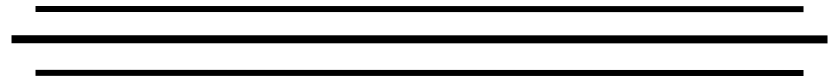


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

ANALISIS DE LOS ESTADOS DEL MICROCIRCUITO
NEOESTRIATAL EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

OMAR PEDRO JAIDAR BENAVIDES

DIRECTORES DE TESIS: DR. ARTURO HERNANDEZ CRUZ
DR. JOSE BARGAS DIAZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis Doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Arturo Hernández Cruz en conjunto con el Dr. José Bargas Díaz en el laboratorio BL-305 del Departamento de Neurociencia Cognitiva en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Arturo Hernandez Cruz Instituto de Fisiología Celular/División Neurociencias
 Dr. José Bargas Díaz Instituto de Fisiología Celular/División Neurociencias
 Dr. José Fernando Peña Ortega Instituto de Neurobiología

Se reconoce la colaboración del Dr. René Druker Colin, del Departamento de Neurociencias Cognitivas del Instituto de Fisiología Celular, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de conducta.

Se reconoce el apoyo técnico de Nicolas Jiménez Pérez, así como la asesoría técnica de la Dra. Claudia Rivera, jefa del bioterio del Instituto de Fisiología Celular y la asistencia de Xochitl Ayala y Adriana Becerril en el manejo y reproducción de los animales transgénicos.

El proyecto fue apoyado parcialmente por el programa IMPULSA 03. Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr Ranulfo Romo Trujillo	Instituto de Fisiología Celular
Secretario	Dr Arturo Hernández Cruz	Instituto de Fisiología Celular
Vocal	Dra Elvira Galarraga Palacio	Instituto de Fisiología Celular
Vocal	Dra Elizabeth Hernández Echeagaray	Unidad de Biomedicina, FES-I
Vocal	Dr Víctor de Lafuente Flores	Instituto de Neurobiología

ÍNDICE

Abreviaciones	1
Resumen	3
Summary	4
1. Introducción	5
1.1. Ganglios Basales.....	6
1.1.1. Microcircuito Neoestriatal.....	9
1.1.2. Neuronas espinosas medianas.....	9
1.1.2.1. Participación de la vía directa e indirecta dentro de los GB.....	11
1.1.3. Interneuronas “clásicas”.....	12
1.1.3.1. Interneuronas gigantes colinérgicas.....	12
1.1.3.2. Interneuronas SOM/NOS/NPY+.....	13
1.1.3.3. Interneuronas PV+.....	14
1.1.3.4. Interneuronas CR+.....	16
1.1.4. Interneuronas “no clásicas”.....	16
1.1.4.1. Interneuronas TH+.....	17
1.2. Actividad del microcircuito Neoestriatal.....	20
1.2.1. Estados up y down.....	20
1.2.2. Potenciales en meseta.....	21
1.2.3. Dinámica de red neoestriatal.....	22
1.3. La enfermedad de Parkinson.....	24

1.3.1. Tratamientos de la enfermedad de Parkinson.....	27
1.4. Depleción dopaminérgica en los Ganglios Basales.....	29
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
3. OBJETIVO.....	33
3.1. Objetivos particulares.....	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. Métodos.....	35
5.1. Animales.....	35
5.2. Modelo en rata de la enfermedad de Parkinson.....	35
5.3. Inmunohistoquímica.....	38
5.4. Obtención de rebanadas de tejido cerebral para registros <i>in vitro</i>	39
5.5. Imagenología de calcio.....	40
5.6. Fármacos.....	42
5.7. Electrofisiología.....	43
5.8. Análisis de imágenes.....	44
5.9. Análisis estadístico.....	45
6. Resultados.....	49
6.1. Registros ópticos y electrofisiológicos de las neuronas estriatales cargadas con fluo-4.....	49
6.2. Dinámica de red neostriatal en el microcircuito depletado de dopamina.....	52
6.3. Visualización de estados funcionales durante la dinámica de red en rebanadas sin dopamina.....	56

6.4.	Mecanismos sinápticos que subyacen los estados de red en ausencia de dopamina.....	60
6.5.	Participación de las NEMs de la vía directa en la dinámica de red en rebanadas sin dopamina.....	69
7.	Discusión.....	75
7.1.	Actividad de red local parkinsónica.....	78
7.2.	Mecanismos que subyacen al comportamiento anormal del neostriado parkinsónico.....	80
7.3.	Participación de la vía directa en el circuito neostriatal Parkinsónico.....	82
7.4.	Relevancia fisiológica.....	83
8.	Referencias.....	85
9.	Apéndice	
9.1.	Publicación durante el doctorado.....	96

ABREVIACIONES

6-OHDA	6-hidroxydopamina
APV	acido (2R)-amino-5-fosfonovalerico
CCK	colesistoquinina
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
DA	dopamina
DAB	3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorito
ECP	estimulación cerebral profunda
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ENC	encefalina
EP	enfermedad de Parkinson
FRPM	formación reticular pontomedular
FS	fast spiking
GB	ganglios basales
GPe	globo pálido externo
GPi	globo pálido interno
L-DOPA	levodopa, L-dihidroxifenilalanina
LLE	locally linear embedding
LTS	low threshold spiking
MPTP	1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NE	neoestriado
NEM	neurona espinosa mediana
NMDA	N-Metil-D-aspartato
NOS	óxido nítrico sintetasa
NPY	neuropeptido Y
NST	núcleo subtalámico
PBS	buffer de fosfato salina
PPN	núcleo pedunculopontino
PV	parvoalbúmina
RLM	región locomotora mesencefálica
SNc	sustancia <i>nigra pars compacta</i>
SNr	sustancia <i>nigra reticulata</i>
SOM	somastostatina
TAN	tonic active neuron
TH	tirosina hidroxilasa
TOC	trastornos obsesivos compulsivos
Tx	triton X-100
VIP	polipeptido vasoactivo intestinal

RESUMEN

En condiciones fisiológicas, la sincronización neuronal en los circuitos de los ganglios basales tiene un papel fundamental en la codificación de movimientos, el almacenaje de memorias de procedimiento y la formación de hábitos. La falta de dopamina en el Parkinsonismo genera una sincronización anormal en las asas cortico-ganglio basales ocasionando diversas fallas motoras. Sin embargo, existe poca información de la dinámica del microcircuito neostriatal durante la sincronización anormal generada por el Parkinsonismo. Para describir las alteraciones en la dinámica de red neostriatal después de eliminar las aferentes dopaminérgicas en un modelo en rata de la enfermedad de Parkinson, se utilizaron registros electrofisiológicos de célula completa, imagenología de calcio y métodos analíticos para poder registrar docenas de células de forma simultánea. La dinámica observada dentro del circuito reveló que además de un incremento en la actividad basal de las neuronas, es frecuente observar periodos de sincronización espontánea. Con el uso de una técnica de reducción dimensional de la dinámica de red vectorizada se encontró que la sincronización genera un estado dominante en la red que recluta a la mayoría de las neuronas espontáneamente activas. La sincronización anormal puede ser prácticamente eliminada por el bloqueo de los receptores glutamatérgicos, mientras que el uso de antagonistas GABAérgicos facilita el enganche del ensamble neuronal neostriatal en el estado dominante. Por último, la activación de un receptor dopaminérgico modificó la dinámica de red liberando a las neuronas del estado dominante. La sincronización anómala y el enganche a un estado dominante pueden representar los mecanismos básicos, a nivel microcircuito, que subyacen a los problemas motores.

SUMMARY

Neuronal synchronization in basal ganglia circuits plays a key role in the encoding of movement, procedural memory storage and habit formation. Striatal dopamine depletion during Parkinsonism causes abnormal synchronization in cortico-basal ganglia loops resulting in motor dysfunction. However, the dynamics of the striatal microcircuit underlying abnormal synchronization in Parkinsonism is poorly understood. Here we used targeted whole cell recordings, calcium imaging allowing the recording from dozens of cells simultaneously and, to describe the striking alterations in network dynamics that the striatal microcircuit undergoes following DA depletion in a rat model of Parkinson disease: In addition to a significant enhancement of basal neuronal activity frequent periods of spontaneous synchronization were observed. Multidimensional reduction techniques of vectorized network dynamics revealed that increased synchronization resulted from a dominant network state that absorbed most spontaneously active cells. Abnormal synchronous activity can be virtually abolished by glutamatergic antagonists, while blockade of GABAergic transmission facilitates the engagement of striatal cell assemblies in the dominant state. Finally, a dopaminergic receptor agonist was capable of uncoupling neurons from the dominant state. Abnormal synchronization and “locking” into a dominant state may represent the basic neuronal mechanism that underlies movement disorders at the microcircuit level.

1. INTRODUCCIÓN

La deprivación ya sea de forma experimental o patológica a los ganglios basales (GB) de sus aferentes dopaminérgicas cambia en muchos sentidos el comportamiento de todos sus circuitos, neuronas y sinapsis. En ausencia de dopamina (DA) se presentan patrones oscilatorios patológicos en el neocórtex (NE), el glóbulo pálido parte externa (GPe) e interna (GPi), núcleo subtalámico (NST) y la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) (Blandini *et al.*, 2000). Estos patrones patológicos son expresados en la corteza como una actividad coherente a la frecuencia tipo β incrementada (Costa *et al.*, 2006; Fuentes *et al.*, 2009; Kozlov *et al.*, 2009; Walters y Bergstrom, 2009), que se ve reflejada en la inhabilidad de seleccionar, cambiar o iniciar acciones motoras (Magill *et al.*, 2001; Ni *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2006). A nivel de comportamiento, el mal funcionamiento de los diferentes microcircuitos de los GB es acompañado por síntomas como bradicinesia, asinesia, temblores y rigidez muscular (Brown, 2007; Hammond *et al.*, 2007; Galvan y Wichmann, 2008; Fuentes *et al.*, 2009; Walters y Bergstrom, 2009; Zold *et al.*, 2009).

La pregunta principal que pretendemos resolver en este trabajo es básicamente entender cuáles son las manifestaciones de estos cambios a nivel del microcircuito neocórtex. Para responderla, se compara la actividad neuronal del microcircuito neocórtex intacto y después de eliminar experimentalmente sus aferencias dopaminérgicas. Los cambios observados son fundamentales para entender el funcionamiento de los GB durante el parkinsonismo.

1.1. Ganglios Basales

Los GB son un conjunto de núcleos subcorticales ubicados en la base del prosencéfalo en mamíferos, aves, reptiles y peces pulmonados. Cuando estos núcleos son activados, su actividad neuronal correlacionada se distribuye por diferentes núcleos influyendo en el control motor (Prescott et al., 2003) y regulando conductas voluntarias e involuntarias así como el paso de unas a otras (Barnes *et al.*, 2005; Harris, 2005; DeLong y Wichmann, 2007; Graybiel, 2008; Uhlhaas *et al.*, 2009). Los ganglios basales también tienen un papel fundamental en el aprendizaje y ejecución de memorias de procedimientos y hábitos (Graybiel, 2000). Las patologías de los ganglios basales generan diversos problemas motores: desde problemas hipocinéticos como la enfermedad de Parkinson, hasta hipercinéticos como la enfermedad de Huntington (Mink, 2003). Del mismo modo, la actividad metabólica anómala dentro de estos núcleos ha sido relacionada con desordenes neuropsiquiátricos como trastornos obsesivos compulsivos (TOC) o el síndrome de Tourette (Albin y Mink, 2006).

Los ganglios basales se conforman por: un grupo neuronal de entrada, el neostriado (NE); núcleos intermedios, la sustancia *nigra pars compacta* (SNc), el globo pálido externo (GPe) y el núcleo subtalámico (NST); por último, núcleos de salida, el globo pálido interno (GPi) y la *sustancia nigra pars reticulata* (SNr) (Wichmann 1999, Bolam et al, 2000). Todos los ganglios basales reciben aferencias dopaminérgicas de la SNc, pero es en el NE donde se concentra la mayor densidad. La dopamina (DA) es

fundamental para el buen funcionamiento del NE y el resto de los ganglios basales (Bjorklund y Dunnett, 2007).

El NE, por su localización anatómica, también recibe entradas glutamatérgicas de toda la corteza cerebral, principalmente de las cortezas sensorial, motora y de asociación (Bolam *et al.*, 2000), y de los núcleos intralaminares del tálamo (Doig *et al.*, 2010). La actividad correlacionada de estas estructuras es integrada y procesada por el NE y eventualmente transmitida por dos vías principales: la vía “directa” donde el estriado manda sus proyecciones a los núcleos de salida, GPi y SNr; y la vía “indirecta” proyectando hacia el GPe. El GPe proyecta a su vez hacia las neuronas glutamatérgicas del NST y este a los núcleos de salida (Albin *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1998; Gertler *et al.*, 2008). Los núcleos de salida de los GB, el GPi y la SNr tienen proyecciones GABAérgicas inhibitorias hacia distintas áreas subcorticales como el circuito tálamo-cortical, el colículo superior o bien hacia el tallo cerebral, específicamente hacia el núcleo pedunculopontino (PPN) y la región locomotora mesencefálica (RLM) (Beckstead *et al.*, 1979; Moriizumi *et al.*, 1988; Spann y Grofova, 1991). La actividad tónica de estos núcleos de salida, que disparan potenciales de acción constantemente con una frecuencia entre 20 y 50 Hz, mantiene inhibidos a estos circuitos. El GPi y la SNr tienen una representación topográfica de todos los músculos del cuerpo. La constante actividad de estos núcleos mantiene inhibidos a grandes grupos musculares oponiéndose a la activación muscular generalizada creada por la formación reticular del tallo cerebral. Para efectuar algún movimiento voluntario es necesario inhibir de forma selectiva a algunas neuronas de los núcleos de salida y

así eliminar temporalmente su actividad tónica y por lo tanto activar un grupo muscular específico (Figura 1) (Alexander *et al.*, 1990; Wilson, 1993; Mink, 2003).

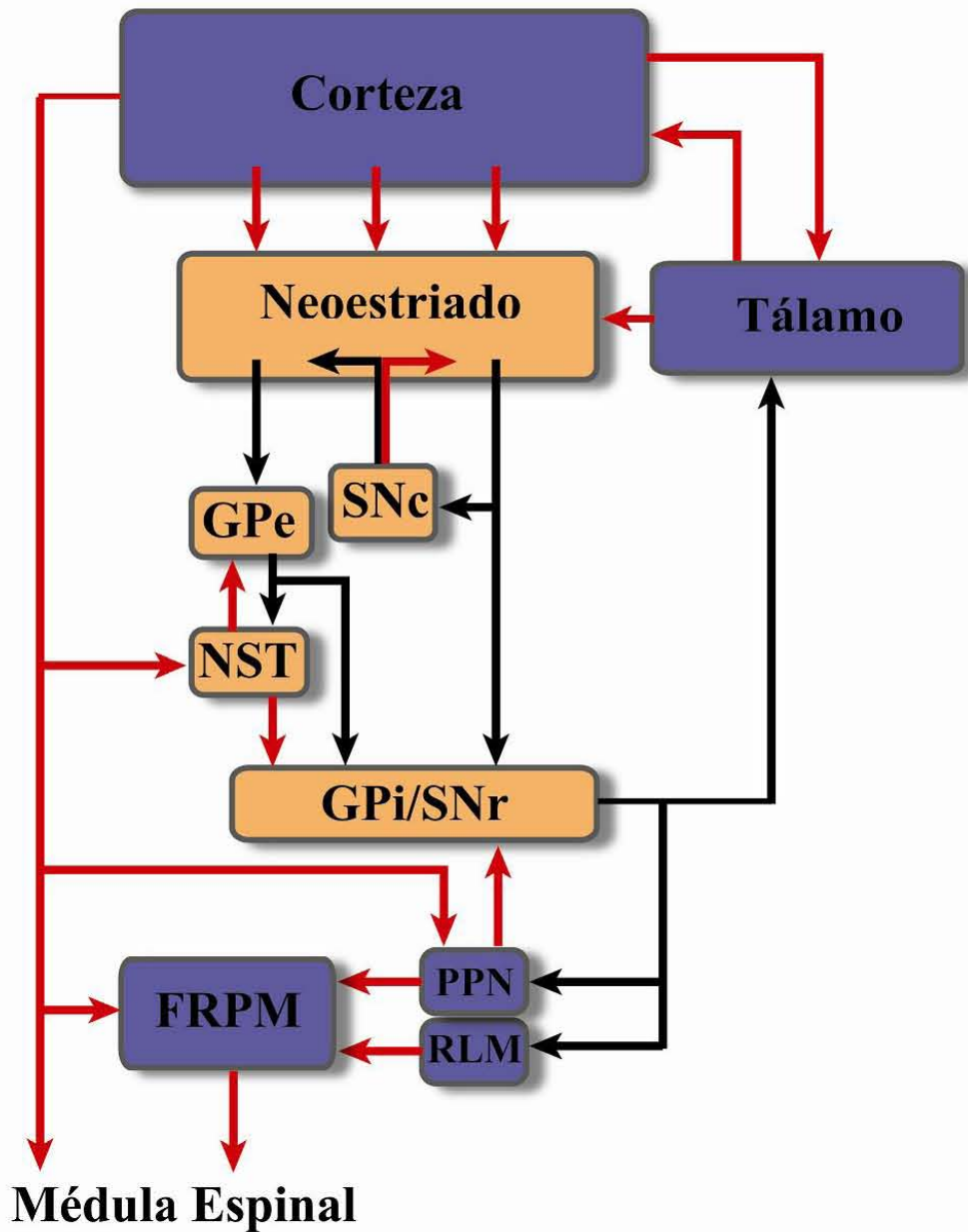


Figura 1. Diagrama simplificado de los GB donde se muestran sus principales componentes (rectángulos anaranjados: neostriado, globo pálido externo e interno, *sustancia nigra pars reticulata* y *compacta* y núcleo subtalámico) así como las distintas estructuras de las que recibe y envía información (rectángulos azules: corteza, tálamo, pedunculopontino, región locomotora mesencefálica y formación reticular pontomedular); las flechas rojas representan sinapsis excitatorias y las negras inhibitorias.

En resumen, podríamos decir que una de las funciones del NE es integrar información y “dejar” salir los movimientos al desinhibir distintas asas subcorticales.

1.2. Microcircuito Neostriatal

1.2.1. Neuronas espinosas medianas

El NE, el núcleo de mayor tamaño de los GB, es el encargado de integrar la información proveniente de la corteza, tálamo, aferentes dopaminérgicas de la SNc y otros núcleos (Smith *et al.*, 1994; Parr-Brownlie *et al.*, 2009). Los elementos básicos que conforman el microcircuito neostriatal son las neuronas espinosas medianas (NEMs) y una población de interneuronas (Kreitzer, 2009). Las NEMs de naturaleza GABAérgica conforman cerca del 95% de la población neuronal del NE en roedores (Gerfen and Wilson, 1996), disminuyendo su proporción en primates (Graveland y DiFiglia, 1985). Las NEMs tienen un sello electrofisiológico característico y se encuentran por lo general en un estado de reposo (en ausencia de cualquier entrada sináptica de otros núcleos) con un potencial de membrana hiperpolarizado (ca., -80 mV), una resistencia de entrada relativamente baja (ca., 100 MΩ en neuronas de animales adultos) (Bargas *et al.*, 1988; Reyes *et al.*, 1998). Después de una despolarización sostenida, este tipo de neuronas disparan tónicamente debido a una corriente persistente de potasio (K⁺) activada por voltaje (Galarraga *et al.*, 1989; Nisenbaum y Wilson, 1995; Bargas *et al.*, 1999), presentando una latencia en el primer disparo generada por corrientes inactivantes de K⁺ (Surmeier *et al.*, 1988; Bargas *et al.*, 1989), un rectificador entrante (Galarraga *et al.*, 1994; Nisenbaum y Wilson, 1995) y un intervalo inter espiga parcialmente gobernado por corrientes de K⁺ dependientes de calcio (Ca²⁺) dependientes (Pineda *et al.*, 1992; Bargas *et al.*, 1999), junto con otras

corrientes salientes (Nisenbaum y Wilson, 1995; Shen *et al.*, 2005). La información integrada y procesada por el NE es transmitida al resto de los GB a través de dos subpoblaciones de las neuronales: las NEMs de la vía directa y de la vía indirecta, las cuales reciben este nombre por proyectar sus axones en forma mono sináptica o polisináptica a los núcleos de salida (Gerfen y Wilson, 1996). Las neuronas de la vía directa extienden sus proyecciones axónicas a los núcleos de salida de los GB (GPi y SNr) y las neuronas de la vía indirecta solo extienden sus proyecciones axónicas hacia el GPe. Éste proyecta al NST, el cual a su vez lo hace a los núcleos de salida. Formándose así un circuito multisináptico entre el estriado y los núcleos de salida.

Diferenciar a las dos poblaciones de NEMs (de la vía directa e indirecta) no es tarea fácil. Como ya vimos, en registros electrofisiológicos ambas poblaciones son iguales y anatómicamente similares. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que existe una dicotomía en la anatomía somatodendrítica. En los roedores se ha descrito que las neuronas de la vía indirecta poseen un árbol dendrítico de tamaño considerablemente menor que el de las neuronas de la vía directa. La diferencia radica en que las NEMs de la vía indirecta tienen en promedio de una a dos dendritas primarias menos que las NEMs de la vía directa (Gertler *et al.*, 2008; Fujiyama *et al.*, 2011), generando una diferencia en el área total de superficie celular. Suponiendo que estas mantienen la misma proporción de espinas dendríticas (que conforman la mitad de la superficie neuronal total), la diferencia en el tamaño del árbol dendrítico podría tener repercusiones en la excitabilidad celular a nivel del microcircuito (Gertler *et al.*, 2008; Kreitzer y Malenka, 2008; Lobo *et al.*, 2010).

Otra dicotomía fue encontrada en la década de los 80's donde se observó que

las NEMs de la vía directa expresan grandes cantidades de sustancia P, mientras que en la de la vía indirecta se encuentra gran concentración de encefalina (ENC) (Young *et al.*, 1986). Aunado a esto, también se encontraron diferencias en la distribución de receptores dopaminérgicos. Aunque en el NE están presentes los cinco receptores a DA (D₁-D₅), son los receptores D₁ y D₂, por mucho, los más abundantes y estos se encuentran segregados en las NEMs de la vía directa e indirecta. Los receptores D₁ son expresados por las NEMs de la vía directa y los D₂ por las NEMs de la vía indirecta (Gerfen *et al.*, 1990; Surmeier *et al.*, 2009).

1.2.1.1. Participación de la vía directa e indirecta dentro de los ganglios basales

De acuerdo con el modelo clásico del funcionamiento de los ganglios basales (Albin *et al.*, 1989), los movimientos son generados durante las pausas en la actividad tónica de los núcleos de salida de los GB. En este modelo la inhibición de los núcleos de salida se genera por la activación de las NEMs de la vía directa (Chevalier *et al.*, 1985; Deniau y Chevalier, 1985) y la supresión de movimientos se le ha asignado a la vía indirecta. ¿Cómo sucede esto? Esta vía al igual que la directa contiene dos grupos de neuronas inhibitorias en serie, las NEMs de esta vía, al recibir un comando cortical, mandan sus proyecciones GABAérgicas hacia el GPe, núcleo que continuamente está inhibiendo al NST. De esta forma, la función principal de las NEMs de la vía indirecta es aumentar la actividad del NST. El NST tiene un disparo tónico glutamatérgico, al desinhibirse activa a los núcleos de salida (SNr/GPi) de los GB (Hammond *et al.*, 1978; Alexander y Crutcher, 1990; Rinvik y Ottersen, 1993; Smith *et al.*, 1998). La activación de la vía indirecta aumenta la actividad de los núcleos de salida produciendo una

sobreinhibición de las diferentes asas motoras impidiendo la ejecución de movimientos. La funcionalidad de estas dos vías había sido asumida por medio de registros electrofisiológicos en donde el aumento o decremento de la actividad en los núcleos de salida había sido correlacionado con comandos motores. Pero no fue hasta que en estudios recientes se pudieron comprobar los principios de este modelo con la activación específica de las neuronas de una u otra vía por medio del uso de optogenética (Hikida *et al.*, 2010; Kravitz *et al.*, 2010).

1.2.2. Interneuronas “clásicas”

Las interneuronas son la otra clase neuronal presente en el NE. Comprenden aproximadamente entre 5-10% de la población total neuronal. Estas a su vez se pueden dividir en dos categorías: las interneuronas gigantes colinérgicas (0.5-1%) y los diferentes subtipos de interneuronas GABAérgicas (3-4%).

