



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS

LA ESTIMULACIÓN CORTICAL ALIVIA LA ACTIVIDAD
PATOLÓGICA DEL PARKINSONISMO *IN VITRO*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ARIADNA APARICIO JUÁREZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MARZO, 2019



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.

“Las especies que sobreviven a la lucha por la existencia, no son las que tienen a los individuos más fuertes, sino aquellas cuyos integrantes son más solidarios”.

Vamos hacia la vida.

Ricardo Flores Magón.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.

Al Dr. José Bargas Díaz por todo el apoyo brindado en el desarrollo de los diferentes proyectos de investigación, admiro su trabajo como neurocientífico y su calidad humana.

A la Dra. Elvira Galarraga Palacio por compartirme sabias palabras para la realización de este proyecto doctoral. Muchas gracias por todo su apoyo.

A la M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo por la capacitación recibida en el cuidado y manejo de los animales de laboratorio.

A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro por enseñarme y brindarme su apoyo en el desarrollo de las diferentes técnicas de biología molecular.

A la M. C. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez por el trabajo en equipo que desempeñamos.

Al M.V.Z. Héctor Malagón Rivero por el apoyo obtenido en la unidad de Bioterio.

A los Técnicos Académicos Juan Antonio Laville Conde, Dagoberto Tapia Ramírez, Dr. Josué Orlando Ramírez J. por el apoyo en el trabajo del laboratorio y las sugerencias académicas.

A la Dra. Laura Ongay Larios encargada de la Unidad de Biología Molecular y a las Técnicas Académicas Minerva Mora Cabrera y Ma. Guadalupe Códiz Huerta por todas las facilidades brindadas con el uso del equipo que se encuentra en esa unidad.

A la unidad de cómputo, Ana María Escalante Gonzalbo y a Francisco Pérez Eugenio.

Al Posgrado en ciencias biomédicas de la UNAM.

Al Instituto de Fisiología Celular por todo el apoyo en mi formación académica.

Al CONACyT por otorgarme la beca de Doctorado en el programa de posgrado en ciencias biomédicas.

A la UNAM, por todo lo aprendido, por formarme y darme herramientas que me permiten realizar y desarrollar diferentes proyectos de investigación, gracias por ser el *alma mater*.

AGRADECIMIENTOS

A mi Mamá Luz María y a mi Papá Juan, a mi hermano Alfredo, que siempre me apoyan en todo momento, por sus sabias palabras, por ser parte importante y fundamental en mi vida, por todo el amor que siempre me dan, los amo familia.

A toda la raíz, a mi familia, a los Abuelos, a los tíos y tías, primos y primas que siempre me impulsaron a seguir adelante y sin ellos no sería lo que soy.

A todos mis amigos de sueños y carnales de vida, a todas esas personas que han sido parte importante, gracias por todo lo compartido y salud por lo que viene, me siento muy afortunada de tenerlas y contar con su apoyo.

A mis compañeras de proyectos, a Mariana y Esther que fueron clave fundamental para la realización de este trabajo.

Índice

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | II |
| Resumen | IV |
| 1. Introducción. | |
| 1.1. Ganglios Basales | 1 |
| 1.2. Las vías directa e indirecta | 1 |
| 1.3. La señalización de la Dopamina | 3 |
| 1.4. La enfermedad de Parkinson | 3 |
| 1.5. Microcircuitos | 5 |
| 2. Planteamiento del problema. | |
| 2.1 Pregunta | 7 |
| 2.2 Hipótesis | 7 |
| 2.3 Objetivo | 7 |
| 3. Metodología: Material y Métodos. | |
| 3.1 Manejo, uso y cuidado de los Animales | 8 |
| 3.2 Modelo de 6-OHDA | 8 |
| 3.3 Preparación de las rebanadas cerebrales | 10 |
| 3.4 Adquisición de datos | 10 |
| 3.5 Análisis de datos | 11 |
| 3.6 Análisis estadístico | 13 |
| 4. Resultados. | |
| 4.1 Estimulación cortical en rebanadas de estriado | 15 |
| 4.2 Actividad celular en el estriado deficiente en DA antes y después de la estimulación cortical | 21 |
| 4.3 Cambios en la arquitectura y dinámica del microcircuito deficiente en DA después de la estimulación cortical | 25 |
| 4.4 Efectos de la estimulación cortical en presencia de L-DOPA en un microcircuito deficiente en DA | 28 |
| 5. Discusión. | |
| 5.1 Estimulación cortical en el control y microcircuitos deficientes en DA | 37 |
| 6. Referencias | 41 |

