



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS

**Efecto de la estimulación cortical en el
microcircuito estriatal en un modelo murino de
la enfermedad de Parkinson**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

Fátima Sofía Ávila Cascajares

Bajo la tutoría del:

Dr. José Bargas Díaz

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., México. Junio, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Por quienes nos legaron fuerza,
arte, inspiración, amor y familia:*

*Tirso y Helvia,
Ana María y Armando,
Mallile y Tete,*

y todos los que son luz en mi vida.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por abrirme las puertas desde la educación media superior a la ciencia, cultura, arte y deporte en sus diversos recintos y programas. Particularmente, al Programa de Jóvenes a la Investigación, por brindarme los primeros acercamientos serios a la investigación científica en la UNAM que contribuyeron a mi formación profesional.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, los miembros del Comité y del Subcomité de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica (LIBB) por hacer posible el desarrollo de ésta licenciatura y permitirme formar parte de ella.

Al Dr. José Bargas Díaz su tutoría, consejo y disposición continua, que hicieron posible este proyecto y me permitieron crecer de manera personal y académica.

A la cDra. Mariana Duhne Ramírez, mi mentora y amiga, cuya intervención fue crucial para mi desarrollo profesional y la elaboración de este trabajo.

Al Fís. Juan Antonio Laville Conde, cuya labor como técnico académico, orientador y consejero de los estudiantes es pilar en el funcionamiento del laboratorio y los proyectos que ahí se desarrollan, incluyendo el presente.

A la cDra. Ariadna Aparicio Juárez y la M. en C. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez por su labor en la crianza y genotipificación de los ratones utilizados en este y otros proyectos del laboratorio.

Al Técnico Académico Dagoberto Tapia Ramírez por su colaboración en la tinción inmunohistoquímica realizada en este trabajo.

A la Dra. Yazmín Ramiro Cortés por el servicio prestado para la toma de micrografías confocales presentadas en ésta tesis.

A los miembros del jurado que contribuyeron con sus comentarios y consejos a la presente tesis, que a continuación menciono:

- Dra. Carolina Escobar Briones
- Dr. José Bargas Díaz
- Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza
- Dr. Rudolf Marinus Buijs
- Dr. Salvador Leonardo Hernández López

A todos los que de alguna manera contribuyeron a la revisión de éste trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Rocío Salceda y los miembros de su laboratorio, por mostrarme la investigación científica como un estilo de vida fundado en el trabajo constante y colectivo.

Al Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza por su apoyo y dedicación en mi aprendizaje y desarrollo profesional. A todos los miembros de su laboratorio, por ser a la vez verdaderos maestros y compañeros, de manera especial al Dr. Romel Arias, al M. en C. Raúl Rodríguez Cruces y a la Dra. Diana Elinos Calderón.

Al Dr. Georges Dreyfus Cortés por ayudarme a confirmar mi vocación en la ciencia. A los miembros de su laboratorio, por ser ejemplo del compromiso y la responsabilidad en el trabajo. Particularmente, a la QFB. María Teresa Ballado Nava y al Dr. Francisco Javier de la Mora Bravo por su orientación durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Regina Dorinda Montero Montoya por darme la oportunidad de explorar una rama diferente de la investigación científica. A mis compañeros Fernando Aguilera, Paulina López, Nancy Mondragón y Luis Serrano, por su valiosa amistad y conversación.

Al Dr. José Bargas Díaz, por su visión crítica de la ciencia, las instituciones y la sociedad; por la libertad y autonomía que concede a sus estudiantes en ejercicio profesional.

A la Dra. Elvira Galarraga Palacio, el Fís. Juan Antonio Laville Conde y a todos los miembros del BL-103 y del BL-101, por compartir su trabajo conmigo dentro y fuera de los seminarios. A Mariana Duhne, Esther Lara, Ariadna Aparicio y Vladimir Calderón, mis amigos, compañeros de *set-up* y asesores.

A los miembros del BL-202 y AL-105, a quienes considero mi segunda familia académica, por compartir conmigo amistad y recuerdos.

A los profesores que han sido ejemplo e inspiración, por transmitirme su pasión y dedicación por la ciencia y a quienes reconozco de manera especial: el Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, la Dra. Tzipe Govezenski Zac, el Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar, el Dr. Rufold Marinus Buijs y la Dra. Eileen Uribe Querol.

A mis compañeros de licenciatura por ser parte de esta etapa académica. A Gisselle Campos, Abiram Olivares, Susana Vázquez, Arlen Ramírez, Beatriz Rodríguez y Erick Arroyo, quienes no sólo compartieron clase conmigo sino amistad, sueños, proyectos y mucho más. A Nisa Cuevas, Fabiola Duarte, Rodrigo Moreno, Cecilia Gómez, Aldo Meizoso, Diego Pérez, Alexander Pommer y Rodrigo Ibarra, porque a pesar de no coincidir en clase con todos ellos, estuvieron igualmente presentes en este proceso y les guardo un gran cariño.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Diana y Luis Enrique, por amarme, apoyarme y creer siempre en mí. Por su amor y comprensión constante. Por darme colores y melodías para llenar el mundo, y un millón de cosas más.

A mi hermana Belén, mi amiga y confidente; cómplice de juegos, aventuras, ideas y proyectos. Una persona maravillosa a quien admiro y deseo lo mejor en la vida.

A mis padrinos Helvita y Armando, extensión de mi familia nuclear, por su cariño sincero, su apoyo constante y su comprensión a través del amor más allá de las diferencias de pensamiento.

A Alejandro Fábregas Tejeda, científico, filósofo, amante de la literatura y la música; por ser mi amigo, confidente y compañero de vida. Por su paciencia y consejo. Por mostrarme nuevas formas de trazar caminos, inspirarme valor para emprender viajes intrépidos y para escribir nuevas historias, historias con amor.

A los integrantes de la familia Ávila, por sus cantos, su pintura, su arte. Por su personalidad escandalosa, diversa y contrastante pero armónica en conjunto.

A mi familia materna, diversa en apellidos pero estrecha en sentimiento, porque a pesar de estar lejos siempre estamos cerca.

A la familia León, por los lazos trazados con cada uno de ellos y las experiencias que nos acercan más.

A mis amistades entrañables: Casandra, Susana, Aranxa, Alejandra, Celia y David, con quienes comparto el gusto por la música, la danza, el arte, la cultura, la alegría de hacer lo que nos gusta y la satisfacción de un proyecto realizado o nueva meta alcanzada. Por los desafíos que hemos enfrentado y las distancias que hemos superado. Porque estoy orgullosa de cada uno y soy afortunada por tener su amistad.

A los miembros del coro Ars Iovialis y su director Óscar Herrera, por proveerme de un espacio de expresión y respiro en medio de las dificultades de la vida. Por enseñarme sobre la amistad y el verdadero trabajo en equipo, y por permitirme cumplir algunos de los sueños más bellos de mi vida.

Índice

Resumen

Introducción

- Los Ganglios Basales (BG)
 - El modelo de las dos vías
 - Regulación y tipos neuronales presentes en los BG
 - La modulación de las IN estriatales
- Los Ganglios Basales y la Enfermedad de Parkinson
 - Alteraciones de los BG en la EP
 - Evidencia experimental
 - Tratamientos
- Los microcircuitos neuronales y la Teoría de Redes
 - Microcircuitos neuronales
 - Análisis de redes
 - El análisis de redes complejas y la topología de redes
 - Imagenología de Calcio
 - El microcircuito estriatal

Planteamiento del problema

- Hipótesis
- Objetivos

Materiales y Métodos

- Manejo de animales
- Lesión con 6-OHDA
- Evaluación de la conducta de giro
- Tinción inmuno-histoquímica contra TH
- Microscopía Estereoscópica
- Microscopía confocal
- Preparación de rebanada para registro
- Imagenología de Ca^{2+}
- Adquisición de la actividad neuronal
- Análisis de la red neuronal
- Representación gráfica de los resultados

Resultados

- El modelo de 6-OHDA
- La estimulación cortical en el microcircuito estriatal control
- La estimulación cortical en el microcircuito Parkinsoniano
- La actividad neuronal asociada al estado Parkinsoniano
- El microcircuito retoma la actividad parkinsoniana un tiempo después del estímulo cortical
- Relación entre las neuronas clasificadas por actividad y por ensambles de coactividad

Discusión

Conclusiones

Perspectivas

Referencias

Anexo. Siglas y abreviaturas

Índice de figuras y tablas

Introducción

Figura 1: Proyecciones y tipos neuronales en los Ganglios Basales y el Str.

Materiales y Métodos

Figura 2: Resumen gráfico del diseño experimental

Tabla 1. Evaluación de la conducta de giro.

Figura 3: Análisis de red del microcircuito estriatal.

Resultados

Figura 4: Caracterización del modelo murino de hemiparkinsonismo de 6-OHDA.

Figura 5. La estimulación cortico-estriatal promueve la actividad neuronal, la presencia y alternancia de los ensambles neuronales en el microcircuito estriatal.

Figura 6. La estimulación cortical promueve alternancia de los ensambles neuronales en el microcircuito estriatal parkinsoniano.

Figura 7. La estimulación incrementa la actividad del microcircuito estriatal control, pero no del microcircuito parkinsoniano.

Figura 8. Diferentes poblaciones neuronales contribuyen a la actividad de la red antes y después del estímulo en el microcircuito parkinsoniano.

Figura 9. El microcircuito retoma la actividad parkinsoniana cierto tiempo después de la estimulación.

Figura 10. Cambios en la conectividad funcional entre los grupos y los ensambles neuronales parkinsonianos en función del estímulo cortical.

Resumen

La estimulación magnética transcraneal es uno de los tratamientos para la enfermedad de Parkinson, que consiste en estimular la corteza motora para modular el circuito de los ganglios basales. Los efectos en la clínica han sido diversos y menos eficientes de lo esperado. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto sobre el microcircuito estriatal, núcleo de entrada al circuito de los ganglios basales que está encargado mantener la postura, realizar movimientos, y de la memoria de procedimientos y hábitos.

Usando imagenología de calcio, en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson, se ha reportado la dinámica del microcircuito estriatal patológico en términos de actividad total del circuito, eventos de coactividad neuronal dados por ensamblajes neuronales específicos y dinámica de redes. El microcircuito patológico se encuentra en estado hiperactivo pero sin alternancia de la actividad neuronal entre los ensamblajes neuronales, mientras que el circuito no patológico es silente y presenta alternancia entre ensamblajes.

Utilizando este modelo de la enfermedad de Parkinson, se aplicó estimulación eléctrica cortico-estriatal *in vitro* con el propósito de observar el efecto de la entrada cortical al microcircuito estriatal patológico. Se observaron mejoras transitorias en la alternancia del microcircuito parkinsoniano. Sin embargo, el efecto sobre el microcircuito parkinsoniano es de menor duración que en el microcircuito control. El cambio transitorio en la actividad parkinsoniana se debe a la participación de diferentes neuronas antes y después del estímulo.

La corta duración del efecto de la estimulación en el circuito podría deberse a que la falta de dopamina afecta los mecanismos de plasticidad neuronal en el estriado. La administración de fármacos dopaminérgicos y estimulación cortical podría tener mayor eficiencia en el tratamiento. Se requieren experimentos donde se evalúe la eficacia del estímulo en presencia de fármacos, así como del uso de técnicas farmacológicas y genéticas para discernir las poblaciones implicadas en el cambio de la actividad patológica y tratada.

Introducción

Los ganglios basales

Los ganglios basales (BG, por sus siglas en inglés) son un conjunto de núcleos subcorticales ubicados en el telencéfalo, alrededor del tálamo. La división dorsal de los BG está relacionada principalmente con funciones motoras y asociativas, mientras que la ventral, con funciones límbicas (Tepper *et al*, 2007). La información entra a los BG principalmente a través del Núcleo Estriado (Str, del inglés striatum). Posteriormente, ésta pasa por el resto de los BG: el Globo Pálido externo (GPe) y núcleo Subtalámico (STN, por sus siglas en inglés), o es proyectada directamente hacia a los núcleos de salida de los BG: el Globo Pálido Interno (GPi) y la Sustancia Nigra pars Reticulata (SNr), como se ilustra en la Figura 1. La proyección a los núcleos de salida tiene una organización somatotópica, de manera que el GPi participa en movimientos axiales y de extremidades, mientras que la SNr se encarga de movimientos de cabeza y los ojos (Gerfen & Surmeier, 2011). Las neuronas de proyección de los ganglios basales son GABAérgicas, a excepción del STN cuya salida es glutamatérgica (Smith *et al*, 1998).

El modelo de las dos vías

La principal entrada a los BG, el Str, recibe las aferencias glutamatérgicas de la corteza y el tálamo, así como las aferencias dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars compacta (SNc), que resultan de gran importancia para su función. Las eferencias GABAérgicas del Str se dividen clásicamente en dos vías, llamadas: directa e indirecta, ambas se componen de neuronas espinosas de proyección (SPN, por sus siglas en inglés). Las SPNs de la vía directa (dSPNs) proyectan a los núcleos de salida: GPi y SNr (Smith *et al*, 1998), mientras que las neuronas de la vía indirecta (iSPNs) proyectan principalmente al GPe. Las neuronas del GPe proyectan a todos los demás ganglios basales incluyendo al Str y al STN. La conexión del GPe con el STN es recíproca (Shink *et al*, 1996; Karachi *et al*, 2005) y ambos proyectan a los núcleos de salida (Tepper *et al*, 2007), donde el balance entre excitación (subtalámica) e inhibición (palidal) mantiene un disparo de irregular a tónico (Figura 1). A su vez, los núcleos de salida proyectan a varios blancos: el tálamo, el tectum y los núcleos del tallo cerebral tal como los pedúnculo-pontinos (PPN) y la región locomotora mesencefálica (MLR por sus siglas

Introducción

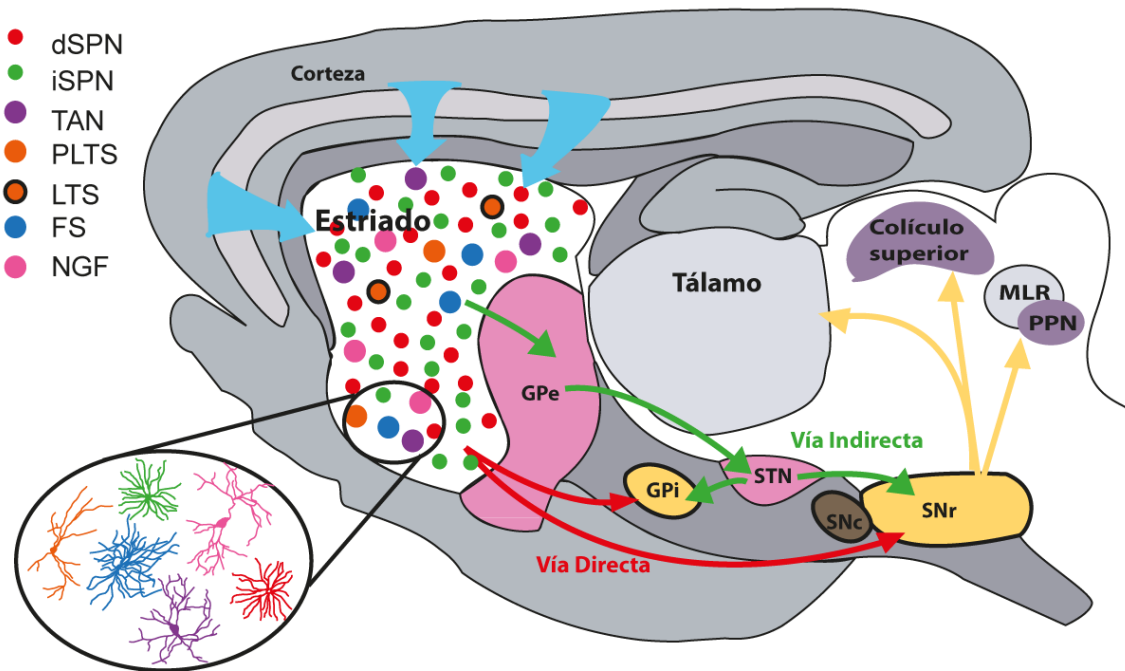
en inglés) (Stocco *et al*, 2010). Estos núcleos se encuentran tónicamente inhibidos por los núcleos de salida de los BG. Por lo tanto, la inhibición de los núcleos de salida ejercida por la vía directa libera esta inhibición tónica y promueve el movimiento. Mientras que la activación de la vía indirecta libera la inhibición que el GPe ejerce sobre los núcleos de salida, aumentando su actividad y disminuyendo el movimiento. Al mismo tiempo, la vía indirecta desinhibe al STN que aumenta su actividad excitadora sobre los núcleos de salida disminuyendo el movimiento. Esto se ha comprobado experimentalmente activando, mediante optogenética, exclusivamente a las vías directa o indirecta y evaluando su efecto en la locomoción (Kravitz *et al*, 2010), así como en la MLR (Roseberry *et al*, 2016).

Desde su descripción en los años 60s (Shik, Severin y Orlovskii, 1966) se sabe que la MLR es una región que, al ser estimulada produce locomoción proporcional a su activación, donde la activación de menor intensidad produce la caminata y la de mayor el trote. 50 años después del trabajo de Shik y colaboradores, Roseberry y colaboradores, disecaron mediante estimulación optogenética específica, la participación de las neuronas de la MLR en el movimiento, y encontraron que el disparo de las neuronas glutamatérgicas predice el inicio de la locomoción (confirmando la propuesta de Sherman y colaboradores en 2015). También confirmaron que a mayor excitación de las neuronas glutamatérgicas de la MLR, es mayor la velocidad de la locomoción, pasando de la caminata al trote y la carrera. El mismo estudio mostró que la activación de la vía directa del Str es suficiente para aumentar el disparo de las neuronas glutamatérgicas de la MLR y para la locomoción. Por el contrario, la activación de la vía indirecta disminuye la frecuencia de disparo de las neuronas glutamatérgicas del MLR, así como la velocidad de locomoción, deteniendo el movimiento si la activación es adecuada (Roseberry *et al*, 2016). La locomoción no es la única función que se adjudica a la MLR: desde la década de 1980 se estudió su papel en la estabilidad postural (García-Rill, 1986), el cual ha sido confirmado en un estudio reciente (Sherman *et al*, 2015) que demuestra que los BG promueven la activación de la porción dorsal de la MLR, responsable de la locomoción, y también promueven la estabilidad postural activando la porción ventral.

Por otro lado, las conexiones de los BG con el tálamo generan una asa de retroalimentación, que participa en el control de los movimientos dirigidos a alcanzar metas (Lambot *et al*, 2016). Entre ambas salidas es posible generar movimientos usando la fuerza apropiada y con

Introducción

los respectivos ajustes posturales (Turner & Anderson, 1997; 2005; Gerfen & Surmeier, 2011).