1.2.2.1. Interneuronas gigantes colinérgicas

Las interneuronas gigantes colinérgicas, también llamadas neuronas tónicamente activas (TANs, por sus siglas en inglés tonic active neurons), tienen un gran cuerpo celular que miden entre 20 y 50 μm de diámetro. De éste surgen de dos a cuatro troncos dendríticos primarios que se expanden en varias dendritas de orden superior por varios milímetros. El axón contiene muchas ramificaciones y forma una arborización densa que abarca un área mayor que la de las dendritas (Bennet y Wilson, 2000). Estas interneuronas inervan a las NEMs y a las interneuronas GABAérgicas inmunoreactivas a parvalbúmina (descritas más adelante) (Koós y Tepper, 2002). Las TANs reciben aferentes excitatorias que provienen principalmente del tálamo (Lapper *et*

al., 1992) y en menor número de la corteza (Thomas *et al.*, 2000) y aferentes GABAérgicas provenientes de las NEMs (Bolam *et al.*, 1986).

En registros electrofisiológicos, estas neuronas pueden ser distinguidas por su potencial de reposo despolarizado y su alta resistencia de entrada (Kawaguchi *et al.*, 1995). El disparo tónico característico de estas neuronas esta dado por la expresión de corrientes de sodio y corrientes catiónicas activadas por hiperpolarización (Bennett *et al.*, 2000). La frecuencia de disparo (2-10Hz) está limitada por una hiperpolarización subsecuente al disparo generada por la activación de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (Wilson *et al.*, 1990; Kawaguchi *et al.*, 1995; Wilson y Goldberg, 2006).

1.2.2.2. Interneuronas SOM/NOS/NPY+

Dentro de las interneuronas GABAérgicas, encontramos a las LTS (por sus siglas en ingles low threshold spiking) que constituyen menos del 1% de su población neuronal (Rymar *et al.*, 2004). Las LTS expresan somatostatina (SOM), neuropeptido Y (NPY) y oxido nítrico sintetasa (NOS) (Vincent y Johansson, 1983; Chesselet y Graybiel, 1986) el cual juega un papel importante en la plasticidad de largo plazo (Calabresi *et al.*, 1999). Éstas interneuronas tienen una estructura de tipo bipolar, comparadas con otras interneuronas GABAérgicas sus dendritas son menos ramificadas y más lisas. La arborización axonal es apenas mayor que la dendrítica. Las LTS reciben aferentes glutamatérgicas de la corteza y del tálamo, así como GABAérgicas provenientes de las interneuronas FS y del globo pálido (Bolam *et al.*, 2000). Estas interneuronas establecen sinapsis con las NEMs (Vuillet *et al.*, 1989; Sidibe y Smith, 1999).

La característica electrofisiológica principal de estas interneuronas es la

presencia de potenciales tipo meseta y espigas de calcio de bajo umbral (de ahí su nombre LTS, “low threshold spiking”) y una despolarización sensible al cobalto que es más evidente en el cese de pulsos hiperpolarizantes (“off-rebound excitation”). Estas neuronas presentan una alta resistencia de entrada y un potencial de reposo relativamente despolarizado (Kawaguchi, 1993).

1.2.2.3. Interneuronas PV+

Las interneuronas inmunoreactivas a parvoalbúmina (PV+) fueron reportadas por Gerfen y colaboradores (1985), donde se demostró la existencia de unas interneuronas que no contaban con espinas dendríticas, que eran diferentes a las colinérgicas y las LTS (reactivas a somatostatina) descritas con anterioridad y cuya abundancia es mayor en el NE dorsal que en el medial, sugiriendo que juegan un papel importante en la integración sensomotora.

Estas neuronas de naturaleza GABAérgica las constituyen el 1% de la población neuronal del NE, por lo general han sido categorizadas de tamaño medio con un soma de 10 a 30 μm (Kawaguchi, 1993; Rymar *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha reportado la existencia de una variante que puede llegar a tener un soma de tamaño similar a las interneuronas gigantes colinérgicas (50 μm) (Bennett y Bolam, 1994). En estudios donde se marcaron poblaciones de neuronas PV+ en el NE se describió la existencia de dos poblaciones morfológicamente distintas: una población con un soma mediano, un campo dendrítico y axónico menor y otras con un soma mayor, así como dendritas y axones que abarcan mayor distancia. Esto podría sugerir subpoblaciones dentro de este tipo neuronal (Kawaguchi, 1993).

Las interneuronas PV+ tienen dendritas lisas en las proximidades del soma y varicosidades en las zonas distales (Kawaguchi, 1993; Kita, 1993). Muestran una arborización axonal densa, con un volumen mayor que el volumen de su arborización dendrítica, además hacen contacto sináptico sobre los somas y dendritas proximales de las NEMs. Dentro del NE estas interneuronas reciben aferencias glutamatérgicas mayoritariamente de la corteza y en menor número del tálamo (Kita, 1993), aferentes colinérgicas de las TANs (Chang y Kita, 1992) y aferentes GABAérgicas de las neuronas del GP (Bevan *et al.*, 1998). Las proyecciones del GP hacia estas interneuronas disminuyen su tasa de disparo durante rutinas de discriminación simple, coincidiendo con el aumento de disparo de estas interneuronas (Gage *et al.*, 2010).

Su fenotipo electrofisiológico característico consiste en tener una frecuencia de disparo que puede llegar hasta 400 Hz. Por lo anterior, esta neurona es comúnmente denominada de disparo rápido (FS, "fast spiking"). Las FS tienen una baja resistencia de entrada similar a las NEMs (50-150 M Ω), pero con una rectificación entrante menor. Por lo general, en registros *in vivo*, esta neurona se encuentra hiperpolarizada y casi no presenta disparos espontáneos (Kita, 1993) pero a diferencia de las NEMs no necesita de una fuerte entrada sincrónica de la corteza para disparar. Esto está dado por el abundante número de contactos sinápticos de aferentes glutamatérgicos y colinérgicos individuales (Ramanathan *et al.*, 2002).

Las FS juegan un fuerte papel inhibitorio sobre las NEMs. Se sabe que una NEM recibe sinapsis inhibitorias de 4-27 interneuronas FS, donde cada una tiene de 135-541 contactos sinápticos (Koos y Tepper, 1999). También es interesante resaltar que presentan uniones comunicantes permitiendo un acople eléctrico entre ellas. De esta

forma las FS tienen un papel fundamental en el control global sobre la actividad de las neuronas principales del NE (Kita *et al.*, 1990; Koos y Tepper, 1999). Gracias a esto, modular la actividad de las FS ha sido objeto de estudio en los últimos años.

1.2.2.4. Interneuronas CR+

Por último, dentro de los tres tipos de neuronas clásicas GABAérgicas del NE, encontramos a las interneuronas que expresan calretinina, una proteína amortiguadora de calcio. Esta interneurona es por mucho la menos estudiada. Aunque su presencia en el NE es apenas menor que las interneuronas FS (0.5%) (Rymar *et al.*, 2004), lo único que se sabe de esta interneurona está limitado a estudios inmunológico ya que nunca se ha podido tener registros electrofisiológicos de ella. Dentro de su anatomía estas neuronas poseen un soma de tamaño medio, 12-20 μ m de diámetro y poseen pocas ramificaciones dendríticas lisas (Bennett y Bolam, 1993).

1.2.3. Interneuronas “no clásicas”

Además de las interneuronas anteriormente mencionadas, se han descrito diferentes neuronas en la población del NE, denominadas aquí como “no clásicas”. Un pequeño número de neuronas que expresan colesistoquinina (CCK) y polipeptido vasoactivo intestinal (VIP, por sus siglas en inglés vasoactive intestinal polypeptide) fueron descritas en el NE de ratas (Takagi *et al.*, 1984). Ambas interneuronas tienen un soma entre 10-20 μ m y de 3-5 dendritas principales. Hasta la fecha nada se sabe de la función de estas neuronas dentro del NE.

Otras neuronas descritas en el NE son las interneuronas que expresan tirosina hidroxilasa (TH+). Poco se sabía de estas interneuronas hasta que gracias a la

existencia y variabilidad de animales transgénicos elaborados para expresar la proteína EGFP (enhanced green fluorescent protein) citoplásmica bajo el control de factores transcripcionales específicos (Gong *et al.*, 2003), facilitó la localización y estudio de neuronas de subtipos específicos. Gracias a esto se encontraron y caracterizaron, morfológica y electrofisiológicamente, nuevos subtipos de interneuronas GABAérgicas estriatales TH⁺ (Tepper *et al.*, 2010).

1.2.3.1. Interneuronas TH⁺

La presencia y cantidad de interneuronas TH⁺ fue descrita desde finales de los 80's (Dubach *et al.*, 1987; Tashiro *et al.*, 1989), sin embargo, su caracterización morfológica y electrofisiológica no fue posible en esa época debido a su escaso número en el estriado. Gracias a la utilización de estos animales recientemente fue posible visualizar y generar registros electrofisiológicos y anatómicos en neuronas estriatales EGFP-TH⁺ (Ibáñez-Sandoval *et al.*, 2010). Las neuronas TH⁺ exhiben un soma mediano de ~16µm de diámetro, su árbol dendrítico proyecta de dos a cuatro dendritas primarias lisas. En registros electrofisiológicos, las neuronas EGFP-TH⁺ mostraron una heterogeneidad en la población en donde se encontraron cuatro subpoblaciones distintas denominadas TH de tipo I a IV. La interneurona TH⁺ con más frecuencia encontrada fue la tipo I (60%) seguida de la tipo IV (21%), tipo II (13%) y finalmente la tipo III (6%).

Las neuronas tipo I presentan una resistencia de entrada alta (346-1500 MΩ), se caracterizan por su inhabilidad de mantener un disparo continuo después de una despolarización por inyección de corriente y la generación de una despolarización tipo meseta (descritos más adelante) de larga duración generada por una corriente de Ca²⁺

tipo L.

En contraste, las tipo II tienen una resistencia de entrada menor (234-758 M Ω). Estas neuronas al inyectarles corriente presentan ráfagas de disparos rápidos entre 137 y 265 Hz y no tienen una despolarización tipo meseta.

Las neuronas tipo III pueden distinguirse por presentar un potencial más negativo que los otros subtipos (-89 mV) y la más baja resistencia de entrada (150-205 M Ω) debida a una fuerte rectificación entrante activada a potenciales más negativos que -80mV, al igual que las neuronas tipo I, las tipo III son incapaces de mantener un disparo continuo en respuesta a una inyección de corriente larga, pero a diferencia de la tipo I es necesaria menos corriente para inducir disparos. Estas neuronas también presentan potenciales tipo meseta.

Por último, la neurona tipo IV tiene una alta resistencia de entrada de valor similar a las neuronas tipo I y II (235-821M Ω) pero a diferencia de esas neuronas la tipo IV presenta una espiga de bajo umbral (LTS) que puede ser activada por despolarización o por rebote desde una inyección de corriente hiperpolarizante. Esta corriente LTS está acompañada por una ráfaga corta de potenciales de acción de 300Hz (Ibáñez-Sandoval *et al.*, 2010). Esta neurona tiene un sello electrofisiológico muy similar a la interneurona clásica antes descrita: la LTS.

Ibáñez-Sandoval y col. mostraron que al menos las neuronas tipo I reciben aferentes glutamatérgicas de la corteza y aferentes inhibitorias intraestriatales aún no definidas. Resulta interesante que las NEMs tengan contactos inhibitorios sobre las neuronas TH+ tipo I y III, siendo estos los únicos contactos de estas neuronas hacia

otro tipo neuronal que no sean las NEMs. En cuanto a las eferentes, las neuronas del tipo I-III hacen contactos GABAérgicos sobre las NEMs (Cossette *et al.*, 2005; Ibáñez-Sandoval *et al.*, 2010).

Hasta la fecha, estos componentes y conexiones básicas son los que conforman al microcircuito neostriatal (Figura 2). Pero, ¿cómo se integra la información?, ¿cómo se almacenan memorias motoras? o ¿cómo se cambia de una conducta motora a otra? Para poder responder estas preguntas es necesario estudiar no sólo la estructura, sino la dinámica del microcircuito NE en el tiempo.

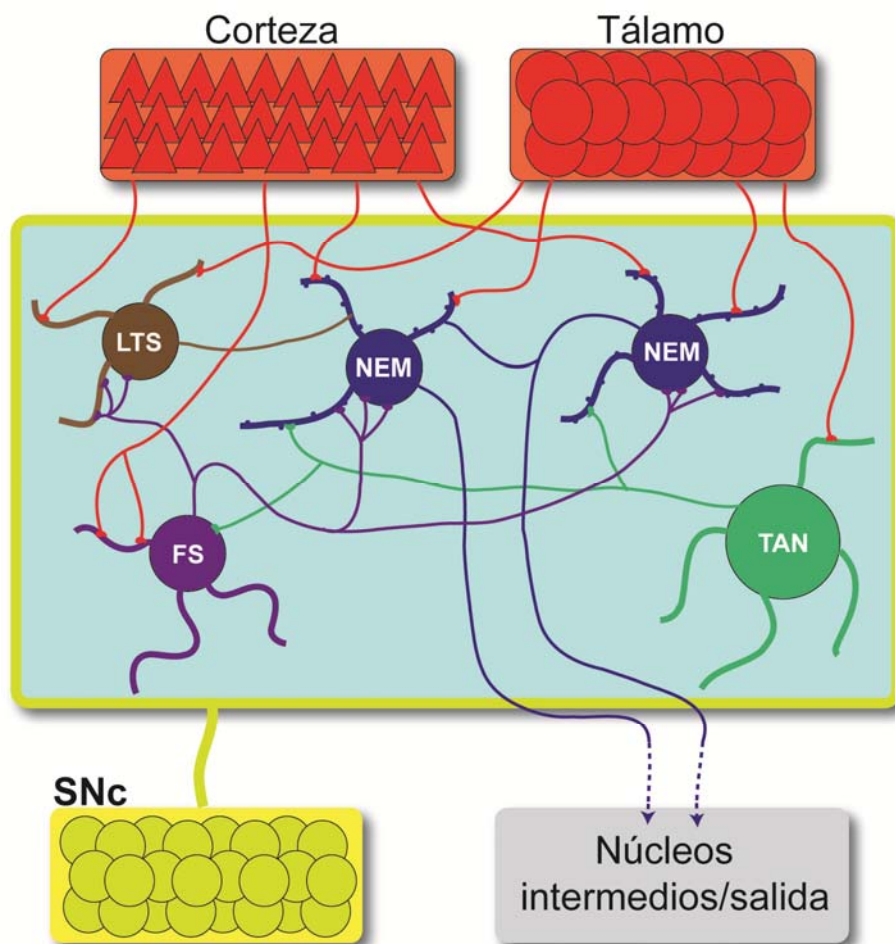


Figura 2. Diagrama modificado del microcircuito neoestriatal canónico (modificado de Tepper *et al.*, 2004) donde se muestran los principales tipos neuronales del circuito (cuadro azul; neurona espinosa mediana, tonic active neuron, fast spiking y low threshold spiking), sus aferentes (cuadros anaranjados: corteza y talamo, cuadro amarillo: *substancia nigra pars compacta*) y sus aferentes (cuadro gris).

1.3. Actividad del microcircuito Neoestriatal

Como ya se mencionó antes, el NE está conformado en su mayoría por neuronas de naturaleza GABAérgica, siendo las NEMs por mucho las neuronas más abundantes. Se sabe que estas neuronas en condiciones basales (cuando el sujeto no ha iniciado un comportamiento motor) casi no presentan potenciales de acción (Crutcher y DeLong, 1984; Kimura, 1992; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2008; Vautrelle *et al.*, 2009), esto se debe a que poseen corrientes de K⁺ rectificadoras entrantes y activadas por despolarización (Bargas *et al.*, 1989; Galarraga *et al.*, 1994; Nisenbaum y Wilson, 1995; Tepper *et al.*, 2004). Por la poca actividad espontánea de estas neuronas, este núcleo es clasificado como un núcleo cuasi “silente”; característica que difiere notoriamente con el resto de los GB cuyas neuronas muestran disparos continuos (e.g., Nakanishi *et al.*, 1987; Kita y Kitai, 1991; Ibanez-Sandoval *et al.*, 2007). El NE sale de este estado silente cuando es activado por la corteza, o por el tálamo y una vez que las neuronas llevan a cabo su función vuelven a su estado silente basal (Brown y Hestrin, 2009). También es posible activar farmacológicamente al estriado por la adición de NMDA (N-Metil-D-aspartato), agonista de receptores glutamatérgicos, haciendo que grupos de NEMs empiecen a disparar en una forma persistente y recurrente (Vergara *et al.*, 2003; Mahon *et al.*, 2006; Vautrelle *et al.*, 2009).

1.3.1. Estados up y down

El disparo de las NEMs se caracteriza por tener transiciones de potencial de membrana prolongados denominados estados “up y down” (Wilson y Kawaguchi, 1996), estos estados son generados tanto por sus propiedades intrínsecas de membrana como de las entradas excitatorias del tálamo y corteza. El estado down se caracteriza por ser un estado inactivo cercano del potencial de reposo y el estado up por ser un estado activo despolarizado, en donde se presentan ráfagas de potenciales de acción (Wilson, 1993; Wilson y Kawaguchi, 1996; Vergara *et al.*, 2003; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). El estado up persiste mientras se presente una entrada excitatoria de suficiente intensidad sobre la neurona proveniente del tálamo o la corteza. Este patrón de disparo se genera durante la ejecución de movimientos (Vautrelle *et al.*, 2009) o en preparaciones *in vitro* sin necesidad de una sobre-estimulación, ocasionada por una biestabilidad condicional adquirida (en presencia de un agonista glutamatérgico) (Vergara *et al.*, 2003; Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

1.3.2. Potenciales en meseta

Otra propiedad de las NEMs es la generación de potenciales tipos meseta (plateau). Los plateaus son un potencial de membrana estable que se mantiene por arriba del potencial de reposo. Cuando un potencial plateau es generado, las neuronas que lo poseen pueden generar potenciales de acción en ausencia de una entrada sináptica excitatoria continua (Grillner *et al.*, 1981; Guertin y Hounsgaard, 1998; Vautrelle *et al.*, 2009). Los plateaus pueden durar varios segundos para terminar de manera espontánea o bien pueden ser interrumpidos por un potencial sináptico inhibitorio. La forma y duración del plateau puede ser modificada por distintas condiciones patológicas o por neuromoduladores (Guertin y Hounsgaard, 1998; Flores-Barrera *et al.*,

2010). A su vez, cuando se genera un plateau sobre una neurona, la conductancia de entrada incrementa disminuyendo la efectividad de las entradas sinápticas, reduciendo entonces la activación del circuito por entradas presinápticas estocásticas (Kiehn y Eken, 1998). Lo anterior sugiere que no siempre es necesaria la entrada de una fuerte entrada sináptica para generar potenciales de acción sobre un grupo de neuronas del circuito, sino que la entrada de secuencias temporalmente similares basta para provocar plateaus simultáneos sin importar si las fuentes de los estímulos son diferentes (Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

Los potenciales plateau en las NEMs subyacen las transiciones de los estados up y down (Vergara *et al.*, 2003; Ibanez-Sandoval *et al.*, 2007; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a; Carrillo-Reid *et al.*, 2009b). Las mismas transiciones *in vivo* están implicadas conductas motoras (Vautrelle *et al.*, 2009), siendo parte fundamental para la existencia de una dinámica de red neocortical (Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

1.3.3. Dinámica de red neocortical

Como ya se mencionó las neuronas del NE al ser activadas presentan ráfagas de potenciales de acción, estas ráfagas están montadas sobre los estados up. Los estados up se presentan de manera correlacionada en distintos elementos de la red funcionando como atractores, es decir, estados preferentes de la red que pueden estar relacionados con procesos de memoria o resolución de problemas de cómputo (Cossart *et al.*, 2003). En teoría, los atractores se definen como estados estables dentro de la dinámica de redes. En el NE estas propiedades se presentan durante

picos de actividad sincrónica donde secuencias de grupos coactivos de neuronas se repiten a lo largo del tiempo (Cossart *et al.*, 2003; Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

Los estados de red generados por grupos o “pools” neuronales ya han sido descritos en diferentes microcircuitos (Petersen y Sakmann, 2000; Doupe *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010). El grado de sincronización entre sus elementos es variable, en algunos casos la escala de tiempo de sincronización es rápida. Por ejemplo, dentro de la escala temporal de una sinapsis y potenciales de acción (Diesmann *et al.*, 1999; Leger *et al.*, 2005; Robbe *et al.*, 2006). Sin embargo, en por lo general, esta escala de tiempo presenta una gran variabilidad en las respuestas neuronales (Calvin y Stevens, 1968; Shadlen y Newsome, 1994; Grinvald *et al.*, 2003; Kostal *et al.*, 2007). Por lo mismo, la sincronía entre neuronas a una escala de potencial de acción es muy difícil de encontrar en la mayoría de los circuitos del sistema nervioso central (Shadlen y Newsome, 1994; Arieli *et al.*, 1996) y en caso de encontrarse, la actividad del circuito podría ser alterada con una mínima perturbación (Izhikevich y Edelman, 2008).

En el NE, el disparo correlacionado ha sido inferido por medio del registro de potencial de campo de manera conjunta con el disparo neuronal (Murer *et al.*, 2002; Berke *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Mahon *et al.*, 2006; Walters *et al.*, 2007; Zold *et al.*, 2009). Pero fue gracias al uso de técnicas de imagenología de calcio que se registraron ráfagas de potenciales de acción sincronizadas y correlacionadas entre muchos elementos del pool neuronal después de activar al circuito neocortical (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Esto demostró que el registro de ráfaga de potenciales de acción observado en células únicas (Vergara *et al.*, 2003) se sincroniza

espontáneamente entre grupos de neuronas cuando el circuito es echado a andar en una condición particular (Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

Por lo anterior, se podría decir que el estado up presentado por las neuronas del NE funciona como una “ventana” de tiempo para la actividad sincrónica y correlacionada del pool neuronal (Yuste *et al.*, 2005) y no así los potenciales de acción individuales (Wickens y Wilson, 1998). La sincronización entre elementos de la red genera distintos patrones espacio-temporales que están ligados a diversos estados de atención y deriva en diferentes comportamientos. En la corteza, estos patrones han sido relacionados con estados de vigilia y periodos de atención focalizada (Gross *et al.*, 2004). Los patrones espaciotemporales de actividad correlacionada pueden ser iniciados por el microcircuito NE y son dependientes tanto de propiedades sinápticas como intrínsecas neuronales (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Kravitz *et al.*, 2010). En estados patológicos como la enfermedad de Parkinson (EP), las neuronas de los GB cambian su comportamiento (Tseng *et al.*, 2001) exhibiendo una sincronización anormal elevada (Costa *et al.*, 2006; Fuentes *et al.*, 2009; Walters y Bergstrom, 2009). ¿Cómo se comporta la dinámica del microcircuito NE durante la enfermedad de Parkinson? y ¿Cuáles son las propiedades que gobiernan dicha actividad? Estas son algunas de las preguntas que se abordan en éste trabajo.

1.4. La Enfermedad de Parkinson

La EP, descrita originalmente por James Parkinson en 1817, es un padecimiento neurodegenerativo que se estima afecta a más de seis millones de personas alrededor

del mundo, impactando severamente la calidad de vida de los pacientes y de sus familiares. La naturaleza crónica y progresiva de esta enfermedad dificulta la eficacia de tratamientos farmacológicos específicos de larga duración así como la pronta detección de la enfermedad.

Las proyecciones dopaminérgicas que recibe en NE de la SNc son cruciales para la correcta iniciación y ejecución de movimientos voluntarios. Estudios *post mortem* en pacientes de la EP muestra una excesiva neurodegeneración en la vía nigroestriatal (revisado por Fahn, 2003). Aunque la enfermedad de Parkinson es el resultado de un complejo proceso neurodegenerativo, la mayoría de los síntomas de esta enfermedad pueden ser adjudicados a la falta de DA en el NE, como sugiere el hecho de que cualquier intervención que reduzca directa o indirectamente los niveles de DA en el NE [e.g. lesiones crónicas de las neuronas dopaminérgicas (Mendez y Finn, 1975; Burns *et al.*, 1983); inhibición severa de la síntesis de DA (Costa *et al.*, 2006); daño mitocondrial genéticamente dirigido (Burns *et al.*, 1983); sobre expresión de α -sinucleína (Masliah *et al.*, 2000; Kirik *et al.*, 2002)] generan hipocinesia y rigidez, los síntomas motores principales observados en esta enfermedad.

¿Por qué mueren las neuronas dopaminérgicas? Después de muchos años de investigación no se ha podido encontrar una causa general que aplique para todos los individuos. Distintas causas han sido adjudicadas a esta enfermedad: mientras que algunos pacientes parecen mostrar Parkinson genético, la mayoría de los casos parecen ser idiopáticos o ligados al medio ambiente. Por el momento, la generación de la EP causada por factores ambientales sólo ha sido comprobada por la intoxicación con 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y el Parkinson postencefálico

(enfermedad viral que causa la degeneración de las células dopaminérgicas de la SNc), pero ninguno reproduce todos los síntomas de la EP.