Abreviaturas

AP: Anterior-posterior

AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico, (por sus siglas en inglés).

CCW: En sentido contrario de las manecillas del reloj, (por sus siglas en inglés).

CPG: Centros innatos generadores de pautas, (por sus siglas en inglés).

Ctrl: Control

CW: Sentido de las manecillas del reloj, (por sus siglas en inglés).

CtxS: Estimulación cortical

DA: Dopamina.

EN: Ensamble(s) neuronal(es)

EP: Enfermedad de Parkinson

fMRI: Resonancia magnética funcional, (por sus siglas en inglés).

PLC: Enzima fosfolipasa C

GABA: Ácido gamma-aminobutírico, (por sus siglas en inglés).

GB: Ganglios basales

GPe: Globo pálido externo

GPi: Globo pálido interno

6-OHDA: 6-hydroxy-dopamina

L-DOPA: levodopa, L-3,4 dihidroxifenilalanina

NMDA: N-metil-D-aspartato

NSP: Neuronas espinosas de proyección

NPP: Núcleo pedúnculo pontino

NST: Núcleo subtalámico

PKA: Proteína cinasa A, (por sus siglas en inglés).

RGS: Reguladores de la señalización de proteínas G

SC: Colículo superior, (por sus siglas en inglés).

SNC: Substancia Nigra *pars compacta*

SNr: Sustancia Nigra *pars reticulata*

Resumen

En trabajos previos del laboratorio, hemos comprobado que la adición de un estímulo excitatorio como N-metil-D-aspartato (NMDA) es capaz de activar al microcircuito estriatal, mostrando ensambles neuronales que alternan su actividad produciendo secuencias temporales. Uno de los objetivos de este trabajo, fue demostrar si se podía evocar una actividad similar mediante la estimulación cortical. La imagenología de calcio nos permite seguir la actividad de docenas de neuronas con resolución de célula única en rebanadas de cerebro de ratón. Un tren como estímulo eléctrico en la corteza provocó la actividad de la red, similar a la inducida por la aplicación de NMDA. Anteriormente, también se demostró que el microcircuito estriatal deficiente en dopamina aumenta la actividad espontánea generando ensambles muy recurrentes que interrumpen las secuencias temporales encontradas en los microcircuitos control. Esta actividad se correlaciona con la actividad patológica de la enfermedad de Parkinson. Varios protocolos de estimulación cortical, tales como la estimulación magnética transcraneal, reducen los signos motores del parkinsonismo. En esta tesis se muestra que la estimulación cortical *in vitro* elimina temporalmente la actividad patológica del microcircuito estriatal deficiente en dopamina y mla actividad de algunas neuronas que sostienen esta actividad, también se reclutan nuevas neuronas que permiten transiciones entre estados de red, similares al circuito control. Cuando la estimulación cortical es dada en presencia de L-DOPA, la actividad parkinsoniana es eliminada durante todo el período de adquisición. La evidencia experimental sugiere que la estimulación cortical puede ser equiparada a la generada por la estimulación magnética transcraneal, esto podría permitir reducir la dosis de L-DOPA en pacientes con la enfermedad de Parkinson.

1. Introducción

1.1 Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB) son una serie de núcleos subcorticales encargados de la organización y ejecución de acciones voluntarias e intervienen en la regulación de las funciones motoras (Graybiel, A. M., 1995). El estriado es el principal núcleo de entrada de los GB. Está compuesto principalmente de neuronas GABAérgicas, de las cuales 90% son neuronas espinosas de proyección (NSP) que constituyen la salida estriatal a los otros núcleos de los GB. El 10% restante de las neuronas son interneuronas colinérgicas y GABAérgicas (Gerfen y Surmeier, 2011).