Modificado de Gerfen *et. al.*, 2011

Figura 1. Proyecciones y tipos neuronales en los Ganglios Basales y el Str. Esquema en corte sagital de los ganglios basales. De acuerdo con el modelo de las dos vías, el estriado recibe abundantes aferencias corticales (flechas azules) y envía información mediante las neuronas espinosas de proyección (SPN) que forman la vía directa (rojo) e indirecta (verde). Las vías directa e indirecta proyectan a los núcleos de salida (GPi y SNr) y a núcleos intermedios (GPe), respectivamente. Los núcleos de salida proyectan al Tálamo, al Colículo Superior, al Núcleo Pedúnculo-Pontino (PPN) y a la región locomotora (MLR) (flechas amarillas). Además de las neuronas de proyección (dSPN e iSPN) el Str posee interneuronas GABAérgicas (PLTS, FS, NGF) y colinérgicas (TAN). Los tipos neuronales se muestran en el Str mediante código de color y su morfología se ejemplifica en la ampliación circular a la izquierda de la figura. Todas las abreviaturas corresponden a su nomenclatura en inglés. TAN: Tonically active neuron, PLTS: Plateau Low Threshold Spike Neuron, LTS: Low Threshold Spike Neuron, FS: Fast Spiking neuron, NGF: Neurogliform neuron.

Regulación y tipos neuronales presentes en los BG

En el Str, las SPNs constituyen el 90-95% de la población neuronal. Estas neuronas reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza, a través de sinapsis asimétricas en las espinas dendríticas (Kemp & Powell, 1971), con alta convergencia en una misma neurona (Bolam *et al*,

Introducción

2000; Gerfen & Surmeier, 2011). También reciben aferencias del tálamo, particularmente de los núcleos intralaminares (Doig *et al*, 2010; Smith *et al*, 2004). Las sinapsis glutamatérgicas contienen receptores AMPA/KA y NMDA (Bernard *et al*, 1997; Bernard & Bolam, 1998). Dichos receptores son necesarios para los mecanismos de plasticidad neuronal, específicamente la potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD, respectivamente, por sus siglas en inglés) demostrados en el Str (Kreitzer & Malenka, 2008). La deficiencia del receptor NMDA afecta la selección de acciones, el aprendizaje y la memoria de procedimientos y hábitos, así como la coordinación y almacenamiento de programas motores (Beutler *et al*, 2011; Lambot *et al*, 2016). La convergencia de estímulos corticales en espacio y tiempo permite los llamados “up-states” en las SPN: depolarizaciones prolongadas durante las cuales las SPN disparan de manera repetitiva (Gerfen & Surmeier, 2011).

Las SPNs se clasifican como pertenecientes a la vía directa o indirecta, de acuerdo a sus proyecciones. Sin embargo, presentan diferencias en una variedad de propiedades. Las neuronas de la vía directa poseen mayor longitud dendrítica que las de la vía indirecta (Gertler *et al*. 2008). Las propiedades intrínsecas de la vía indirecta la hacen la más excitable (Arias-García *et al*, 2013; Day *et al*, 2008; Flores-Barrera *et al*, 2009; Kreitzer & Malenka 2007). Dicha diferencia en las características intrínsecas es tan marcada que permite clasificar a una neurona como de la vía directa o indirecta a partir de registros electrofisiológicos (Flores-Barrera *et al*, 2010). Además de sus propiedades intrínsecas, las SPN difieren en la expresión de distintos marcadores moleculares y sus repertorios de receptores, que permiten regular diferencialmente ambas vías. El ácido gamma-amino-butírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central, regula el disparo de las SPN de manera diferencial (Flores-Barrera *et al*, 2010), a través de receptores ionotrópicos de tipo GABA_A-R (Fujiyama *et al*, 2010).

El modelo de las dos vías propone que la activación de la vía directa promueve el movimiento, mientras la activación de la vía indirecta lo inhibe. Aunque dicha dinámica no es tan simple. Se ha comprobado que ambas vías participan durante el inicio y término de una tarea motora, pero que participan de manera diferencial durante la ejecución (Jin *et al*, 2014; Jin & Costa, 2015). Tanto la teoría antagónica como la teoría coordinada de las dos vías requieren de la modulación de la actividad de ambas vías. El modulador propuesto para regular esta coordinación es la dopamina (Gerfen & Surmeier, 2011). En el Str, la dopamina proviene de

Introducción

las terminales de neuronas pertenecientes a la SNc. De acuerdo con el trabajo de Freund y colaboradores en 1984, dichas terminales coinciden con las aferencias glutamatérgicas corticales en las espinas dendríticas de las SPNs (Bolam *et al*, 2000), esto permite que la DA module la respuesta las sinapsis glutamatérgicas responsables de la transición a los “up states” (Gerfen & Surmeier, 2011) a través de los receptores presentes en las SPN. Se han descrito 5 tipos de receptores para dopamina que actúan acoplados a proteínas G: los tipo D1 (D1 y D5) aumentan la excitabilidad neuronal, mientras que los tipo D2 (D2, D3 y D4) la disminuyen (Hernández-López *et al*, 1997; 2000; Surmeier *et al*, 2007). Se ha demostrado que en el Str, las SPN de la vía directa presentan el DRD1 (Receptor de dopamina tipo D1, por sus siglas en inglés) y las de la vía indirecta el DRD2 (Gertler *et al*, 2008; Valjent *et al*, 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que la liberación de GABA es regulada por dopamina en las sinapsis colaterales (Guzmán *et al*. 2003) de las SPN: la estimulación del DRD2 disminuye la liberación de GABA, mientras que la estimulación del DRD1 la aumenta. Así, la dopamina es un neuromodulador de gran importancia en la regulación de la actividad de las SPNs en el Str.

Otro neuromodulador presente en el estriado es la acetilcolina, provista principalmente por interneuronas estriatales (Bennett & Wilson, 1999; Zhou *et al*, 2002) y por aferencias colinérgicas del PPN y del núcleo Laterodorsal Tegmental (LDT) de forma topológicamente organizada (Dautan *et al*, 2014). Los receptores a acetilcolina pueden ser de tipo nicotínico o muscarínico; ambos están presentes en el Str. Los muscarínicos a su vez se dividen en dos familias: tipo M1 (M1 y M5) y tipo M2 (M2, M3 y M4) (Tepper *et al*, 2007). El receptor M1 está presente en las SPN de ambas vías y su activación aumenta la excitabilidad neuronal. Por otro lado, el receptor M4, cuya activación también aumenta el disparo neuronal (Hernández-Flores *et al*, 2015) solo se encuentra en la vía directa (Goldberg *et al*, 2012); así, nuevamente, las neuronas de cada vía son reguladas de manera diferencial (Shen *et al*, 2007).

Adicionalmente, las neuronas de la vía directa expresan sustancia P y dinorfina (Young, *et al*, 1986), mientras que las neuronas de la vía indirecta expresan encefalina (Young, *et al*, 1986) y el receptor de adenosina A2a (Schiffmann *et al*, 2007).

En resumen, ambas vías muestran diferencias en las características intrínsecas de excitabilidad neuronal, a su vez reguladas de manera diferencial a través de los diferentes receptores que expresan. La implicación fisiológica de estas diferencias es la capacidad del

Introducción

circuito para adecuar la respuesta entre ambas vías (Flores-Barrera *et al*, 2010). La integración de ambas vías permite ejecutar y aprender procedimientos motores complejos. Por lo tanto, la actividad balanceada es crucial para el correcto funcionamiento de los BG (Lambot *et al*, 2016), donde la dopamina tiene un papel primordial.

La modulación de las interneuronas estriatales

En el Str las SPNs constituyen el 90-95% de la población neuronal. El 5-10% restante de la población neuronal lo componen varios tipos de interneuronas (IN), en su mayoría GABAérgicas. Los fenotipos electrofisiológicos más abundantes son: 1) “fast-spiking” (FS) que siguen frecuencias de disparo hasta de 200-300 Hz *in vitro* y expresan parvalbúmina (PV+), 2) con disparo de bajo umbral (LTS, por sus siglas en inglés) que expresan calretinina, 3) con disparo de bajo umbral que presentan una meseta de potencial prolongado (PLTS por sus siglas en inglés) y que expresan neuropéptido Y (NPY) y/o somatostatina y óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés). En un estudio reciente, se describió que un gran porcentaje de las interneuronas estriatales expresan el receptor a somatostatina 5HT3a. Estas interneuronas presentan fenotipos de FS-PV+, de adaptación rápida y LTS que no expresan somatostatina (Muñoz-Manchado *et al*, 2016). 4) Asimismo hay un grupo de interneuronas GABAérgicas que expresan la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y que también poseen varios fenotipos anatómicos y electrofisiológicos, entre ellos las neuronas neurogliformes (NGF) (Ibañez-Sandoval *et al*, 2010).

Las neuronas FS-PV+ reciben inervación directa de las neuronas piramidales corticales de manera preferencial (Bennett & Bolam 1994; Gittis *et al*, 2010; Planert *et al*, 2010) y a su vez inhiben a las SPN de ambas vías a través de sinapsis mediadas por el receptor GABA_A (Berke, 2001). Se ha propuesto que dicha inhibición contribuye a la selección de acciones al suprimir la actividad de circuitos de SPNs que corresponden a acciones no deseadas (Gerfen & Surmeier, 2011). Las interneuronas GABAérgicas son reguladas por la dopamina a través de receptores tipo D5 (Bracci *et al*, 2003; Centonze *et al*, 2003). Las neuronas PV+ son reguladas a través de receptores muscarínicos de acetilcolina (Koós & Tepper, 2002).

Además de las interneuronas GABAérgicas hay interneuronas colinérgicas en el Str, que se identifican por la expresión de Acetil-colina Transferasa (ChAT) y se les conoce como TANs

Introducción

debido a que disparan tónicamente (Tepper *et al*, 2004), manteniendo un nivel basal de acetilcolina en el Str. Las TANS, al igual que las PVs reciben conexión preferencial desde la corteza (Hernández-Flores *et al*, 2015; Pérez-Ramírez *et al*, 2015; Vizcarra-Chacón *et al*, 2013). Las TANS son moduladas por la dopamina a través de receptores D2 y D5 (Bergson *et al*. 1995; Hersch *et al*. 1995) y por la misma acetilcolina debido a receptores tipo M2 y M4 que fungen como auto-receptores (Yan & Surmeier, 1996).

En resumen, además de la presencia de los neurotransmisores GABA y glutamato en el Str, la dopamina y la acetilcolina modulan la actividad estriatal tanto en las neuronas SPNs de proyección como en las interneuronas. Se piensa que el balance entre ambos moduladores es necesario para ejercer el control motor.

Los Ganglios Basales y la Enfermedad de Parkinson

Alteraciones de los BG en la EP

El balance entre las dos vías de los BG y los neurotransmisores que los regulan se rompe en algunas enfermedades (Albin *et al*, 1989), una de ellas es la Enfermedad de Parkinson (EP). La primera descripción de la EP fue realizada por James Parkinson en el siglo XIX, los síntomas motores que incluía eran bradicinesia, rigidez muscular, temblor en reposo e impedimentos de postura y caminata (Kalia *et al*, 2015). Actualmente se sabe que los síntomas de la EP no son exclusivamente motores, también se presentan dificultades cognitivas, disfunción autonómica, dolor y fatiga. Particularmente, hay síntomas no motores que preceden la aparición de síntomas motores de la enfermedad y que tienen cierta capacidad predictiva respecto a su desarrollo. Estos incluyen disfunción olfatoria, depresión, exceso de sueño durante el día, desorden de movimiento rápido ocular durante el sueño y estreñimiento (Kalia *et al*, 2015).

A lo largo de varias décadas se ha acumulado información tanto clínica como experimental respecto a los mecanismos y alteraciones de la EP y sus posibles tratamientos. A mediados del siglo XX, se describió que la EP muestra una reducción de casi el 90% de dopamina en el Str (véase Ehringer & Hornykiewicz, 1960). En 1963, Hornykiewicz encontró que la SNc también mostraba una gran reducción en la dopamina. Un año más tarde, Anden y colaboradores

Introducción

mostraron que la SNc inerva al Str (Anden *et al*, 1964), mostrando que la causa de los síntomas de la EP es la degeneración de las fibras de la SNc que inervan al Str y a otros núcleos de los BG. Sin embargo, poco se ha descrito sobre la causa de dicha degeneración. Se planteó como causa la acumulación de alfa- sinucleína descrita en pacientes de EP en varias áreas cerebrales (Polymeropoulos *et al*. 1997; Spillantini *et al*. 1997), debida a mutaciones puntuales en los pacientes estudiados. Sin embargo, son pocos los casos que se pueden explicar por causas genéticas exclusivamente. Actualmente se postula que la relación entre factores ambientales y susceptibilidad genética ocasiona la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Wood-Kaczmar *et al*, 2006).

Otro signo de la EP, detectado en pacientes no medicados es la presencia de oscilaciones anormales en frecuencia beta en registros de actividad cerebral (Brown *et al*, 2001). Estas ráfagas oscilatorias híper-sincrónicas (SO, del inglés Synchronus Oscillations), se observan tanto en los BG (particularmente en el STN y el GPe) (Bevan *et al*, 2002), como en la corteza y el tálamo (Bergman *et al*, 2002; Rivlin-Etzion *et al* 2006).

Evidencia experimental

Para la investigación experimental se han desarrollado y empleado modelos animales de la EP, siendo los más comunes: la lesión por MPTP en monos (Langston *et al*, 1984; 1989), la lesión unilateral por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) en ratón (Ungerstedt, 1968) y rata (Schultz *et al*, 1982), y cultivos organotípicos derivados de pacientes o animales. Los modelos animales se correlacionan en síntomas y signos con los pacientes con EP. En roedores el modelo más utilizado es el hemi-parkinsonismo por lesión unilateral con 6-OHDA, donde se degeneran las fibras de la SNc que inervan al Str. Dicho modelo no reproduce todos los signos y síntomas de la EP, ya que sólo consiste en la privación de dopamina en los BG. Sin embargo, es el modelo más utilizado debido a su administración segura, la correlación de sus síntomas motores con aquellos de la EP y la prueba de conducta de giro, que permite la evaluación *in vivo* de la lesión. Se utiliza la lesión unilateral ya que la lesión bilateral es letal, además de que impediría la evaluación por conducta de giro.

Se han observado SO en registros electrofisiológicos de monos tratados con MPTP (Nini *et al*, 1995), se han estudiado las oscilaciones de los BG en STN y GPe en otros modelos (Bevan *et al*,

Introducción

2002; Wichmann & DeLong, 1999), y se ha descrito la dinámica establecida entre ambas estructuras (Plenz & Kitai, 1999). En el trabajo de Plenz y Kitai se determinó, utilizando un cultivo organotípico de GPe, STN, Str y corteza (Ctx), carente de dopamina, que las SO dependen de la interacción GPe-STN. Se postula que a través de la vía indirecta estriato-palidal se podría controlar al sistema GPe-STN (Plenz & Kitai, 1999).

A pesar de observarse tanto en pacientes como en modelos animales, no se ha determinado aún si las SO son necesarias o suficientes para producir el parkinsonismo (Wichmann *et al*, 2011). Sin embargo, se ha sugerido (Brown *et al*, 2003; 2007) que los circuitos tálamo-cortico-basales podrían estar enganchados en oscilaciones híper-sincronizadas patológicas que perturban la actividad relacionada al movimiento en la EP. En concordancia, la sincronización de los ganglios basales se ha visto en la preparación de rebanadas cerebrales *in vitro*, en el modelo Parkinsoniano en ratones por lesión con 6-OHDA (Carrillo-Reid *et al*, 2008; Jaidar *et al*, 2010; Pérez-Ortega *et al*, 2016).

Los modelos *ex vivo* han permitido ver cambios a nivel neuronal en condiciones carentes de dopamina. En ausencia de dopamina la vía directa muestra menor respuesta cortico-estriatal ante cualquier estímulo, mientras que en la vía indirecta aumentan y se prolongan los potenciales sinápticos (Flores-Barrera *et al*, 2011). A su vez, la respuesta dependiente de GABA, vista mediante la administración de bicuculina (antagonista GABAérgico) se vio aumentada en las SPNs que expresan D2 y disminuido en las que expresan D1 (Flores-Barrera *et al*, 2011).

A pesar de los avances obtenidos en el entendimiento y la clínica de la EP, no existe hoy en día un tratamiento contra la pérdida de las neuronas dopaminérgicas o algún tratamiento preventivo, únicamente existen paliativos que buscan eliminar los síntomas motores.

Tratamientos

Desde 1960 se sabe que la administración de levodopa (L-DOPA) reduce las principales características de la enfermedad (Descrito por Birkmayer y colaboradores en 1961), tanto los síntomas motores como las SO y algunos síntomas cognitivos. Sin embargo, la administración a largo plazo de L-DOPA presenta varios efectos secundarios tales como movimientos

Introducción

involuntarios (Cotzias *et al*, 1969) conocidos como discinesias, y desórdenes de control de impulsos que incluyen híper-sexualidad y ludopatía (Fernández & González, 2009). Para evitar dichos efectos se han buscado tratamientos que suplan o disminuyan la administración de L-DOPA.

En el campo de la farmacología se desarrollaron y probaron inhibidores de la catecolmetiltransferasa (COMT) y agonistas dopaminérgicos para disminuir las dosis de L-DOPA. Así como fármacos anti-muscarínicos para combatir las discinesias (Rascol *et al*, 2011). Sin embargo, todos ellos presentaban más complicaciones y efectos secundarios no deseados que la L-DOPA, por lo cual, la L-DOPA sigue siendo el mejor tratamiento farmacológico para tratar la EP.

En la década de 1990 se probaron alternativas no farmacológicas que retomaban técnicas quirúrgicas empleadas en los 50s, abandonadas tras la aparición de la L-DOPA, entre ellas la talamotomía y la palidotomía. Dichas técnicas se aplicaron tanto en pacientes humanos como en la investigación en modelos animales. Un estudio en monos tratados con MPTP demostró experimentalmente que lesiones en el STN disminuían los principales síntomas motores de la EP casi instantáneamente (Benazzouz *et al*, 1993). Otra técnica utilizada para disminuir los síntomas motores de la EP es la estimulación profunda (DBS, por su siglas en inglés) aplicada en el tálamo y otros blancos desde la década de 1960 (Benabid *et al*, 1987; 1991; Sironi, 2011). Reuniendo estos antecedentes y basados en que la estimulación crónica a altas frecuencias tiene efectos inhibitorios en la zona estimulada, Limousin y colaboradores realizaron estimulación profunda en el STN en pacientes con EP en 1995.

Desde entonces, la DBS ha sido empleada en pacientes con EP avanzada y síntomas secundarios provocados por la administración de L-DOPA. Se han llevado a cabo estudios sobre las mejores formas de aplicar dicho tratamiento, desde la frecuencia de estimulación, las cirugías unilaterales o bilaterales y los blancos de estimulación, que son, principalmente, el STN, el GPi y el núcleo intermedio ventral del tálamo (VIM). Se recomienda el uso de distintos blancos dependiendo de las características de la enfermedad y del paciente que predicen un efecto benéfico o una mayor complicación (Munhoz *et al*, 2016). Siendo la estimulación en el STN la más recomendada en la EP (Munhoz *et al*, 2016). La estimulación en el STN mejora el temblor y otros síntomas motores, mientras que los síntomas que no responden a L-DOPA, así

Introducción

como el inicio de la marcha, ataxia, disartria y los síntomas cognitivos, tienden a empeorar (Munhoz *et al*, 2016). Debido a complicaciones secundarias no todos los pacientes son candidatos para recibir dicho tratamiento y deben pasar por un proceso de revisión antes de que el procedimiento sea aprobado. El proceso de selección requiere de un grupo multidisciplinario experimentado que evalúe al paciente y los efectos riesgo-beneficio (Munhoz *et al*, 2016).