Una de las teorías más aceptadas de la muerte neuronal dentro de la SNc, sugiere que la causa pudiera ser la propia DA. Evidencias sugieren que la oxidación de la dopamina citosólica y de sus metabolitos generan la liberación de radicales libres que dañan a las células provocando su muerte (Greenamyre y Hastings, 2004). Por otro lado, se ha sugerido que es la propia conducta electrofisiológica característica de las neuronas dopaminérgicas de la SNc lo que las vuelve endebles al estrés oxidativo. Esta última hipótesis sugiere que la entrada excesiva de Ca^{2+} por medio de los canales de calcio tipo L genera un aumento en el estrés oxidativo mitocondrial ocasionando un tiempo de vida media neuronal más corto (Guzman *et al.*, 2010). Por lo mismo, el bloqueo del canal de calcio tipo L se ha convertido en un blanco terapéutico importante, ya que al bloquearlo se genera un efecto neuroprotector en las neuronas dopaminérgicas sin afectar su papel fisiológico (Guzman *et al.*, 2010; Surmeier *et al.*, 2010a; Surmeier *et al.*, 2010b, 2011). Juntando distintas hipótesis se podría decir que las neuronas de la SNc son vulnerables a distintos factores genéticos, celulares y ambientales que generan la muerte celular conforme el tiempo pasa (Perier *et al.*, 2007; Sulzer, 2007). Estos factores generarían daño mitocondrial y, por ende, estrés oxidativo causando degradación de proteínas por la alteración del sistema de ubiquitinas, la autofagia de chaperonas, entre otras disfunciones subcelulares (Obeso *et al.*, 2010). Aunque todas estas causas juntas podrían ser las causantes de la muerte neuronal de la SNc, no se sabe el grado de contribución o si incluso juegan un papel importante en esta patología.

¿Cuándo comienza la enfermedad de Parkinson? Por lo general esta enfermedad se diagnostica cuando los problemas motores son evidentes, lo cual no ocurre hasta que cerca del 85% de las neuronas dopaminérgicas de la SNc han muerto. Sin embargo, el concepto de Parkinson premotor ha ido poco a poco tomando fuerza (Langston, 2006; Hawkes, 2008a, b). Los síntomas del Parkinson premotor son: disfunción olfatoria, anormalidades durante el sueño, constipación, depresión y dolor (O'Sullivan *et al.*, 2008). Diagnosticar y tratar a tiempo la EP es muy importante, sin embargo, los síntomas premotores no son específicos de esta enfermedad. En la clínica la generación de estudios longitudinales, que revele todo el abanico de síntomas premotores, sería de gran ayuda para detectar esta enfermedad en etapas tempranas. No obstante, aunque los tratamientos actuales pueden revertir algunos de los padecimientos de esta enfermedad, no existe hasta la fecha un tratamiento que la cure o detenga su progresión.

1.4.1. Tratamientos de la enfermedad de Parkinson

La naturaleza crónica y progresiva de la EP dificulta la eficacia de un tratamiento farmacológico efectivo de larga duración. En la actualidad, uno de los tratamientos farmacológicos más usados es la levodopa (L-DOPA), un precursor de la DA. La administración de este fármaco busca restaurar los niveles dopaminérgicos basales dentro del NE promoviendo la liberación de DA de las terminales remanentes y como resultado, mejorar temporalmente los síntomas motores de la enfermedad (Cotzias *et al.*, 1969; Hornykiewicz, 1973b, a). L-DOPA es uno de los mejores agentes

farmacológicos usados hoy en día en la clínica. Sin embargo el uso prologado de este fármaco, como el de cualquier otro que busque restaurar de los niveles dopaminérgicos de la vía nigroestriatal, pierde con el tiempo eficacia, expresada con complicaciones motoras graves (discinesias) en cerca del 80% de los pacientes, empeorando su calidad de vida (Obeso *et al.*, 2000; Olanow y Obeso, 2000; Rascol *et al.*, 2000; Ahlskog y Muenter, 2001).

Los agentes antiparkinsonianos que hasta la fecha se han empleado para la restauración del funcionamiento adecuado del NE se pueden dividir de acuerdo a su forma de administración de la siguiente forma:

Medicamentos administrados por vía oral:

- L-DOPA + inhibidores de descarboxilasa de aminoácidos aromáticos ± inhibidores de catecol-O-metiltransferasa.
- Agonistas dopaminérgicos, incluidas formulas de lenta liberación: ropinirole, paramipexole.
- Inhibidores de la Monoamina oxidasa B: selegiline, rasagiline.
- Anticolinérgicos: trijexyphenidyl.
- Antiglutamatérgicos: amantadine.

Terapias de liberación continua:

- Agonistas dopaminérgicos subcutáneos o intravenosos: apomorfina y lisuride.
- Parche transdermal: rotigotina.
- L-Dopa Intraduodenal: duodopa.

Diferentes combinaciones de estos agentes son utilizados en la clínica con el objetivo de prolongar la eficacia de los mismos y demorar la aparición de disinecias motoras. Por otro lado, aún no se ha generado un bioensayo que pueda evaluar cual es el impacto global de estos agentes sobre el funcionamiento y dinámica del mircocircuito estriatal o cualquier otro núcleo de los GB.

En las últimas dos décadas la estimulación eléctrica de núcleos subcorticales, generalmente conocida como estimulación cerebral profunda (ECP), ha tenido un gran avance dentro de la clínica, como una terapia complementaria para distintas enfermedades neurológicas (Perlmutter y Mink, 2006). La ECP ha sido utilizada en diferentes núcleos como el GPi y el PPN, pero en particular, la estimulación del NST ha tenido efectos bastante favorables aliviando los síntomas motores de la EP (Benabid *et al.*, 2009). Aunque la ECP parece ser el tratamiento sintomático más efectivo, también es cierto que implica un procedimiento costoso y de alto riesgo, además de que no son candidatos a la intervención quirúrgica (Morgante *et al.*, 2007). Sin embargo, en la actualidad se trata de generar alternativas menos invasivas que tengan el mismo efecto terapéutico (Fuentes *et al.*, 2009; Fuentes *et al.*, 2010).

1.5. Depleción dopaminérgica en los Ganglios Basales

La falta de DA dentro de los GB parece generar un desbalance entre los distintos mircocircuitos neuronales, afectando los procesamientos fisiológicos al alterar el disparo neuronal normal de sus elementos. En las últimas décadas, estudios en humanos y modelos animales han aportado evidencias de la presencia de oscilaciones

sincrónicas en todos los núcleos que conforman los GB (rev. por Hammond *et al.*, 2007). Durante el estado patológico, la actividad de las neuronas de los GB cambia su comportamiento (Tseng *et al.*, 2001) mostrando una sincronización anormalmente elevada (Bergman *et al.*, 1994; Nini *et al.*, 1995; Sharott *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006; Fuentes *et al.*, 2009; Walters y Bergstrom, 2009). Patrones oscilatorios similares han sido observados en pacientes con la EP en registros electrofisiológicos obtenidos durante la implantación de electrodos de ECP (estimulación cerebral profunda) (Levy *et al.*, 2000; 2002).

Diferentes estudios han demostrado que la frecuencia de actividad neuronal está ligada con el desempeño de una función. Se ha visto que durante la generación de movimientos voluntarios, las oscilaciones tipo α (8-12 Hz) y β (10-30 Hz) tienden a ser bloqueadas, mientras que las oscilaciones tipo γ (30-100Hz) predominan (Sanes y Donoghue, 1993; Murthy y Fetz, 1996; Fries *et al.*, 2007). En contraste, las oscilaciones en el rango bajo de la banda β se asocian con estados de inactividad o reposo (MacKay y Mendonca, 1995). Durante la EP, la frecuencia tipo β es predominante a lo largo de los GB (Bergman *et al.*, 1994; Nini *et al.*, 1995; Sharott *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006; Fuentes *et al.*, 2009; Walters y Bergstrom, 2009). Cuando esta actividad es modificada tanto farmacológicamente (Costa *et al.*, 2006) cómo eléctricamente (Fuentes *et al.*, 2009) los síntomas motores de esta enfermedad disminuyen drásticamente.

En resumen, la depleción dopaminérgica de los GB genera la aparición anormal de oscilaciones tipo β a lo largo de ellos GB, oscilaciones que se relacionan con la presencia de los síntomas motores de la EP (Brown, 2007; Hammond *et al.*, 2007;

Fuentes *et al.*, 2009; Walters y Bergstrom, 2009; Zold *et al.*, 2009). No obstante, no existe ningún trabajo que estudie el cambio de la actividad neuronal, explicando la sincronización del NE o cualquier otro microcircuito de los GB. Esta información podría dar sustento a la hipótesis donde los circuitos globales están estructurados de forma dinámica por la acción coordinada de muchos microcircuitos interconectados que integran su actividad (Uhlhaas *et al.*, 2009).

Se ha mostrado en trabajos previos, *in vitro* e *in vivo*, que los disparos espontáneos y la actividad sináptica de las neuronas estriatales se encuentra aumentada después de la depleción dopaminérgica (Galarraga *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2008). La actividad incrementada se caracteriza por ráfagas de disparos recurrentes acompañados por numerosos periodos de alta sincronización no observados en condiciones normales (Zold *et al.*, 2009). Sin embargo, la dinámica del microcircuito en estas condiciones no había sido descrita. Trabajos en el laboratorio reportaron la dinámica que presenta el microcircuito neuronal al inducir su actividad en rebanadas cortico-estriatales durante la administración de NMDA. Esta dinámica presenta patrones espaciotemporales y actividad correlacionada que viaja a través de distintos estados de la red (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a). En el presente trabajo, utilizamos registros de célula completa, técnicas de imagenología de calcio y métodos analíticos para poder comparar, en primera estancia, al NE normal y al NE con depleción dopaminérgica. Del mismo modo, al analizar la dinámica generada en el circuito desprovisto de DA pudimos describir las diferencias o similitudes entre el estriado sano y el patológico.

La reducción dimensional de la actividad de red vectorizada reveló que episodios de actividad sincrónica en rebanadas sin DA revelan un estado dominante dentro de la actividad de red, que absorbe a la mayoría de las células activas. El bloqueo de la transmisión glutamatérgica reduce la hiperactividad y la sincronización anormal del microcircuito patológico, mientras que el bloqueo de la transmisión GABAérgica rápida facilita el enganche del circuito en la dinámica anómala. Es interesante que un agonista dopaminérgico haya sido capaz de desenganchar a las neuronas del estado dominante, restaurando parcialmente la dinámica entre los distintos estados de la red. En este trabajo se mostró por primera vez una reconfiguración funcional del circuito neostriatal en ausencia de DA. Esta configuración patológica fue parcialmente revertida después de la administración del agonista dopaminérgico. Nuestra preparación es una opción viable como bioensayo para probar el efecto de diferentes agentes farmacológicos diseñados para reducir los problemas motores asociados a la EP.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la enfermedad de Parkinson los niveles de dopamina en el núcleo neostriado disminuyen drásticamente. En ausencia de este neurotransmisor la actividad de red cambia, generando en los síntomas motores característicos de esta enfermedad.

Si pudiéramos registrar la actividad de la dinámica de red en tejido aislado *in vitro* en un modelo de la enfermedad de Parkinson estaríamos ante la posibilidad de estudiar y describir sus propiedades biofísicas durante un estado patológico, así como de conocer el efecto que tienen distintos neurotransmisores sobre la actividad global de los microcircuitos, el efecto que tienen distintos fármacos utilizados en la clínica e incluso se podría investigar el papel que desempeña cada elemento en la función de la red.

3. OBJETIVO

Estudiar la dinámica del microcircuito neostriatal *in vitro* en un modelo de la enfermedad de Parkinson.

3.1. Objetivos particulares

- Caracterizar los mecanismos que generan la actividad de red en el neostriado parkinsónico.
- Estudiar las propiedades de los ensambles neuronales neostriatales en un modelo de la enfermedad de Parkinson.

4. HIPÓTESIS

- La actividad de la red neostriatal observada en un modelo de la enfermedad de Parkinson estará incrementada con respecto a la encontrada en condiciones control.
- La actividad global del microcircuito neostriatal refleja el estado patológico de la red.
- La dinámica patológica de red del microcircuito neostriatal está mediada tanto por propiedades sinápticas como por propiedades intrínsecas de las neuronas.

5. MÉTODOS

5.1. Animales

Fueron utilizados ratas Wistar albinas y ratones BAC-GFP (Mutant Mouse Regional Resource Centers, GENSAT, Rockefeller University, N.Y., U.S.A.) de 20-30 p.p., sin distinción de sexo. Los animales fueron mantenidos en un ciclo normal de luz/oscuridad 12:12 a temperatura ambiente (22°C), con libre acceso a alimento y agua. Todos los procedimientos utilizados durante la elaboración de este trabajo fueron aprobados por la comisión de cuidado animal del Instituto de Fisiología Celular.

5.2. Modelo de la enfermedad de Parkinson

El modelo de rata hemiparkinsoniana está probado y muy bien estandarizado desde los trabajos de Ungerstedt y Arbuthnott en 1970. No obstante, el número de elementos neuronales que puede ser registrado con la técnica de imagenología de calcio mediante epifluorescencia es mayor mientras más joven sea el animal. Por ello la edad de las ratas fue modificada hasta un rango de edad donde la lesión fuera posible y el registro de la dinámica de red no se viera comprometida (Figura 3). Por lo anterior, fue necesario ajustar las coordenadas proporcionadas por el atlas para hacer la lesión en ratas de menor edad. Después de varias pruebas, el ajuste de las coordenadas para las ratas jóvenes de 12-14 días de edad en base a bregma quedaron de la siguiente manera (en mm): Anteroposterior: 3.9, Lateral: 1.8, Ventral: 6.8.

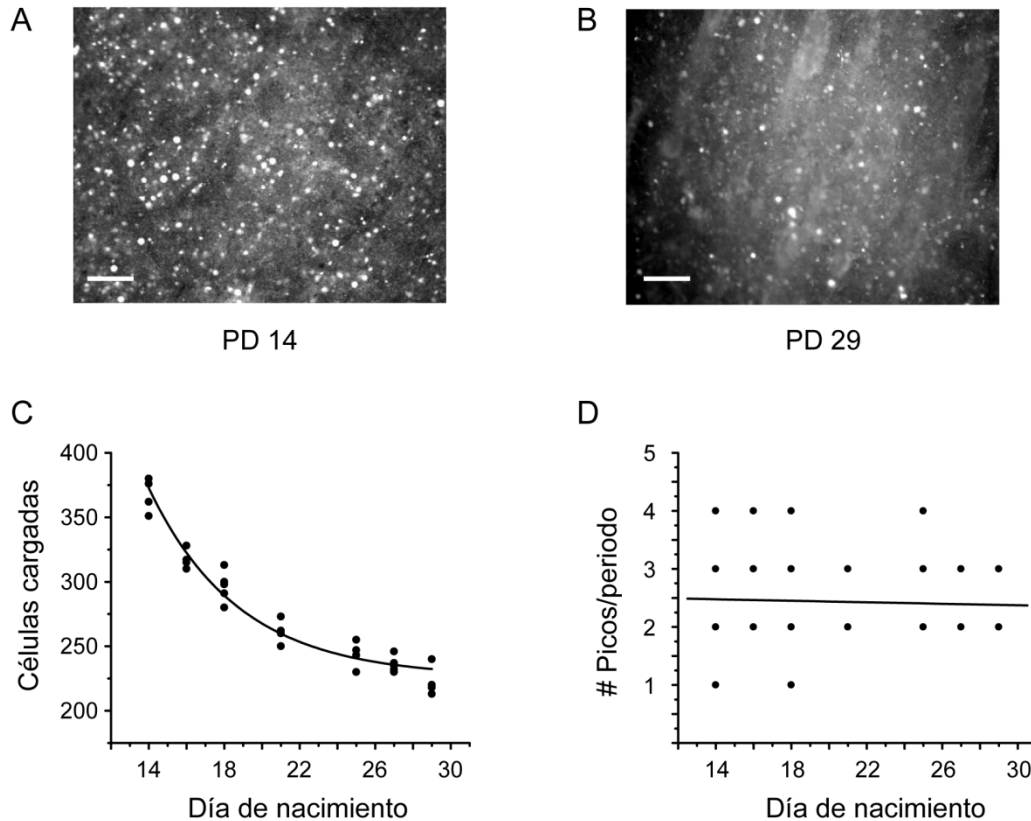


Figura 3. Imagenología de calcio contra la edad. Neuronas en una rebanada de cerebro cargadas con fluo-4 AM. (A) PD 14. (B) PD 29. Escala: 100 μ m. C: Número de células cargadas en función del día de nacimiento. Cada punto representa una rebanada. La línea representa el ajuste de una exponencial. D: Número de picos/periodo en función del día de nacimiento (Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

Ratas albinas Wistar macho anestesiadas de 12-14 días de edad, fueron inyectadas con 2 μ l de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma-Aldrich- RBI, St Louis, MO, USA; 4 μ g/ μ l en 0.9% de NaCl, 0.5% C₆H₆O₆) en la SNC del hemisferio derecho a 0.5 μ l/min en las coordenadas antes mencionadas: AP:3.9, L:2, V:6.8. Para generar el modelo hemiparkinsoniano en los ratones transgénicos, las coordenadas utilizadas en base a bregma fueron (mm): AP:2.58, L:0.7 y V:4.5 y el volumen de 6-OHDA fue ajustado para inyectar 1 μ l a 0.25 μ l/min.

Una semana después, se evaluó el grado en la lesión con una prueba estandarizada de conducta de giro, administrando intraperitonealmente (IP) 4 mg/kg de amfetamina y contabilizando los giros durante 90 min con la ayuda de un rotómetro automatizado. La administración de amfetamina induce la liberación de dopamina en las terminales dopaminérgicas de las células de la SNc, invirtiendo la dirección de funcionamiento del transportador de DA. Por lo tanto, una rata o ratón al que se le ha eliminado unilateralmente la vía nigroestriatal genera un desbalance de DA en el espacio extracelular a causa de la administración de amfetaminas. Como consecuencia, el aumento de DA en el lado intacto tiene un efecto procinético aumentando la actividad motora unilateralmente, ocasionando en los roedores con una buena lesión, una conducta de giro ipsilateral al lado de la lesión. En nuestros experimentos, sólo fueron utilizados como modelos de la Enfermedad de Parkinson aquellos animales que superaron los 500 giros ipsilaterales al lado de la lesión y pocos giros contralaterales en un lapso de 90 minutos (Figura 4). Estudios anteriores reportan que esa cantidad de giros corresponde a la pérdida de ~97% de células dopaminérgicas de la SNc (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970; Ungerstedt, 1971; Dunnett *et al.*, 1981).

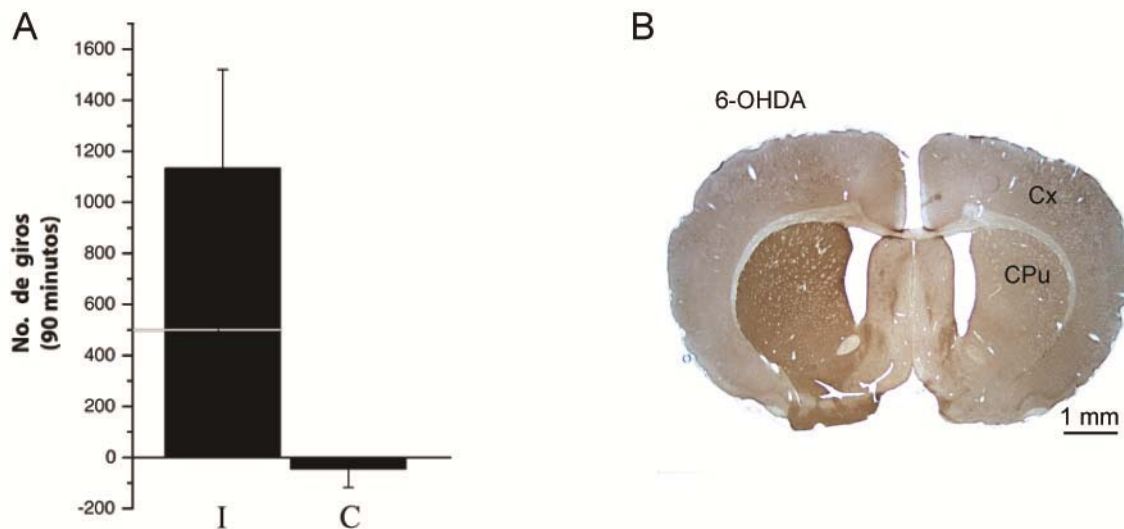


Figura 4. Evaluación del grado de la lesión A: Promedio del número de giros contabilizados durante las pruebas de conducta de los animales hemiparkinsonianos. (I: giros ipsilaterales al hemisferio lesionado, eje y: números de giros positivos; C: giros contralaterales, eje y: números de giros negativos). La línea gris indica el número mínimo de giros que una rata tiene que dar para sea considerada como modelo. B: Imagen de campo claro de una rebanada de cerebro coronal marcada inmunológicamente contra TH (el color café indica el reacciones fuertes contra TH) de una animal tratado unilateralmente con 6-OHDA en la sustancia nigra pars compacta.

5.3. Inmunohistoquímica

El grado de la lesión fue verificado utilizando inmunotinción de TH en cierto número de ratas. La TH es la enzima responsable de catalizar la conversión del aminoácido L-tirosina a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) contenida en las neuronas dopaminérgicas de la SNc.

Una semana después de la inyección de 6-OHDA, las ratas fueron perfundidas transcardialmente con paraformaldeído 4% en 0.1M "buffer" de fosfato (PBS), con pH 7.3. Después, el cerebro fue removido y con un criostato (Leica CM 1900) se obtuvieron rebanadas coronales de 40 μm de grosor. En algunos experimentos,

utilizando animales no evaluados, se obtuvieron rebanadas cortico-estriatales a modo de control. Las rebanadas fueron incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-TH (Millipore Bioscience Research Reagents; AB152, 1:1000) en PBS con 10% de suero normal de burro (SNB) y 0,3% de triton X-100 (Tx) a 4°C durante 8 horas. Después de una serie de lavados con PBS, las rebanadas fueron incubadas durante 2 horas con anti-conejo de burro biotinilado diluido 1:200 en PBS-Tx con 1% SNB a temperatura ambiente. Las muestras fueron expuestas con el complejo avidin-biotin peroxidasa por 2 horas a temperatura ambiente. La unión de la enzima peroxidasa fue revelada usando TRIS-amortiguado, pH7.3, con 6mg de 3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorito (DAB) y 0,1 ml de peróxido de hidrógeno al 3% diluidos en 10 ml de PBS. Las imágenes de contraste de fase fueron capturadas con una cámara digital montada en un microscopio vertical (Figura 4).

5.4. Obtención de rebanadas de tejido cerebral para registros *in vitro*

Se obtuvieron rebanadas cortico-estriatales (200-250 μm de grosor) de cerebros de ratas o ratones hemiparkinsonianos 3 días después de la evaluación conductual. Como condiciones control se utilizaron ratas sanas (Wistar albinas) y ratones transgénicos de 20-30 días de nacidos. A modo de conservar las aferencias corticales se utilizó un corte transversal con un ángulo de 45° previamente descrito (Kawaguchi, 1993; Vergara *et al.*, 2003; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a; Carrillo-Reid *et al.*, 2009b). Los animales previamente anestesiados vía i.p. con pentobarbital sódico (1 ml/2.5 kg) fueron perfundidos intracardialmente con una solución salina (4°C) que contiene (en mM): 124 ColinaCl, 3.5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 26 NaHCO₃ y 11 glucosa, solución saturada con 95% O₂ and 5% CO₂; pH=7.4; 298 mOsm/L. El cerebro se

sumergió en la misma solución con colina helada para llevar a cabo los cortes. Con ayuda de un vibratomo (Vibratome Company), se obtuvieron rebanadas oblicuas de 200 micras de grosor. Después, éstas se transfirieron a una solución salina control, que en lugar de ColinaCl contiene 123 mM de NaCl, a temperatura ambiente (20-25°C) en donde permanecieron por lo menos una hora antes del registro de fluorescencia. Las concentraciones de sales de esta solución control favorecen la aparición de los estados activos (up-states) *in vitro* necesarios para la generar la actividad de red (Sanchez-Vives y McCormick, 2000; Vergara *et al.*, 2003; Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

5.5. **Imagenología de calcio.**

Las rebanadas fueron incubadas en la oscuridad a 35°C durante 20-30 min inmersas dentro de la solución salina control en presencia de 10-20 μ M acetoximetil de Fluo-4 (Fluo-4AM) (Tef Labs, Austin, TX) en 0.1% de dimetilsulfóxido, en una atmósfera saturada con 95% O₂ y 5% CO₂. Después de la incubación, las rebanadas se mantuvieron con un flujo continuo de la solución salina control dentro de la cámara de registro montada sobre la platina de un microscopio vertical de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Melvilla, Ny) equipado con un objetivo 10X de inmersión en agua (apertura numérica de 0.3). La excitación del fluoróforo se hizo a 488 nm con el microscopio conectado mediante una fibra óptica con un monocromador Polychrome V (TiLL Photonics). La fluorescencia emitida fue seleccionada a 510 nm al pasar por una serie de filtros de emisión Nikon B-2E/C. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD (*cooled digital camera*) IMAGO-QE a 250-500 ms/cuadro, 15 ms de exposición por imagen, bajo protocolos escritos en el software TILLVISION 4.0 (TiLL Photonics). El campo registrado fue 800X600 μ m. Se realizaron películas cortas (100-250s, 50-100ms

milisegundos de exposición 250-500 ms/imagen) con intervalos de 5-20 min. Las secuencias de imágenes se tomaron durante aproximadamente una hora o más. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

En los experimentos donde se utilizaron ratones transgénicos GFP-BAC una estrategia experimental adicional fue requerida. Debido a la similitud entre los espectros de excitación y emisión de la proteína GFP y el Fluo4 (465/509nm, 488/512nm respectivamente), fue necesario identificar a las coordenadas de las neuronas GFP positivas antes de la exposición del tejido al Fluo4-AM. Para ello se obtuvo una imagen de contraste de fase, de esta forma fue posible establecer las coordenadas (x,y,z) con referencia a las características anatómicas y así el tejido pudo ser montado y desmontado en la cámara de registro sin perder el campo inicial. Se adquirió una imagen de epifluorescencia para localizar a las células GFP positivas. Después el tejido fue cargado con Fluo4-am de la forma antes descrita. Una vez que el tejido estaba cargado una nueva imagen de contraste de fase fue tomada para restablecer las coordenadas iniciales. Una vez establecida la misma área de registro se prosiguió con los experimentos regulares.