Se sabe que el estriado es el principal núcleo de entrada por la gran cantidad de aferencias que recibe (Bolam et al., 2000). Por ejemplo, todas las áreas corticales, como la sensorial, motora y de asociación, proyectan al estriado (Bolam et al., 2000, Gerfen et al., 2002). De la misma manera, recibe una gran aferencia del tálamo, particularmente, de los núcleos intralaminares (Doig et al., 2010, Smith et al., 2004). Ambas proyecciones son glutamatérgicas por lo que forman conexiones excitatorias sinápticas con las NSP y las diferentes interneuronas. Todas ellas, integran los comandos corticales y talámicos (Arias-García M et al., 2017, Kawaguchi et al., 1995). Estos comandos se transmiten desde este núcleo al resto de los ganglios basales a través de NSPs GABAérgicas de dos vías llamadas directa e indirecta (Gerfen y Wilson, 1996).

1.2 Las vías directa e indirecta

Las NSP son neuronas GABAérgicas que se dividen en dos poblaciones que tiene una proporción similar de acuerdo a su proyección axonal (Gerfen y Surmeier, 2011). Los axones de las NSP de la vía directa proyectan a los núcleos de salida de los GB que son el globo pálido interno (GPi) y la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr). Mientras que la vía indirecta proyecta al resto de los núcleos de los GB: al globo pálido externo (GPe) y al núcleo subtalámico (NST). A su vez estos núcleos se comunican entre sí y con los núcleos de salida GPi y SNr. Todas las neuronas en el GPe, GPi, NST y SNr disparan tónicamente de manera autónoma. La vía indirecta genera excitación de las neuronas de los núcleos de salida a través de desinhibición del NST. La vía indirecta proyecta al GPe

el cual a su vez proyecta al NST, al inhibir a las neuronas GABAérgicas del GPe se desinhibe a las neuronas glutamatérgicas del NST que excitan tónicamente a los núcleos de salida generando excitación de los mismos. Mientras que la vía directa genera inhibición de los mismos de manera directa (Gerfen y Surmeier, 2011). Por esto, la proyección en paralelo permite a la vía directa e indirecta modular la tasa de disparo del GPi y del SNr bidireccionalmente. Los núcleos de salida proyectan principalmente al colículo superior (SC), al núcleo pedunculopontino (NPP), y al tálamo inhibiendo su actividad de manera tónica (Figura 1). El tálamo a su vez se comunica de manera continua con la corteza, los circuitos tálamo-corticales cierran un asa de retroalimentación corteza - ganglios basales - tálamo modulando la ejecución de movimientos.

Otra característica de las NSP de las vías directa e indirecta es la diferente expresión de receptores a dopamina y péptidos. Las NSP de la vía directa poseen una alta expresión de receptores de dopamina tipo D1, y expresan sustancia P y dinorfina. Las NSP de la vía indirecta se caracterizan por su alta expresión de receptores de dopamina de tipo D2 y la expresión de encefalinas (Gerfen y Young, 1988).