Los criterios más utilizados para la selección de candidatos establecidos en el CAPSIT-PD (Defer *et al*, 1999) son: la duración de la enfermedad (mayor a 5 años), la edad del paciente (menor a 75 años), la respuesta a L-DOPA, tipo y severidad de insensibilidad a L-DOPA, no presentar desórdenes cognitivos y psiquiátricos, y no presentar riesgos estructurales, evaluados a través de la Imagenología por Resonancia Magnética (MRI, por sus siglas en inglés). El incumplimiento de cualquiera de dichos criterios es suficiente para descartar el procedimiento en el paciente (Munhoz *et al*, 2016). Dichos criterios descartan a una gran cantidad de pacientes. De acuerdo con un estudio realizado en 2007, sólo entre el 1.6% y 4.5% de los pacientes con EP son elegibles para DBS, principalmente debido a la severidad de la enfermedad (Morgante *et al*, 2007).

En cuanto al mecanismo de acción, Deisseroth y colaboradores descubrieron en 2009 que el efecto terapéutico de la DBS no se debe a la estimulación o inhibición de las neuronas del STN, sino a la activación antidrómica de neuronas en la capa V del área motora primaria de la corteza (Ctx-M1). De acuerdo con sus resultados, la estimulación selectiva de las neuronas de la capa V de Ctx-M1 es suficiente para reducir los síntomas parkinsonianos utilizando el modelo de 6-OHDA en roedor. Propusieron que la estimulación cortical podría restaurar el balance en el circuito parkinsoniano que se encuentra dedicado a un solo tipo de actividad, excluyendo otros (Gradinaru *et al*, 2009). En ese tiempo ya se utilizaban técnicas dirigidas a la estimulación cortical.

Entre los métodos utilizados para la estimulación cortical, el más utilizado ha sido la estimulación magnética transcraneal (TMS, por sus siglas en inglés). La TMS consiste de una bobina cuyo campo magnético genera estimulación eléctrica en la corteza cerebral. Las ventajas son que tiene menor costo que la DBS, ya que se aplica a varios pacientes con el mismo equipo, no es invasivo ni requiere de un proceso quirúrgico. Sin embargo, los

Introducción

parámetros de estimulación así como sus resultados, varían altamente entre estudios y entre sujetos.

Se piensa que la TMS a frecuencias bajas (igual o menores a 1 Hz) disminuye la excitabilidad cortical, mientras que las frecuencias altas (igual o mayor a 5 Hz) la aumenta (Wagle Shukla *et al*, 2016). Aun entre estas categorías hay diferencias notables, algunos estudios han visto mejoría aplicando 25 Hz, mientras que otros no la observan a 50 Hz, sugiriendo que no todas las llamadas altas frecuencias tienen los mismo resultados. Otra fuente de variación es el blanco a estimular, siendo los más comunes la corteza motora primaria (Ctx-M1), la corteza motora suplementaria (SM1) y la corteza prefrontal dorso-lateral (DLPFC) (Wagle Shukla *et al*, 2016). La literatura actual sugiere que ni la SM1 ni la DLPFC son blancos terapéuticos eficaces para tratar la EP (Lafaucheur *et al*, 2014).

Otras variables a considerar son el número de pulsos aplicados en cada sesión, la duración de las sesiones, el periodo entre sesiones (días, semanas, meses) y la medicación del paciente, que se piensa puede provocar un efecto techo (Fregni *et al*, 2005). En general se reportan mejorías motoras en los pacientes aun con distintos procedimientos (Lafaucheur *et al*, 2004; Fregni *et al*, 2005). Sin embargo, los síntomas específicos que son afectados y la medida en que mejoran varían mucho de un protocolo a otro. No se han reportado efectos adversos, a excepción de jaqueca moderada (Wagle Shukla *et al*, 2016).

Además de la TMS, se han implementado técnicas como la Estimulación Extradural Cortical (Cillia *et al*, 2007), que consiste en la implantación extradural de electrodos en el paciente, y la estimulación directa transcranial (tDCS, por sus siglas en inglés), que estimula la corteza a través de corriente directa de forma no invasiva ni dolorosa. Utilizando tDCS en Ctx-M1 (Fregni *et al*, 2006; Benninger *et al*, 2010) se han reportado mejorías motoras en los pacientes con EP. También se han reportado efectos en el aprendizaje y consolidación motora (Benninger *et al*, 2015).

Estudios de imagenología funcional junto con tDCS, han sugerido que la estimulación de Ctx-M1 es suficiente para activar las estructuras subcorticales del circuito motor (Benninger *et al*, 2015) y se ha visto que dicha estimulación es suficiente para re-iniciar el temblor en reposo (Ni *et al*, 2010).

Introducción

Varios estudios han sugerido que la tDCS genera plasticidad a largo plazo mediante receptores NMDA, y que dicha plasticidad esta mediada por dopamina. También se ha confirmado que la presencia de dopamina puede modificar el efecto de la estimulación de facilitadora a inhibitoria y viceversa. Ambos descubrimientos resaltan las implicaciones del estado de medicación de los pacientes en el efecto a largo plazo que tendrá la estimulación cortical (Benninger *et al*, 2015).

La investigación continúa y día a día se buscan nuevos métodos que superen las dificultades de sus antecesores y mejoren las expectativas para el paciente. El más reciente de dichos tratamientos es la Interferencia Temporal (Grossman *et al*, 2017) que aplica transcranealmente dos estímulos de alta frecuencia (superior a los 1000 Hz) diferentes entre sí por algunos Hz. Las neuronas son incapaces de responder a frecuencias de dicha magnitud, pero si a la diferencia entre ellas cuando convergen en espacio y tiempo. De esta manera, se estimula con baja frecuencia y alta resolución espacial a la zona donde convergen ambas frecuencias. Esta técnica promete tener lo mejor de la DBS (estimulación en blancos profundos, eficaces) sin su mayor complicación (invasividad). Sus efectos ya han sido probados en ratones y se requiere aún de mucha investigación básica y clínica para definir el alcance de esta nueva técnica, sin embargo, es muestra del avance científico y tecnológico constante dirigido a la salud propio de nuestra época.

No existe hoy en día un tratamiento que supla a la L-DOPA, que tiene un gran efecto sobre síntomas motores y no motores de la patología. La DBS mejora varios de los síntomas pero no es aplicable o eficaz en la mayoría de los pacientes. Se ha identificado que la DBS actúa a través de la estimulación antidrómica de neuronas corticales de la capa V. Se han empleado varios mecanismos de estimulación cortical para el tratamiento de la EP que mejoran la bradicinesia, pero no tienen efectos consistentes en otros síntomas cardinales de la EP, como son la marcha, la rigidez y el temblor (Benninger *et al*, 2015). El avance científico y tecnológico actual permite el desarrollo de nuevas técnicas cada vez más potentes y precisas, pero su eficacia depende de la comprensión de los efectos que dicho método tendrá sobre una función cerebral dada (Grossman *et al*, 2017). Particularmente, el entendimiento de los mecanismos neuronales que subyacen la mejoría provocada por la activación cortical es de gran relevancia para el tratamiento de la EP. Se requiere de estudios que permitan analizar los microcircuitos neuronales para descifrar dichos mecanismos.

Los microcircuitos neuronales y la Teoría de Redes

Microcircuitos neuronales

Se define a los microcircuitos neuronales como grupos organizados de neuronas que con su actividad conjunta realizan operaciones específicas en regiones del sistema nervioso. De manera general, se habla de dos teorías que describen la existencia de microcircuitos: los Generadores Centrales de Pautas (CPGs por sus siglas en inglés) descritos por Thomas Graham Brown (1911), que son circuitos innatos encargados de programas motores automáticos, y los ensamblajes celulares (CAs) postulados por Donald O. Hebb (1949), que son los circuitos adquiridos debido a la plasticidad sináptica, asociados a funciones cognitivas y que son capaces de reclutar o activar a los CPGs para realizar operaciones concretas.

Análisis de redes

Los microcircuitos neuronales pueden ser analizados como redes complejas. Una red se define como un conjunto de nodos y enlaces entre los nodos. En el caso de los microcircuitos neuronales a escala histológica, los nodos serían las neuronas y las conexiones anatómicas o funcionales entre ellos serían los enlaces. Las conexiones funcionales corresponden a magnitudes de correlación temporal en la actividad y pueden ocurrir entre elementos no sólo conectados monosinápticamente sino también de manera polisináptica (Rubinov & Sporns, 2010).

El análisis de redes complejas y la topología de redes

El análisis de redes complejas describe propiedades importantes para cuantificar la topología de una red y sus respectivas representaciones. Una de dichas propiedades individuales es el grado: el número de conexiones que tiene un nodo. Cuando los vecinos más cercanos de un nodo están a su vez conectados entre sí se forma un “cluster” o agrupación (Rubinov & Sporns, 2010). A partir del análisis de redes complejas se pueden determinar los ensamblajes celulares como clusters. (Brown 2005; Carrillo- Reid *et al.* 2008, 2009a, 2015a, 2015b; Ikegaya *et al* 2004; Pérez-Ortega *et al*, 2016).

Introducción

Los ensambles neuronales forman secuencias temporales a través de flujos de actividad entre ellos. A dichos flujos de actividad Hebb les llamó secuencias de fase y actualmente se sabe que dependen de LTP y LTD. A lo largo de dichas secuencias se puede presentar recurrencia, donde un ensamble participa en repetidas ocasiones, y alternancia, donde la actividad fluye entre varios ensambles. La recurrencia o alternancia de ensambles podría depender de la dinámica de corto plazo entre las neuronas (Carrillo-Reid *et al* 2015b) y ser la base para la transferencia de información en los microcircuitos neuronales (Pérez-Ortega *et al*, 2016).

El análisis de los microcircuitos neuronales mediante la teoría de redes complejas permite cuantificar diferencias entre circuitos patológicos y controles (Bullmore & Sporns, 2009; Pérez-Ortega *et al*, 2016). Además representa una metodología útil para entender la patogénesis y el tratamiento de los desórdenes cerebrales (Bullmore & Sporns, 2009).

Imagenología de Calcio

El desarrollo en décadas recientes de nuevas técnicas de registro de la actividad neuronal permite registrar la actividad simultánea de decenas de neuronas con resolución de célula única. Una de dichas técnicas es la imagenología de calcio que permite registrar la actividad de las neuronas por el cambio en el flujo de calcio reportado por un fluoróforo quelante de calcio introducido a las células por agentes químicos o genéticos. En registros electrofisiológicos con imagenología de calcio simultánea se ha confirmado que el aumento en la fluorescencia coincide con el aumento en el disparo neuronal (Carrillo-Reid *et al*, 2008; Pérez-Ortega *et al*, 2016). Dependiendo de la microscopía disponible, se pueden observar desde decenas a centenas de neuronas de manera simultánea.

El microcircuito estriatal

Utilizando imagenología de calcio y análisis de redes se ha descrito la topología del microcircuito estriatal en condiciones control y patológicas. El microcircuito control es casi silente, presenta neuronas altamente conectadas, así como alternancia entre ensambles. Por el contrario, en el microcircuito parkinsoniano aumenta la actividad general de la red y disminuye la alternancia entre los ensambles neuronales (Jaidar *et al*, 2010; López-Huerta *et al*, 2013; Plata *et al*, 2013; Pérez-Ortega *et al*, 2016).

Planteamiento del problema

Se ha descrito la dinámica del micro circuito estriatal en un modelo de la EP y se ha observado en pacientes de la EP el mejoramiento de la actividad motora ante estímulos corticales, estimulación magnética transcraneal o aun ante estímulos sensoriales fuertes.

Pregunta

¿Es posible corregir al circuito parkinsoniano estimulando la vía corticoestriatal?

Hipótesis

La estimulación cortical en el tejido Parkinsoniano restablecerá la dinámica del circuito estriatal.

Objetivo

Estimular la vía corticostriatal y observar los cambios en el microcircuito Parkinsoniano.

Objetivos particulares

- Determinar los cambios en la actividad del microcircuito ante la estimulación cortical.
- Comparar al microcircuito patológico con el microcircuito control.
- Caracterizar estos cambios.

Materiales y Métodos

Manejo de animales

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a las normas de bioética establecidas por el comité de bioética del Instituto de Fisiología Celular (IFC). Se utilizaron ratones CD-1, criados en el bioterio del IFC, donde permanecieron hasta su destete. En el caso de los ratones operados se permitió su recuperación en el vivarium del IFC. En ambas instalaciones estuvieron bajo un ciclo luz/oscuridad de 24 horas (12/12) con agua y comida estándar *ad libitum*. En la Figura 2 se ilustra el procedimiento experimental a grandes rasgos desde la lesión con 6-OHDA hasta la obtención de resultados.

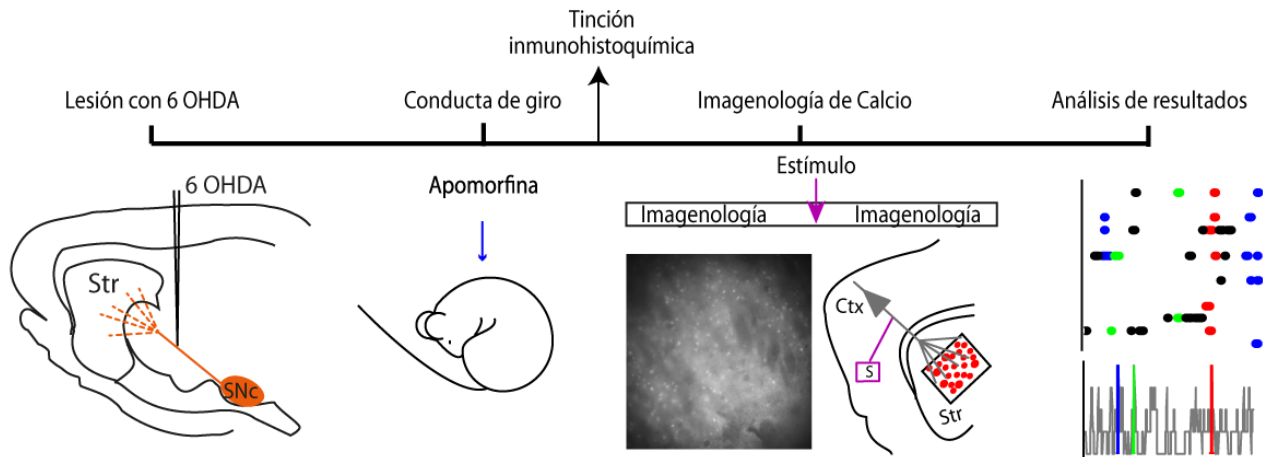


Figura 2. Resumen gráfico del diseño experimental. El modelo murino de hemiparkinsonismo se obtuvo mediante la lesión unilateral con 6 OHDA en el haz de fibras de la SNc que inerva al estriado (Str). Posteriormente, se evaluó el efecto de la lesión mediante la conducta de giro en presencia de apomorfin. Se realizó una tinción immuno-hisotquímica para verificar la lesión con 6-OHDA. Se obtuvieron rebanadas cerebrales de los animales correctamente lesionados, así como de animales control y se realizaron registros de actividad neuronal por imagenología de calcio. Se registró la actividad espontánea y se administró el estímulo cortical en la rebanada. Se muestra un ejemplo del campo de registro y un esquema del protocolo de estimulación en rebanada. Los registros se prolongaron 30 o 60 minutos después de la estimulación. Finalmente, los datos fueron analizados *in silico* y presentados en gráficas.

Materiales y Métodos

Lesión con 6-OHDA

Se utilizaron ratones de 21-23 días postnatales. Los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con (2 $\mu\text{L/g}$ de peso) una solución de ketamina (25%, 0.1mg/ μL) -xilacina (10%, 0.02 mg/ μL)-solución salina (65%, NaCl 0.9%). Se rasuró la parte superior del cráneo y se fijó la cabeza del animal en un estereotáxico para ratón. Se inyectó unilateralmente una solución de 6-OHDA (0.6 μL , 0.1 mg/mL en solución salina) a una velocidad de 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ en el haz medial del prosencéfalo. Las coordenadas a partir de Bregma fueron: -2.6mm AP, -1.5mm LM y -4.7mm DV. La inyección se dejó difundir por 10 min. Al terminar la operación, la piel fue sellada con cianocrilato y se permitió la recuperación del animal en una plancha caliente.

Evaluación de la conducta de giro

Se evaluó la conducta de giro una semana después de la lesión. A los animales se les colocó un arnés que permite el movimiento de las patas delanteras y traseras, conectado con un contador. Se grabaron al menos 30 minutos de actividad espontánea, contabilizando los giros totales (360°) y parciales (180°) en el sentido de las manecillas del reloj (CW, por sus siglas en inglés) y en contra (CCW, por sus siglas en inglés), mediante el programa RotaCount 2.0. Posteriormente fueron inyectados con apomorfina (0.5 mg/mL, 1 $\mu\text{L/g}$ peso) vía subcutánea y se contabilizaron los giros de la misma manera durante una hora aproximadamente. Se utilizaron para los experimentos los ratones que mostraban inversión en la proporción de giros (CW/CCW) entre la evaluación espontánea y la evaluación con apomorfina, y que presentaban más del doble de giros CCW respecto a los giros CW en presencia de apomorfina.

Tinción inmuno- histoquímica contra TH.

Con el fin de confirmar la privación de dopamina en el estriado, ocasionada por la lesión con 6-OHDA, se realizaron tinciones inmuno-histoquímicas para la tirosina hidroxilasa (TH), marcador de las neuronas dopaminérgicas. Para ello, se utilizó un ratón lesionado y uno "sham", en el cual se realizó la operación sin inyectar 6-OHDA. La evaluación de giro resultó positiva para el lesionado y negativa para el sham. La tabla 1 muestra la evaluación de conducta de giro para ambos ratones en ausencia y presencia de apomorfina:

Materiales y Métodos

Tabla 1. Evaluación de la conducta de giro. Se muestran los resultados de la conducta de giro de un ratón lesionado y uno sham, utilizados para tinción inmuno-histoquímica. Se indican los giros completos (F, del inglés: full) y parciales (P), en el sentido de las manecillas del reloj (CW) y en contra (CCW) de manera espontánea (E) y en presencia de apomorfina (A).

Giros	FCW		FCCW		PCW		PCCW	
	E	A	E	A	E	A	E	A
Lesionado	16	0	7	137	39	1	16	279
Sham	4	29	1	2	11	63	7	5

Una semana después de la evaluación de conducta, se obtuvieron los cerebros de ambos ratones. Primero, los ratones fueron anestesiados con una solución ketamina, xilacina intraperitoneal. Fueron perfundidos con una solución de PBS 0.1 M (NaH₂PO₄ 15 mM, Na₂HPO₄ 80 mM, NaCl 50 mM, pH 7.4) y PFA (4% en PBS 0.1 M, pH 8). Se extrajeron los cerebros y se conservaron en PFA por 16 horas. Al día siguiente se realizaron cortes coronales de 50 µm en el vibratomo en PBS.

