridimensionalmente como un complejo sistema de túneles cuyas gruesas paredes presentan una composición química distinta con respecto a la zona central, y con dos extremos de gran grosor. Así, los estriosomas homogéneos que se observan en el estriado posterior podrían ser los extremos de las pequeñas ramificaciones que surgen de estriosomas más grandes.

Los resultados del presente estudio implicarían que la labor de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas como integradoras de la información de los dos compartimentos químicos del estriado (matriz y estriosomas) se conservaría a lo largo de toda la extensión anteroposterior de esta estructura subcortical, salvo en el caso del giro del NC para las interneuronas colinérgicas. En esta región estriatal no se encontró ninguna interneurona perteneciente a esta población en contacto con los estriosomas. La mayor densidad neuronal del NC con respecto al Put resulta lógica si se tiene en cuenta que el primero se encuentra implicado en funciones de integración nerviosa más complejas que el segundo (39, 40). Por otra parte, la presencia de interneuronas en todos los compartimentos químicos de ambas estructuras estriatales invita a pensar que tanto el NC como el Put necesitan coordinar la información presumiblemente de gran componente límbico de los estriosomas con otra de tipo asociativo o sensorimotor de la matriz. Es decir, la integración de los distintos tipos de información nerviosa es necesaria independientemente de la complejidad de las funciones de las distintas regiones estriatales. En un estudio reciente, Saka y colaboradores (37) describieron que, al aplicar agonistas dopaminérgicos al estriado de la rata, los estriosos-

mas mostraban una mayor activación de genes de expresión temprana. Sin embargo, cuando se eliminaban las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas con la neurotoxina SP-PE35, el patrón de activación cambiaba y era mayor en la matriz. Este hecho demuestra la importancia de la localización específica de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas en la organización morfofuncional de los distintos compartimentos estriatales.

El grado de conocimiento que alcancemos acerca de la distribución de las interneuronas estriatales en el cerebro humano normal y patológico, así como su relación con respecto al compartimento estriosomal, puede ser un factor muy importante a la hora de interpretar el papel que juega el estriado en el conjunto de los ganglios basales y en las relaciones corticosubcorticales, y su implicación en procesos patológicos neurodegenerativos y psiquiátricos.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Clínica Universitaria (Universidad de Navarra), al Hospital de Navarra y al Hospital Ramón y Cajal de Madrid por la donación de las muestras biológicas utilizadas en este estudio, a los Drs. Silvano de las Heras y Luis Santamaría por su ayuda en la revisión del texto y en los estudios estereológicos, respectivamente, y a M<sup>a</sup> Ángeles Erdozain por su ayuda técnica con el procesamiento del tejido en el laboratorio. Este estudio ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFI2003-02909 y BFU2006-01189). JB ha sido financiado por beca de la Comunidad de Madrid (FPI-CAM) y LP tiene un contrato Ramón y Cajal del Ministerio de Educación y Ciencia.

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) KEMP, J.M. AND POWELL, T.P. (1971) The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 262: 383-401.
- (2) FOX, C.A.; ANDRADE, A.N.; SCHWYN, R.C. AND RAFOLS, J.A. (1971) The aspiny neurons and the glia in the primate striatum: a Golgi and electron microscopic study. *J. Hirnforsch.* 13: 341-362.

- (3) FOX, C.A.; ANDRADE, A.N.; HILLMAN, D.E. AND SCHWYN, R.C. (1971) The spiny neurons in the primate striatum: a Golgi and electron microscopic study. *J. Hirnforsch.* 13: 181-201.
- (4) DiFIGLIA, M.; PASIK, P. AND PASIK, T. (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 114: 245-256.
- (5) YELNIK, J.; FRANCOIS, C.; PERCHERON, G. AND TANDE, D. (1991) Morphological taxonomy of the neurons of the primate striatum. *J. Comp. Neurol.* 313: 273-294.
- (6) ROBERTS, R.C.; GAITHER, L.A.; PERETTI, F.J.; LAPIDUS, B. AND CHUTE, D.J. (1996) Synaptic organization of the human striatum: a postmortem ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* 374: 523-534.
- (7) GRAVELAND, G.A. AND DiFIGLIA, M. (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res.* 327: 307-311.
- (8) KOWALL, N.W.; FERRANTE, R.J.; BEAL, M.F.; RICHARDSON, E.P. JR.; SOFRONIEW, M.V. ET AL. (1987) Neuropeptide Y, somatostatin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. *Neuroscience.* 20: 817-828.
- (9) BERNÁCER, J.; PRENSA, L. AND GIMÉNEZ-AMAYA, J.M. (2005) Morphological features, distribution and compartmental organization of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced-diaphorase interneurons in the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 489: 311-327.
- (10) DiFIGLIA, M. (1987) Synaptic organization of cholinergic neurons in the monkey neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 255: 245-258.
- (11) PRENSA, L.; GIMÉNEZ-AMAYA, J.M. AND PARENT, A. (1998) Morphological features of neurons containing calcium-binding proteins in the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 390: 552-563.
- (12) CICCHETTI, F.; BEACH, T.G. AND PARENT, A. (1998) Chemical phenotype of calretinin interneurons in the human striatum. *Synapse.* 30: 284-297.
- (13) COWAN, R.L.; WILSON, C.J.; EMSON, P.C. AND HEIZMANN, C.W. (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 302: 197-205.
- (14) COSSETTE, M.; LÉVESQUE, D. AND PARENT, A. (2005) Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum. *Parkinsonism Relat. Disord.* 11: 277-286.
- (15) TANDE, D.; HOGLINGER, G.; DEBEIR, T.; FREUNDLIEB, N.; HIRSCH, E.C. ET AL. (2006) New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain.* 129: 1194-1200.
- (16) MAZLOOM, M. AND SMITH, Y. (2006) Synaptic microcircuitry of tyrosine hydroxylase-containing neurons and terminals in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys. *J. Comp. Neurol.* 495: 453-469.
- (17) BETARBET, R.; TURNER, R.; CHOCKKAN, V.; DELONG, M.R.; ALLERS, K.A. ET AL. (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J. Neurosci.* 17: 6761-6768.