En todos los experimentos para determinar el número total de neuronas que captaron el fluoróforo al final de cada uno de los experimentos se agregó una solución que contiene (en mM): 50 KCl, 120 NaCl, 10 HEPES-Na y 2 CaCl₂ a un pH 7.4 (Figura 05). Esta maniobra revela toda la población de neuronas excitables que capturaron fluo-4 dentro de nuestro campo de registro (tanto las activas como las silentes durante el experimento). Las células que se mantuvieron activas durante el experimento fueron analizadas y la tasa de células activas/inactivas fue obtenida para el análisis posterior.

Los transitorios espontáneos de calcio junto con las respuestas eléctricas de algunas células fueron registradas (ver más adelante). La co-localización de las neuronas activas y GFP positivas se determinó offline usando Image J (v1.36, National Institutes of Health), Adobe Illustrator e IDL.

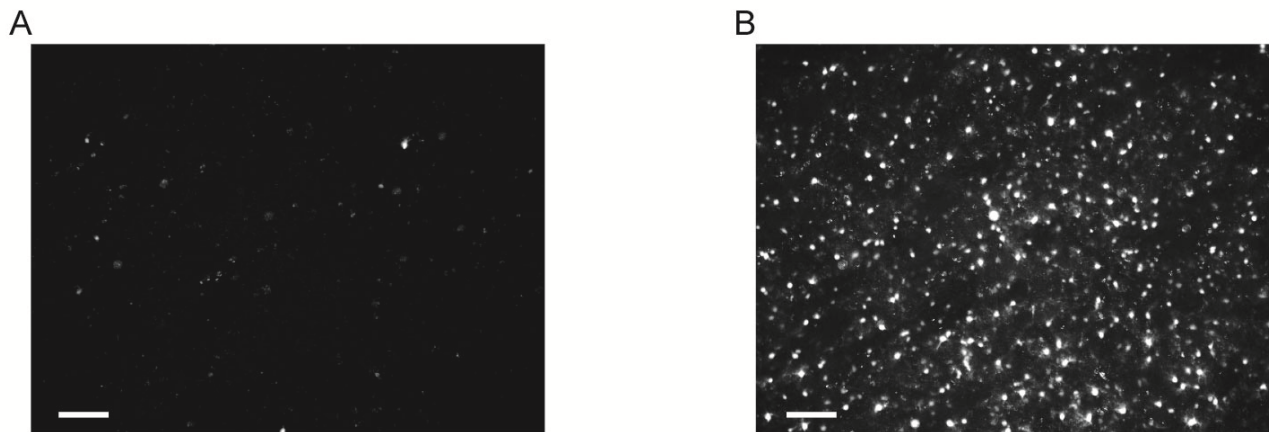


Figura 5. Despolarización con potasio del microcircuito neocortical. A: Imagen desviación estándar del campo de registro de la actividad espontánea de una rebanada cargada con fluo 4-AM. Los puntos blancos son neuronas que presentaron ráfagas de potenciales de acción espontáneas. B: Imagen desviación estándar de la misma rebanada de A durante la aplicación de la solución alta en potasio. Cada punto es una neurona que respondió a la despolarización generada por potasio en nuestro campo de registro; este experimento fue llevado a cabo en un animal intacto, cabe resaltar la poca actividad espontánea que presenta.

5.6. Fármacos

Las soluciones utilizadas fueron preparadas antes de cada experimento y añadidas a la perfusión en la concentración indicada. Acido (2R)-amino-5-fosfonovalerico (APV), 6-ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), SKF 81297 y bicuculina (Sigma, St. Louis, MO, USA).

5.7. Electrofisiología

Registros ópticos y electrofisiológicos fueron realizados simultáneamente en áreas del estriado dorsal como ha sido reportado previamente en estudios del laboratorio (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). El disparo de más de un potencial de acción es necesario para poder generar transitorios de calcio detectables (Figura 06). Registros electrofisiológicos fueron hechos en NEMs visualizados con video microscopía diferencial de interferencia infrarroja y un objetivo de inmersión en agua 40X (COHU 4915-2000 y Eclipse FN1, Nikon Corporation). Las micropipetas para registro de célula completa fueron fabricadas a partir de tubos de vidrio de borosilicato (1.5 mm diámetro exterior, WIP) con una resistencia final de 5-8 M Ω . La solución interna utilizada fue (mM): 112 KSO₃CH₃, 14 KCl, 10 HEPES, 1.1 K₂-EGTA, 1.1 ATP-Mg y 1.1 GTP-Na (pH 7.3 ajustado con KOH; osmolaridad, 287-290 mOsm L⁻¹). Para algunos experimentos se agregó a la pipeta de registro sal fluo-4 (20-30 μ M).

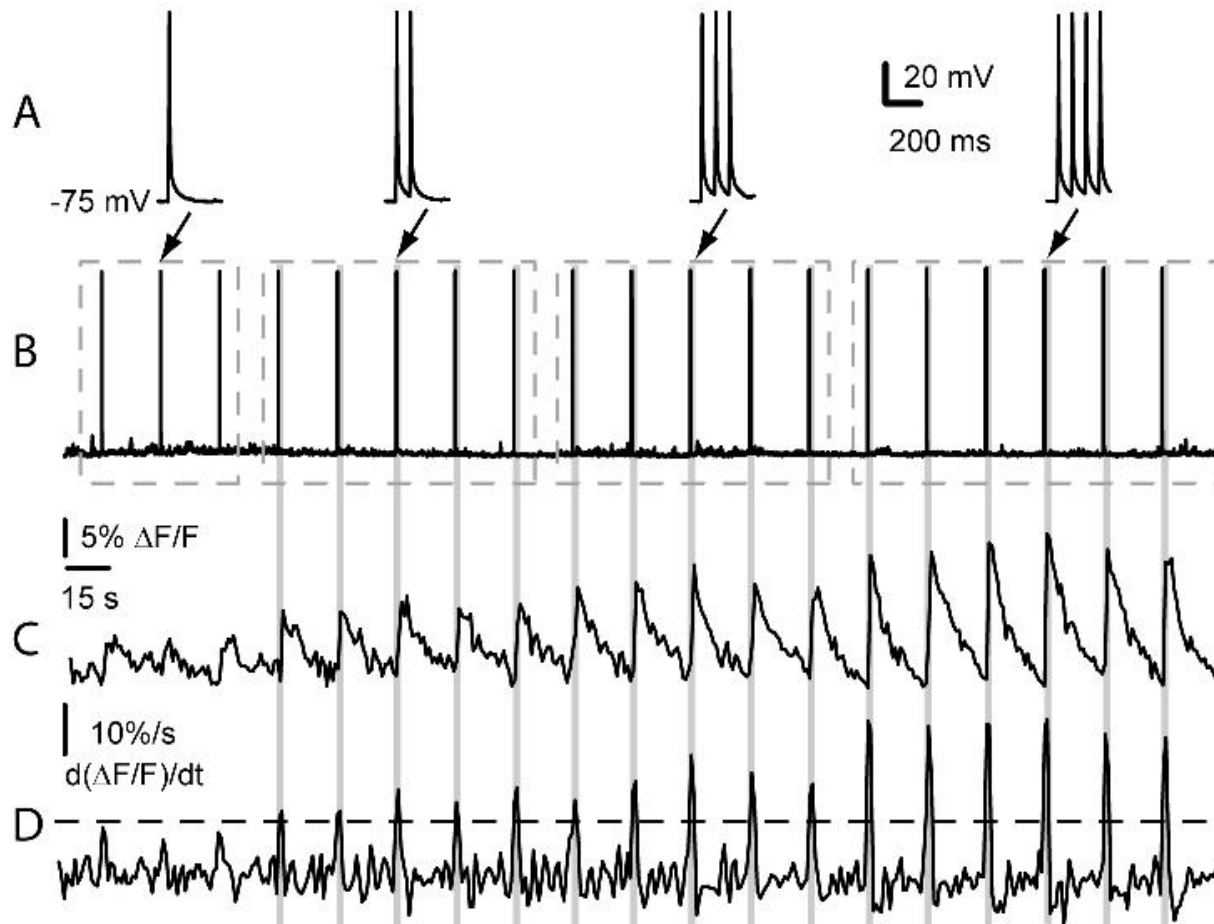


Figura 6. Umbral de detección de los transitorios de calcio. A: Potenciales de acción evocados por comando de corriente en una NEM. Las flechas indican el mismo registro en diferente escala temporal. B: Potenciales de acción (1-4) generados en forma consecutiva. C: Registro simultáneo de los transitorios de calcio provocados por los estímulos mostrados en B. D: Primera derivada temporal de los registros de calcio. El umbral de detección (línea punteada) corresponde a un valor mayor de 2.5 veces la desviación estándar del ruido basal.

5.8. Análisis de imágenes

El procesamiento de las secuencias de imágenes se llevó a cabo con los programas Image J (v.1.36, National Institutes of Health), Multicell 2.0 y programas escritos en IDL (Mao *et al.*, 2001; Cossart *et al.*, 2003) o MATLAB (The Math-Works, Inc., Natick, MA).

Todas las neuronas activas fueron seleccionadas semi-automáticamente y la media de fluorescencia fue calculada en función del tiempo. El ruido generado por pixeles únicos fue descartado usando como filtro la media de 5 pixeles. Las señales de fluorescencia dependientes de calcio fueron computadas como $(F_i - F_o)/F_o$ donde F_i es la intensidad de fluorescencia en cualquier cuadro (frame) de la película y F_o es la fluorescencia basal (fluorescencia promedio de los 4 primeros cuadros de la película).

Las señales de calcio generadas por los potenciales de acción neuronales son detectadas con base al valor umbral dado por la primera derivada de las señales de calcio (2.5 veces la desviación estándar por arriba del valor del ruido) (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Los registros fueron inspeccionados manualmente para eliminar artefactos y registros de células con cambios de calcio muy lentos que podrían corresponder a las células gliales (Ikegaya *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2007; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a).

5.9. Análisis estadístico

Para determinar si la actividad entre los elementos de la red neuronal se encontraba correlacionada, se registró el número de eventos simultáneos por experimento de todas las células del campo de registro. Para determinar el valor P de las espigas simultáneas que ocurren por azar se calculó la distribución de la actividad bajo la hipótesis nula de las espigas independientes usando 1,000 interacciones en la simulación de Monte Carlo (Mao *et al.*, 2001).

El grado de correlación entre las células activas fue calculado con el coeficiente de correlación Jaccard entre todos los posibles pares de neuronas. La diferencia entre dicho coeficiente de correlación y otras medidas radica en que el coeficiente de Jaccard mide eventos en donde las correlaciones son simétricas. Es decir, el grado de correlación entre dos células es el mismo sin importar cuál de ellas se tome como referencia. De esta manera fue posible construir mapas de correlación donde las células que se encuentran correlacionadas están unidas entre sí. El grosor de dichas líneas representa el grado de correlación y su distribución espacial dentro del campo de registro es respetada. También se construyeron mapas de pseudo color que nos permiten observar directamente el grado de correlación entre cada par de neuronas registradas pero no conserva la ubicación espacial del registro.

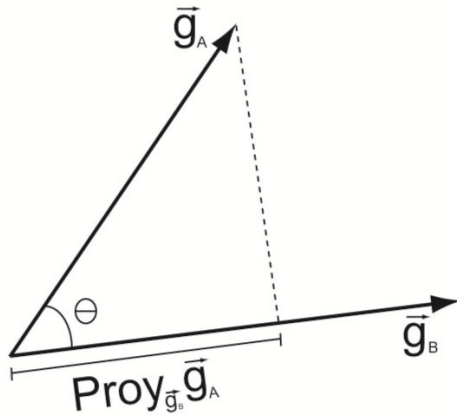
También fueron identificados, en función del tiempo, los grupos de células que se activaron simultáneamente. De esta forma, a lo largo de un experimento es posible identificar los picos de actividad sincrónica (aquellos que incluían a más células que las esperadas por el azar) utilizando nuevamente la simulación Monte Carlo para validar la significancia de la correlación. El umbral utilizado corresponde a una significancia de $P < 0.01$. Los picos de actividad sincrónica que presentaron una $P < 0.001$ fueron utilizados para el análisis posterior.

Para analizar la dinámica de red del microcircuito neuronal fueron elaboradas matrices multidimensionales de DXN, donde D representa el número de neuronas activas en una serie de experimentos y N denota el disparo de células durante ventanas de tiempo de 250ms a 1s. Esta ventana temporal fue escogida con base a estudios previos donde se demuestra que la duración de los estados activos de las

NEMs tienen duraciones similares (Vergara *et al.*, 2003; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Después, los picos de actividad sincrónica fueron vectorizados y, por ende, las ráfagas de actividad a través del tiempo de diferentes neuronas fueron asociadas con distintos elementos vectoriales. En este sentido, cada vector está conformado por la suma de diferentes transitorios de calcio de distintos elementos de la red en un momento dado, correspondientes a un estado de la red como una función de tiempo.

Utilizando los vectores nos fue posible buscar patrones de disparo similares dentro de la dinámica de red. Para esto medimos el índice de similitud entre todos los posibles pares de vectores de la red, observando los elementos que los componen por medio del cálculo del producto interno (Schreiber, 2003; Sasaki *et al.*, 2006). El producto interno entre dos vectores representa la proyección espacial de un vector sobre otro. De esta forma, el coseno del ángulo formado entre ellos nos puede decir que tan similares son: cuando dos vectores son iguales el índice de similitud es 1 ($\cos 0=1$); de lo contrario, es 0 ($\cos 90=0$) (Figura 07). Después, con los índices de similitud generamos matrices de pseudo color con todos los pares de vectores existentes en función del tiempo, donde los vectores se presentan como estructuras cuadradas y la similitud entre ellos se presenta en una escala de pseudo color (Sasaki *et al.*, 2006; Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

A



B

$$\cos \theta = \frac{\|\text{Proy}_{\vec{g}_B} \vec{g}_A\|}{\|\vec{g}_A\|}$$

Figura 7. Proyección de un vector sobre otro y obtención del índice de similitud. A: Esquema del ángulo formado en la proyección de un vector \vec{g}_A sobre un vector \vec{g}_B . B: Expresión geométrica del producto escalar para calcular el coseno del ángulo formado entre los dos vectores. Cuando los vectores son ortogonales (forman un ángulo de 90° entre ellos) el producto escalar será 0. Cuando los vectores son paralelos o tienen la misma dirección (forman un ángulo de 0° o 180°) el producto escalar será 1.

Para un mejor estudio de la actividad grupal de dichas estructuras utilizamos un algoritmo de reducción dimensional llamado “agrupamiento local lineal” (LLE, por sus siglas en inglés: *locally linear embedding*). Este algoritmo es una buena herramienta para realizar reducciones dimensionales en sistemas no lineales (Roweis y Saul, 2000; Stopfer *et al.*, 2003; Brown y Williams, 2005). Una vez aplicado, los vectores que representan la dinámica de red son proyectados en un espacio bidimensional en donde cada punto representa un vector en algún momento dado. Los vectores similares entre sí van a ser proyectados adyacentes en este espacio vectorial, generando conjuntos que representan vectores con dinámicas similares y los vectores con dinámicas se proyectarán distantes. Las flechas que unen a los conjuntos de vectores indican las

trayectorias seguidas por la actividad sincrónica de los diferentes estados de la red (Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

Para separar correctamente a los diferentes grupos de vectores formados por la dinámica de red utilizamos algoritmos de agrupamientos estrictos y difusos, tomando el índice de Dunn (el número óptimo de grupos es aquel donde el índice de Dunn alcanza su primer máximo local) como medida en la función de validez (Sasaki *et al.*, 2007).

Para identificar las neuronas que pertenecen a cada estado utilizamos algoritmos de agrupamiento jerárquico utilizando distancias euclidianas y el método de vecino más cercano. De esta forma, nos fue posible describir el ensamble neuronal en diferentes condiciones.

7. RESULTADOS

7.1. Registros ópticos y electrofisiológicos de las neuronas estriatales cargadas con fluo-4

La red o dinámica del microcircuito es definida como los cambios recurrentes y alternados de actividad sincrónica y correlacionada generada por grupos identificados de neuronas en el tiempo en un campo visual determinado. El registro simultáneo de la actividad eléctrica de un gran número de células con resolución de célula única es necesario para describir correctamente la dinámica de red local. Los disparos correlacionados y sincrónicos definidos en este trabajo como “picos de sincronía” son el resultado del disparo conjunto de numerosas neuronas. En trabajos anteriores del laboratorio, se mostró que el registro con imagenología de Ca^{2+} permite registrar el disparo de docenas de neuronas estriatales como cambios en los transitorios de fluorescencia (Figura 08) (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Secuencias de imágenes adquiridas del estriado dorsal en un campo visual de 800X600 μm de tamaño fueron adquiridas de 67 rebanadas cortico-estriatales, incluyendo rebanadas desprovistas de DA como de rebanadas intactas (control) y de animales intactos (naive). Las neuronas registradas electrofisiológicamente mostraron un sello electrofisiológico característico de las NEMs como la rectificación entrante y el retraso en el disparo del primer

potencial de acción (Figura 09). En la figura 10A se muestra un campo visual

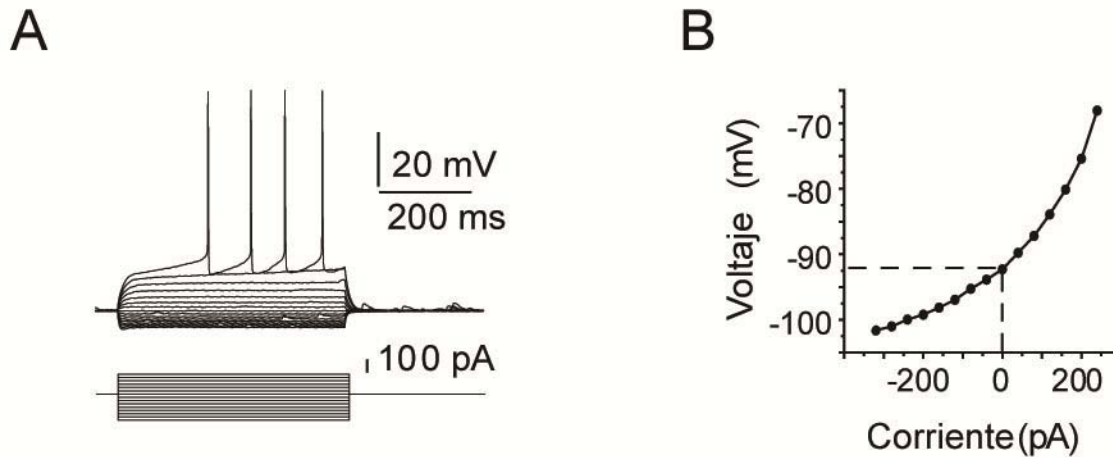


Figura 9. Registro electrofisiológico de las neuronas espinosas medianas. A: Respuestas de voltaje (arriba) de una neurona espinosa mediana durante la inyección de pasos de corriente incrementando en amplitud (abajo). Los registros de fijación de corriente fueron obtenidos de una neurona en una rebanada de un animal sin tratamiento. La rectificación entrante y la larga latencia para el primer disparo son comportamientos característicos de estas neuronas. B: Curva I-V del Estado estacionario obtenido de los datos de A.

representativo de neuronas cargadas con fluo-4. Los contornos celulares fueron seleccionados con la ayuda de un algoritmo semiautomático, definiendo así en cada experimento la distribución espacial de todas las neuronas activas e inactivas en el campo de registro (Figura 10B, contornos rellenos y vacíos, respectivamente). Los transitorios de Ca^{2+} generados por todas las células activas fueron seguidos a lo largo del registro. La figura 10C muestra registros representativos de transitorios espontáneos de Ca^{2+} de cuatro neuronas diferentes. Los transitorios de Ca^{2+} que pueden ser detectados se producen cuando las neuronas presentan dos o más potenciales de acción (Figura 11) confirmando que los métodos ópticos pueden reflejar

fielmente

actividad

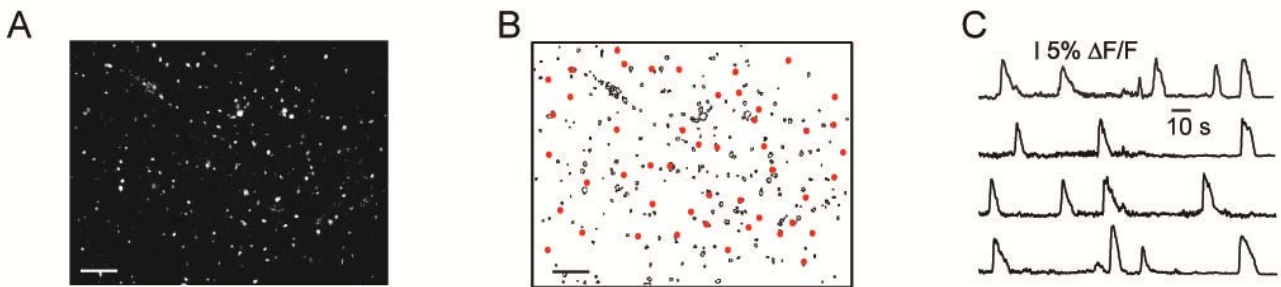


Figura 10. Seguimiento de los transitorios de calcio. A: Imagen de fluorescencia de una rebanada corticoestriatal cargada con fluo4-AM (el promedio de 100 cuadros con el fondo retirado, barra de escala 100 μ m). B: Mapa de 270 células en el campo de registro mostrado en A que respondieron a la adición de alto potasio. Los círculos rojos indican la posición de las neuronas que tuvieron actividad de calcio espontánea (62 de 270: 23%). C: Registro espontáneo de los transitorios de calcio de 4 neuronas tomadas de B.

eléctrica neuronal. De hecho, la intensidad del cambio de fluorescencia es proporcional al total de potenciales de acción generados (Figura 11A). Al igual que en estudios anteriores (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a), los registros simultáneos de imagenología de Ca^{2+} y electrofisiología, confirmaron que la primera derivada de los transitorios de Ca^{2+} corresponde a la duración total de la actividad eléctrica evocada (Figura 11B). Por lo anterior, nos fue posible reconstruir la actividad eléctrica de cada una de las neuronas en la red representando su actividad en forma de puntos en una gráfica tipo “raster” (Figura 11B, puntos negros).

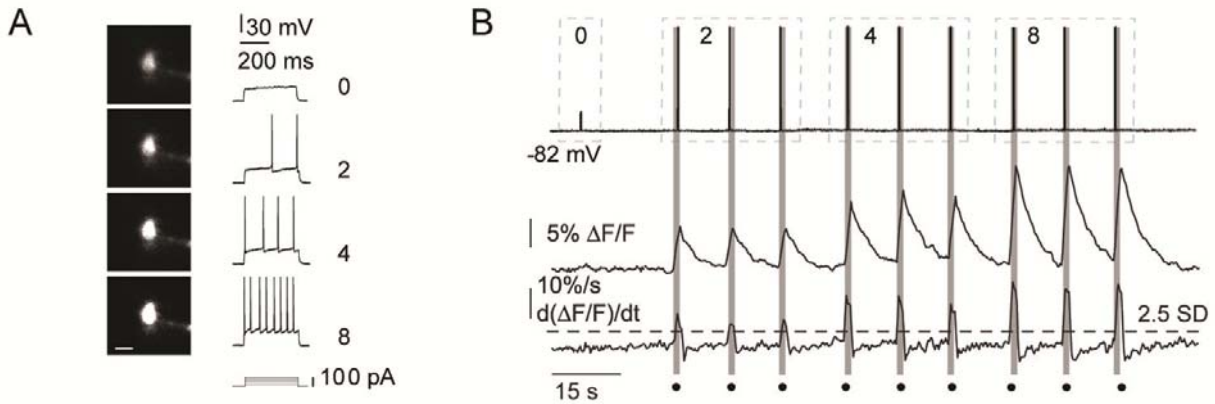


Figura 11. Registros ópticos y electrofisiológicos de las neuronas espinosas medianas. A: Neurona cargada con fluo4 y registrada electrofisiológicamente en modalidad de célula completa, pasos de corriente fueron inyectados al mismo tiempo que se registraba los cambios de fluorescencia. La neurona fue llenada con sal de fluo 4 pentapotásica. La fluorescencia incrementa proporcionalmente al número de potenciales de acción evocados (indicado por números) generada por la despolarización membranal a diferentes amplitudes. Barra de escala 10 μ m.