Se seleccionaron rebanadas de ambos animales que contuvieran la SNc y otras que contuvieran al Str. Se bloquearon con BSA (1% en PBS 0.1 M- Tritón 3%) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 0.1 M. Se incubaron por 12 horas con anticuerpo primario (Rabbit, anti-Tyrosine Hydroxylase, Chemicon International) 1:500 en PBS 0.1 M- Tritón 3% a temperatura ambiente. Se incluyó un control al que no se administró anticuerpo primario para probar marca inespecífica del anticuerpo secundario. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 0.1M. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (Cy3-conjugated Affini Pure Donkey anti-Rabbit, Jackson Immuno Research, Inc 711-165-152) en PBS 0.1 M- Tritón 3% a temperatura ambiente durante dos horas. Se realizaron 3 lavados con PBS 0.1M. Se montaron las rebanadas en laminillas, selladas posteriormente con medio de montaje para fluorescencia con DAPI (Vecta Shield, Vector Laboratories, Inc H-1200).

Microscopía Estereoscópica

Se tomaron imágenes de fluorescencia en un microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500, con un objetivo HR plan Apo 1x WD 54 y un aumento de 0.75. El tiempo de exposición fue de 45 s y la ganancia digital de 1x. El software de adquisición fue NIS-Elements F 4033.00 64 bit.

Materiales y Métodos

Se fotografiaron rebanadas coronales correspondientes a distintas coordenadas Antero-Posteriores.

Microscopía confocal.

Se tomaron micrografías con microscopía confocal en el Str dorsal y la SNc. Representadas en la parte inferior de los paneles A y B de la Figura 4. La cuantificación de fluorescencia de las fibras TH⁺ en el Str se realizó con las imágenes crudas y una rutina de MatLab, tomando la muestra sin anticuerpo primario como referencia para la señal de fondo. Las células TH⁺ se cuantificaron manualmente en la SNc con la ayuda de ImageJ y el programa Im-Patch © (panel D).

Preparación de rebanada para registro

Al menos un día después de evaluar la conducta de giro, cada ratón fue anestesiado con (1 μ L/g de peso) de una solución ketamina (85%, 0.1mg/ μ L) -xilacina (15%, 0.02 mg/ μ L) y perfundido con una solución de sacarosa (Sacarosa 234 mM, NaHCO₃ 28 mM, Dextrosa 7 mM, Piruvato 4.54 mM, ácido ascórbico 0.28 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 7 mM, NaH₂PO₄ 1.44 mM, CaCl₂ 0.4 mM) a 4°C. Posteriormente cada ratón fue decapitado y se extrajo su cerebro. Se obtuvieron rebanadas horizontales con ángulo de 30°, de 300 μ m de grosor, únicamente del hemisferio derecho (lesionado) con un vibratomo (PELCO easiSlicer). A partir de este momento las rebanadas se mantuvieron en fluido cerebro-espinal artificial (NaCl 126 mM, Dextrosa 15 mM, NaHCO₃ 26 mM, tiourea 0.2 mM, ácido ascórbico 0.2 mM, KCl 3.5 mM, MgCl₂ 1 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM y CaCl₂ 2 mM), referido a partir de ahora como ACSF por sus siglas en inglés, y carbógeno (95% O₂, 5% CO₂). Se realizó el mismo procedimiento con animales no lesionados para comparar al microcircuito lesionado con el control. Se utilizaron indistintamente ambos hemisferios de los animales control.

Imagenología de Calcio

Las rebanadas se incubaron por 40 min a 37°C con 1 μ M de un fluoróforo quelante de calcio, Calcium Orange (Molecular Probes®, Life technologies, Mexico City, MX), diluido en ACSF con 0.1% de DMSO. La difusión del fluoróforo alcanzó una profundidad de 150 μ m en la rebanada.

Materiales y Métodos

La rebanada se fijó en una cámara con perfusión constante de ACSF y carbógeno, bajo un objetivo de inmersión 20X, 0.95 AN (XLUMPlanFI, Olympus, Center Valley, PA). El campo observado fue de 750×750 μm . La estimulación del fluoróforo se realizó mediante una lámpara Lambda LS illuminator (Sutter instruments, Petaluma, CA), con un filtro de luz de 560/30 nm. Los videos de actividad se adquirieron mediante Im-Patch ©, con una cámara CoolSnap K4 (Photometrics, Tucson, AZ) a una frecuencia de 4-6 imágenes/segundo y con una duración de 720-1440 cuadros/ video. Para la estimulación se utilizó un electrodo bipolar concéntrico (FHC, #CBCFE75) colocado sobre la corteza motora. Para cada experimento se adquirieron entre 7 y 10 videos con una duración total de ~60 min. Todos los videos se adquirieron en el estriado adyacente al sitio de colocación del electrodo. Se administró únicamente un tren de 10 pulsos a 40Hz de ~1.1-1.3 mA. Al finalizar el experimento se agregó una solución 0.5 M de KCl a la perfusión para contabilizar las neuronas viables que participaron o no en el experimento.

Adquisición de la actividad neuronal

Los videos se filtraron con el programa ImageJ para evaluar a simple vista el cambio de fluorescencia y se procesaron en el programa Im-Patch ©. Se calcularon los transitorios de calcio así como el cambio en la fluorescencia por unidad de área en el tiempo. Cada unidad de área, determinada por una coordenada, contiene una neurona y su fluorescencia se compara con la fluorescencia en un área circular de 20 pixeles alrededor de la misma. Posteriormente se calculó la derivada de los cambios en la fluorescencia para cada neurona.

Previamente en el laboratorio (Carrillo-Reid *et al*, 2008, 2009a, 2009b, 2011, 2015a, 2015b Hernández-Flores *et al*, 2015; Jáidar *et al*, 2010; López-Huerta *et al*, 2013; Pérez-Ortega *et al*, 2016; Pérez- Ramírez *et al*, 2015; Plata *et al*, 2013a, 2013b) se ha demostrado con imagenología de calcio y registros electrofisiológicos simultáneos que la derivada del cambio en la fluorescencia de calcio coincide con los momentos de actividad neuronal. Así, se seleccionaron como cuadros activos aquellos cuyo valor de la derivada fue positivo, mayor a 2 desviaciones estándar y con ellas se construyó una matriz de unos y ceros, donde cada 1 es un cuadro donde la célula *i* estuvo activa y cada 0 donde no lo estuvo. Se guardó una matriz de actividad por cada video.

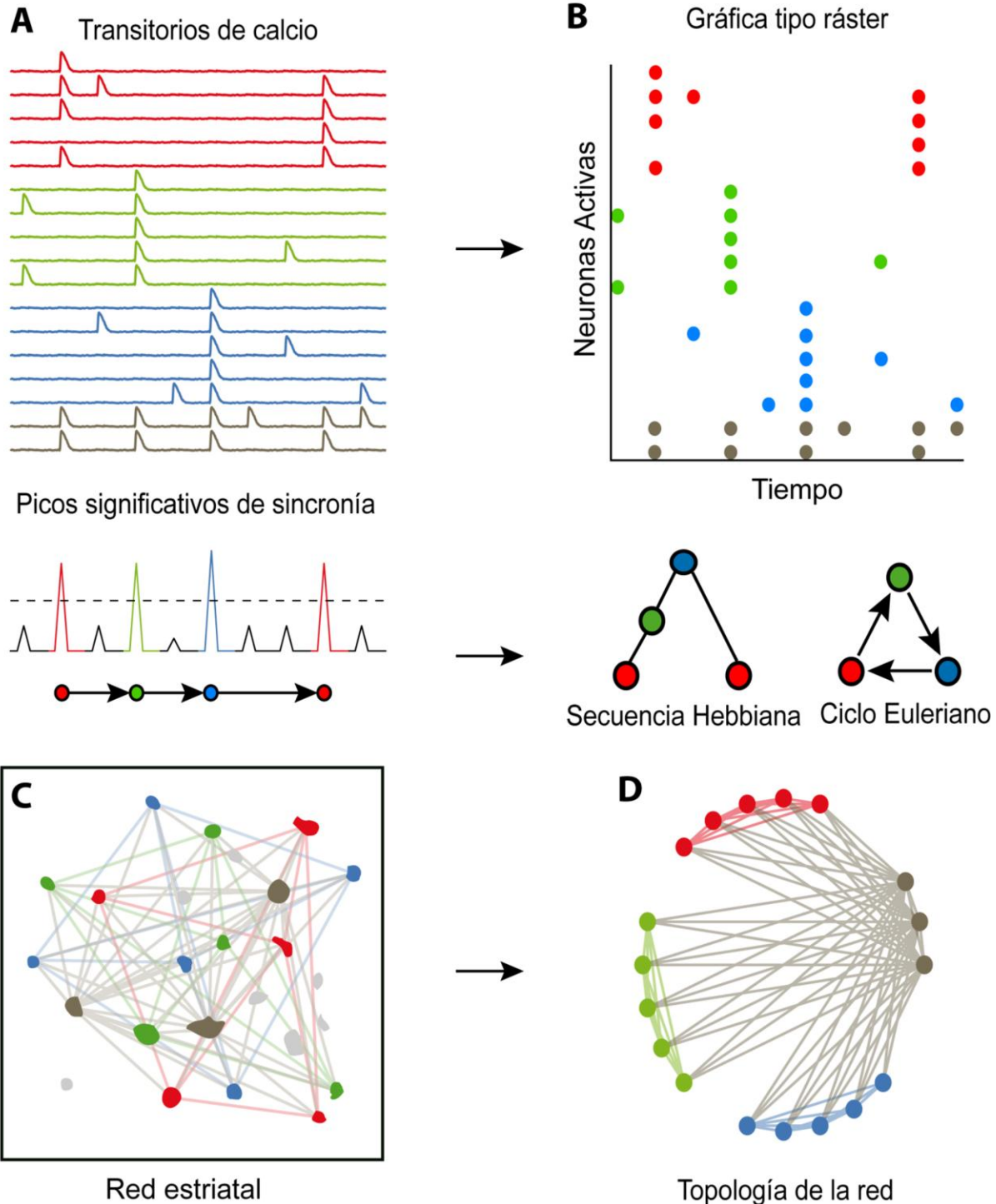


Figura 3. Análisis de red del microcircuito estriatal. Los transitorios de calcio, obtenidos del registro en la rebanada (A) son convertidos a una matriz de actividad representada en una gráfica tipo ráster (B). La actividad de los ensambles neuronales del microcircuito se observa como picos de actividad sincrónica o co-actividad (A inferior). Se determina un umbral de significancia y los picos de actividad sincrónica que sobrepasen dicho umbral son clasificados de acuerdo a las neuronas que participan en ellos. Los colores en la gráfica representan a los distintos ensambles neuronales presentes en la red (estados de la red). El paso de la actividad entre un ensamble y otro es llamado alternancia. La participación consecutiva de un ensamble se llama recurrencia. Se presentan la secuencia Hebbiana (alternancia de ensambles en el tiempo) y el ciclo Euleriano (B inferior), que indica las direcciones de las alternancias a lo largo del experimento. La red tal como se obtiene de la rebanada (C) se puede representar en una organización circular donde las neuronas son agrupadas de acuerdo al ensamble al que pertenecen y se muestran las conexiones funcionales entre ellas. Modificado de Bargas y Pérez-Ortega, 2017.

Las matrices de actividad se ilustraron en **gráficas tipo ráster** donde cada fila es una célula y los puntos representan la actividad (unos en la matriz) de esa célula en un cuadro, es decir una imagen del video. Finalmente, se tiene representada la actividad de todas las neuronas a lo largo del experimento en el tiempo.

Análisis de la actividad neuronal

En la Figura 3 se presentan secuencialmente el procesamiento experimental y las gráficas utilizadas para ilustrar la red y su dinámica. Para el análisis de la actividad neuronal se utilizaron las matrices de actividad de cada video, las coordenadas y el programa MatLab. Se unieron las matrices de cada video para obtener una matriz del experimento.

Para determinar el umbral de disparo sincrónico significativo se utilizó la prueba de Monte Carlo, que permite calcular la probabilidad de que cierto número de neuronas disparen simultáneamente al azar, dada la actividad contenida en la matriz. Dicho algoritmo cambia la distribución de los datos en el tiempo 1000 veces y compara las distribuciones de co-actividad de cada iteración. La probabilidad de que la distribución observada sea producto del azar o no se reporta a través de la medida alfa. La medida alfa es el **umbral** de disparo sincrónico, esto es, el número mínimo de neuronas cuyo disparo sincrónico es poco probable dada la distribución de los datos (presentado como una línea punteada en el panel A). Los eventos en los que participa una cantidad de neuronas igual o mayor al umbral son llamados **picos de actividad sincrónica** (panel A) y se consideran no dados por el azar.

Los picos de actividad sincrónica se definen como eventos de co-actividad no dados por azar, las neuronas que participan en ellos forman un **ensamble**. Se define al ensamble como un grupo de neuronas funcionalmente conectadas que disparan en sincronía. Los picos de actividad sincrónica en una red se deben a la actividad de varios ensambles. Para determinar los ensambles responsables de los picos de actividad sincrónica, estos fueron comparados con un índice de similitud que toma el coseno del ángulo entre los vectores de actividad significativa normalizados por su magnitud (Carrillo *et al.*, 2008), y se obtuvo una matriz de similitud con todos ellos. Posteriormente los picos de sincronía fueron agrupados mediante un algoritmo de agrupamiento jerárquico de acuerdo a su índice de similitud. Los picos de mayor similitud son producto de la actividad de un mismo ensamble.

Materiales y Métodos

La matriz de actividad se ilustra en una **gráfica tipo ráster** (panel B) donde cada fila es una neurona y cada punto representa un cuadro de video donde dicha neurona estuvo activa a lo largo del experimento. En ésta gráfica, los picos de sincronía son mostrados en distintos colores para distinguir grupos de neuronas que corresponden a distintos ensambles neuronales dentro del mismo circuito.

Se utilizaron dos tipos de gráficas para mostrar la dinámica del circuito: las secuencias Hebbianas y los ciclos Eulerianos (panel B). Las **secuencias Hebbianas** muestran la identidad de cada evento de co-actividad sincrónica a lo largo de un experimento. Estas gráficas permiten apreciar con claridad la alternancia y recurrencia entre ensambles. Por otro lado, los **ciclos Eulerianos** muestran la dirección de la alternancia entre ensambles. Estas gráficas permiten saber si la alternancia ocurre entre todos los ensambles o si la red no presenta todas las alternancias posibles.

La **topología de la red** se ilustró mediante gráficas de visualización circular (panel D). Estas gráficas permiten agrupar a las neuronas de acuerdo criterios distintos a su posición anatómica. En este trabajo se utilizaron dos criterios: agrupación por ensambles y agrupación por actividad en las diversas condiciones experimentales. Después de agrupar a las neuronas se trazan enlaces entre ellas que denotan las conexiones funcionales (definida como sincronía de disparo) que existen entre ellas. El uso de visualización circular en diferentes puntos del experimento resalta la participación de grupos neuronales específicos en condiciones específicas.

Resultados

El modelo de 6-OHDA

Los ratones fueron lesionados unilateralmente con 6-OHDA, la eficiencia de la lesión fue evaluada mediante la conducta de giro como se explica en los Materiales y Métodos. Para corroborar la lesión se realizó una tinción inmuno-histoquímica de fluorescencia contra TH, marcador de neuronas y terminales dopaminérgicas, en un ratón lesionado y uno no lesionado (sham). Como se observa en la figura 4, se confirmó la disminución de TH en el hemisferio lesionado. Se observa una disminución considerable de la señal CY3-TH tanto en las fibras estriatales como en los somas de la SNc. Esto comprueba la eficiencia de la lesión y valida el modelo patológico que se utilizó para el resto de los experimentos. No se observaron cambios entre ambos hemisferios del ratón sham.

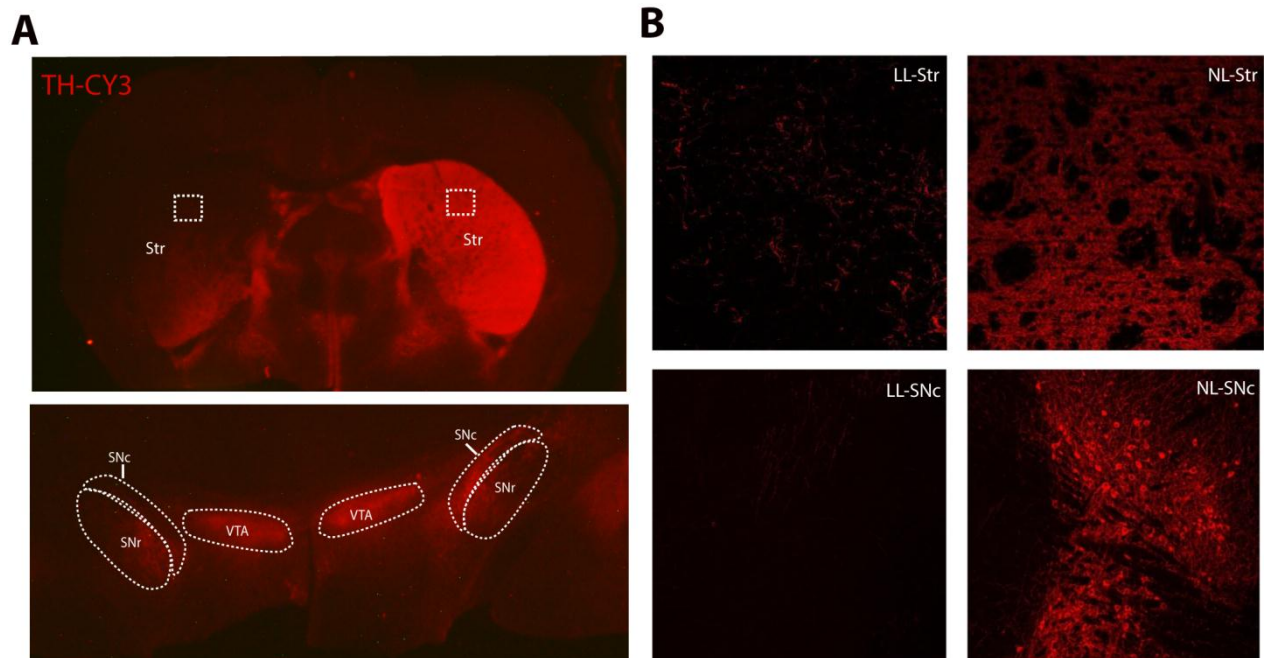


Figura 4. Caracterización del modelo murino de hemiparkinsonismo de 6-OHDA. (A) Microscopía estereoscópica de fluorescencia donde CY3 marca TH en dos cortes coronales de un ratón lesionado. La micrografía superior muestra el Str, mientras que el corte inferior muestra la SNc, la SNr y el VTA. (B) Micrografías confocales del Str (superiores) y la SNc (inferiores) del lado lesionado (LL) y no lesionado (NL) del mismo ratón. En todas las micrografías superiores se aprecia una disminución de fibras TH en el estriado lesionado, mientras que en el hemisferio contrario se observa el estriado intacto. En las inferiores se observa una clara disminución de somas en la SNc.