- (18) GRAYBIEL, A.M. AND RAGSDALE, C.W. JR. (1978) Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5723-5726.
- (19) HOLT, D.J.; GRAYBIEL, A.M. AND SAPER, C.B. (1997) Neurochemical architecture of the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 384: 1-25.
- (20) PRENSA, L.; GIMÉNEZ-AMAYA, J.M. AND PARENT, A. (1999) Chemical heterogeneity of the striosomal compartment in the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 413: 603-618.
- (21) BERNACER, J.; PRENSA, L AND GIMENEZ-AMAYA, J.M. (2007) Chemical architecture of the posterior striatum in the human brain. *J Neural Transm.*
- (22) BERENDSE, H.W.; GALIS-DE GRAAF, Y. AND GROENEWEGEN, H.J. (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J. Comp. Neurol.* 316: 314-347.
- (23) FLAHERTY, A.W. AND GRAYBIEL, A.M. (1993) Two input systems for body representations in the primate striatal matrix: experimental evidence in the squirrel monkey. *J. Neurosci.* 13: 1120-1137.
- (24) PARTHASARATHY, H.B.; SCHALL, J.D. AND GRAYBIEL, A.M. (1992) Distributed but convergent ordering of corticostriatal projections: analysis of the frontal eye field and the supplementary eye field in the macaque monkey. *J. Neurosci.* 12: 4468-4488.
- (25) MAI, J.; ASSHEUER, J. AND PAXINOS, G. (1997) Atlas of the human brain. San Diego, California: Academic Press.
- (26) NOWINSKI, W.; BRYAN, R. AND RAGHAVAN, R. (1997) The electronic clinical brain atlas. Version 1.0. Three-dimensional navigation of the human brain. Stuttgart (Germany): Georg Thieme.
- (27) SCHALTENBRAND, G. AND WAHREN, W. (1977) Atlas for stereotaxy of the human brain. Stuttgart (Germany): Thieme.
- (28) CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; BERNARDI, G. AND CALABRESI, P. (1999) Permissive role of interneurons in corticostriatal synaptic plasticity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31: 1-5.
- (29) CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; PISANI, A. AND BERNARDI, G. (2000) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends. Neurosci.* 23: 120-126.
- (30) CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; MARFIA, G.A.; PISANI, A. ET AL. (2000) Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 61: 231-265.
- (31) PISANI, A.; BONSI, P.; PICCONI, B.; TOLU, M.; GIACOMINI, P. ET AL. (2001) Role of tonically-active neurons in the control of striatal function: cellular mechanisms and behavioral correlates. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 25: 211-230.
- (32) PISANI, A.; BONSI, P.; CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; BERNARDI, G. ET AL. (2003) Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 45: 45-56.
- (33) HOLT, D.J.; BACHUS, S.E.; HYDE, T.M., WITTIE, M.; HERMAN, M.M. ET AL. (2005) Reduced density of cholinergic interneurons in the ventral striatum in schizophrenia: an in situ hybridization study. *Biol. Psychiatry.* 58: 408-416.

- (34) HOLT, D.J.; HERMAN, M.M.; HYDE, T.M.; KLEINMAN, J.E.; SINTON, C.M. ET AL. (1999) Evidence for a deficit in cholinergic interneurons in the striatum in schizophrenia. *Neuroscience*. 94: 21-31.
- (35) CANNIZZARO, C.; TEL, B.C.; ROSE, S.; ZENG, B.Y. AND JENNER, P. (2003) Increased neuropeptide Y mRNA expression in striatum in Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 110: 169-176.
- (36) SAKA, E. AND GRAYBIEL, A.M. (2003) Pathophysiology of Tourette's syndrome: striatal pathways revisited. *Brain. Dev.* 25 Suppl 1: S15-19.
- (37) SAKA, E.; IADAROLA, M.; FITZGERALD, D.J. AND GRAYBIEL, A.M. (2002) Local circuit neurons in the striatum regulate neural and behavioral responses to dopaminergic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 9004-9009.
- (38) LAUER, M.; JOHANNES, S.; FRITZEN, S.; SENITZ, D.; RIEDERER, P. ET AL. (2005) Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients. *Neuropsychobiology*. 52: 111-117.
- (39) LEHERICY, S.; BARDINET, E.; TREMBLAY, L.; VAN DE MOORTELE, P.F.; POCHON, J.B. ET AL. (2006) Motor control in basal ganglia circuits using fMRI and brain atlas approaches. *Cereb Cortex*. 16: 149-161.
- (40) MIYACHI, S.; HIKOSAKA, O. AND LU, X. (2002) Differential activation of monkey striatal neurons in the early and late stages of procedural learning. *Exp. Brain Res.* 146: 122-126.