7.2. Dinámica de red neoestrial en el microcircuito depletado de dopamina

Las neuronas estriatales registradas en rebanadas control o animales intactos tienen poca actividad espontánea mostrando solo algunas neuronas activas (Figura 12, izquierda) (Liang *et al.*, 2008). Esta poca actividad neuronal no se encuentra significativamente correlacionada (Figura 12A, control, línea punteada; nivel de significancia $p < 0.01$) (Crutcher y DeLong, 1984; Kimura, 1992; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). En contraste, las rebanadas deprivadas de DA provenientes de ratas tratadas con 6-OHDA presentan una gran cantidad de neuronas con actividad eléctrica espontánea (Figura 12A, derecha: vease la diferencia en la escala en el eje y comparado con el raster control) (Galarraga *et al.*, 1987; Raz *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2001; Goldberg *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008). Algunas hipótesis sugieren que la hiperactividad del estriado sin DA es acompañada de

una sincronización incrementada entre las neuronas activas, generando un impedimento en la selección de sinergias motoras (Hammond *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2009; Uhlhaas *et al.*, 2009; Zold *et al.*, 2009). Con nuestra técnica comprobamos esta hipótesis mostrando que el número de neuronas que presentan disparo correlacionado se incrementa significativamente en el estriado sin DA, expresado como la aparición de picos de sincronía neuronal dentro de la actividad espontánea (Figura 12B, derecha abajo). Los picos de sincronía espontáneos representan el aumento de actividad sincrónica y correlacionada de grupos identificados de neuronas (Cossart *et al.*, 2003; Ikegaya *et al.*, 2004; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). El número de picos de sincronía registrados por episodios de 180s fue 11.3 ± 1.8 en rebanadas sin DA, comparado con 0.9 ± 0.9 en rebanadas controles ($p < 0.0001$; prueba Mann-Whitney U, $n = 17$ rebanadas). Además, cabe destacar que los picos de sincronía espontáneos se presentaron en el registro de cada una de las rebanadas sin DA ($n = 54$) y casi nunca en rebanadas intactas o control. En registros electrofisiológicos las neuronas que participaron en los picos de sincrónicos presentaron despolarizaciones espontáneas, ráfagas de disparo y eventos sinápticos frecuentes (Figura 12B) (Galarraga *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 2001; Zold *et al.*, 2009). Este comportamiento difícilmente se observa en la actividad espontánea de rebanadas control y resulta interesante que se presente con más frecuencia que en la dinámica estriatal inducida en rebanadas sanas (Carrillo-Reid *et al.*, 2009a). El incremento de las ráfagas de potenciales de acción espontáneos, sincrónicos y correlacionados es el reflejo de una reconfiguración drástica de la dinámica de red producida por la ausencia de DA.

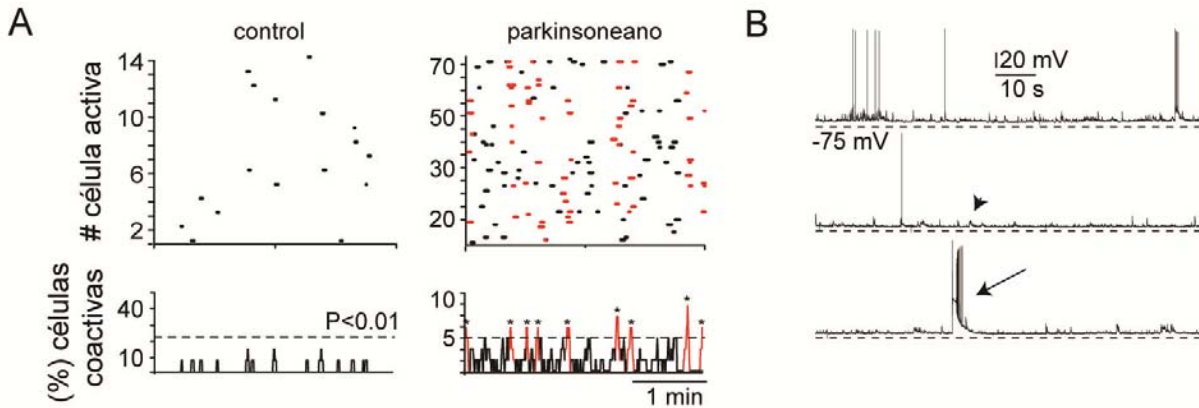


Figura 12. Dinámica de red del neocórtico control y parkinsoniano. A: Gráficas tipo raster de la actividad espontánea en el neocórtico normal (rata control; izquierda) y en el neocórtico privado de dopamina (derecha). Cada renglón representa una célula activa. Los histogramas presentados abajo muestran el porcentaje de células coactivas a lo largo del tiempo. Los picos de actividad sincrónica (rojos) indican el grupo de neuronas con disparos en ráfaga simultáneos. El nivel de significancia fue fijado a $p < 0.01$; línea punteada. Los patrones de sincronización solo están presentes en las rebanadas sin dopamina.

La distribución espacial de las neuronas activas es heterogénea a lo largo del campo, algunas neuronas activas forman grupos mientras que otras están separadas por cientos de micras de distancia con muchas neuronas inactivas interpuestas (Figura 13A, círculos rellenos; los círculos vacíos representan neuronas silentes). Los mapas de correlación espacial (Figura 13B) muestran que la gran mayoría de las células activas presentan actividad correlacionada estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Las líneas que conectan a las neuronas indican disparos correlacionados entre ellas en algún momento durante el registro. El grosor de la línea es proporcional al grado de correlación entre ellas. En promedio, $96 \pm 3\%$ de las neuronas activas presentan disparos correlacionados con alguna otra neurona en algún momento del registro ($n=20$ rebanadas). La mayoría de los disparos correlacionados fueron producidos por las células en los picos de sincronía (Figura 13B, círculos rojos). La gráfica de correlación en pseudocolor (Figura 13C) muestra que el grado de sincronización entre distintos

pares de neuronas es heterogéneo, lo cual implica que la dinámica de red observada en el microcircuito neostriatal no se debe a una correlación azarosa generada entre pares neuronales sino a la dinámica propia del circuito.

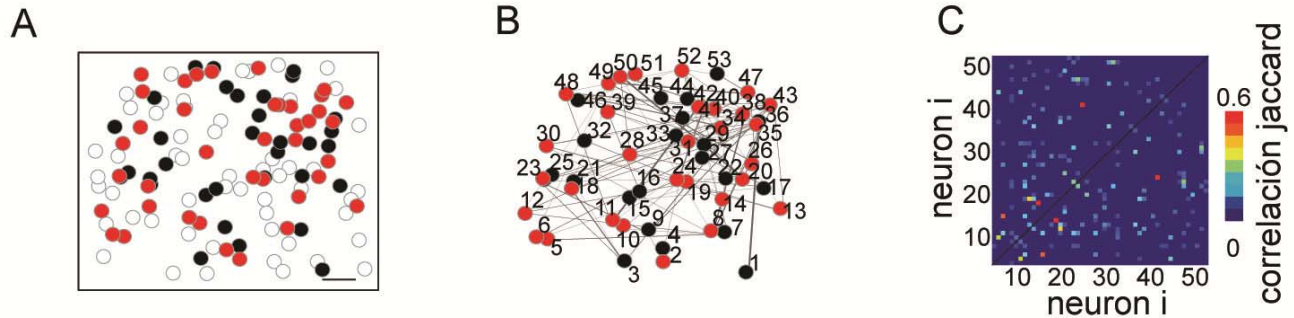


Figura 13. Dinámica de red del microcircuito estriatal en ausencia de dopamina. A: Localización espacial dentro del campo de registro de las neuronas que presentaron transitorios de calcio espontáneos en el neostriado parkinsoniano (círculos rellenos). Los círculos vacíos indican a las células inactivas a lo largo del registro que respondieron en presencia de alto potasio. Los círculos rojos indica las células que dispararon durante los picos de actividad (Figura 12A), barra de calibración 100 μ M. B: Mapa de correlación espacial de las células espontáneamente activas. Los pares de células que presentan un disparo correlacionado significativo son unidas con una línea (ver material y métodos). C: Matiz de correlación cruzada de todos los posibles pares de neuronas en A y B. Nótese la distribución heterogénea de los componentes.

Nuestros experimentos muestran que en la rebanada depletada de DA la actividad espontánea del microcircuito neostriatal se encuentra incrementada, presentando picos de actividad sincrónica a lo largo del tiempo. Estos picos de sincronía están ausentes en las rebanadas de animales control (Cossart *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2007; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Sin embargo en rebanadas corticoestriatales de animales sanos es posible inducir una dinámica de red mediante la aplicación de NMDA en el baño. La dinámica inducida por NMDA también se caracteriza por la presencia de picos de sincronía, los grupos de neuronas que se sincronizan bajo estas condiciones muestran disparos correlacionados de forma

recurrente y alternada, demostrando tener patrones espacio-temporales autónomos que en trabajos previos han sido descritos como ensambles neuronales (Hebb, 1949; Harris, 2005; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a). La forma y, por ende, la dinámica del microcircuito que presenta un ensamble neuronal puede ser modificada por la acción de algunos neurotransmisores (Carrillo-Reid *et al.*, 2009b; Vautrelle *et al.*, 2009). La aplicación de NMDA dentro del neostriado genera en su dinámica de red un ensamble neuronal característico (Carrillo-Reid *et al.*, 2008), que se refleja como un correlato motor procinético (Ossowska, 1995). Si la ausencia de DA tiene repercusiones motoras acinéticas, visualizar y comparar el ensamble neuronal del microcircuito estriatal en ausencia de DA nos puede revelar las principales diferencias funcionales de este microcircuito patológico.

7.3. Visualización de estados funcionales durante la dinámica de red en rebanadas sin dopamina

Para el estudio de los estados de red neuronales en rebanadas sin DA, los picos de sincronía espontáneos fueron seleccionados y procesados para formar vectores verticales con base a los datos de cada pico (bin = 250ms). Los vectores revelan el comportamiento de la red del microcircuito neostriatal durante los picos de sincronía (ver métodos). Un estado de red será definido como una cantidad de N vectores (bins) en D dimensiones (neuronas activas) (Schreiber, 2003; Brown y Williams, 2005; Sasaki *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2007). Los índices de similitud revelan estructuras agrupadas tipo mosaico, mostrando la semejanzas entre los distintos vectores (Figura 14A).

La dinámica del microcircuito fue extraída de estos datos multidimensionales. Para poder visualizarlos fue necesario utilizar un algoritmo de “agrupamiento local lineal” (LLE, por sus siglas en inglés: *locally linear embedding*), una técnica de reducción dimensional no lineal (Roweis y Saul, 2000; Stopfer *et al.*, 2003; Brown y Williams, 2005; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a). Con esta técnica, es posible proyectar la información contenida en los vectores a lo largo del tiempo en dos dimensiones (Figura 14B). La reducción dimensional reveló que la dinámica de red del estriado deprivado de DA se caracteriza por la presencia de un estado dominante, el cual comprende a la mayoría de los picos de sincronía (vectores) a lo largo de todo el registro (Figura 14B, círculos azules; el porcentaje indica la probabilidad de la red de dejar o recaer en un estado determinado). Por lo tanto, en el estriado deprivado de DA la probabilidad de presentarse el estado dominante dentro de la dinámica de red es significativamente mayor (más recurrente) a la probabilidad de que cualquier otro estado aparezca (Figura 14B). Los pools neuronales que generan los diferentes estados de la red en las rebanadas sin DA fueron registrados en series de videos cortos con intervalos de tiempo establecidos (episodios), después fueron elaboradas gráficas tipo raster representando la actividad de todas las neuronas involucradas (Figuras 14C).

Entonces, en ausencia de DA la actividad neuronal del estriado se caracteriza por la presencia de numerosos picos de sincronía de actividad espontánea por episodio (Figura 14C, abajo). Conteniendo un estado dominante con una alta probabilidad de aparición, la red neostriatal comprende numerosas neuronas que pertenecen a diferentes estados (Figura 14D). El estado dominante atrae a la mayoría de estas

neuronas: $80\pm 13\%$ (Figura 14E; n= 17 rebanadas) como se confirma por el análisis de grupos jerárquicos (Figura 14F). Cabe resaltar que algunas de las neuronas activas en la dinámica de red no forman parte del estado dominante. Estos experimentos nos demostraron que la actividad de red que se produce de forma espontánea en el microcircuito estriatal desnervado de sus proyecciones dopaminérgicas presenta una dinámica muy diferente a la del neostriado contralateral a la lesión y a la de animales intactos.

¿Qué genera ésta dinámica de red patológica?, ¿es posible modificarla?, gracias al tipo de preparación que desarrollamos es posible efectuar experimentos farmacológicos para resolver éstas y otras preguntas.

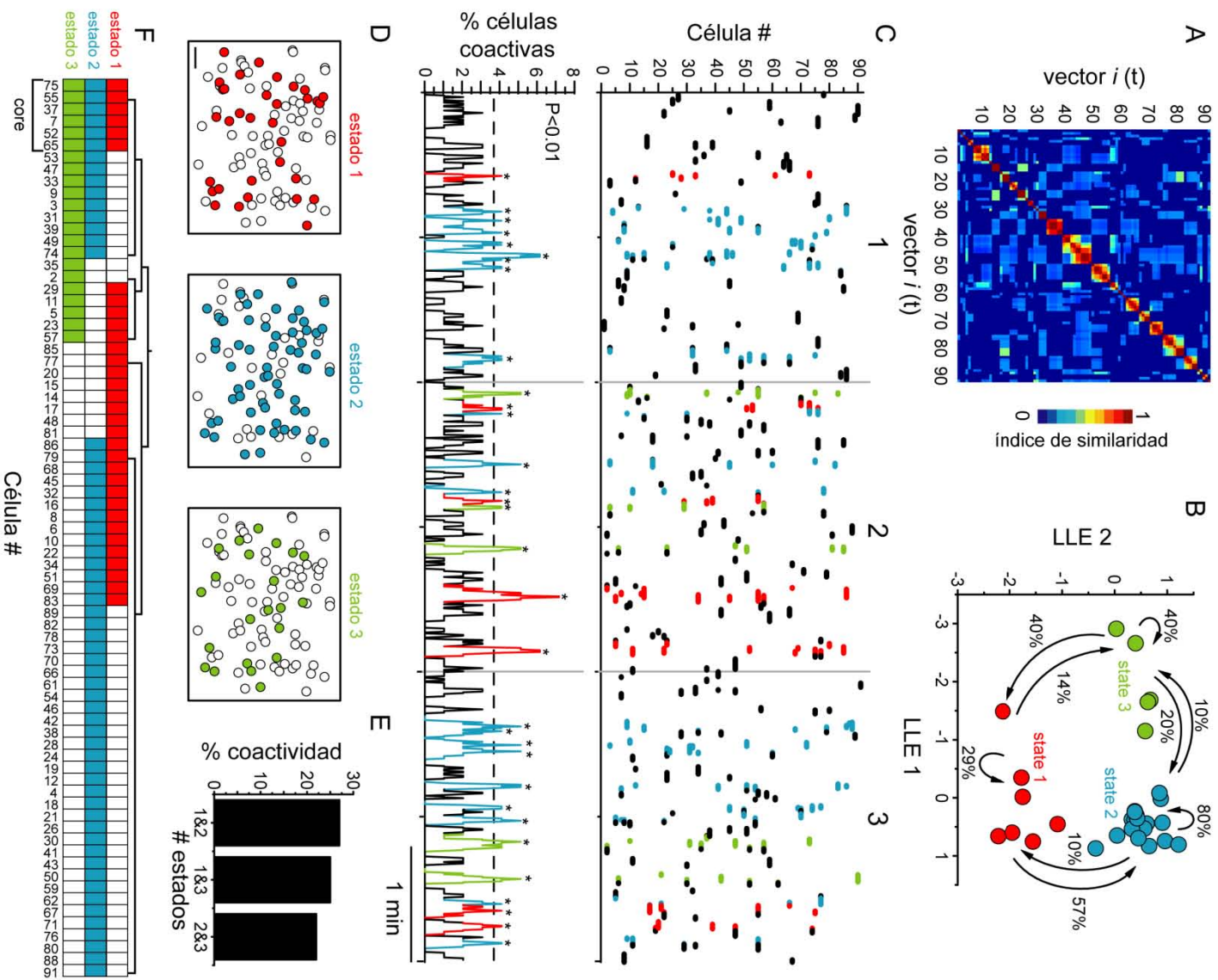


Figura 14. Dinámica del microcircuito neocortical en rebanadas de animales hemiparkinsonianos. A: Matriz de los índices de similitud de una rebanada representativa de una rata tratada con 6-OHDA (sin fármacos en el medio de perfusión). Nótese la recurrencia de estructuras cuadriculadas a través del tiempo, lo cual indica la similitud entre diferentes vectores. B: La reducción multidimensional de los estados de la red con LLE muestra un estado dominante (círculos azules) con una alta probabilidad de

recurrencia. C: Gráfica del comportamiento global del microcircuito neostriatal denervado. Los picos de sincronía están indicados con asteriscos. Los colores indican estados de la red diferentes. Existe una sincronía incrementada y la preferencia por permanecer en un estado. D: Mapa espacial que muestra los ensambles neuronales estriatales que mantienen los diferentes estados. Escala: 100 μ m. E: Células coactivas en diferentes estados. Existe un incremento en la participación de algunas células en varios estados. F: Ensamblen neuronales encontrados por el análisis jerárquico de grupos. Es importante resaltar la existencia de un ensamble central (core assembly) que participa en todos los estados.

7.4. Mecanismos sinápticos que subyacen los estados de red generados en ausencia de dopamina.

Se sabe que la denervación dopaminérgica incrementa la actividad sináptica glutamatérgica sobre las NEMs (Galarraga *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2001; Bamford *et al.*, 2004). Por lo tanto, nosotros quisimos determinar cuál era la participación de la transmisión glutamatérgica sobre la dinámica de esta red patológica. En la Figura 15 se aprecia cómo la aplicación de CNQX (10 μ M), antagonista de los receptores AMPA/Kainato, redujo el número de células activas de un 82 ± 12 células a 25 ± 10 células por campo de registro ($p < 0.006$; prueba *t* de Wilcoxon, $n = 10$ rebanadas).

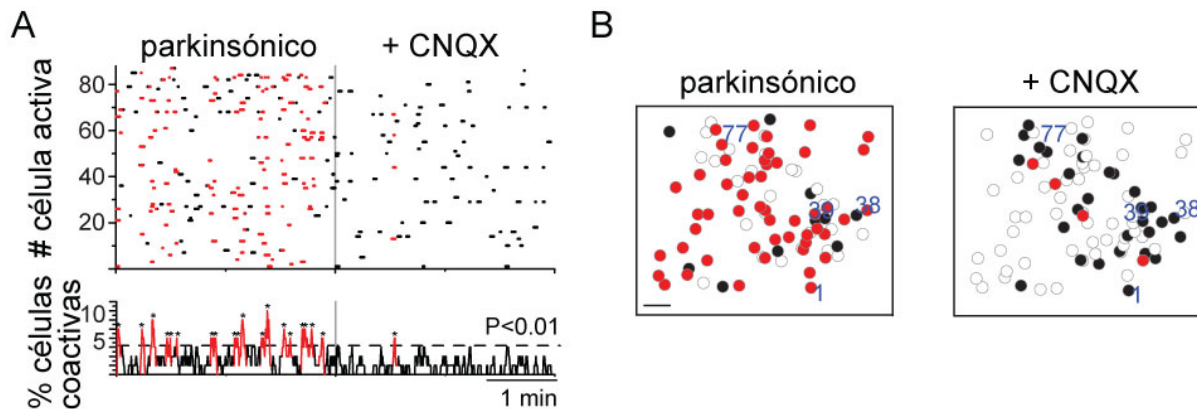


Figura 15. Inhibición de la transmisión glutamatérgica excitatoria mediada por los receptores AMPA/Kainato en la dinámica neostriatal en ausencia de dopamina. A: Gráfica tipo raster (arriba) e histograma de actividad (abajo) mostrando la actividad del núcleo estriado en un animal tratado con 6-OHDA antes (izquierda) y después (derecha) de la aplicación de CNQX. La hiperactividad neuronal y los picos de sincronía (rojos y asteriscos) casi desaparecieron después de la aplicación de CNQX. B: Mapa espacial mostrando la posición de las neuronas activas. Los círculos llenos representan a las células activas durante el registro; los círculos rojos representan a las neuronas involucradas en los picos de sincronía. Las neuronas indicadas con números azules fueron las que se mantuvieron activas en ambas condiciones.

De la misma manera, después de la inhibición de los receptores NMDA mediante su antagonista específico APV (50 μ M), el número de células activas disminuyó de 83 ± 14 a 33 ± 12 células ($p < 0.0007$; prueba t de Wilcoxon, $n = 15$ rebanadas) (Figura 16).

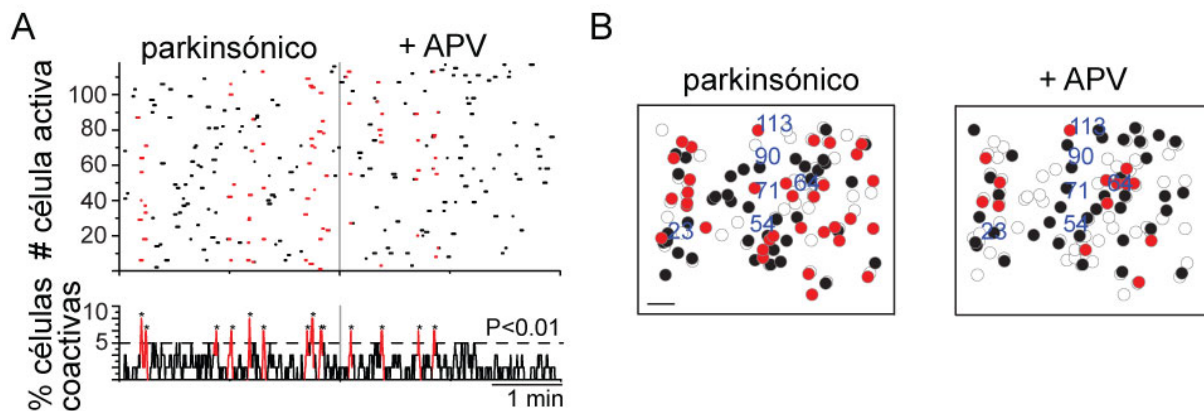


Figura 16. Inhibición de la transmisión glutamatérgica excitatoria mediada por los receptores NMDA en la dinámica neostriatal en ausencia de dopamina. A: Gráfica tipo raster (arriba) e histograma de actividad (abajo) mostrando la actividad del núcleo estriado en un animal tratado con 6-OHDA antes (izquierda) y después (derecha) de la aplicación de APV. La hiperactividad neuronal y los picos de sincronía (rojos y asteriscos) disminuyen después de la aplicación de APV. B: Mapa espacial mostrando la posición de las neuronas activas. Los círculos llenos representan las células activas durante el registro; los círculos rojos representan a las neuronas involucradas en los picos de sincronía. Los números azules indican a las neuronas que estuvieron activas en ambas condiciones.

De forma interesante, algunas neuronas permanecieron activas incluso después de la aplicación conjunta de ambos antagonistas glutamatérgicos (Figura 17).