Resultados

La estimulación cortical en el microcircuito estriatal control

Para describir el efecto de la estimulación cortical sobre el microcircuito estriatal se obtuvieron rebanadas horizontales de 300 μm conservando las fibras cortico-estriatales y se registró la actividad celular mediante imagenología de calcio. Después de registrar varios minutos la actividad espontánea se administró un tren de 10 pulsos a 40 Hz en las fibras cortico-estriatales. Se registró la actividad durante al menos media hora después del estímulo.

Dichos experimentos se realizaron en 5 ratones diferentes y los datos de todos ellos fueron usados para las comparaciones y pruebas estadísticas. En la Figura 5, se muestra uno de ellos como experimento representativo del efecto de la estimulación en el microcircuito control. Tanto en la gráfica tipo ráster, como en el histograma del panel A, se aprecia que el estímulo aumenta significativamente la actividad del microcircuito y promueve los eventos de co-actividad neuronal (picos significativos de sincronía), en los que participan distintos ensambles neuronales (véase la definición de ensambles neuronales en la sección de Microcircuitos neuronales y en Materiales y Métodos). En la secuencia Hebbiana (B) se aprecia que después del estímulo, ilustrado en morado, se recluta a un nuevo ensamble, ilustrado en verde. Tanto la secuencia Hebbiana como los ciclos Eulerianos muestran alternancia entre ensambles tanto antes como después del estímulo.

Resultados

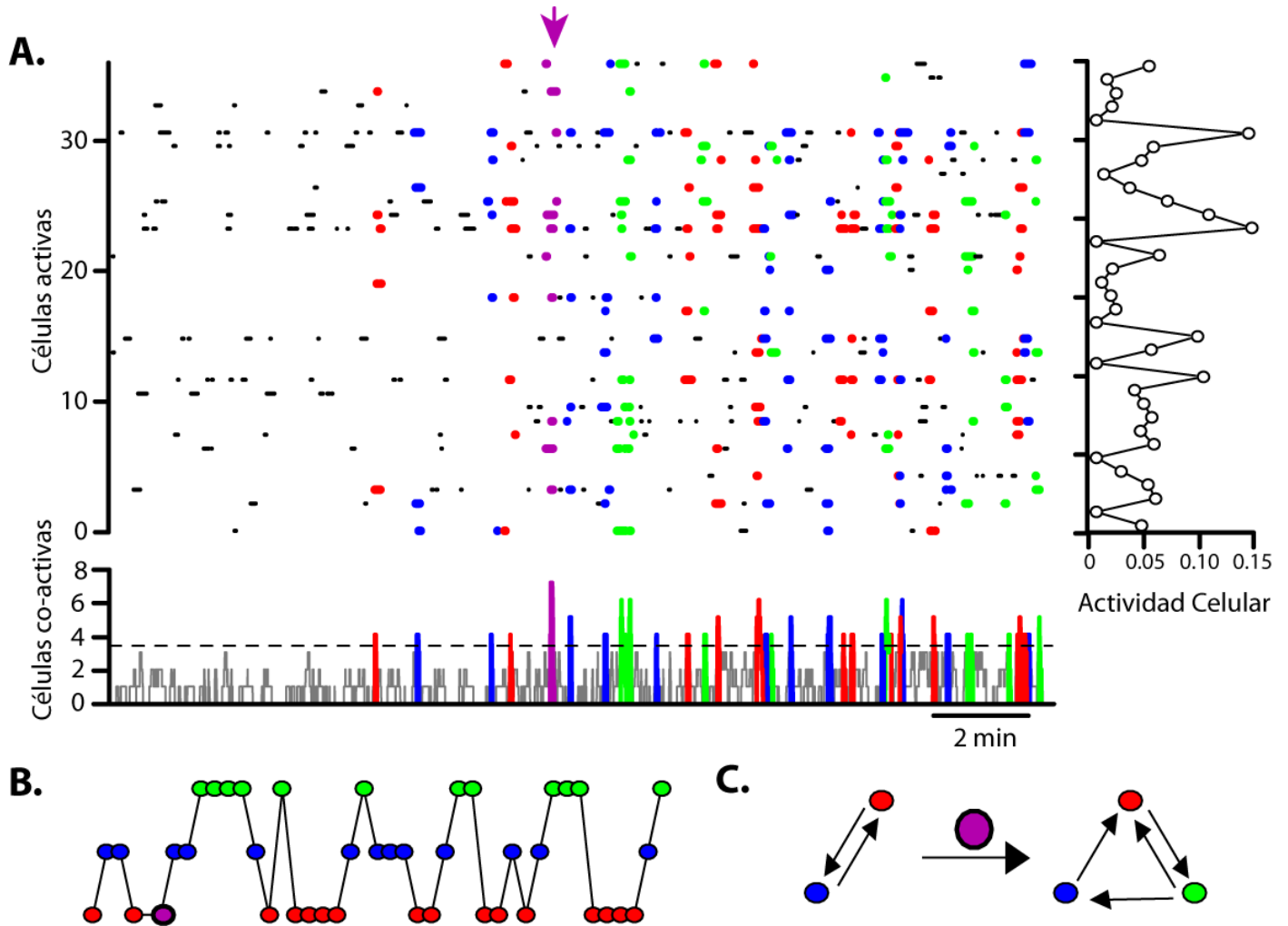


Figura 5. La estimulación cortico-estriatal promueve la actividad neuronal, la presencia y alternancia de los ensambles neuronales en el microcircuito estriatal. (A) Gráfica tipo ráster donde se muestra la actividad espontánea de más de 50 neuronas en el Str: las filas representan la actividad de células individuales a lo largo del tiempo total del experimento en minutos. Las neuronas están ordenadas de acuerdo con su posición espacial en la rebanada original. Debajo se muestra la suma de la actividad celular y la co-actividad en función del tiempo. La línea punteada marca el umbral de significancia estadística para los picos de co-actividad ($p < 0.05$). Los picos de actividad que superan el umbral (significativos) se agruparon de acuerdo a su similitud en ensambles neuronales. Los colores denotan los ensambles celulares activos a lo largo del tiempo tanto en el histograma como en la gráfica tipo ráster. Se observa que la actividad de la red aumenta luego del estímulo cortical (mostrado por la flecha, el vector y los círculos morados). También se observa que los eventos de co-actividad son más frecuentes después de la estimulación cortical y que un nuevo ensamble (verde) participa en la red. A la derecha se muestra la suma de la actividad de cada neurona a lo largo del experimento, normalizada a la actividad total del experimento y expresada en porcentaje de la actividad total. Se observa que algunas neuronas tienen más actividad que otras. (B) Secuencias Hebbianas de activación de los ensambles neuronales a lo largo del tiempo y sus transiciones. (C) Ciclos Eulerianos previos y posteriores a la estimulación cortical. Nótese que el número de picos significativos aumenta, emerge un nuevo estado y hay alta alternancia entre los ensambles neuronales tanto antes como después del estímulo.

Resultados

La estimulación cortical en el microcircuito Parkinsoniano

Los animales cuya lesión resultó exitosa (véase evaluación de conducta de giro en los Materiales y Métodos), fueron utilizados para los experimentos de imagenología de calcio. Se obtuvieron rebanadas horizontales de 300 μm , conservando la vía cortico-estriatal (de la misma manera que en la preparación control) y se realizó el registro de su actividad mediante imagenología de calcio. Después de registrar varios minutos de actividad espontánea, se administró un tren de 10 pulsos a 40 Hz en las fibras cortico-estriatales, de la corteza motora. Se registró al menos durante 20 minutos, luego del estímulo.

Se obtuvieron rebanadas de 10 ratones diferentes y sólo se conservó una rebanada de cada animal. En la Figura 6 se muestra un experimento representativo, el efecto de la estimulación en el microcircuito Parkinsoniano fue similar en todos los experimentos. En contraste con el microcircuito control, el microcircuito Parkinsoniano exhibe alta actividad tanto antes como después del estímulo. Al principio, la actividad se encuentra dominada por un ensamble (verde) cuya actividad es altamente recurrente a lo largo del tiempo limitando la alternancia entre los ensambles (Figura 6). Después del estímulo cortical se observa mayor alternancia entre los ensambles neuronales, como se aprecia en el panel B y C. También se aprecia en la Figura 6 que tanto antes como después del estímulo participan el mismo número de ensambles. Pero a diferencia del microcircuito control, en el microcircuito parkinsoniano el estímulo no aumenta la actividad de la red, el número de picos significativos, ni la distribución de actividad individual de las células (Figura 7), aunque tanto la condición lesionada, como el microcircuito después del estímulo, son significativamente diferentes a la condición control. El estímulo permite que el microcircuito recupere la alternancia entre los ensambles, de manera similar al microcircuito control.

La actividad previa y posterior al estímulo de los microcircuitos control y lesionado se analiza en la Figura 7. En el microcircuito control aparece un nuevo ensamble neuronal (verde) a partir del estímulo (mostrado en magenta en la Figura 5) y su participación en la red no afecta a la alternancia de ensambles, sólo se suma. Se observan cambios significativos en la actividad acumulada (B), el número de picos (C) y la distribución acumulada de la actividad (D).

Resultados

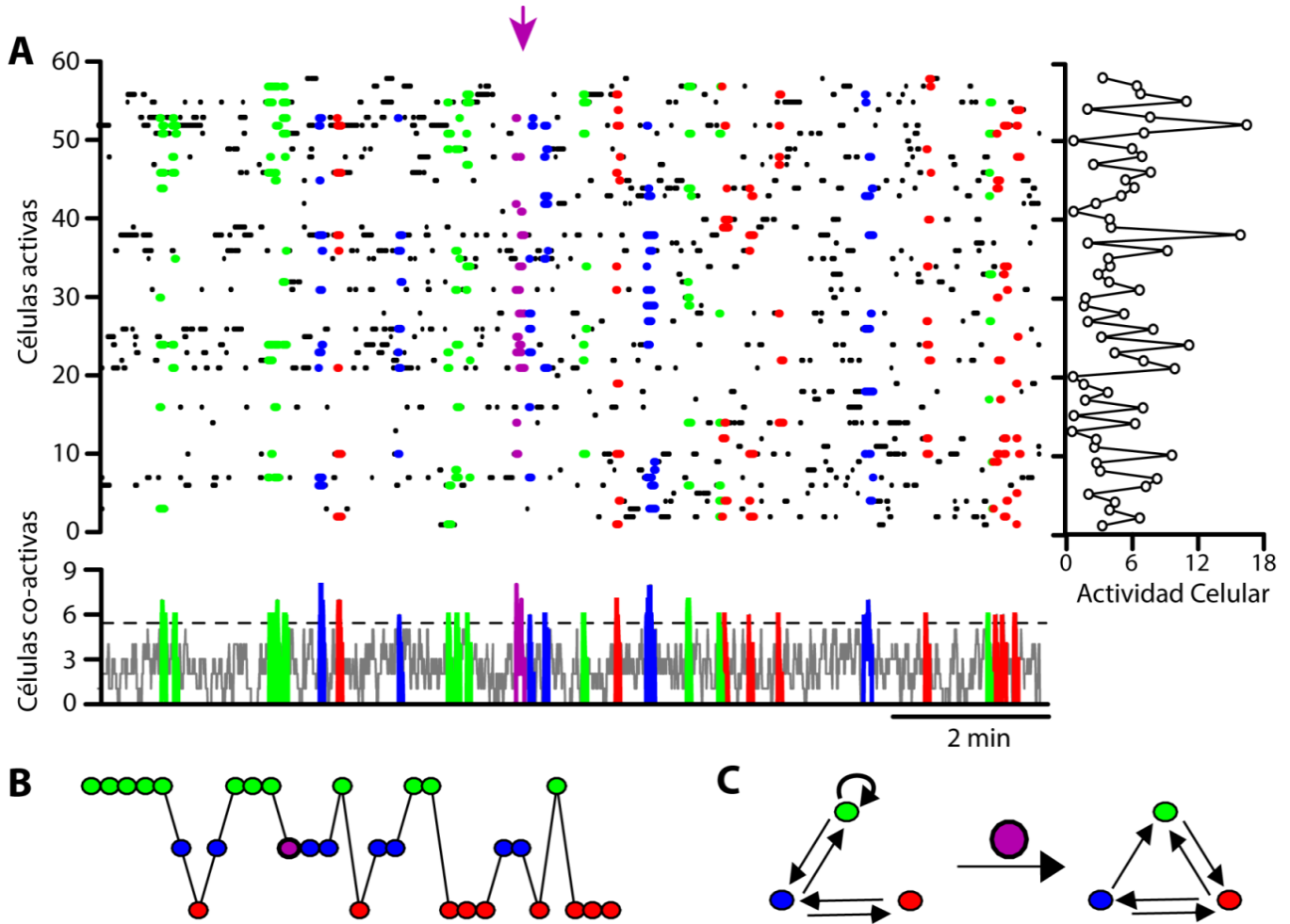


Figura 6. La estimulación cortical promueve alternancia de los ensambles neuronales en el microcircuito estriatal parkinsoniano. (A) Gráfica tipo ráster del microcircuito parkinsoniano en presencia de un estímulo cortical (señalado en morado). Note que hay actividad espontánea con un ensamble dominante altamente recurrente (verde) en detrimento de la alternancia en el circuito parkinsoniano. Debajo del ráster se muestra la actividad neuronal y la co-actividad a lo largo del tiempo. La línea punteada marca el umbral de significancia estadística para los picos de co-actividad. Los picos de actividad sincrónica que superan el umbral se muestran en colores de acuerdo al ensamble neuronal al que pertenecen. Obsérvese que después del estímulo aumenta la alternancia entre los ensambles. A la derecha se muestra la suma de la actividad de cada neurona a lo largo del experimento, normalizada con la actividad total del experimento y expresada como porcentaje de ésta. Se observa que algunas neuronas tienen más actividad que otras. (B) Secuencias Hebbianas que muestran los ensambles neuronales a lo largo del tiempo así como sus transiciones. (C) Ciclos Eulerianos previos y posteriores a la estimulación cortical. Nótese que aumenta la alternancia entre los ensambles neuronales después del estímulo perdiéndose la dominancia del ensamble verde.

Resultados

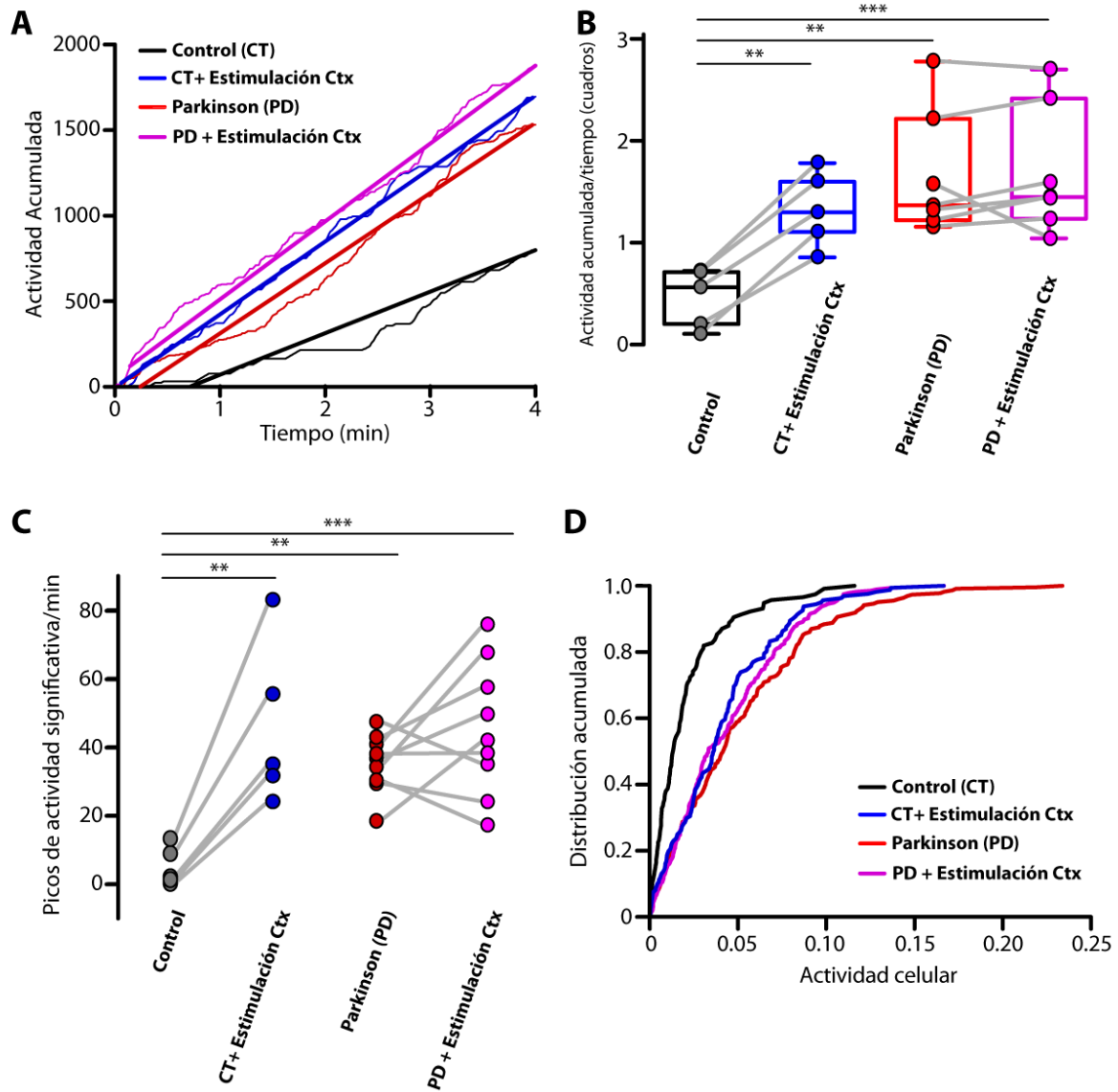


Figura 7. La estimulación incrementa la actividad del microcircuito estriatal control, pero no del parkinsoniano. El análisis estadístico se realizó con la actividad de todas las neuronas activas en los experimentos control ($n= 5$ experimentos) y parkinsonianos ($n= 10$ experimentos). En el panel A se muestra la actividad acumulada en los microcircuitos control y parkinsoniano antes (negro y rojo, respectivamente) y después de la estimulación cortical (azul y magenta, respectivamente). (B) Actividad acumulada normalizada en el tiempo para todas las condiciones. Se observa que la actividad del microcircuito control aumenta de manera significativa después del estímulo cortical (Wilcoxon, $p<0.01$). No se observan cambios significativos en la actividad del microcircuito parkinsoniano después de la estimulación. La condición control (CT) fue significativamente diferente de las otras condiciones (Kruskal-Wallis, $p<0.01$). (C) Cuantificación de los picos de co-actividad significativa en todas las condiciones. Se observa que los picos ocurren con mayor frecuencia en el microcircuito control a partir de la estimulación, mientras que respecto al microcircuito patológico no hay diferencia significativa. (D) Distribución acumulada de la actividad celular. Todas las condiciones muestran que la mayoría de las células presentan baja actividad celular (80% <0.1), siendo la condición control notablemente más baja (80% <0.05) (Kruskal-Wallis, $p<0.01$). Sin embargo, entre las demás condiciones no existen diferencias significativas.