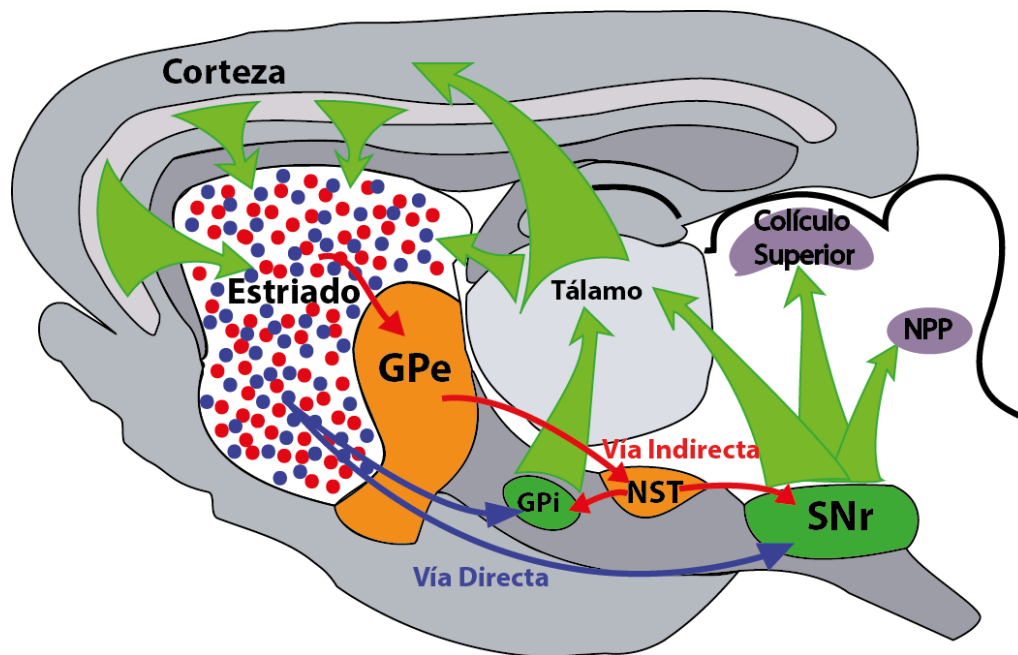


Fig. 1 Diagrama de los circuitos de los ganglios basales en el cerebro de ratón. El estriado recibe entradas excitatorias corticales y talámicas. Los puntos de salida de los ganglios basales son el segmento interno del globo pálido (GPi) y sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) cuyas proyecciones son dirigidas al tálamo, al colículo superior, al núcleo

pedúnculo pontino (NPP) y otros núcleos del tallo cerebral (modificado de Gerfen y Surmeier, 2011).

Los dos receptores D1 y D2 están acoplados a proteínas G, por lo que la dopamina (DA) activa diferentes cascadas de señalización intracelulares y extracelulares.

1.3 La señalización de la Dopamina

La actividad de los GB está regulada por la dopamina proveniente de la sustancia nigra compacta (SNc). La señalización de dopamina es mediada por 5 receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Estos receptores son agrupados en dos familias, dependiendo de la proteína G que activen, la familia D1 que incluye a los receptores D₁ y D₅ activan las proteínas G_s y G_{olf}. Mientras que la familia D2 que son los receptores D₂, D₃ y D₄ activan a las proteínas G_o y G_i (Neve et al., 2004). G_s y G_{olf} estimulan a la adenilato ciclasa, elevando los niveles intracelulares de la adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y activando la proteína cinasa A (PKA). Los blancos celulares de PKA incluyen factores de transcripción, canales iónicos dependientes de voltaje y receptores a glutamato (Svenningsson et al., 2004). Las proteínas G_i y G_o activan a las diferentes isoformas de la enzima fosfolipasa C (PLC) (Hernandez-Lopez et al., 2000). G_i también inhibe a la adenilato ciclasa (Stoof & Keibian 1984). El receptor D₂ es modulado por los reguladores de la señalización de proteínas G (RGS) robustamente expresadas en neuronas estriatales (Geurts et al., 2003).

Los 5 receptores de dopamina son expresados en el estriado, los receptores D₁ y D₂ son los más abundantes y son segregados en la vía directa e indirecta de las NSP.

1.4 La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de los ganglios basales comprende desordenes del movimiento que van desde la hipocinesia, tal como la enfermedad de Parkinson (EP), a la hipercinesia tales como las coreas (enfermedad de Huntington) y las distonías (todas revisadas en Mink 2003).