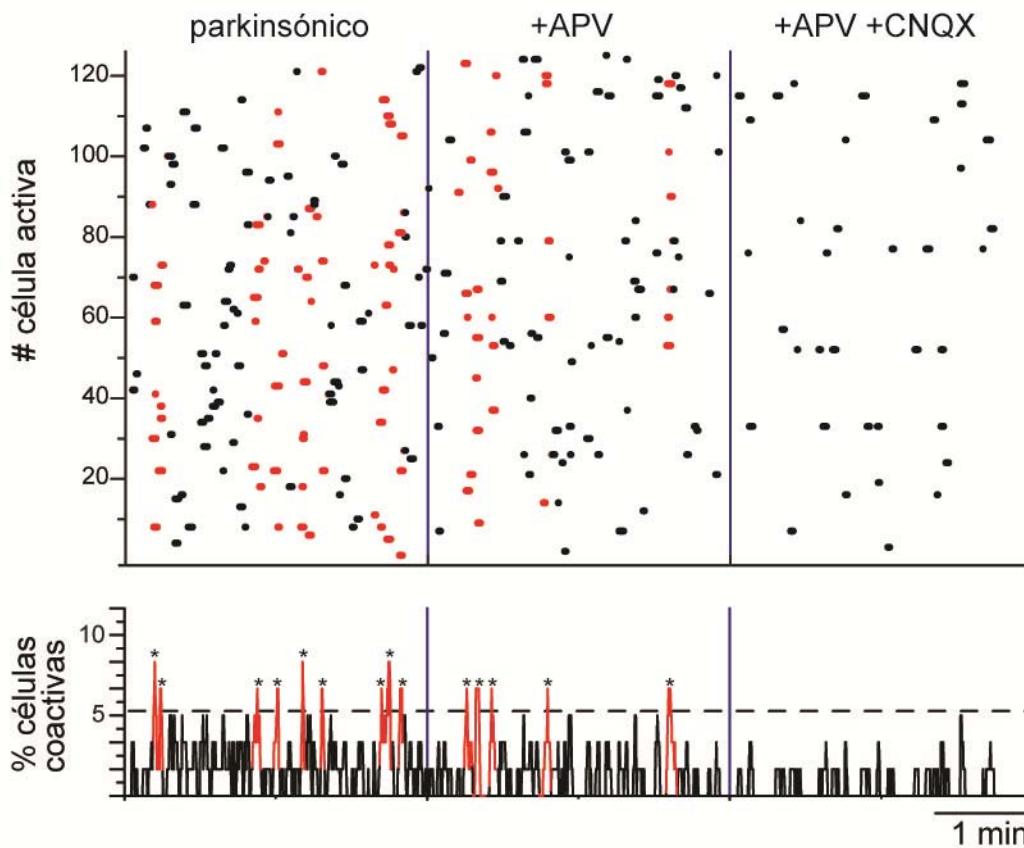


Figura 17. Participación de la transmisión glutamatérgica excitatoria. Gráfica tipo raster (arriba) e histograma de actividad (abajo) de la actividad parkinsoniana (izquierda), en presencia de APV (en medio) y en presencia de APC y CNQX (derecha). Algunas neuronas siguen presentando actividad aún en presencia de ambos antagonistas glutamatérgicos, pero esta actividad no presenta picos sincrónicos.

Por otro lado, las conexiones intraestriatales son en su mayoría de naturaleza GABAérgica (Czubayko y Plenz, 2002; Tunstall *et al.*, 2002; Guzman *et al.*, 2003; Koos *et al.*, 2004; Tepper *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2007; Tecuapetla *et al.*, 2007; Tecuapetla *et al.*, 2009) incluyendo a las sinapsis GABAérgicas entre NEMs, que se sabe que son importantes para el mantenimiento del disparo en ráfagas (Flores-Barrera *et al.*, 2009). La transmisión GABAérgica también es fundamental para mantener la transición de estados en la dinámica de red generada por la aplicación NMDA (Carrillo-

Reid *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la dopamina modula las conexiones sinápticas entre las NEMs (Guzman *et al.*, 2003; Tecuapetla *et al.*, 2007; Tecuapetla *et al.*, 2009) la fuerza de las cuales disminuyen después de la denervación dopaminérgica (Taverna *et al.*, 2008; Tecuapetla *et al.*, 2009; Flores-Barrera *et al.*, 2010).

Para estudiar la repercusión del bloqueo de la transmisión GABAérgica rápida en la red neocortical depletada de DA, agregamos 10 μ M de bicuculina en el baño (Figura 18). Ya que la denervación dopaminérgica reduce las conexiones inhibitorias entre las NEMs (Taverna *et al.*, 2008; Tecuapetla *et al.*, 2009) teníamos presente que el efecto total del bloqueo de la transmisión GABAérgica sobre toda la actividad neuronal estaría parcialmente ocluido. Nosotros encontramos que el bloqueo GABAérgico no se ve reflejado en el número de picos de sincronía por episodio de 180s: 12 ± 2 antes contra 10 ± 7 después de adicionar bicuculina ($n= 18$; $p > 0.36$ prueba t de Wilcoxon), confirmando nuestra predicción. Sin embargo, los mapas de pseudo color de índices de similitud mostraron un incremento en las estructuras agrupadas después de la aplicación de bicuculina (figura 18A). Cabe resaltar que después del bloqueo de la transmisión GABAérgica rápida las neuronas compartidas entre los distintos picos de sincronía (sobrelapamiento neuronal) cambió de un $24 \pm 3\%$ ($n= 25$) sin bicuculina a $32 \pm 3\%$ ($n= 23$) con bicuculina ($p < 0.001$; prueba U Mann-Whitney). Esta condición se ve reflejada como una restricción en la diversidad de los estados funcionales neuronales (Figura 18B). Entonces se puede decir que la pérdida de la transmisión GABAérgica puede facilitar al enganche de los vectores neuronales hacia un estado dominante (Figura 18B). El estado dominante después de la adición de bicuculina atrapa a la mayoría de las células activas (Figura 18C, véanse los picos

sincronía recurrentes, en color amarillos). La Figura 18D muestra la distribución espacial de las neuronas implicadas en cada estado de la red; cabe resaltar el gran número de neuronas que participa en el estado dominante. La proporción de células compartidas por los diferentes estados en ambas condiciones experimentales se muestra en la Figura 18 E.

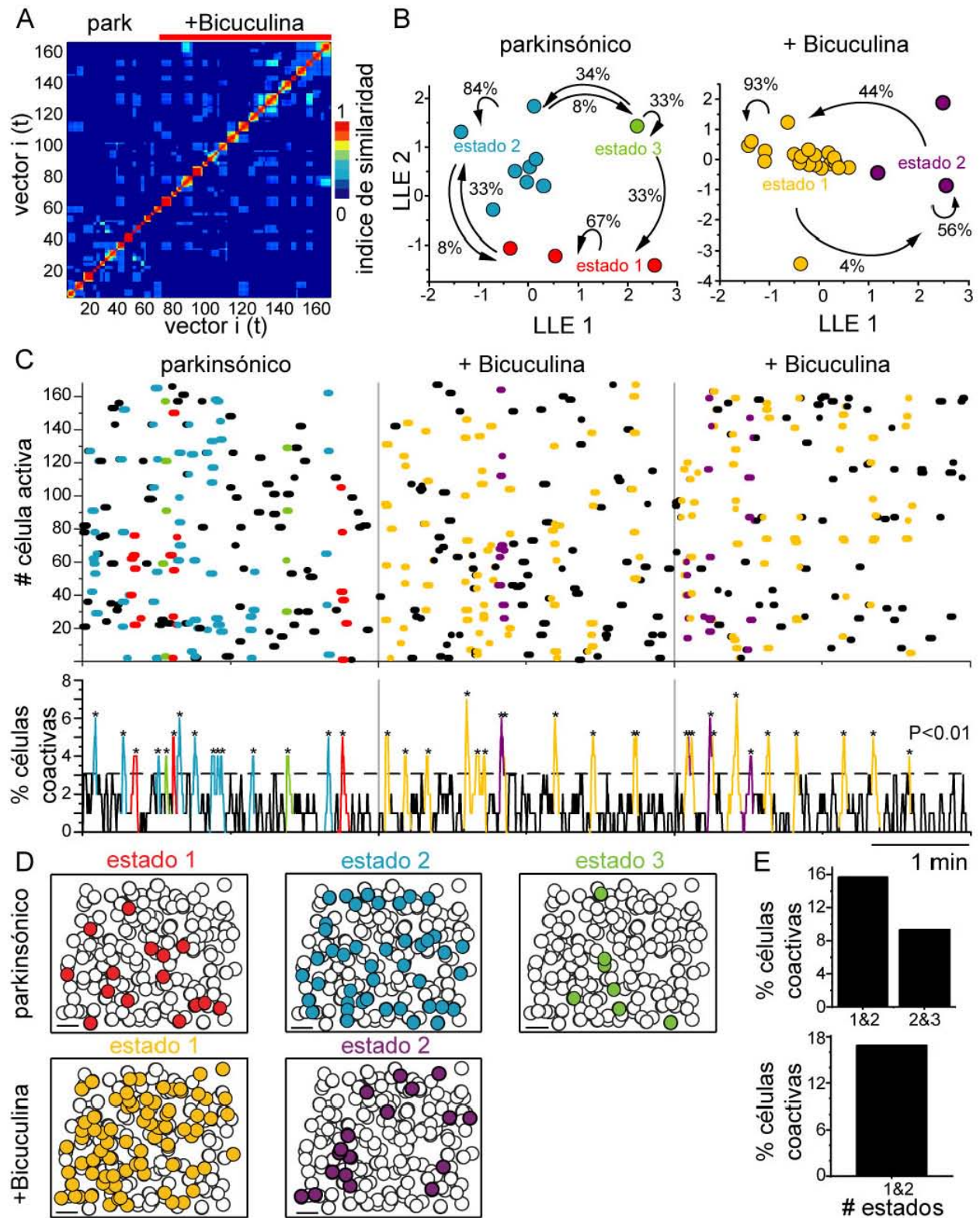


Figura 18. Efecto de la supresión de la transmisión GABAérgica rápida en la dinámica de red del neocórtico depletado de dopamina. A: Matriz de índices de similitud del estriado desnervado (park) y después de la aplicación de bicuculina, bloqueador del receptor GABA_A (10 μ M, línea roja). B:

Proyección LLE mostrando los ensamblajes neuronales antes (izquierda) y después (derecha) de la aplicación de bicuculina. Nótese que después de la aplicación de bicuculina el número de estados se reduce. C: Gráfica tipo raster (arriba) e histograma de la actividad global (abajo) revelando la dinámica de red en el estriado desnervado antes (izquierda) y después (en medio y derecha) de la aplicación del antagonista GABAérgico. Los colores muestran a las células pertenecientes a los diferentes estados de la red. D: Distribución espacial de la población neuronal perteneciente a los diferentes estados antes (arriba) y después (abajo) de la aplicación de bicuculina.

En un esfuerzo por recuperar al microcircuito del reclutamiento en el estado dominante que se encuentra por la ausencia de DA, decidimos agregar de forma aguda un agonista de los receptores dopaminérgicos. El mapa similitud de pseudo color de un experimento representativo muestra el cambio del patrón de las estructuras después de la aplicación de 1 μ M del agonista dopaminérgico específico para el receptor tipo D₁, SKF 81297 (Figura 19A). Con el registro de un episodio es suficiente para mostrar la dinámica patológica de las rebanadas en ausencia de DA (Figura 19B, izquierda). Después de la exposición a SKF 81297, se observa un decremento en el número de neuronas compartidas entre los diferentes vectores, de $26 \pm 3\%$ (n= 20) en la condición control, depletado de DA contra $20 \pm 3\%$ (n= 29) después de agregar al agonista D₁ ($p < 0.001$; prueba *U* Mann-Whitney; n = 4 rebanadas). El decremento en el número de neuronas compartidas por los vectores es reflejado en la restauración parcial de la capacidad de la red para generar diferentes estados (Figura 19B, derecha). Contrario a lo que se podría esperar, la adición del agonista dopaminérgico no disminuye la actividad global del neostriado; después de su aplicación la hiperactividad de la red neostriatal no se ve modificada. Los picos de sincronía continúan apareciendo (Figura 19C). La distribución espacial de las neuronas pertenecientes a distintos estados de la red se muestra en la Figura 19D. El porcentaje de neuronas compartidas por los

estados de la red antes y después de la adición de SKF 812397 se muestra en la Figura 19E.

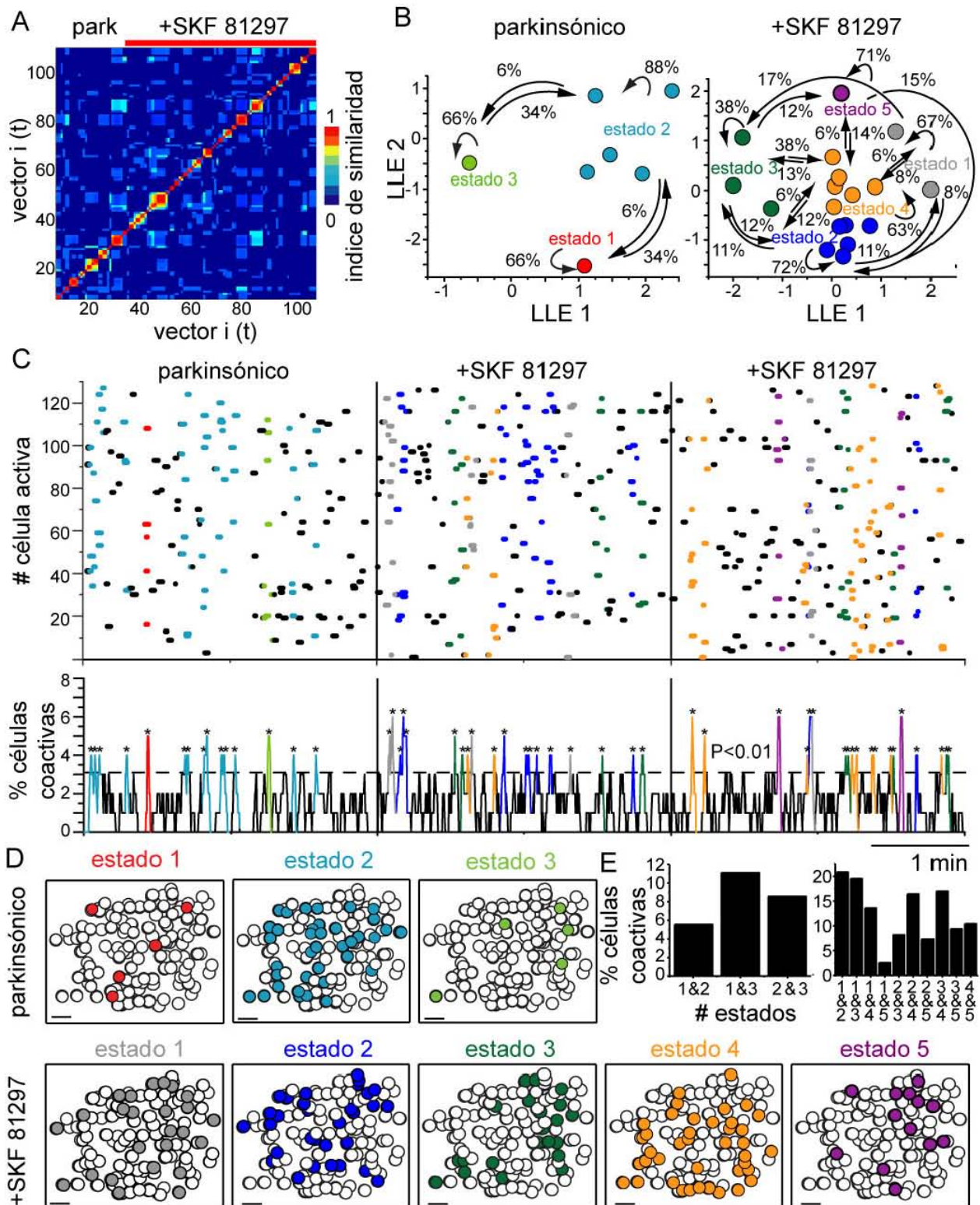


Figura 19. Efectos del agonista dopaminérgico. A: Índice de similitud del estriado desnervado antes y después de la aplicación del agonista al receptor D_1 (SKF 81297), $1\mu\text{M}$ (línea roja). B: Proyección LLE mostrando los ensambles neuronales del estriado desnervado antes (izquierda) y después de la

aplicación de SKF 81297 (derecha). Destaca la aparición de nuevos estados de la red sin preferencia por ninguno en particular (ausencia de estado dominante) después de la aplicación del agonista. C: Gráfica tipo raster (arriba) e histograma temporal (abajo) de la actividad global de la red, revelando la dinámica de red del estriado desnervado antes (izquierda) y después de la aplicación de SKF 81297 (en medio y derecha). Los colores representan a las células pertenecientes a los diferentes estados. D: Distribución espacial de los pools neuronales pertenecientes a los distintos estados antes (arriba) y después (abajo) de la aplicación de SKF 81297. E: Porcentaje de células coactivas en el estriado desnervado antes (izquierda) y después de la aplicación de SKF 81297 (derecha).

El incremento en la diversidad de los estados neuronales y de la actividad que poseen es un hallazgo importante que puede servir en un futuro para probar distintos agonistas bajo estas condiciones.

Hasta este punto, nuestra preparación nos permitió observar a la dinámica del microcircuito neoestriatal en distintas condiciones experimentales. Sin embargo revelar la identidad de los elementos implicados en esta dinámica no es cosa trivial. Para evaluar la participación las NEMs de la vía directa o indirecta fue necesario la utilización de ratones transgénicos BAC-EGFP acoplados a los receptores DRD1 y DRD2 respectivamente.

7.5. Participación de las NEMs de la vía directa en la dinámica de red en rebanadas sin dopamina

Desde 1989 Albin, Young y Penny propusieron el modelo de las “dos vías”, en donde la información que se genera en la corteza, viaja por dos rutas paralelas a través de los GB hacia el tálamo para regresar a la corteza. Bajo esta premisa se genera una hipótesis en donde un desbalance entre estas rutas podría explicar los principales síntomas motores de los pacientes con la EP (Albin *et al.*, 1989). El esquema de éste modelo propone que la pérdida de DA en el NE genera un decremento en la actividad de las neuronas de la vía directa y un aumento en las NEMs de la vía indirecta. El desbalance es apoyado por trabajos donde se muestra un cambio en la expresión

genética de las dos vías (Gerfen *et al.*, 1990) o bien por un incremento en las terminales sinápticas en el GPe después de la denervación dopaminérgica (Ingham *et al.*, 1997). Si bien, esta evidencia da soporte al modelo de Albin, hasta la fecha no se ha logrado demostrar que durante la EP alguna clase de NEM gobierne la dinámica red estriatal. Por lo anterior, nosotros quisimos retar al modelo evaluando la participación de las NEMs de la vía directa en la dinámica de red el estriado depletado de DA.

Para responder a nuestra hipótesis, el primer paso en la identificación de los elementos neuronales dentro de la dinámica patológica consistió en el traslado de nuestra preparación experimental al modelo parkinsonico en ratón. Después de la eliminación de la vía *nigro*-estriatal mediante la inyección unilateral de 6-OHDA en la SNc (véase métodos), la dinámica de red fue observada y estudiada de la misma manera que al NE de las ratas hemiparkinsonicas.

Pudimos observar que al igual que en el modelo en rata la denervación dopaminérgica en ratones reveló actividad neuronal incrementada en el NE, dentro de éste incremento se encontró actividad sincrónica entre los distintos elementos a lo largo del tiempo (14.4 ± 3.6 picos por episodio) . Situación opuesta con las rebanadas cortico-estriatales de ratones sanos donde la actividad espontánea es menor y casi no se presentan periodos de sincronía (0.6 ± 0.8 picos por episodio, $p < 0.0001$; prueba Mann-Whitney U, $n=5$ rebanadas). Entonces, en ausencia de DA se genera un incremento en la actividad espontánea dentro del NE en ambos modelos de la enfermedad de Parkinson. Analizar ésta dinámica de red patológica de la misma forma en la que fue analizada la dinámica en rata (visualizando su ensamble neuronal), es un

paso crucial para la comparación y corroboración de nuestras hipótesis en ambos modelos, así, como la identificación de los elementos involucrado en dicha dinámica.

De la misma forma que en modelo de rata, los picos de actividad sincrónica observados en los experimentos fueron seleccionados y vectorizados (bin=250ms, ver métodos). Se calcularon los índices de similitud entre los distintos vectores y estos fueron graficados en un el mapa de pseudo-color revelando estructuras tipo mosaico similares a las observadas la dinámica patológica en rata (Figura 20A). Más aún, la dinámica de red extraída de los datos multidimensionales revelo que un estado dominante dentro de la dinámica de red también se presenta en el NE de ratón depletado de DA (Figura 20B). Este estado dominante comprende a la mayoría de de los vectores (picos de sincronía) presentes en el registro, mostrando una alta probabilidad de recurrencia y poca alternancia entre los distintos estados (Figura 20B, círculos rojos; el porcentaje indica la probabilidad de la red de dejar o recaer en un estado determinado). La gráfica tipo raster muestra al pool neuronal implicado en los diferentes estados de la red en la serie de videos (Figura 20C).

Entonces podríamos decir que al igual que en el modelo de rata, cuando el NE de ratón pierde sus aferencias dopaminérgicas su actividad de red se caracteriza por un aumento en la actividad espontánea y por la presencia de numerosos picos de sincronía a lo largo del tiempo (Figura20C, abajo). Un estado dominante con una alta probabilidad de recurrencia y aparición gobierna a la dinámica, dicho estado comprende a la mayoría de las neuronas activas en los picos de sincronía (Figura 20E y F). Estos experimentos nos revelaron que la dinámica de red en ausencia de DA del

microcircuito neocortical de ratón se comporta de una manera muy similar a la observada en el NE de rata (Figura 14).

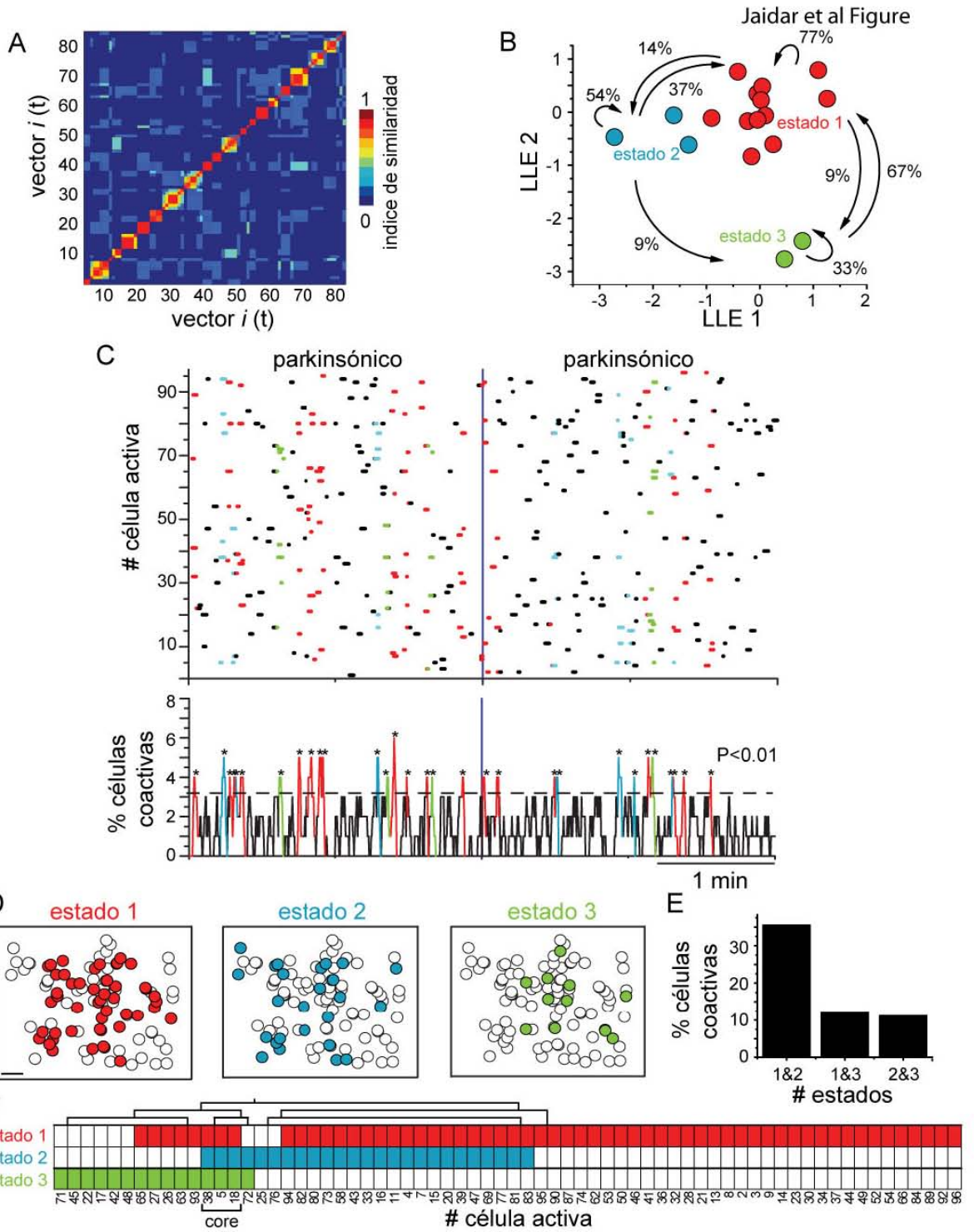


Figura 20. Dinámica del microcircuito neostriatal en rebanadas de ratón hemiparkinsonianos. A: Matriz de los índices de similitud de una rebanada representativa de un ratón tratado con 6-OHDA. B: La reducción multidimensional de los estados de la red con LLE muestra un estado dominante (círculos rojos) con una alta probabilidad de recurrencia. C: Gráfica tipo raster del comportamiento global del microcircuito neostriatal desnervado. Los picos de sincronía están indicados con asteriscos. Los colores indican estados de la red diferentes. Nótese la recurrencia de los picos rojos D: Mapa espacial que muestra los ensambles neuronales estriatales que mantienen los diferentes estados. Escala: 100 μ m. E: Células coactivas en diferentes estados. Existe un incremento en la participación de algunas células en varios estados. F: Ensambls neuronales encontrados por el análisis jerárquico de grupos. Es importante resaltar la existencia de un ensamble central (core) que participa en todos los estados.