Resultados

La actividad neuronal asociada al estado Parkinsoniano

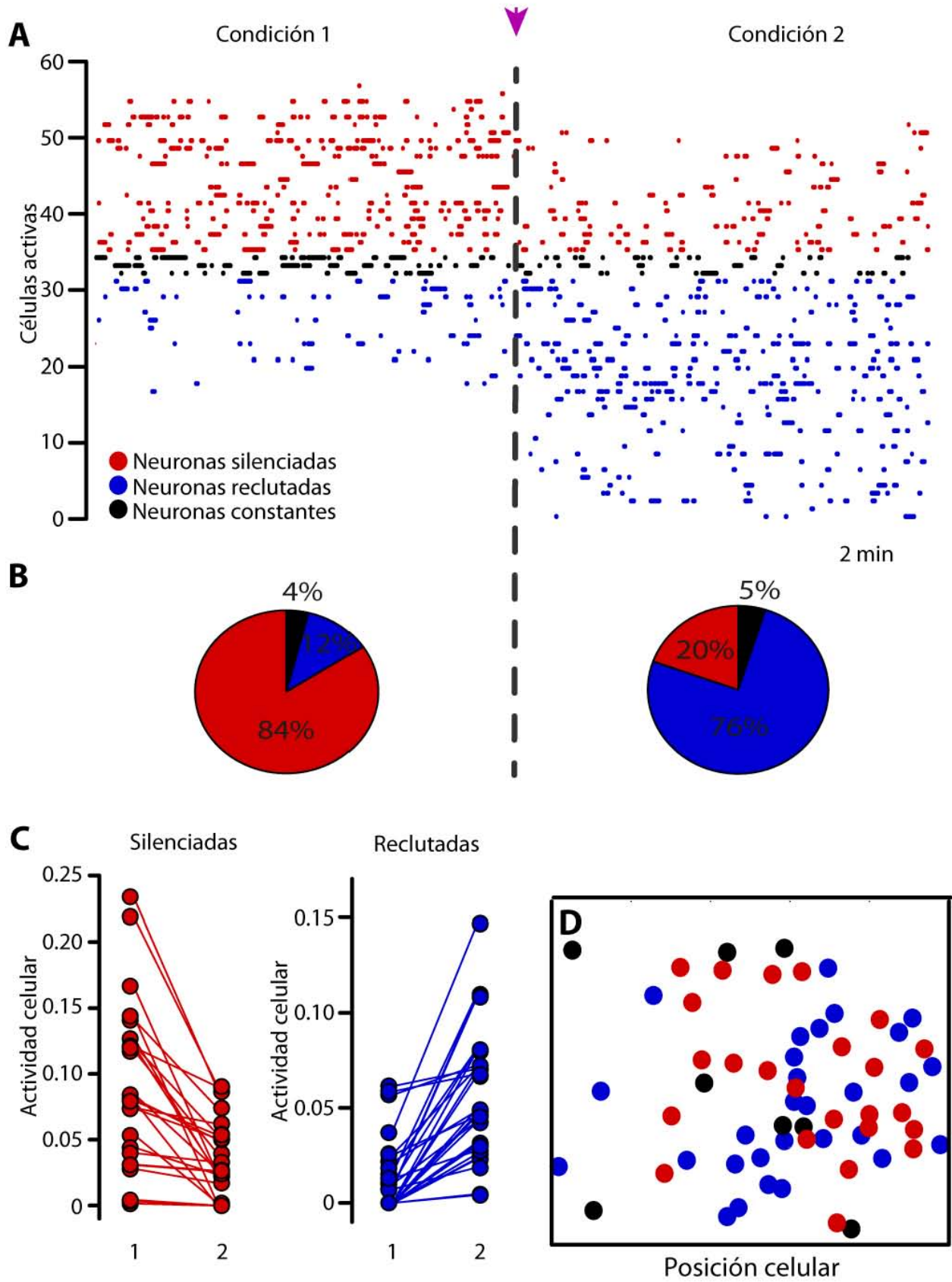
Debido a que el estímulo cortical libera al microcircuito del estado dominante y promueve la alternancia entre los ensambles en el microcircuito parkinsoniano (Figura 6) pero no incide en la actividad de la red, ni en el número de picos de co-actividad significativos, ni en la proporción de neuronas con alta o baja actividad que participan de una condición u otra, decidimos seguir en el curso del mismo experimento la actividad de las neuronas activas antes (PD) y después del estímulo cortical (PD+Ctx Stim) en el tejido parkinsoniano.

Todas las neuronas fueron clasificadas de acuerdo a su actividad en ambas condiciones. Aquellas que disminuyeron su actividad en un 90% (señaladas en rojo en la Figura 8) se diferencian de aquellas que aumentaron su actividad en un 90% a partir del estímulo (señaladas en azul en la Figura 8). Un pequeño porcentaje mantuvo su actividad constante antes y después del estímulo (señaladas en negro en la Figura 8).

En la Figura 8 se observa la gráfica tipo ráster con las neuronas ordenadas de acuerdo a su actividad durante la condición PD y PD+Stim. Se aprecia que, a pesar de que algunas neuronas rojas persisten a pesar del estímulo, sí hay un cambio considerable en su actividad a partir del estímulo. Al contrario, se aprecia que el estímulo recluta un nuevo grupo de neuronas, cuya actividad durante el estado parkinsoniano era baja o nula. De esta manera, el número de neuronas activas antes y después del estímulo permanece casi constante, pero la dinámica cambia debido a que neuronas que no participaban en un principio de la condición parkinsoniana, son responsables del estado parkinsoniano que ocurre después del estímulo.

Se ha visto que la conexión entre los elementos lejanos de un ensamble es poco probable por conexiones monosinápticas, ya que las colaterales de las SPNs no superan las 100 μm (Czubayko y Plenz 2002; Taverna 2008; Tunstall 2002). Por lo tanto se ha propuesto que para el funcionamiento de los ensambles se necesita de la participación de neuronas de axón largo, esto es, interneuronas para formar conexiones a largas distancias ya que su arborización mide alrededor de 1 mm de largo, dependiendo del tipo de IN (Kawaguchi 1995; Tepper y Bolam 2004; Ibañez-Sandoval 2011; Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

Resultados



Resultados

Para comprobar si las neuronas que participan en el estado parkinsoniano coinciden o difieren en su localización con las que no participan durante el estado parkinsoniano, se utilizaron las coordenadas de cada neurona en el tejido cerebral y se visualizaron en colores de acuerdo a su participación o no en el estado parkinsoniano. Se determinó que no existe agrupación espacial entre las neuronas que participan de la misma condición (Figura 8, panel C) sino que ambos grupos están entremezclados.

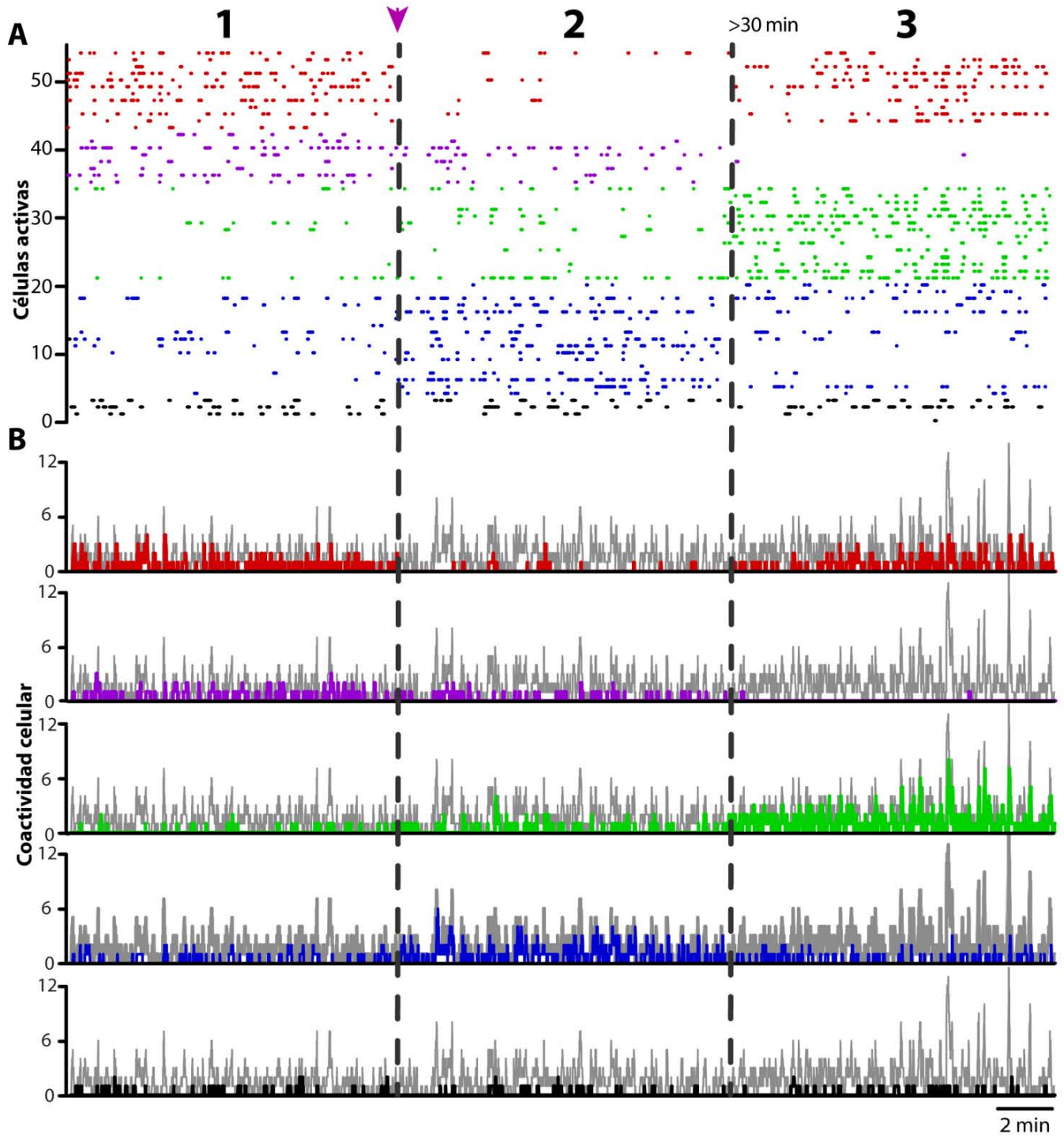
La capacidad del estímulo para **silenciar** las neuronas activas durante el estado parkinsoniano y **reclutar** neuronas silentes en el estado parkinsoniano, se observó en todos los experimentos realizados (n =10 experimentos, n = 568 neuronas). Se nombró a cada población de acuerdo al efecto que tiene el estímulo sobre su actividad como: silenciadas (rojo) y reclutadas (azul). En todos los experimentos la proporción de neuronas silenciadas y reclutadas fue equivalente. Antes del estímulo hay más neuronas cuya actividad coincide con el estado parkinsoniano y después del estímulo hay menos. Pero como el estímulo recluta neuronas ajenas al estado parkinsoniano, en el experimento total ambas poblaciones contribuyen casi al 50% de la población. Las neuronas cuya actividad no es modificada por el estímulo difícilmente rebasan el 10% de la población total.

El microcircuito retoma la actividad parkinsoniana un tiempo después del estímulo cortical

Para saber cuánto tiempo dura el cambio en la dinámica del microcircuito después del estímulo cortical se realizaron registros hasta 60 minutos después del estímulo. El periodo mayor a 30 minutos después de la estimulación se tomó como tercera condición.

Figura 8. Diferentes poblaciones neuronales contribuyen a la actividad de la red antes y después del estímulo en el microcircuito parkinsoniano. (A) Gráfica tipo ráster ordenada de acuerdo a la participación neuronal en la condición parkinsoniana (rojo) y en la condición posterior al estímulo (azul). La flecha morada indica la estimulación. Un tercer grupo exhibió actividad constante antes y después del estímulo (negro). (B) Gráficas de pastel donde se muestra el porcentaje de la población activo en la condición 1 y condición 2, clasificadas de acuerdo a su actividad (B) La actividad de las neuronas parkinsonianas se reduce mientras que la actividad de las neuronas no enganchadas en la actividad parkinsoniana aumenta después de la estimulación cortical (Wicoxon, $p < 0.01$). (C) Posición anatómica de las células en el tejido (D). Los colores indican su participación o no en la actividad parkinsoniana. Se observa que las neuronas están distribuidas de manera aleatoria y los grupos entremezclados, de manera que no hay un agrupamiento espacial que coincida con la agrupación en función del tipo de actividad.

Resultados



Resultados

Se clasificaron las células de acuerdo al aumento o disminución a lo largo de las 3 condiciones. Obtuvimos 5 conjuntos, donde las categorías silenciada y reclutada abrieron paso a dos categorías más dependiendo de si su actividad aumentó o disminuyó en la tercera condición, el quinto grupo corresponde a las células constantes que representan un bajo porcentaje de la población total (Figura 9, panel C).

En los histogramas de suma de actividad de la Figura 9 (panel B) se aprecia que una porción de las neuronas activas durante el estado parkinsoniano disminuye considerablemente su actividad después del estímulo, pero la recupera después en la tercera condición, 30 minutos después del estímulo (roja), mientras que otro conjunto presente en el estado parkinsoniano ya no regresa (morado).

En cuanto a las neuronas que se activan inmediatamente después el estímulo, un grupo aumenta su actividad exclusivamente en asociación al estímulo y luego la disminuye, siendo su actividad en la condición 3 similar a la condición 1 (azul), mientras que otro grupo aumenta considerablemente su actividad en la tercera condición (verde). Los trazos grises de los histogramas que corresponden a la población total muestran que en la tercera condición abundan los picos significativos de co-actividad y se puede ver que tanto las neuronas originalmente en el estado parkinsoniano como otras que se reclutaron después del estímulo participan conjuntamente de dichos picos.

Figura 9. El microcircuito retoma la actividad parkinsoniana cierto tiempo después de la estimulación. Los experimentos ilustran tres condiciones: 1. Circuito parkinsoniano, 2. Circuito parkinsoniano después del estímulo cortical y abandono temporal del estado parkinsoniano, 3. Regreso al estado parkinsoniano. Se obtuvieron cinco conjuntos de neuronas de acuerdo a su actividad en las diferentes condiciones. Las líneas punteadas marcan la separación entre las tres condiciones. La flecha morada indica la administración del estímulo. (A) Gráfica tipo ráster e (B) histogramas de sumas de actividad donde el gris representa la actividad total y los colores representan los grupos que: son recurrentes en el estado parkinsoniano y que disminuyen su actividad después del estímulo cortical (rojo y magenta), aumentan su actividad después del estímulo cortical (azul y verde), y el ensamble cuya actividad permanece constante antes y después del estímulo (negro). (C) Usando gráficas pareadas de densidad podemos seguir la actividad de cada grupo y observar porque son diferentes. Los conjuntos señalados con rojo y magenta disminuyen su actividad inmediatamente después del estímulo pero el grupo rojo retorna mientras el magenta no. Los grupos azul y verde aumentan su actividad después del estímulo, sin embargo, en la tercera condición la actividad del grupo azul decae mientras que las del grupo verde aumenta aún más. El grupo negro mantiene constante su actividad. En la tercera fase la dinámica de tipo parkinsoniana es muy similar a la primera condición aunque algunas neuronas ya son diferentes (Friedman ANOVA, $p < 0.01$).

Resultados

Relación entre las neuronas clasificadas por actividad y por ensambles de co-actividad

Es posible construir una red con los grupos de neuronas clasificadas por su actividad en el estado parkinsoniano antes y después del estímulo cortical. En la Figura 10, se comparan las conexiones funcionales durante las tres condiciones, agrupando las neuronas a partir de su clasificación por actividad o por su participación en los ensambles de co-actividad (paneles A y C de la Figura 10). A diferencia de la Figura 9 que muestra la actividad total de las neuronas durante el experimento, la Figura 10 se basa sólo en la participación de dichos grupos durante los picos de co-actividad. Se observa que antes del protocolo de estimulación la mayoría de las conexiones de la red son entre neuronas que tienen actividad relacionada con la primera condición (roja). Después del protocolo de estimulación hay muchas conexiones del grupo activado por el estímulo (azul). Y en la tercera condición, aunque las conexiones funcionales son reconfiguradas, las neuronas asociadas a la primera condición (rojas) vuelven a activarse. Es de notar que varios grupos participan durante la tercera condición de los picos de co-actividad.

Después se extrajeron las secuencias Hebbianas para las 3 condiciones. Se observa el estado dominante característico del microcircuito parkinsoniano en la primera condición. A partir del estímulo incrementa la alternancia entre estados y la actividad del ensamble dominante disminuye. La reactivación del grupo asociado a la condición 1 (las neuronas rojas del panel A) coincide con la pérdida de la alternancia entre ensambles y la re-aparición del ensamble dominante, vista antes del estímulo.

Las conexiones funcionales entre las neuronas clasificadas por actividad (panel A) reflejan la composición de los ensambles neuronales en términos de comportamiento neuronal a lo largo del experimento. La dinámica de redes (paneles B y C) muestra que en la condición 3 aumentan las células que participan del ensamble dominante y se encuentran funcionalmente más conectadas entre sí, que en la condición 1.