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa, caracterizada por desórdenes del movimiento tales como bradicinesia, rigidez, temblor en reposo, déficit

locomotor y cognitivo (Thomas y Beal, 2010; Kalia et al., 2015; Drauer y Przedborski, 2003; Parkinson 1817), la expresión de estos síntomas varía entre pacientes. Es posible distinguir dos principales fenotipos: un subtipo que presenta temblor dominante de la enfermedad de Parkinson (TD-PD) y un subtipo sin temblor y con rigidez (T-PD) (Jankovic et al., 1990). Estos signos y síntomas aparecen como resultado de la pérdida de dopamina en los ganglios basales seguida de la pérdida de células dopaminérgicas en la *sustancia nigra pars compacta* (SNc) (Anden et al., 1964; Ehringer y Hornykiewicz, 1960; Bernheimer et al., 1973). La EP está también asociada con numerosos síntomas no motores, algunos de los cuales preceden a la disfunción motora.

La interacción entre medio ambiente y factores genéticos, posiblemente desencadena la enfermedad afectando diferentes procesos celulares. Se han propuesto 6 genes involucrados, los cuales son: *SNCA*, *LRRK2*, *VPS35*, *EIF4G1*, *DNAJC13* y *CHCHD2*. El primer gen identificado fue *SNCA* que codifica para la proteína α -sinucleína, gen asociado con la EP hereditaria (Polymeropoulos et al., 1997). La patología de cuerpos de Lewy consiste de agregados anormales de la proteína α -sinucleína. Las mutaciones en *LRRK2* y parkina son las causas más comunes de herencia dominante y recesiva de la EP (Corti et al., 2011).

Las respuestas corticoestriatales cambian dramáticamente después de la depleción estriatal de dopamina en animales lesionados con 6-hydroxy-dopamina (6-OHDA). En modelos de animales deficientes de dopamina, se han reportado alteraciones en la integración sináptica de comandos corticoestriatales tales como diferencias en la excitabilidad neuronal (Fieblinger et al., 2014), distinta integración sináptica (Flores-Barrera et al., 2011), cambios en las subunidades del receptor a NMDA (Feng et al., 2014), alteración de las respuestas a entradas somatosensoriales (Ketzel et al., 2017) y cambios en la plasticidad a largo plazo (Picconi et al., 2012).

El tratamiento por excelencia de la EP es el tratamiento con L-DOPA que incrementa la concentración de dopamina o directamente estimula los receptores dopaminérgicos. La L-DOPA es usada como una droga antiparkinsoniana.

La estimulación cortical mejora temporalmente el estado parkinsoniano (Dileone et al., 2017). Algunos investigadores piensan que la corteza tiene un papel principal en la enfermedad (Perez-Ortega et al., 2016; Arbuttnoth and Garcia-Munoz., 2016). La resonancia magnética funcional (fMRI, por sus siglas en inglés) mostró que la activación a

nivel de la corteza prefrontal y el globo pálido fue reducida en pacientes con NT-PD comparada con TD-PD y controles después de la estimulación cortical (Prodoehl et al., 2013).

1.5 Microcircuitos

Trabajos previos en el laboratorio han utilizado imagenología de calcio para registrar docenas de neuronas simultáneamente, describiendo el comportamiento de los microcircuitos estriatales, definidos como la actividad estructurada de grupos de neuronas, que tienen actividad correlacionada (ensamble neuronal (EN)) en respuesta a un estímulo no correlacionado, adición de NMDA en el baño. Estos muestran recurrencia y patrones de actividad secuenciales. Los EN son módulos dinámicos que pueden reactivarse de manera confiable, creando patrones de actividad neuronal que representan percepciones o recuerdos (Carrillo-Reid et al., 2008).

La teoría de grafos ofrece una descripción cuantificable de las interacciones que caracterizan varios sistemas biológicos, como son los microcircuitos neuronales, la organización celular, la de las moléculas y los genes (Wei Gao et al., 2017). Cada uno de estos sistemas se puede representar como una red definiendo a sus componentes ya sea moléculas, genes, neuronas etc. como nodos, su interacción que puede ser una regulación génica o sinapsis, se representa como una arista. Al conjunto de nodos y aristas que forman una red se le denomina grafo (Barabási et al, 2004).