Así, gracias a la expresión de la proteína GFP en las neuronas pertenecientes al a vía directa (DRD1-EGFP) es posible identificar y seguir la actividad electrofisiológica de estas neuronas durante nuestros registros de la dinámica de red estriatal (Figura 21).

Nuestros resultados revelan que al contrario de lo que predice el modelo de Albin, un alto porcentaje de neuronas de la vía directa se encuentran espontáneamente activas en la dinámica sin DA ($33\% \pm DE$, figura 21A) distribuidas a lo largo del campo de registro (Figura 21B). Los picos de actividad sincrónica no muestran una homogeneidad en el tipo neuronal que los componen y todos los estado de la dinámica de red están conformados por un alto porcentaje de neuronas de la vía directa (Figura 21C).

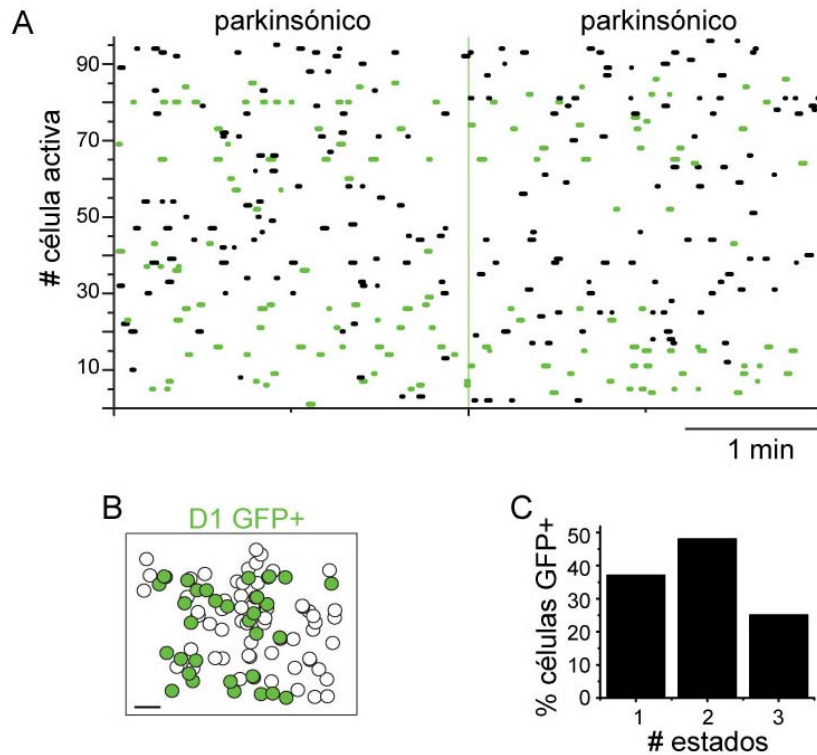


Figura 21. Participación de las NEMs en la dinámica de red sin DA. A: Gráfica tipo raster de la actividad global del microcircuito neoestriatal sin DA. Los puntos verdes representan ráfagas de potenciales de acción pertenecientes a NEMs de la vía directa, cabe resaltar el alto porcentaje de neuronas activas (~33%). B: Mapa espacial que muestra la localización en el video de las NEMs de la vía directa (círculos verdes) y al resto de las neuronas activas durante el video (círculos vacíos), escala: 100 μ m. C: Porcentaje de NEMs involucradas en los diferentes estados de la dinámica de red mostrados en la figura 21.

El hecho de que la dinámica estriatal generada por la eliminación de las aferentes dopaminérgicas no esté gobernada por un solo tipo de NEM, nos genera una nueva pauta para poder descifrar las diferentes modificaciones del microcircuito NE durante la EP.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra que la dinámica de red espontánea del microcircuito neostriatal parkinsoniano difiere de forma notoria al observarse en rebanadas cortico-estriatales del lado control, como en animales intactos en dos especies de roedores distintos. Las neuronas estriatales que en condiciones control permanecen la mayor parte del tiempo en silencio, se vuelven hiperactivas y por lo general se sincronizan entre ellas al eliminar las aferencias dopaminérgicas, presentando un estado dominante dentro de la dinámica de red que atrapa a la mayoría de las células activas. Este comportamiento de red también difiere al comportamiento inducido por NMDA en el neostriado normal, donde los estados de red son definidos por grupos específicos de neuronas que presentan una actividad sincrónica recurrente y alternada. La hiperactividad y el enganche de las neuronas activas en un estado dominante son neutralizados o aumentados por los antagonistas glutamatérgicos y GABAérgicos, respectivamente. El enganche en un estado dominante es abolido después de la activación de los receptores dopaminérgicos D1 (Figura 22. El hecho de que este tipo de comportamientos puedan ser observados en

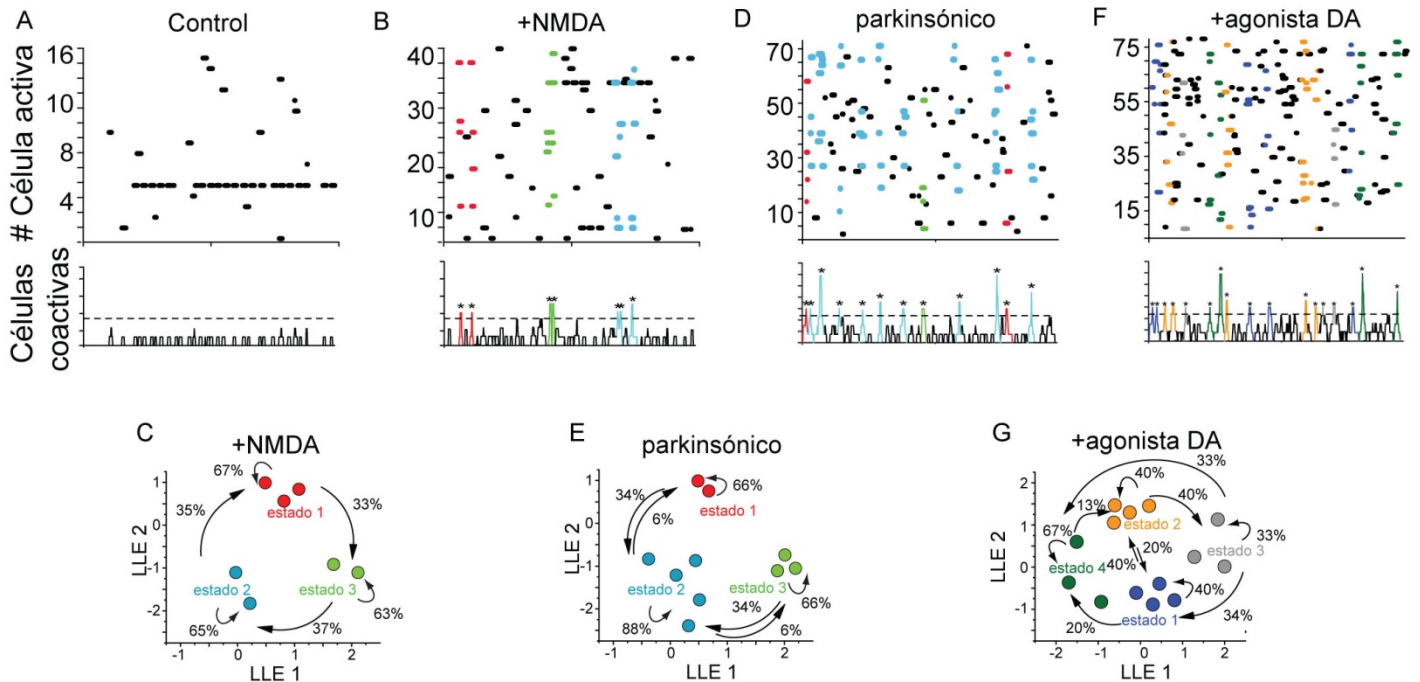


Figura 22. Siguiendo al microcircuito neostriatal con imagenología de calcio. A: Arriba: Gráfica tipo raster mostrando la poca actividad espontánea en condiciones control. Abajo; histograma representando a las células coactivas mostradas en la gráfica tipo raster (suma de columnas). B: Arriba: Después de la adición de $8\mu\text{M}$ de NMDA en el baño más células se tornan activas (>40 células). Los puntos de colores muestran a las células involucradas en picos sincrónicos pertenecientes a distintos estados de la red. C: Ensamble neuronal de la dinámica de red en presencia de NMDA. Nótese como la red va cambiando de un estado a otro sin preferencia alguna. D: Arriba: Gráfica tipo raster de la dinámica de red después de eliminar las aferentes dopaminérgicas (parkinsonico). Cabe destacar que la actividad espontánea está muy incrementada con respecto a la condición control e incluso es mayor a la inducida por NMDA (>70 células). Abajo: histograma de actividad mostrando los picos de sincronía celular espontáneamente formados. El número de picos no sólo es mayor al observado en la dinámica generada por NMDA, también, la presencia de un estado dominante (picos azules) resalta con respecto a los otros. E: LLE de la dinámica de red parkinsonica mostrando el estado dominante (puntos azules). F: Adición de un agonista dopaminérgico (SKF-81296) a la dinámica de red parkinsonica. Aunque la actividad espontánea sigue incrementada la alternancia entre los distintos elementos del pool neuronal se incrementa. G: LLE muestra que la dinámica del microcircuito tiende a recuperarse, eliminando al estado dominante.

un pequeño campo de registro, sugiere que el microcircuito puede ser visto como una unidad modular cuya actividad puede reflejarse en una función de un circuito mayor, constituyendo una interface entre la actividad neuronal de célula única y una función cerebral global. El estudio y comprensión del microcircuito podría revelar las reglas

intrínsecas y sinápticas que gobiernan los comportamientos normales y patológicos de las redes neuronales: Los resultados de este trabajo apoyan la noción de que la denervación dopaminérgica se correlaciona con el incremento, y no con el decremento, de la actividad del microcircuito neostriatal. Estos resultados también fueron consistentes con el decremento de la inhibición lateral entre NEMs y el incremento de la entrada excitatoria en el estriado parkinsoniano. Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con el modelo de las dos vías, presentando un incremento en la actividad de las neuronas estriato-nigrales y no sólo de las estriato-palidales.

7.1. Actividad de red local parkinsoniana

Las neuronas estriatales *in vivo* presentan poca actividad espontánea durante estados basales, cuando no se encuentran relacionadas a alguna tarea específica. (Crutcher y DeLong, 1984; Kimura, 1992; Liang *et al.*, 2008; Vautrelle *et al.*, 2009). La pérdida de las aferentes dopaminérgicas genera un incremento en la actividad espontánea de las NEMs tanto *in vitro* como *in vivo* (Galarraga *et al.*, 1987; Raz *et al.*, 1996; Tseng *et al.*, 2001; Goldberg *et al.*, 2004; Day *et al.*, 2006; Uhlhaas y Singer, 2006; Liang *et al.*, 2008; Zold *et al.*, 2009). Esta hiperactividad ha sido asociada con síntomas de la EP como la acinesia, rigidez muscular y temblor de las extremidades (Costa *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2009; Walters y Bergstrom, 2009; Fuentes *et al.*, 2010). No obstante, el mecanismo de red que subyace a esta hiperactividad no había sido estudiado debido a las limitantes del registro de célula única (Kimura, 1992; Courtemanche *et al.*, 2003; Berke *et al.*, 2004; Goldberg *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008; Blume y Tseng, 2009; Fuentes *et al.*, 2009). Aquí demostramos que con la preparación *in vitro* que hemos desarrollado es posible observar la dinámica de

calcio neuronal del microcircuito neostriatal bajo distintas condiciones (animales normales y tratados con 6-OHDA) y en distintas especies de roedores (rata Wistar y ratones BAC-EGFP). Esta técnica nos permite el registro simultáneo de la actividad eléctrica de docenas de células con resolución de célula única. Además de tener libre acceso a la aplicación de neurotransmisores y drogas por medio de la perfusión permitiendo observar los cambios en la dinámica de red a través de la reducción dimensional de la actividad de red vectorizada (Cossart *et al.*, 2003; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Estos permiten hacer una comparación rigurosa entre los distintos estados de la red a lo largo del tiempo (Barnes *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2007). Más aún, gracias a la utilización de ratones transgénicos nos es posible la identificación de los diferentes tipos neuronales dentro de la dinámica de red.

La actividad observada en rebanadas cortico-estriatales de animales control (sin tratamiento), presentan poca actividad y de manera esporádica. Por otra parte, la dinámica de red inducida por NMDA en el neostriado muestra contiene distintos estados de red con igual probabilidad de recurrencia. Los pools neuronales que generan estos estados alternan su actividad sincrónica revelando patrones espaciotemporales de caminos recurrentes auto-organizados (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a). El flujo de la actividad ha sido considerado como una propiedad de ensamble neuronal por las trayectorias que forma entre los diferentes estados de la red (Hebb, 1949; Harris, 2005). En contraste, el circuito parkinsónico se caracteriza por el surgimiento de un estado dominante, compuesto por ambas poblaciones de NEMs, con una alta probabilidad de incidencia que absorbe a casi todas las neuronas activas en el campo de registro. El número de transiciones entre los

estados disminuye. Esto se debe a la alta recurrencia del estado dominante que impide la alternancia entre las neuronas del circuito, pudiendo reflejarse en la incapacidad alternar distintos programas o actos motores (Olsson *et al.*, 1995; Hutchison *et al.*, 2004; Uhlhaas y Singer, 2006; Fuentes *et al.*, 2009; Walters y Bergstrom, 2009) y no a la participación exagerada de una NEM específica (MSN-D2), cómo postula el modelo de Albin. Sin embargo, aunque esta dinámica posee un número reducido de estados, la actividad neuronal y los picos de sincronía son mayores en frecuencia y número comparados con los generados con NMDA. Para recuperar la posibilidad de transitar entre distintas secuencias de actividad es necesaria la supresión del estado dominante, restableciendo así la actividad cíclica (Grillner, 2006). En presencia del agonista dopaminérgico se observó un incremento en las transiciones de los estados en la dinámica de red, probablemente generado por el reclutamiento de nuevos elementos en esta dinámica.

7.2. Mecanismos que subyacen al comportamiento anormal del neostriado parkinsoniano

Los síntomas de la enfermedad de Parkinson surgen con la pérdida de la vía nigro-estriatal (Carlsson, 1972; Zgaljardic *et al.*, 2003). La ausencia de dopamina aumenta la entrada excitatoria cortico-estriatal, siendo esta la principal fuente de la hiperactividad (Galarraga *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2008; Blume y Tseng, 2009; Zold *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que existe un decremento de la inhibición lateral entre las neuronas principales (Tecuapectla *et al.*, 2007; Taverna

et al., 2008), volviéndose éste otra posible causa de la hiperexcitabilidad (Costa *et al.*, 2006; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). En este trabajo mostramos que el bloqueo de las sinapsis glutamatérgicas reduce tanto la hiperactividad como la sincronía en el circuito parkinsoniano. La activación de las NEMs por medio de los receptores AMPA resultó ser crucial para la dinámica de red patológica ya que su bloqueo produce una disminución dramática en el número de picos de sincronía (Day *et al.*, 2006; Calabresi *et al.*, 2007; DeLong y Wichmann, 2007; Flores-Barrera *et al.*, 2009). El bloqueo de los receptores NMDA también disminuyen la hiperactividad y sincronía, indicando la importancia de los potenciales tipo plateau dentro de la dinámica de red para la generación de comandos de salida (Schiller y Schiller, 2001; Vergara *et al.*, 2003; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Flores-Barrera *et al.*, 2009). El aumento de la entrada excitatoria (Tseng *et al.*, 2001; Bamford *et al.*, 2004; Calabresi *et al.*, 2007) puede ser resultado ya sea de la falta de modulación dopaminérgica en las terminales presinápticas de las aferentes glutamatérgicas (Flores-Hernández *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2001; Bamford *et al.*, 2004) o bien por la alteración en otro sistema de transmisión, como el sistema colinérgico (ver Carrillo-Reid *et al.*, 2009a), y las propiedades neuronales intrínsecas (Galarraga *et al.*, 1999; Day *et al.*, 2006; Carrillo-Reid *et al.*, 2009b).

Las conexiones inhibitorias entre las NEMs son esenciales para la alternancia de actividad entre las distintas neuronas del circuito como también para mantener los potenciales tipos plateau y la actividad en ráfagas (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Flores-Barrera *et al.*, 2009). Cuando las sinapsis GABAérgicas son bloqueadas dentro de la dinámica de red del neostriado normal generada por la presencia de NMDA, la dinámica de red se engancha en un estado dominante (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Por

lo tanto, el enganche dentro de un estado dominante puede resultar de la interacción limitada entre las neuronas estriatales (Mizuno *et al.*, 2007; Tecuapetla *et al.*, 2007; Taverna *et al.*, 2008; Tecuapetla *et al.*, 2009). Sin embargo, el bloqueo de los receptores a DA o la eliminación de las terminales no es capaz de disgregar las conexiones fuertes entre las neuronas de la vía indirecta (neuronas con receptores dopaminérgicos tipo D₂) (Tecuapetla *et al.*, 2009) y las sinapsis inhibitorias provenientes de interneuronas GABAérgicas (Tepper *et al.*, 2004; Tecuapetla *et al.*, 2007; Dehorter *et al.*, 2009). Esto sugiere que las sinapsis GABAérgicas específicas tienen distintos papeles dentro de la modulación de la dinámica de red (Berke *et al.*, 2004; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Gittis *et al.*, 2010; Planert *et al.*, 2010). El bloqueo de la inhibición GABAérgica restante en el estriado parkinsónico produce un estado dominante aún más recurrente, sugiriendo que las conexiones intraestriatales son esenciales en el procesamiento de la información cortical y la generación de comandos con patrones espaciotemporales.

7.3. Participación de la vía directa en el circuito neostriatal Parkinsónico

Una de las razones por la cual el modelo original de Albin ha sido utilizado por los últimos veinte años es, en gran parte, por las sugerencias terapéuticas que el modelo arroja; proponiendo una relación directa entre la reducción de la actividad en las NEMs de la vía indirecta y la generación de movimientos (Albin *et al.*, 1989).

Nuestros resultados indican que no sólo las neuronas de la vía indirecta están implicadas en la actividad espontánea del microcircuito NE parkinsónico, encontrándose un alto porcentaje de NEMs de la vía directa con actividad eléctrica

espontánea durante toda la dinámica patológica, formando parte de todos los estados de la dinámica de red. Si bien estos resultados son controversiales, concuerdan con trabajos anteriores en donde la modificación de la actividad de los núcleos intermedios involucrados en el flujo de información de la vía indirecta, cuya actividad según el modelo estaría inhibiendo los movimientos, no basta para generar mejoras motoras (Dejean *et al.*, 2009; Gradinaru *et al.*, 2009). Por otro lado, un estímulo en la capa V de la corteza cerebral (Gradinaru *et al.*, 2009) o una activación masiva de las NEMs de la vía directa (Kravitz *et al.*, 2010) alivian los síntomas motores en animales parkinsonianos, demostrando que es necesario una fuerte entrada sináptica o una estimulación intrínseca masiva para sacar al microcircuito neostriatal de su ensamble enganchado y así generar movimientos.

Nuestros datos sugieren que en ausencia de DA el microcircuito neostriatal genera una actividad de red espontánea cuya dinámica aberrante involucra a la mayoría de las neuronas disponibles tanto de la vía directa como de la indirecta. La dinámica patológica podría ser responsable de no permitir la integración, generación y terminación de conductas motoras nuevas (Jaidar *et al.*, 2010; Costa, 2011) y no así la supuesta hiperactividad de las NEMs de la vía indirecta (Albin *et al.*, 1989; Gerfen *et al.*, 1990; Ingham *et al.*, 1997).

7.4. Relevancia fisiológica

El disparo sincrónico neuronal refleja la actividad coordinada de redes específicas (Singer, 1999; Barnes *et al.*, 2005; Fries *et al.*, 2007; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Graybiel, 2008). La activación secuencial sincrónica de los pools neuronales genera patrones

espaciotemporales que pueden explicar procesos como la memoria de procedimientos y la formación de hábitos (Barnes *et al.*, 2005; Harris, 2005; Graybiel, 2008; Uhlhaas *et al.*, 2009). Los estados patológicos surgen de reglas similares a aquellas que gobiernan los estados fisiológicos, pero de una manera más frecuente y en situaciones menos moduladas (Costa *et al.*, 2006; Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a; Walters y Bergstrom, 2009). De esta forma, enfermedades como la epilepsia, esquizofrenia, desordenes obsesivo compulsivos, demencia, Alzheimer, Huntington y la enfermedad de Parkinson han sido asociadas con procesos de sincronización anormal (Uhlhaas y Singer, 2006; Hammond *et al.*, 2007; Kreitzer y Malenka, 2008; Uhlhaas *et al.*, 2009) cuyos mecanismos celulares aún no son comprendidos.

En este trabajo, demostramos por primera vez la reconfiguración dramática que presenta la dinámica de red a nivel de microcircuito después de la denervación dopaminérgica. La actividad aberrante y sincronización aumentada puede ocasionar generadores de patrones anómalos (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2009) compuestos por un estado neuronal dominante que absorbe a la mayoría de las neuronas activas y que comprende a ambas poblaciones de NEMs, formando un ensamble neuronal característico que a través del tiempo obliga a la red a ejecutar de forma repetitiva una misma configuración, impidiendo el flujo normal de información. A largo plazo, estas anomalías pueden generar grandes modificaciones en el cableado del microcircuito producidas por mecanismos de plasticidad (Pisani *et al.*, 2005; Day *et al.*, 2006). Cuando una proporción considerable del pool neuronal forma parte de un ensamble neuronal improductivo, la disponibilidad de las neuronas para generar procedimientos voluntarios podría disminuir de forma importante (Brown, 2007;

Hammond *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2009). Los experimentos presentados en esta tesis muestran que las técnicas de imagenología de calcio en rebanadas del estriado desprovistas de sus aferentes dopaminérgicas y la utilización de ratones transgénicos pueden ayudar seguir la actividad de los distintos elementos de la red y a contrastar el comportamiento del microcircuito neostriatal normal y el patológico, generando pistas para comprender las acciones fisiológicas de agentes terapéuticos potenciales, lo que abre un camino para la caracterización de un novedoso bioensayo *in vitro*.

8. REFERENCIAS

- Ahlskog JE, Muentner MD (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16:448-458.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* 85:119-146.
- Arieli A, Sterkin A, Grinvald A, Aertsen A (1996) Dynamics of ongoing activity: explanation of the large variability in evoked cortical responses. *Science* 273:1868-1871.
- Bamford NS, H. Z, Schmitz Y, Wu NP, Cepeda C, Levine MS, Schmauss C, Zakharenko SS, Zablow L, Sulzer D (2004) Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* 42:653-663.
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1988) Electrotonic properties of neostriatal neurons are modulated by extracellular potassium. *Exp Brain Res* 72:390-398.
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989) An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res* 75:146-156.
- Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, Pineda JC, Galarraga E (1999) Ca²⁺-activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 88:479-488.

- Barnes TD, Kubota Y, Hu D, Jin DZ, Graybiel AM (2005) Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature* 437:1158-1161.
- Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res* 175:191-217.
- Benabid AL, Chabardes S, Mitrofanis J, Pollak P (2009) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 8:67-81.
- Bennett BD, Bolam JP (1993) Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat. *Brain Res* 609:137-148.
- Bennett BD, Bolam JP (1994) Localisation of parvalbumin-immunoreactive structures in primate caudate-putamen. *J Comp Neurol* 347:340-356.
- Bennett BD, Callaway JC, Wilson CJ (2000) Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20:8493-8503.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72:507-520.
- Berke JD, Okatan M, Skurski J, Eichenbaum HB (2004) Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron* 43:883-896.
- Bevan MD, Booth PA, Eaton SA, Bolam JP (1998) Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *J Neurosci* 18:9438-9452.

- Bjorklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. Trends Neurosci 30:194-202.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. Prog Neurobiol 62:63-88.
- Blume SR, Tseng KY (2009) Leading toward a unified cortico/basal ganglia functional model. In: Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson Disease (Tseng KY, ed), pp 3-22. New York: Humana/Springer.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. J Anat 196 (Pt 4):527-542.
- Bolam JP, Ingham CA, Izzo PN, Levey AI, Rye DB, Smith AD, Wainer BH (1986) Substance P-containing terminals in synaptic contact with cholinergic neurons in the neostriatum and basal forebrain: a double immunocytochemical study in the rat. Brain Res 397:279-289.
- Brown P (2007) Abnormal oscillatory synchronisation in the motor system leads to impaired movement. Curr Opin Neurobiol 17:656-664.
- Brown P, Williams D (2005) Basal ganglia local field potential activity: character and functional significance in the human. Clin Neurophysiol 116:2510-2519.
- Brown SP, Hestrin S (2009) Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. Nature 457:1133-1136.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Proc Natl Acad Sci U S A 80:4546-4550.

- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30:211-219.
- Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Sancesario G, Morello M, Giorgi M, Pisani A, Bernardi G (1999) A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci* 19:2489-2499.
- Calvin WH, Stevens CF (1968) Synaptic noise and other sources of randomness in motoneuron interspike intervals. *J Neurophysiol* 31:574-587.
- Carlsson A (1972) Biochemical and pharmacological aspects of Parkinsonism. *Acta Neurol Scand Suppl* 51:11-42.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibanez-Sandoval O, Hernandez-Cruz A, Galarraga E, Vargas J (2009a) Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 101:737-749.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernandez-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Vargas J (2008) Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99:1435-1450.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Vautrelle N, Hernandez A, Vergara R, Galarraga E, Vargas J (2009b) Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J Neurophysiol* 102:682-690.
- Chang HT, Kita H (1992) Interneurons in the rat striatum: relationships between parvalbumin neurons and cholinergic neurons. *Brain Res* 574:307-311.
- Chesselet MF, Graybiel AM (1986) Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience* 17:547-571.

- Chevalier G, Vacher S, Deniau JM, Desban M (1985) Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. I. The striato-nigral influence on tecto-spinal/tecto-diencephalic neurons. *Brain Res* 334:215-226.
- Cossart R, Aronov D, Yuste R (2003) Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423:283-288.
- Cossette M, Levesque D, Parent A (2005) Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum. *Parkinsonism Relat Disord* 11:277-286.
- Costa RM (2011) A selectionist account of de novo action learning. *Curr Opin Neurobiol*.
- Costa RM, Lin SC, Sotnikova TD, Cyr M, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicoletis MA (2006) Rapid alterations in corticostriatal ensemble coordination during acute dopamine-dependent motor dysfunction. *Neuron* 52:359-369.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) L-dopa in parkinson's syndrome. *N Engl J Med* 281:272.
- Courtemanche R, Fujii N, Graybiel AM (2003) Synchronous, focally modulated beta-band oscillations characterize local field potential activity in the striatum of awake behaving monkeys. *J Neurosci* 23:11741-11752.
- Crutcher MD, DeLong MR (1984) Single cell studies of the primate putamen. II. Relations to direction of movement and pattern of muscular activity. *Exp Brain Res* 53:244-258.
- Czubayko U, Plenz D (2002) Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15764-15769.

- Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9:251-259.
- Dehorter N, Guigoni C, Lopez C, Hirsch J, Eusebio A, Ben-Ari Y, Hammond C (2009) Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *J Neurosci* 29:7776-7787.
- Dejean C, Hyland B, Arbuthnott G (2009) Cortical effects of subthalamic stimulation correlate with behavioral recovery from dopamine antagonist induced akinesia. *Cereb Cortex* 19:1055-1063.
- DeLong MR, Wichmann T (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64:20-24.
- Deniau JM, Chevalier G (1985) Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. II. The striato-nigral influence on thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus. *Brain Res* 334:227-233.
- Diesmann M, Gewaltig MO, Aertsen A (1999) Stable propagation of synchronous spiking in cortical neural networks. *Nature* 402:529-533.
- Doig NM, Moss J, Bolam JP (2010) Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci* 30:14610-14618.
- Doupe AJ, Solis MM, Kimpo R, Boettiger CA (2004) Cellular, circuit, and synaptic mechanisms in song learning. *Ann N Y Acad Sci* 1016:495-523.

- Dubach M, Schmidt R, Kunkel D, Bowden DM, Martin R, German DC (1987) Primate neostriatal neurons containing tyrosine hydroxylase: immunohistochemical evidence. *Neurosci Lett* 75:205-210.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Stenevi U, Iversen SD (1981) Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res* 215:147-161.
- Fahn S (2003) Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 991:1-14.
- Flores-Barrera E, Vizcarra-Chacon BJ, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (2010) Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front Syst Neurosci* 4:15.
- Flores-Barrera E, Laville A, Plata V, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (2009) Inhibitory contribution to suprathreshold corticostriatal responses: an experimental and modeling study. *Cell Mol Neurobiol* 29:719-731.
- Flores-Hernández J, Galarraga E, Bargas J (1997) Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse* 25:185-195.
- Fries P, Nikolic D, Singer W (2007) The gamma cycle. *Trends Neurosci* 30:309-316.
- Fuentes R, Petersson P, Nicoletis MA (2010) Restoration of locomotive function in Parkinson's disease by spinal cord stimulation: mechanistic approach. *Eur J Neurosci* 32:1100-1108.
- Fuentes R, Petersson P, Siesser WB, Caron MG, Nicoletis MA (2009) Spinal cord stimulation restores locomotion in animal models of Parkinson's disease. *Science* 323:1578-1582.

- Fujiyama F, Sohn J, Nakano T, Furuta T, Nakamura KC, Matsuda W, Kaneko T (2011) Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *Eur J Neurosci* 33:668-677.
- Gage GJ, Stoetzner CR, Wiltschko AB, Berke JD (2010) Selective activation of striatal fast-spiking interneurons during choice execution. *Neuron* 67:466-479.
- Galarraga E, Bargas J, Martinez-Fong D, Aceves J (1987) Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neurosci Lett* 81:351-355.
- Galarraga E, Bargas J, Sierra A, Aceves J (1989) The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 75:157-168.
- Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernandez JV, Bargas J (1994) Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res* 100:239-249.
- Galarraga E, Hernandez-Lopez S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J (1999) Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19:3629-3638.
- Galvan A, Wichmann T (2008) Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol* 119:1459-1474.
- Gerfen CR, Wilson CJ (1996) The basal ganglia. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, 12th Edition (Swanson LA, Bjorklund, A., Hokfelt, T., ed), pp 371-468. Amsterdam: Elsevier Science.

- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gertler TS, Chan CS, Surmeier DJ (2008) Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 28:10814-10824.
- Gittis AH, Nelson AB, Thwin MT, Palop JJ, Kreitzer AC (2010) Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *J Neurosci* 30:2223-2234.
- Goldberg JA, Rokni U, Boraud T, Vaadia E, Bergman H (2004) Spike synchronization in the cortex/basal-ganglia networks of Parkinsonian primates reflects global dynamics of the local field potentials. *J Neurosci* 24:6003-6010.
- Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917-925.
- Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324:354-359.
- Graveland GA, 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.
- Graybiel AM (2008) Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci* 31:359-387.

- Greenamyre JT, Hastings TG (2004) Biomedicine. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. *Science* 304:1120-1122.
- Grillner S (2006) Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52:751-766.
- Grillner S, McClellan A, Sigvardt K, Wallen P, Wilen M (1981) Activation of NMDA-receptors elicits "fictive locomotion" in lamprey spinal cord in vitro. *Acta Physiol Scand* 113:549-551.
- Grinvald A, Arieli A, Tsodyks M, Kenet T (2003) Neuronal assemblies: single cortical neurons are obedient members of a huge orchestra. *Biopolymers* 68:422-436.
- Gross J, Schmitz F, Schnitzler I, Kessler K, Shapiro K, Hommel B, Schnitzler A (2004) Modulation of long-range neural synchrony reflects temporal limitations of visual attention in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13050-13055.
- Guertin PA, Hounsgaard J (1998) NMDA-Induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles. *J Neurophysiol* 80:3380-3382.
- Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468:696-700.
- Guzman JN, Hernandez A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J, Vargas J (2003) Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci* 23:8931-8940.
- Hammond C, Bergman H, Brown P (2007) Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci* 30:357-364.

- Hammond C, Deniau JM, Rizk A, Feger J (1978) Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat. *Brain Res* 151:235-244.
- Harris KD (2005) Neural signatures of cell assembly organization. *Nature Rev Neurosci* 6:399-407.
- Hawkes CH (2008a) The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it? *Mov Disord* 23:1799-1807.
- Hawkes CH (2008b) Parkinson's disease and aging: same or different process? *Mov Disord* 23:47-53.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior*. New York: Wiley.
- Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S (2010) Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66:896-907.
- Hornykiewicz O (1973a) Parkinson's disease: from brain homogenate to treatment. *Fed Proc* 32:183-190.
- Hornykiewicz O (1973b) Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA). *Br Med Bull* 29:172-178.
- Hutchison WD, Dostrovsky JO, Walters JR, Courtemanche R, Borraud T, Goldberg J, Brown P (2004) Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci* 24:9240-9243.
- Ibanez-Sandoval O, Carrillo-Reid L, Galarraga E, Tapia D, Mendoza E, Gomora JC, Aceves J, Vargas J (2007) Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: possible relevance for Parkinson disease. *J Neurophysiol* 98:2311-2323.

- Ibáñez-Sandoval O, Tecuapetla F, Unal B, Shah F, Koos T, Tepper JM (2010) Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. *J Neurosci* 30:6999-7016.
- Ikegaya Y, Aaron G, Cossart R, Aronov D, Lampl I, Ferster D, Yuste R (2004) Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science* 304:559-564.
- Ingham CA, Hood SH, Mijster MJ, Baldock RA, Arbuthnott GW (1997) Plasticity of striatopallidal terminals following unilateral lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway: a morphological study. *Exp Brain Res* 116:39-49.
- Izhikevich EM, Edelman GM (2008) Large-scale model of mammalian thalamocortical systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3593-3598.
- Jaidar O, Carrillo-Reid L, Hernandez A, Drucker-Colin R, Bargas J, Hernandez-Cruz A (2010) Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J Neurosci* 30:11326-11336.
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13:4908-4923.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.
- Kiehn O, Eken T (1998) Functional role of plateau potentials in vertebrate motor neurons. *Curr Opin Neurobiol* 8:746-752.

- Kimura M (1992) Behavioral modulation of sensory responses of primate putamen neurons. *Brain Res* 578:204-214.
- Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A (2002) Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci* 22:2780-2791.
- Kita H (1993) GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99:51-72.
- Kita H, Kitai ST (1991) Intracellular study of rat globus pallidus neurons: membrane properties and responses to neostriatal, subthalamic and nigral stimulation. *Brain Res* 564:296-305.
- Kita H, Kosaka T, Heizmann CW (1990) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 536:1-15.
- Koos T, Tepper JM (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2:467-472.
- Koos T, Tepper JM, Wilson CJ (2004) Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24:7916-7922.
- Kostal L, Lansky P, Rospars JP (2007) Neuronal coding and spiking randomness. *Eur J Neurosci* 26:2693-2701.
- Kozlov A, Huss M, Lansner A, Kotaleski JH, Grillner S (2009) Simple cellular and network control principles govern complex patterns of motor behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20027-20032.

- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622-626.
- Kreitzer AC (2009) Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci* 32:127-147.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543-554.
- Langston JW (2006) The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol* 59:591-596.
- Lapper SR, Smith Y, Sadikot AF, Parent A, Bolam JP (1992) Cortical input to parvalbumin-immunoreactive neurones in the putamen of the squirrel monkey. *Brain Res* 580:215-224.
- Leger JF, Stern EA, Aertsen A, Heck D (2005) Synaptic integration in rat frontal cortex shaped by network activity. *J Neurophysiol* 93:281-293.
- Levy R, Hutchison WD, Lozano AM, Dostrovsky JO (2000) High-frequency synchronization of neuronal activity in the subthalamic nucleus of parkinsonian patients with limb tremor. *J Neurosci* 20:7766-7775.
- Levy R, Ashby P, Hutchison WD, Lang AE, Lozano AM, Dostrovsky JO (2002) Dependence of subthalamic nucleus oscillations on movement and dopamine in Parkinson's disease. *Brain* 125:1196-1209.
- Li X, Ouyang G, Usami A, Ikegaya Y, Sik A (2010) Scale-free topology of the CA3 hippocampal network: a novel method to analyze functional neuronal assemblies. *Biophys J* 98:1733-1741.

- Liang L, DeLong MR, Papa SM (2008) Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci* 28:7537-7547.
- Lobo MK, Covington HE, 3rd, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, Damez-Werno D, Dietz DM, Zaman S, Koo JW, Kennedy PJ, Mouzon E, Mogri M, Neve RL, Deisseroth K, Han MH, Nestler EJ (2010) Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science* 330:385-390.
- MacKay WA, Mendonca AJ (1995) Field potential oscillatory bursts in parietal cortex before and during reach. *Brain Res* 704:167-174.
- Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2001) Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106:313-330.
- Mahon S, Vautrelle N, Pezard L, Slaght SJ, Deniau JM, Chouvet G, Charpier S (2006) Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep-wake cycle. *J Neurosci* 26:12587-12595.
- Mao BQ, Hamzei-Sichani F, Aronov D, Froemke RC, Yuste R (2001) Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* 32:883-898.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287:1265-1269.
- Mendez JS, Finn BW (1975) Use of 6-hydroxydopamine to create lesions in catecholamine neurons in rats. *J Neurosurg* 42:166-173.

- Mink JW (2003) The Basal Ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns. Arch Neurol 60:1365-1368.
- Mizuno T, Schmauss C, Rayport S (2007) Distinct roles of presynaptic dopamine receptors in the differential modulation of the intrinsic synapses of medium-spiny neurons in the nucleus accumbens. BMC Neurosci 8.
- Morgante L, Morgante F, Moro E, Epifanio A, Girlanda P, Ragonese P, Antonini A, Barone P, Bonuccelli U, Contarino MF, Capus L, Ceravolo MG, Marconi R, Ceravolo R, D'Amelio M, Savettieri G (2007) How many parkinsonian patients are suitable candidates for deep brain stimulation of subthalamic nucleus? Results of a questionnaire. Parkinsonism Relat Disord 13:528-531.
- Moriizumi T, Nakamura Y, Tokuno H, Kitao Y, Kudo M (1988) Topographic projections from the basal ganglia to the nucleus tegmenti pedunculo-pontinus pars compacta of the cat with special reference to pallidal projection. Exp Brain Res 71:298-306.
- Murer MG, Tseng KY, Kasanetz F, Belluscio M, Riquelme LA (2002) Brain oscillations, medium spiny neurons, and dopamine. Cell Mol Neurobiol 22:611-632.
- Murthy VN, Fetz EE (1996) Oscillatory activity in sensorimotor cortex of awake monkeys: synchronization of local field potentials and relation to behavior. J Neurophysiol 76:3949-3967.
- Nakanishi H, Kita H, Kitai ST (1987) Electrical membrane properties of rat subthalamic neurons in an in vitro slice preparation. Brain Res 437:35-44.
- Ni ZG, Bouali-Benazzouz R, Gao DM, Benabid AL, Benazzouz A (2001) Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal

activity after 6-OHDA-induced dopamine depletion in rats. *Brain Res* 899:142-147.

- Nini A, Feingold A, Slovin H, Bergman H (1995) Neurons in the globus pallidus do not show correlated activity in the normal monkey, but phase-locked oscillations appear in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 74:1800-1805.
- Nisenbaum ES, Wilson CJ (1995) Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci* 15:4449-4463.
- O'Sullivan SS, Williams DR, Gallagher DA, Massey LA, Silveira-Moriyama L, Lees AJ (2008) Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. *Mov Disord* 23:101-106.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, DeLong MR, Olanow CW (2000) Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: problems with the current model. *Ann Neurol* 47:S22-32; discussion S32-24.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med* 16:653-661.
- Olanow CW, Obeso JA (2000) Preventing levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol* 47:S167-176; discussion S176-168.
- Olsson M, Nikkhah G, Bentlage C, Bjorklund A (1995) Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci* 15:3863-3875.

- Ossowska K (1995) Interaction between striatal excitatory amino acid and gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the turning behaviour of rats. *Neurosci Lett* 202:57-60.
- Parr-Brownlie LC, Poloskey SL, Bergstrom DA, Walters JR (2009) Parafascicular thalamic nucleus activity in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 217:269-281.
- Perier C, Bove J, Wu DC, Dehay B, Choi DK, Jackson-Lewis V, Rathke-Hartlieb S, Bouillet P, Strasser A, Schulz JB, Przedborski S, Vila M (2007) Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8161-8166.
- Perlmutter JS, Mink JW (2006) Deep brain stimulation. *Annu Rev Neurosci* 29:229-257.
- Petersen CC, Sakmann B (2000) The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *J Neurosci* 20:7579-7586.
- Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J (1992) Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 68:287-294.
- Pisani A, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2005) Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease. *Mov Disord* 20:395-402.
- Planert H, Szydlowski SN, Hjorth JJ, Grillner S, Silberberg G (2010) Dynamics of synaptic transmission between fast-spiking interneurons and striatal projection neurons of the direct and indirect pathways. *J Neurosci* 30:3499-3507.

- Ramanathan S, Hanley JJ, Deniau JM, Bolam JP (2002) Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto GABAergic interneurons in the rat striatum. *J Neurosci* 22:8158-8169.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N Engl J Med* 342:1484-1491.
- Raz A, Feingold A, Zelanskaya V, Vaadia E, Bergman H (1996) Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates. *J Neurophysiol* 76:2083-2088.
- Reyes A, Galarraga E, Flores-Hernandez J, Tapia D, Bargas J (1998) Passive properties of neostriatal neurons during potassium conductance blockade. *Exp Brain Res* 120:70-84.
- Rinvik E, Ottersen OP (1993) Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat. *J Chem Neuroanat* 6:19-30.
- Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, Buzsaki G (2006) Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci* 9:1526-1533.
- Roweis ST, Saul LK (2000) Nonlinear dimensionality reduction by locally linear embedding. *Science* 290:2323-2326.

- Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF (2004) Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J Comp Neurol* 469:325-339.
- Sanchez-Vives MV, McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3:1027-1034.
- Sanes JN, Donoghue JP (1993) Oscillations in local field potentials of the primate motor cortex during voluntary movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4470-4474.
- Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y (2007) Metastability of active CA3 networks. *J Neurosci* 27:517-528.
- Sasaki T, Kimura R, Tsukamoto M, Matsuki N, Ikegaya Y (2006) Integrative spike dynamics of rat CA1 neurons: a multineuronal imaging study. *J Physiol* 574:195-208.
- Schiller J, Schiller Y (2001) NMDA receptor-mediated dendritic spikes and coincident signal amplification. *Curr Opin Neurobiol* 11:343-348.
- Schreiber S, Fellous JM, Whitmer D, Tiesinga P, Sejnowski TJ. (2003) A new correlation-based measure of spike timing reliability. In: *Neurocomputing*, pp 925-935.
- Shadlen MN, Newsome WT (1994) Noise, neural codes and cortical organization. *Curr Opin Neurobiol* 4:569-579.
- Sharott A, Magill PJ, Harnack D, Kupsch A, Meissner W, Brown P (2005) Dopamine depletion increases the power and coherence of beta-oscillations in the cerebral cortex and subthalamic nucleus of the awake rat. *Eur J Neurosci* 21:1413-1422.

- Shen W, Hamilton SE, Nathanson NM, Surmeier DJ (2005) Cholinergic suppression of KCNQ channel currents enhances excitability of striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 25:7449-7458.
- Sidibe M, Smith Y (1999) Thalamic inputs to striatal interneurons in monkeys: synaptic organization and co-localization of calcium binding proteins. *Neuroscience* 89:1189-1208.
- Singer W (1999) Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? *Neuron* 24:49-65, 111-125.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- Smith Y, Bennett BD, Bolam JP, Parent A, Sadikot AF (1994) Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J Comp Neurol* 344:1-19.
- Spann BM, Grofova I (1991) Nigropedunculo-pontine projection in the rat: an anterograde tracing study with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol* 311:375-388.
- Stopfer M, Jayaraman V, Laurent G (2003) Intensity versus identity coding in an olfactory system. *Neuron* 39:991-1004.
- Sulzer D (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 30:244-250.
- Surmeier DJ, Vargas J, Kitai ST (1988) Voltage-clamp analysis of a transient potassium current in rat neostriatal neurons. *Brain Res* 473:187-192.

- Surmeier DJ, Plotkin J, Shen W (2009) Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr Opin Neurobiol* 19:621-628.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J (2010a) Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell Calcium* 47:175-182.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Goldberg JA (2010b) What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Prog Brain Res* 183:59-77.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Goldberg JA (2011) The origins of oxidant stress in Parkinson's disease and therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal* 14:1289-1301.
- Takagi H, Mizuta H, Matsuda T, Inagaki S, Tateishi K, Hamaoka T (1984) The occurrence of cholecystokinin-like immunoreactive neurons in the rat neostriatum: light and electron microscopic analysis. *Brain Res* 309:346-349.
- Tang K, Low MJ, Grandy DK, Lovinger DM (2001) Dopamine-dependent synaptic plasticity in striatum during in vivo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1255-1260.
- Tashiro Y, Sugimoto T, Hattori T, Uemura Y, Nagatsu I, Kikuchi H, Mizuno N (1989) Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the striatum of the rat. *Neurosci Lett* 97:6-10.
- Taverna S, Ilijic E, Surmeier DJ (2008) Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 28:5504-5512.

- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J, Galarraga E (2007) Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10258-10263.
- Tecuapetla F, Koos T, Tepper JM, Kabbani N, Yeckel MF (2009) Differential dopaminergic modulation of neostriatal synaptic connections of striatopallidal axon collaterals. *J Neurosci* 29:8977-8990.
- Tepper JM, Koos T, Wilson CJ (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 27:662-669.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koos T, Ibanez-Sandoval O (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat* 4:150.
- Thomas TM, Smith Y, Levey AI, Hersch SM (2000) Cortical inputs to m2-immunoreactive striatal interneurons in rat and monkey. *Synapse* 37:252-261.
- Tseng KY, Kasanetz F, Kargieman L, Riquelme LA, Murer MG (2001) Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions. *J Neurosci* 21:6430-6439.
- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR (2002) Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol* 88:1263-1269.
- Uhlhaas PJ, Singer W (2006) Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron* 52:155-168.
- Uhlhaas PJ, Pipa G, Lima B, Melloni L, Neuenschwander S, Nikolic D, Singer W (2009) Neural synchrony in cortical networks: history, concept and current status. *Front Integr Neurosci* 3:17.

- Ungerstedt U (1971) Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:49-68.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485-493.
- Vautrelle N, Carrillo-Reid L, Bargas J (2009) Diversity of up-state voltage transitions during different network states. In: *Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson Disease* (Tseng KY, ed), pp 73-85. New York: Humana/Springer.
- Vergara R, Rick C, Hernandez-Lopez S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E, Surmeier DJ, Bargas J (2003) Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol* 553:169-182.
- Vincent SR, Johansson O (1983) Striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities and NADPH-diaphorase activity: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 217:264-270.
- Vuillet J, Kerkerian L, Salin P, Nieoullon A (1989) Ultrastructural features of NPY-containing neurons in the rat striatum. *Brain Res* 477:241-251.
- Walters JR, Bergstrom DA (2009) Basal ganglia network synchronization in animal models of Parkinson's disease. In: *Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson Disease* (Tseng KY, ed), pp 117-142. New York: Humana/Springer.
- Walters JR, Hu D, Itoga CA, Parr-Brownlie LC, Bergstrom DA (2007) Phase relationships support a role for coordinated activity in the indirect pathway in

organizing slow oscillations in basal ganglia output after loss of dopamine. *Neuroscience* 144:762-776.

- Wickens JR, Wilson CJ (1998) Regulation of action-potential firing in spiny neurons of the rat neostriatum in vivo. *J Neurophysiol* 79:2358-2364.
- Wilson CJ (1993) The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99:277-297.
- Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16:2397-2410.
- Wilson CJ, Goldberg JA (2006) Origin of the slow afterhyperpolarization and slow rhythmic bursting in striatal cholinergic interneurons. *J Neurophysiol* 95:196-204.
- Wilson CJ, Chang HT, Kitai ST (1990) Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci* 10:508-519.
- Wilson CL, Cash D, Galley K, Chapman H, Lacey MG, Stanford IM (2006) Subthalamic nucleus neurones in slices from 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mice show irregular, dopamine-reversible firing pattern changes, but without synchronous activity. *Neuroscience* 143:565-572.
- Yin HH, Mulcare SP, Hilario MR, Clouse E, Holloway T, Davis MI, Hansson AC, Lovinger DM, Costa RM (2009) Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci* 12:333-341.
- Young WS, 3rd, Bonner TI, Brann MR (1986) Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9827-9831.

- Yuste R, MacLean JN, Smith J, Lansner A (2005) The cortex as a central pattern generator. *Nat Rev Neurosci* 6:477-483.
- Zgaljardic DJ, Borod JC, Foldi NS, Mattis P (2003) A review of the cognitive and behavioral sequelae of Parkinson's disease: relationship to frontostriatal circuitry. *Cogn Behav Neurol* 16:193-210.
- Zold CL, Belluscio M, Kasanetz F, Pomata PE, Riquelme LA, Gonon F, Murer MG (2009) Converging into a unified model of Parkinson's disease pathophysiology. In: *Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson Disease* (Tseng KY, ed), pp 143-156. New York: Humana/Springer.