Resultados

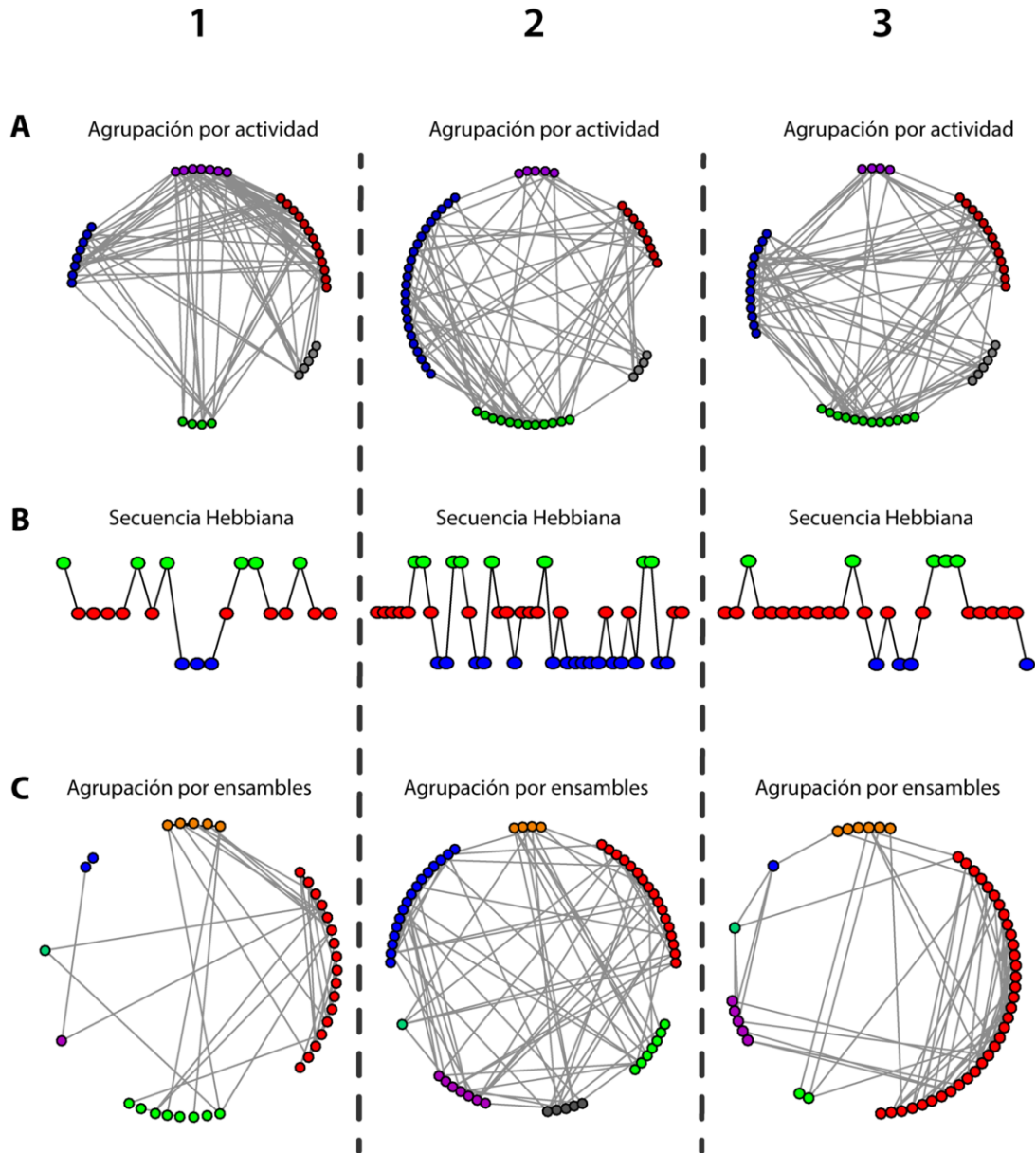


Figura 10. Cambios en la conectividad funcional entre los grupos y los ensambles neuronales parkinsonianos en función del estímulo cortical. Se muestran las 3 condiciones, separadas por las líneas punteadas: antes (1), inmediatamente después del estímulo cortical (2) y 30 min después del estímulo (3) (A) Visualización circular de las neuronas de la Figura 9 agrupadas de acuerdo a los conjuntos neuronales clasificados por su actividad. Las líneas que los unen muestran sus conexiones funcionales durante los picos de co-actividad de la red. (B) Secuencias Hebbianas. Nótese que las condiciones 1 y 3 muestran menor alternancia entre ensambles que la condición 2. (C) Visualización circular de las neuronas de la Figura 9, agrupadas de acuerdo a los ensambles neuronales de co-actividad. Los colores para el panel A no indican lo mismo que para los paneles B y C. En el panel A los colores señalan las diferentes poblaciones neuronales con base en su patrón de actividad en las distintas condiciones, mientras que los colores en los paneles B y C indican la pertenencia de dichas neuronas a distintos ensambles neuronales encontrados en los eventos de co-actividad significativa. De manera que una célula dada del panel A o C puede pertenecer a varios grupos simultáneamente de B y C, pero pertenece sólo a una población neuronal del panel A.

Discusión

En busca de nuevas terapias para la EP se ha utilizado la estimulación cerebral mediante diversas técnicas en distintos blancos. Las más comunes son: la estimulación profunda (DBS) en el STN, GPe y el VIM (Munhoz *et al*, 2016), la estimulación magnética transcraneal, principalmente en M1, SM1 y DLPFC (Wagle Shukla *et al*, 2016; Lafaucheur *et al*, 2014), y otras técnicas de estimulación cortical como la Estimulación Extradural Cortical (Cillia *et al*, 2007) y la estimulación directa transcraneal (tDCS) en Ctx-M1 (Fregni *et al*, 2006; Benninger *et al*, 2010). Los parámetros y efectos obtenidos de la estimulación cortical varían considerablemente entre protocolos y entre sujetos (Fregni *et al*, 2005). Un estudio reciente (Gradinaru *et al*, 2009) determinó que el blanco de la DBS responsable de las mejoras motoras es la corteza motora primaria (Ctx- M1), enfatizando la importancia de comprender los mecanismos por los cuales la estimulación cortical mejora los síntomas motores.

El presente trabajo muestra que un estímulo cortico-estriatal en el área motora primaria (Ctx Stim) es suficiente para modificar, transitoriamente, la dinámica de redes del microcircuito estriatal en una rebanada de tejido cerebral mantenida *ex vivo*. El análisis de las neuronas y los ensambles responsables de dicho cambio en la dinámica fueron el objeto de este trabajo.

De acuerdo con el análisis de dinámica de redes, el estímulo cortical (Ctx Stim) recluta a un nuevo ensamble en el microcircuito control y aumenta considerablemente la actividad del microcircuito, así como los picos significativos de co-actividad. Dichos cambios se mantienen hasta por 1 hora en la rebanada cerebral.

En el microcircuito parkinsoniano, la actividad es mayor que la observada en el microcircuito control sin estimular: presenta mayor cantidad de picos significativos de co-actividad, aunque la alternancia entre los ensambles es poca, pues la dinámica está dominada por un ensamble dominante y recurrente, como se ha reportado previamente (Carrillo-Reid *et al*, 2008; Jaidar *et al*, 2010; Pérez-Ortega *et al*, 2016). En el microcircuito parkinsoniano la actividad neuronal total no se ve afectada por el Ctx Stim. Sin embargo, el Ctx Stim cambia los grupos de neuronas activas y recupera la alternancia entre los ensambles neuronales liberando al circuito del estado parkinsoniano de manera temporal.

Discusión

En busca de los procesos que subyacen el cambio en la dinámica de los ensamblajes neuronales del circuito, las células fueron clasificadas de acuerdo a su participación en las siguientes condiciones: 1. Condición parkinsoniana o tejido carente de dopamina (PD); y 2. Condición post-estímulo cortical del circuito parkinsoniano (PD+Ctx Stim). La población neuronal quedó dividida de manera casi simétrica en neuronas que participan preferencialmente en el estado parkinsoniano y en las que aparecen después del estímulo desenganchadas de este estado la (condición 1 ó 2). Sólo un pequeño porcentaje de neuronas mantuvo su actividad constante antes y después del estímulo.

El estímulo cortical consistentemente recluta a un nuevo grupo de neuronas en el microcircuito. Además las neuronas del circuito se desenganchan de la dinámica parkinsoniana. Esto es evidente ya que se pierde el ensamble dominante, aparecen nuevos ensamblajes y se inicia una dinámica de alternancia de actividad entre ellos como en el circuito control. Sin embargo, la actividad neuronal total y el número total de los picos de actividad sincrónica no difieren.

Un efecto que varía en la práctica clínica es el tiempo durante el cual se mantienen los efectos de la estimulación (Fregni *et al*, 2005). Para poner a prueba la duración de los efectos de la Ctx Stim en el microcircuito parkinsoniano se tomaron registros de duración prolongada (>30 min después del Ctx Stim) y se definieron como la condición experimental 3, esto es, 30 minutos después del Ctx Stim. Encontramos que después de este tiempo el microcircuito regresa a la dinámica parkinsoniana, muy similar a la condición 1: con un ensamble dominante, altamente recurrente y por lo tanto con poca alternancia entre los ensamblajes. Al considerar los experimentos divididos en estas 3 condiciones se obtuvieron 5 grupos neuronales de acuerdo al aumento o disminución de la actividad en cada una de las etapas (Figura 10).

Se observó que en la condición 3 aumenta la actividad de las neuronas reclutadas por el estímulo (grupo verde de la Figura 9) y de neuronas activas en la condición 1 y silenciadas durante la condición 2 (grupo rojo de la Figura 9). Ambos grupos contribuyen a los picos significativos de la condición 3, por lo tanto, dicha actividad no es reconocida como un nuevo ensamble, ya que los vectores neuronales que conforman dichos picos están presentes en fases anteriores del experimento. La dinámica parkinsoniana en la condición 3 es más robusta

Discusión

que la dinámica de la condición 1, en cuanto a los grupos neuronales que participan, las conexiones entre las neuronas que los componen y el alto porcentaje de neuronas del ensamble dominante participando de los picos significativos.

Una de las limitaciones de este trabajo es que no conocemos la identidad de las neuronas involucradas. Sin embargo, sabemos que a causa del Ctx Stim, las neuronas más activas en la condición 1 (rojo y magenta en la Figura 6) reducen su actividad, mientras que un grupo casi silente aumenta considerablemente su actividad (verde y azul en la Figura 6). La disminución de la actividad de las neuronas PD podría deberse a inhibición ejercida por un grupo neuronal presente en el Str. Debido a su innervación cortical preferencial (Vizcarra-Chacón *et al*, 2013; Hernández-Flores *et al*, 2015; Pérez-Ramírez *et al*, 2015) y su alta conectividad en el Str con diversos tipos neuronales, las interneuronas FS-PV⁺ son posibles responsables de dicho cambio, aunque también podría ser provocado por otras interneuronas o por la inhibición conjunta de distintos tipos neuronales. La activación de las neuronas después del Stim podría deberse a una mayor entrada excitatoria, o a la liberación de la inhibición presente en la condición 1. Debido a que la actividad el grupo rojo y la del grupo azul son contrarias, podría existir inhibición recíproca entre ellos, o podrían ser regulados por un mecanismo común.

Aunque el Ctx Stim puede explicar la inversión de actividad de los grupos rojo y azul entre la condición 1 y 2, no está claro el mecanismo que produce el cambio de la dinámica 2 a la 3. Debido a las limitaciones del experimento tampoco podemos afirmar si los cambios de dinámica se deben a la actividad de un tipo neuronal específico o a la actividad de ensambles compuestos por diversos tipos neuronales. Se requieren experimentos con identificación celular, como optogenética o el uso de fármacos específicos para determinar las neuronas responsables de los cambios de actividad y los mecanismos que utilizan para regular a otras neuronas.

La recurrencia de la dinámica parkinsoniana podría deberse a la incapacidad del microcircuito para mantener los cambios provocados por el estímulo. Se sabe que todos los mecanismos de plasticidad neuronal en el Str dependen de dopamina (Kreitzer & Malenka, 2008; Shen *et al*, 2008; Surmeier *et al*, 2010) y son severamente afectadas por la EP (Surmeier *et al*, 2010). Es muy probable que la falta de dopamina imposibilite que se lleven a cabo los cambios plásticos necesarios para conservar la alternancia entre ensambles. El microcircuito

Discusión

en la rebanada es una escala intermedia entre las descripciones a nivel molecular y celular que describen la plasticidad neuronal en la EP y los resultados vistos en la clínica. Reportes clínicos recientes con estimulación cortical muestran que el resultado de esta se ve afectada por el estado de medicación del paciente al momento de la estimulación (Benninger *et al*, 2015). En conjunto dichas evidencias sugieren que el tratamiento conjunto de fármacos y estimulación podría constituir un tratamiento más eficaz. Se requieren más experimentos donde se evalúe a nivel de microcircuito el efecto conjunto de los fármacos y estimulación para proponer protocolos de tratamiento más óptimos.

Conclusiones

- El microcircuito estriatal control exhibe poca actividad espontánea.
- El estímulo cortical activa al microcircuito estriatal revelando secuencias temporales entre ensambles neuronales.
- El microcircuito privado de dopamina exhibe mucha actividad espontánea confinada a un ensamble dominante y recurrente.
- El estímulo cortical recupera la alternancia entre ensambles neuronales de forma similar al circuito control, restringiendo al ensamble dominante.
- El estímulo provoca recambio neuronal (reclutamiento de neuronas silentes y silenciamiento de neuronas activas antes del estímulo) en el tejido parkinsoniano, que puede explicar la recuperación de la dinámica del microcircuito.
- La recuperación de la dinámica se pierde 30 min después del estímulo y el ensamble dominante integra neuronas que fueron reclutadas por el estímulo.

Perspectivas

- Probar el efecto conjunto de estimulación cortical y fármacos anti-Parkinsonianos sobre la dinámica de redes en animales lesionados.
- Realizar experimentos de estimulación cortical en animales transgénicos lesionados que expresen marcadores fluorescentes en poblaciones neuronales específicas presentes en el Str (DRD1, DRD2, PV, ChAT) en la preparación de rebanada.
- Realizar experimentos de activación o inhibición optogenética o farmacológica, en animales transgénicos lesionados para comprobar su participación en el cambio de actividad provocado por el estímulo y en la dinámica parkinsoniana recurrente en el modelo de rebanada.

Referencias

- Arias-García, M.A., Tapia, D., Flores-Barrera, E., Pérez-Ortega, J.E., Bargas, J., Galarraga, E. (2013) Duration differences of corticostriatal responses in striatal projection neurons depend on calcium activated potassium currents. *Front Syst Neurosci.* **7**: 63.
- Ashby, F.G., Turner, B.O., Horvitz, J.C. (2010) Cortical and basal ganglia contributions to habit learning and automaticity. *Trends Cogn Sci.* **14**(5):208-15.
- Barabasi, A.L. & Albert, R. (1999) Emergence of scaling in random networks. *Science.* **286**(5439):509-12.
- Benazzouz, A., Gross, C., Féger, J., Boraud, T., Bioulac, B. (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci.* **5**(4):382-9.
- Bennett, B.D. & Bolam, J.P. (1994) Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neuroscience.* **62**(3):707-19.
- Bennett, B.D. & Wilson, C.J. (1999) Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *J Neurosci.* **19**(13):5586-96.
- Benninger, D.H. & Hallett, M. (2015) Non-invasive brain stimulation for Parkinson's disease: Current concepts and outlook 2015. *NeuroRehabilitation.* **37**(1):11-24.
- Benninger, D.H., Lomarev, M., Lopez, G., Wassermann, E.M., Li, X., Considine, E., Hallett, M. (2010) Transcranial direct current stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **81**(10):1105-11.
- Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J.F., Pappy, M., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S. (1995) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci.* **15**(12):7821-36.
- Beutler, L.R., Eldred, K.C., Quintana, A., Keene, C.D., Rose, S.E., Postupna, N., Montine, T.J., Palmiter, R.D.(2011) Severely impaired learning and altered neuronal morphology in mice lacking NMDA receptors in medium spiny neurons. *PLoS One.* **6** (11):e28168.
- Bernard, V., Somogyi, P., Bolam, J.P. (1997) Cellular, subcellular, and subsynaptic distribution of AMPA-type glutamate receptor subunits in the neostriatum of the rat. *J Neurosci.* **17** (2):819-33.
- Bernard, V. & Bolam, J.P. (1998) Subcellular and subsynaptic distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor in the neostriatum and globus pallidus of the rat: co-localization at synapses with the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor. *Eur J Neurosci.* **10** (12):3721-36.
- Bergman, H. & Deuschl, G. (2002) Pathophysiology of Parkinson's Disease: From Clinical Neurology to Basic Neuroscience and Back. *Movement Disorders* **17**:S28-S40
- Berke, J.D. (2001) Functional Properties of Striatal Fast-Spiking Interneurons. *Front Syst Neurosci.* **5**: 45.
- Bernard, V., Normand, E., Bloch, B. (1992) Phenotypical Characterization of the Rat Striatal Neurons Expressing Muscarinic Receptor Genes. *The Journal of Neuroscience.* **7**: 3591-3600.
- Bevan, M.D., Magill, P.J., Terman, D., Bolam, J.P., Wilson, C.J. (2002) Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci.* **25**(10):525-31.
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., Bevan, M.D. 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* **196**(Pt. 4):527-42
- Bracci, E., Centonze, D., Bernardi, G., Calabresi, P. (2002) Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J Neurophysiol.* **87**(4):2190-4.

Referencias

- Brown, P., Oliviero, A., Mazzone, P., Insola, A., Tonali, P., Di Lazzaro, V. (2001) Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *J Neurosci.* **21**(3):1033-8.
- Brown, S.L., Joseph, J., Stopfer, M., 2005. Encoding a temporally structured stimulus with a temporally structured neural representation. *Nat. Neurosci.* **8**, 1568–1576.
- Bullmore, E. & Sporns, O. (2009) Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci.* **10**(3):186-98.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colín, R., Bargas, J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol.* **99** (33): 1435–1450.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibáñez-Sandoval, O., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Bargas, J., (2009^a). Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* **101**: 737–749.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernández, A., Vergara, R., Galarraga, E., Bargas, J., (2009^b) Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* **102**: 682–690.
- Carrillo-Reid, L., Hernández-López, S., Tapia, D., Galarraga, E., Bargas, J., (2011) Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: receptor-specific configuration of cell assemblies. *J. Neurosci.* **31** : 14972–14983.
- Carrillo-Reid, L., Miller, J.-E.K., Hamm, J.P., Jackson, J., Yuste, R., (2015a) Endogenous sequential cortical activity evoked by visual stimuli. *J. Neurosci.* **35**: 8813–8828.
- Carrillo-Reid, L., Lopez-Huerta, V.G., Garcia-Munoz, M., Theiss, S., Arbuthnott, G.W., (2015b) Cell assembly signatures defined by short-term synaptic plasticity in cortical networks. *Int. J. Neural Syst.* **25**, 1550026.
- Centonze, D., Grande, C., Usiello, A., Gubellini, P., Erbs, E., Martin, A.B., Pisani, A., Tognazzi, N., Bernardi, G., Moratalla, R., Borrelli, E., Calabresi, P. (2003) Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *J Neurosci.* **23**(15):6245-54.
- Cilia, R., Landi, A., Vergani, F., Sganzerla, E., Pezzoli, G., Antonini, A. (2007) Extradural Motor Cortex Stimulation in Parkinson's Disease. *Movement Disorders* **22**: 1.
- Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.S., Gellene, R. (1969) Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med.* **280**(7):337-45.
- Czubayko, U. & Plenz, D. (2002) Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 15764–9.
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I.B., Deisseroth, K., Bolam, J.P., Gerdjikov, T., Mena-Segovia, J. (2014) A Major External Source of Cholinergic Innervation of the Striatum and Nucleus Accumbens Originates in the Brainstem. *J Neurosci.* **34** (13): 4509-4518.
- Day, M., Wokosin, D., Plotkin, J.L., Tian, X., Surmeier, D.J. (2008) Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J Neurosci.* **28**(45):11603-14.
- Defer, G.L., Widner, H., Marié, R.M., Rémy, P., Levivier, M. (1999) Core assessment program for surgical interventional therapies in Parkinson's disease (CAPSIT-PD). *Mov Disord.* **14**(4):572-84.
- Ding, J., Peterson, J. D., Surmeier, D. J. (2008) Corticostriatal and Thalamostriatal Synapses Have Distinctive Properties. *J Neurosci.* **28**(25):6483-92.
- Do, J., Kim, J.-I., Bakes, J., Lee, K., Kaang, B.-K. (2013) Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. *Learning and memory.* **20**:21-28.
- Doig, N.M., Moss, J., Bolam, J. P. (2010) Cortical and Thalamic Innervation of Direct and Indirect Pathway Medium-Sized Spiny Neurons in Mouse Striatum *Journal of Neuroscience* **30** (44) 14610-14618.