Las redes pueden tener interacciones dirigidas o no-dirigidas, en las redes dirigidas, la interacción entre alguno de los dos nodos tiene una dirección bien definida a diferencia de las redes no dirigidas en donde las conexiones no tienen una dirección asignada (Barabási et al, 2004). Los módulos se refieren a un grupo de nodos que físicamente o funcionalmente hacen aristas, estos nodos trabajan juntos para conseguir distintas funciones.

Los experimentos de imagenología de calcio además de permitir estudiar los microcircuitos, permite el uso de la teoría de grafos para caracterizar la actividad asignando a las neuronas como nodos y el disparo simultáneo como aristas (Pérez-Ortega et. Al. 2016). De esta forma las conexiones que define la teoría de grafos definen a su vez los EN que forman el microcircuito.

En 1949 se publicó la teoría de Hebb, que se basa en la premisa, ahora conocida como regla de Hebb, que dice que las conexiones sinápticas se fortalecen por la actividad sincrónica presináptica y postsináptica entre dos neuronas. Esto quiere decir que si una célula contribuye para inducir el disparo de otra célula de manera repetida, la sinapsis que las conectan se fortalece. Es decir que un estado de la red es un estado temporal en el que un grupo de neuronas disparan juntas y cuya sinapsis se fortaleció, planteando los conceptos, el de ensamble de células y el de secuencia de fases (Hebb, 1949).

Los centros innatos generadores de pautas (CPG, por sus siglas en inglés) producen patrones de actividad específica en ausencia de entradas sensoriales y pueden transformar entradas aferentes en salidas espaciotemporales específicas (Grillner et al 2005, 2006; Yuste et al 2005). Los GB contienen CPGs que activan rutinas de comportamiento innato, memorias de procedimientos y programas de aprendizaje motor (Barnes et al. 2005; Graybiel 1995, Grillner et al 2005 a,b, Takakusaki et al. 2004).

Otros trabajos previos del laboratorio (Jaidar et al., 2010 y Plata et al., 2013), han utilizado técnicas de imagenología de calcio para caracterizar la actividad del microcircuito estriatal durante la depleción de dopamina *in vitro*, se observó que la actividad parkinsoniana es diferente que la de los controles, ya que muestran actividad espontánea que no se encuentra en condiciones control que además se caracteriza por la presencia de un estado dominante que recurre con mayor frecuencia que el resto (Jaidar et al., 2010 y Plata et al., 2013a). Estas alteraciones del microcircuito son revertidas por la administración de L-DOPA (Plata et al., 2013a; Ketzef et al., 2017). Sin embargo, la L-DOPA elimina toda la actividad, no se sabe qué tipo de actividad resulte de una estimulación posterior a la administración de este fármaco. La acción de un agonista de dopamina del tipo D1 disuelve el estado dominante pero no revierte el aumento en la actividad (Jaidar et al., 2010), por lo que el uso de un agonista no específico como la L-DOPA es prometedor. Además no se ha mostrado en estos modelos animales si la estimulación cortical puede cambiar la actividad del microcircuito estriatal durante el estado parkinsoniano por sí mismo ya que podría sugerir un mecanismo para los resultados obtenidos *in vivo* (Prodoehl et al 2013).

2. Planteamiento del problema

Se ha comparado la dinámica del microcircuito estriatal en condiciones control y en un modelo parkinsoniano. Se ha observado que en pacientes de la EP se mejora la actividad motora después de estímulos corticales con estimulación magnética transcraneal o estimulación directa por lo que se propone como una alternativa al tratamiento.

2.1 Pregunta

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

2.2 Hipótesis

La estimulación cortical en el tejido parkinsoniano restablecerá la dinámica del circuito estriatal a condiciones control y actuará de manera sinérgica con la aplicación de L-DOPA.

2.3 Objetivo

Estimular la vía corticoestriatal y observar los cambios en el microcircuito parkinsoniano (deficiente de dopamina). Observar el efecto de esta estimulación en presencia de L-DOPA. Esperando obtener un restablecimiento de la dinámica del microcircuito estriatal a condiciones similares al control.