Referencias

- Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., Moisan, F. (2016) Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev Neurol* **172**(1):14-26.
- Flores-Barrera E., Vizcarra-Chacón, B. J., Bargas J., Tapia, D., Galarraga, E. (2011) Dopaminergic Modulation of Corticostriatal Responses in Medium Spiny Projection Neurons from Direct and Indirect Pathways. *Front Syst Neurosci.* **5**: 15.
- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B.J., Tapia, D., Bargas, J., Galarraga, E. (2010) Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Frontiers in Systems Neuroscience.* **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**(5):719-31.
- Fregni, F., Simon, D.K., Wu, A., Pascual-Leone, A. (2005) Non-invasive brain stimulation for Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **76**:1614-1623.
- Fregni, F., Boggio, P.S., Santos, M.C., Lima, M., Vieira, A.L., Rigonatti, S.P., Silva, M.T., Barbosa, E.R., Nitsche, M.A., Pascual-Leone, A. (2006) Noninvasive cortical stimulation with transcranial direct current stimulation in Parkinson's disease. *Mov Disord.* **21**(10):1693-702.
- Fujiyama, F., Fritschy, J.M., Stephenson, F. A., Bolam, J.P. (2010) Synaptic Localization of GABA(A) Receptor Subunits in the Striatum of the Rat. *J Comp Neurol* **416** (2), 158-172.
- Garcia-Rill, E. (1986) The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res.* **396**(1):47-63.
- Gerfen, C. R., Surmeier, D. J. (2011) Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.***34**:441-66
- Gertler, T.S., Chan, C.S., Surmeier, D.J. (2008) Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J Neurosci.* **28**(43):10814-24.
- Gittis, A.H., Nelson, A.B., Thwin, M.T., Palop, J.J., Kreitzer, A.C. (2010) Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *J Neurosci.* **30**(6):2223-34.
- Goldberg, J.A., Ding, J.B., Surmeier, D.J. (2012) Muscarinic modulation of striatal function and circuitry. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **208**: 223-24
- Graham-Brown, T. (1911).The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **84**: 309-319.
- Gradinaru, V., Mogri, M., Thompson, K.R., Henderson, J.M., Deisseroth, K. (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science.* **324**(5925):354-9.
- Grossman, N., Bono, D., Dedic, N., Kodandaramaiah, S. B., Rudenko, A., Suk H-J., Cassara, A. M., Neufeld, E., Kuster, N., Tsai, L-H., Pascual-Leone, A., Boyden, E.S. (2017) Noninvasive Deep Brain Stimulation via Temporally Interfering Electric Fields. *Cell* **169**:1029-1041
- Guzmán, J.N., Hernández, A., Galarraga, E., Tapia, D., Laville A, Vergara R, Aceves J, Bargas J.(2003) Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci.* **23**(26):8931-40.
- Hebb, D.O. (1949). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory.* John Wiley & Sons: New York, NY.
- Hernandez-Flores, T., Hernandez-Gonzalez, O., Perez-Ramirez, M.B., Lara-Gonzalez, E., Arias-Garcia, M.A., Duhne, M., Perez-Burgos, A., Prieto, G.A., Figueroa, A., Galarraga, E., Bargas, J. (2015) Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M-4-type receptors. *Neuropharmacology* **89**:232-244
- Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garcia, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., Surmeier, D.J. (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type

Referencias

- Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β 1]-IP₃-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci.* **20**(24):8987-95.
- Hersch, S.M., Ciliax, B.J., Gutekunst, C.A., Rees, H.D., Heilman, C.J., Yung, K.K., Bolam, J.P., Ince, E., Yi, H., Levey, A.I. (1995) Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci.* **15**(7 Pt 2):5222-37.
- Ibáñez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Unal, B., Shah, F., Koós, T., Tepper, J.M. (2010) Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. *J Neurosci.*
- Ibáñez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Unal, B., Shah, F., Koós, T., Tepper, J.M. (2011) A novel functionally distinct subtype of striatal neuropeptide Y interneuron. *J. Neurosci.* **31**: 16757-16769.
- Ikegaya, Y., Le Bon-Jego, M., Yuste, R., (2005) Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci. Res.* **52**: 132-138.
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., Hernández-Cruz, A. (2010). Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J Neurosci* **30** (34): 11326- 11336.
- Jin, X., Tecuapetla, F., Costa, R. M. (2014) Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nat Neurosci.* **17**(3):423-30.
- Jin, X. & Costa, R.M. (2015) Shaping action sequences in basal ganglia circuits. *Curr Opin Neurobiol.* **33**:188-96.
- Karachi, C., Yelnik, J., Tandé, D., Tremblay, L., Hirsch, E.C., François, C. (2005) The pallidosubthalamic projection: An anatomical substrate for nonmotor functions of the subthalamic nucleus in primates. *Mov. Disord.* **20**: 172-180.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., Emson, P.C. (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* **18**(12):527-35.
- Kemp, J. M., Powell, T. P. S.(1971)The Termination of Fibres from the Cerebral Cortex and Thalamus upon Dendritic Spines in the Caudate Nucleus: A Study with the Golgi Method. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **262** :429-439
- Khedr, E.M., Rothwell, J.C., Shawky, O.A., Ahmed, M.A., Hamdy, A. (2006) Effect of daily repetitive transcranial magnetic stimulation on motor performance in Parkinson's disease. *Mov Disord.* **21**(12):2201-5.
- Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C. (2007) Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature.* **445** (7128):643-7.
- Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C.(2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* **60**: 543-54
- Koós, T. & Tepper, J.M. (2002) Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci.* **22**(2):529-35.
- Lambot, L., Chaves Rodriguez, E., Houtteman, D., Li, Y., Schiffmann, S. N., Gall, D., de Kerchove d'Exaerde, A. (2016) Striatopallidal Neuron NMDA Receptors Control Synaptic connectivity, Locomotor and Goal-Director Behaviors. *The Journal of Neuroscience* **36**(18):4976-4992
- Langston, J.W., Langston, E.B., Irwin, I. (1984) MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl.* **100**:49-54.
- Lefaucheur, J.P., Drouot, X., Von Raison, F., Ménard-Lefaucheur, I., Cesaro, P., Nguyen, J.P. (2004) Improvement of motor performance and modulation of cortical excitability by repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex in Parkinson's disease. *Clin Neurophysiol.* **115**(11):2530-41.

Referencias

- Lefaucheur, J.P., André-Obadia, N., Antal, A., Ayache, S.S., Baeken, C., Benninger, D.H., Cantello, R.M., Cincotta, M., de Carvalho, M., De Ridder, D., Devanne, H., Di Lazzaro, V., Filipović, S.R., Hummel, F.C., Jääskeläinen, S.K., Kimiskidis, V.K., Koch, G., Langguth, B., Nyffeler, T., Oliviero, A., Padberg, F., Poulet, E., Rossi, S., Rossini, P.M., Rothwell, J.C., Schönfeldt-Lecuona, C., Siebner, H.R., Slotema, C.W., Stagg, C.J., Valls-Sole, J., Ziemann, U., Paulus, W., Garcia-Larrea, L. (2014) Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). *Clin Neurophysiol.* **125**(11):2150-206.
- LeWitt, P.A. & Fahn, S. (2016) Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward. *Neurology.* **86**(14 Suppl 1):S3-12.
- Martín Fernández, F. & Martín González, T. (2009) Pathological gambling and hypersexuality due to dopaminergic treatment in Parkinson' disease. *Actas Esp Psiquiatr.* **37**(2):118-22.
- Morgante, L., Morgante, F., Moro, E., Epifanio, A., Girlanda, P., Ragonese, P., Antonini, A., Barone, P., Bonuccelli, U., Contarino, M.F., Capus, L., Ceravolo, M.G., 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**(8):528-31.
- Mulak, A. & Bonaz, B. (2015) Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol* **21**(37): 10609-10620
- Munhoz, R.P., Picillo, M., Fox, S.H., Bruno, V., Panisset, M., Honey, C.R., Fasano, A. (2016) Eligibility Criteria for Deep Brain Stimulation in Parkinson's Disease, Tremor, and Dystonia. *Can J Neurol Sci.* **43**(4):462-71.
- Muñoz-Manchado, A.B., Foldi, C., szydlowski, S., Sjulson, L., Farries, M., Wilson, c., silberberg, G., hjerling-Leffler, J. (2016) *Cereb Cortex.***26** (1):96-105.
- Ni, Z., Pinto, A.D., Lang, A.E., Chen, R. (2010) Involvement of the cerebellothalamocortical pathway in Parkinson disease. *Ann Neurol.* **68**(6):816-24.
- 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**(4):1800-5.
- Pérez-Ramírez, M.B., Laville, A., Tapia, D., Duhne, M., Lara-González, E., Bargas, J., Galarraga, E. (2015) KV7 Channels Regulate Firing during Synaptic Integration in GABAergic Striatal Neurons. *Neural Plast.* 2015:472676.
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., Bargas, J.(2016) Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol Dis.* **91**:347-61.
- Planert, H., Szydlowski, S.N., Hjorth, J.J., 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**(9):3499-507.
- Plenz, D. & Kital, S.T. (1999) A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature.***400** (6745):677-82.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L. (1997) Mutation in the a-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* **276**: 2045–2047.
- Rivlin-Etzion, M., Marmor, O., Heimer, G., Raz, A., Nini, A., Bergman, H. (2006) Basal ganglia oscillations and pathophysiology of movement disorders. *Current Opinion in Neurobiology.* **16**(6): 629–637

Referencias

- Roseberry, T.K., Lee, A.M., Lalive, A.L., Wilbrecht, L., Bonci, A., Kreitzer, A.C. (2016) Cell-Type-Specific Control of Brainstem Locomotor Circuits by Basal Ganglia. *Cell* **164**: 526–537
- Rubinov, M. & Sporns, O. (2010) Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. *Neuroimage*. 52(3):1059-69.
- Ryczlo, D. & Dubuc, R. (2013) The multifunctional mesecephalic locomotor region. *Curr Pharm Des*.**19**(24):4448-70.
- Schiffmann, S.N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R.A., Ferré, S.(2007) Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol*. **83**(5):277-92.
- Schultz, W. (1982) Depletion of dopamine in the striatum as an experimental model of Parkinsonism: direct effects and adaptive mechanisms. *Prog. Neurobiol.*, **18** : 121–166.
- Shen, W., Tian, X., Day, M., Ulrich, S., Tkatch, T., Nathanson, N.M., Surmeier, D.J. (2007) Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci*. **10**(11):1458-66.
- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., Surmeier, D.J. (2008) Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science*. **321**(5890):848-51.
- Sherman, D., Fuller, P.M., Marcus, J., Yu, J., Zhang, P., Chamberlin, N.L., Saper, C.B., Lu, J. (2015) Anatomical location of the mesencephalic locomotor region and its possible role in locomotion, posture, cataplexy, and Parkinsonism. *Front. Neurol*. **6**:140.
- Shik M.L., Severin F.V., Orlovsky G.N. (1966) Control of walking and running by means of electrical stimulation of the midbrain. *Biophysics* **11**: 756-765.
- Shik M.L., Severin F.V., Orlovsky G.N. (1967) Structures of the brain stem responsible for evoked locomotion. *Fiziol. Zh. SSSR im. Sechenova* **53**: 1125:1132.
- Sironi, V. A. (2011) Origin and Evolution of Deep Brain Stimulation. *Front Integr Neurosci*. **5**: 42.
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., Bolam, J.P. (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. **86**(2):353-87.
- Smith, Y., Raju, D.V., Pare, J.F., Sidibe, M. (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci*. **27**(9):520-7.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.G., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M. (1997) α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**: 839–840.
- Stocco, A., Lebiere, C., Anderson, J.R. 2010. Conditional routing of information to the cortex: a model of the basal ganglia's role in cognitive coordination. *Psychol Rev* **117**(2): 541–574.
- Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., Shen, W. (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*. **30**(5):228-35.
- Surmeier, D.J., Shen, W., Day, M., Gertler, T., Chan, S., Tian, X., Plotkin, J.L. (2010) The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits. *Prog Brain Res*. **183**:149-67.
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., Vargas, J. (2011) Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience*. **198**:3-18.
- Taverna, S., Ilijic, E., Surmeier, D.J. (2008) Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci*. **28**: 5504–5512.
- Tepper, J.M. & Bolam, P. (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology* **14**:685–692
- Tetrad, J.W. & Langston, J.W. (1989) MPTP- induced parkinsonism as a model for Parkinson's disease *Acta Neurol. Scand*. **126**:35-40
- Tunstall, M.J., Oorschot, D.E., Kean, A., Wickens, J.R. (2002) Inhibitory Interactions Between Spiny Projection Neurons in the Rat Striatum. *J Neurophysiol* **88**: 1263–1269.

Referencias

- Ungerstedt, U. (1968) 6-Hydroxy-Dopamine induced degeneration of Central Monoamine Neurons. *European Journal of Pharmacology* **5**:107-110.
- Vizcarra-Chacón, B.J., Arias-García, M.A., Pérez-Ramírez, M.B., Flores-Barrera, E., Tapia, D., Drucker-Colin, R., Bargas, J., Galarraga, E. (2013) Contribution of different classes of glutamate receptors in the corticostriatal polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neurosci.* **14**:60.
- Wagle Shukla, A., Shuster, J.J., Chung, J.W., Vaillancourt, D.E., Patten, C., Ostrem, J., Okun, M.S. (2016) Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) Therapy in Parkinson Disease: A Meta-Analysis. *PM R.* **8**(4):356-66.
- Watts, D. J. & Strogatz, S. H. (1998) Collective dynamics of 'small-world' networks *Nature* **393**, 440-442.
- Wichmann, T. & DeLong, M.R. (1999) Oscillations in the basal ganglia. *Nature* **400**:621-622
- Wichmann, T., DeLong, M., Guridi, J., Obeso, J.A. (2011) Milestones in Research on the Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Movement Disorders* **26**(6): 1032-1041.
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., Wood, N.W. (2006) Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *TRENDS in Molecular Medicine* **12**(11): 521-528.
- Yan, Z. & Surmeier, D.J. (1996) Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci.* **16**(8):2592-604.
- Yan, Z., Flores-Hernández, J., Surmeier, D.J. (2001) Coordinated expression of muscarinic receptor Messenger RNAs in striatal médium spiny neurons. *Neuroscience.* **103**(4):1017-1024.
- Young, A.M. & Bradford, H.F.(1986) Excitatory amino acid neurotransmitters in the corticostriate pathway: studies using intracerebral microdialysis in vivo. *J Neurochem.* **47**(5):1399-404.
- Zhou, F.M., Wilson, C.J., Dani, J.A. (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol.* **53**(4):590-605.

Anexo. Siglas y abreviaturas

Siglas	Español	Inglés
6OHDA	6-hidroxidopamina	6-hydroxydopamine
ACSF	Fluido Cerebro-espinal Artificial	Artificial Cerebrospinal Fluid
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AP	Antero-posterior	No aplica
BG	Ganglios Basales	Basal Ganglia
BSA	Albúmina de suero bovino	Bovine Serum Albumin
CA	Ensamblajes celulares	Cell Assemblies
CAPSIT-PD	Programa de evaluación base para las terapias de intervención quirúrgica en la Enfermedad de Parkinson	Core assessment program for surgical interventional therapies in Parkinson's disease
CCW	En contra del sentido de las manecillas de reloj	Counterclockwise
ChaT	Colina-acetil Transferasa	Choline-acetyl Transferase
COMT	Catecol- <i>O</i> -metiltransferasa	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
CPG	Generadores Centrales de Pautas	Central Patern Generators
Ctx Stim	Estímulo Cortico-estriatal	Cortical Stimulus
Ctx-M1	Corteza Motora Primaria	Primary Motor Area
CW	En el sentido de las manecillas del reloj	Clockwise
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBS	Estimulación Cerebral Profunda	Deep Brain Stimulation
DLPFC	Corteza dorsolateral prefrontal	Dorsolateral Prefrontal Cortex
DRD1	Receptor de Dopamina tipo D1	Dopamine Receptor D1
DRD2	Receptor de dopamina tipo D2	Dopamine Receptor D2
dSPN	Neurona Espinosa de Proyección de la vía directa	direct-pathway Spiny Projection Neurons
DV	Dorso-ventral	No aplica
EP	Enfermedad de Parkinson	No aplica
FS	Neuronas de disparo rápido	Fast Spiking
GABA	Ácido gamma-amino-butírico	Gamma Amino Butiric Acid

Anexo

GPE	Globo Pálido externo	External Globus Pallidus
GPI	Globo Pálido interno	Internal Globus Pallidus
IFC	Instituto de Fisiología Celular	No aplica
iSPN	Neurona Espinosa de Proyección de la vía indirecta	indirect-pathway Spiny Projection Neurons
KA	Kainato	Kainate
LDOPA	Levodopa	Levodopa
LDT	Núcleo Latero Dorsal Tegmental	Laterodorsal Tegmental Nucleus
LL	Lado Lesionado	No aplica
LM	Latero-medial	No aplica
LTD	Depresión a largo plazo	Long-term depression
LTP	Potenciación a largo plazo	Long- term potentiation
LTS	Neuronas de bajo umbral de disparo	Low Threshold Spikes
MLR	Región Locomotora Mesencefálica	Mesencephalic Locomotor Region
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MRI	Imagenología por Resonancia Magnética	Magnetic Resonance Imaging
NGF	Neurogliforme	Neurogliform
NL	No lesionado	No aplica
NMDA	N-metil-D-aspartato	<i>N</i> -methyl-D-aspartate receptor
NOS	Óxido nítrico sintasa	Nitric Oxide Synthase
NPY	Neuropéptido Y	Neuropeptide Y
Nst	Neostriado	Neostriatum
PBS	Amortiguador de fosfatos salino	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehido	paraformaldehyde
PLTS	Neuronas de bajo umbral de disparo con meseta	Plateau Low Threshold Spikes
PPN	Núcleo Pedúnculo pontino	Pedunculo Pontine Nucleus
PPN	Núcleo Pedúnculo pontino	Pedunculo Pontine Nucleus
PV	Parvalbúmina	Parvalbumin
SM1	Corteza Sensomotora Primaria	Primary Sensomotor Cortex
SNc	Sustancia Nigra pars compacta	Sustantia Nigra pars compacta
SNr	Sustancia Nigra pars reticulata	Sustantia Nigra pars reticulata
SPN	Neuronas Espinosas de Proyección	Spiny Projection Neurons

Anexo

STN	Núcleo Subtalámico	Subthalamic Nucleus
TAN	Neurona Tónicamente Activada	Tonic Activated Neuron
TAN	Neurona Tónicamente Activada	Tonically Active Neuron
tDCS	Estimulación transcranial de corriente directa	transcranial Direct Current Stimulation
TH	Tirosina Hidroxilasa	Tyrosine hydroxylase
VIM	Núcleo Intermedio Lateral del Tálamo	Ventral Intermedius Nucleus of the Thalamus