Objetivos particulares

- Determinar los cambios en la actividad del microcircuito estriatal ante la estimulación cortical.
- Comparar el microcircuito deficiente de dopamina con el microcircuito control.
- Caracterizar el cambio en la actividad del microcircuito deficiente de dopamina después de la estimulación cortical.
- Caracterizar el efecto de la estimulación cortical en presencia de L-DOPA en el microcircuito deficiente de dopamina.

3. Metodología

Material y Métodos

3.1 Manejo, uso y cuidado de los Animales

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las normas internacionales para el uso ético de los animales de experimentación, establecidos en los protocolos del NIH y fueron presentados y aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM (NOM-062-Z00-1999; proyecto protocolo JBD-59-15). Los experimentos se realizaron en ratones machos C57BL/6 criados en las instalaciones para animales del IFC. Los ratones fueron mantenidos a una temperatura controlada, libres de patógenos, bajo el ciclo de luz:oscuridad 12h:12h con comida y agua *ad libitum*. Ratones de 21 a 23 días posnatales fueron usados para cirugía estereotáxica. Se prepararon rebanadas de cerebro de ratones de 29 a 40 días posnatales para experimentos de imagenología de calcio. Se usaron rebanadas de al menos 4 a 7 animales diferentes en cada experimento muestra (control n=5 rebanadas, hemiparkinsoniano n=7 rebanadas y hemiparkinsoniano + L-DOPA *in vitro*, n=4 rebanadas). En los protocolos quirúrgicos y de perfusión, los animales fueron anestesiados con ketamina (85 mg/kg)-xilacina (15 mg/kg) y se tomaron todas las medidas para minimizar el dolor y malestar. La temperatura corporal se moduló con el uso de una placa térmica (37°C) antes y postoperatoriamente hasta la recuperación completa. Los ratones fueron sacrificados por decapitación y los cerebros rápidamente extraídos y procesados. Los ratones de cada camada fueron elegidos al azar para la cirugía. Los animales deficientes en DA se asignaron aleatoriamente a dos grupos: deficientes en DA o experimentos deficientes en DA + L-DOPA.

3.2 Modelo de 6-OHDA

A los ratones de 21 a 23 días posnatales se les administró ketamina intraperitonealmente (85 mg/kg) -xilacina (15 mg/kg) y fueron colocados en un aparato estereotáxico. Una vez que se rasuró y despejó el cráneo con la ayuda de un hisopo y agua oxigenada (H₂O₂), se localizaron las coordenadas y se inyectaron 0.6 µL de 6-OHDA (0.1 mg/ml) a una velocidad de 0.2 µL/min en las coordenadas -2.6 mm AP, -1.5 mm LM y -4.7 mm DV a partir de Bregma. Las coordenadas se optimizaron previamente en el laboratorio para una

mejor precisión y con la utilización del colorante violeta de cresilo para marcar y asegurarse que la lesión fue efectuada en las coordenadas correctas. El procedimiento completo también se realizó en ratones control usando solución salina (NaCl 0.9%) sin 6-OHDA. La temperatura corporal fue modulada antes y después de la cirugía hasta la recuperación completa con la ayuda de una placa térmica. Se tomó precaución para minimizar el dolor y la incomodidad de los animales. Asegurándonos que los ratones se encontraban bien anestesiados y realizándoles pruebas de sensibilidad como presión en la cola, que no presentaran movimiento en respuesta a estimulación quirúrgica, relajación muscular adecuada y monitorear la presencia de reflejos antes, durante y después de la operación.

Después de la operación los ratones se recuperaron durante 7 días en el vivario con todas las condiciones establecidas: control de temperatura, libre de patógenos, en un ciclo de 12h:12h luz:oscuridad con comida y agua *ad libitum*.

Después de la recuperación total, la lesión fue confirmada por el giro inducido por apomorfina como prueba de comportamiento (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). Para ello los ratones se colocaron en arenas circulares en donde se les colocó un arnés conectado a un rotómetro y se les permitió aclimatarse durante 5 min. Las rotaciones espontáneas se midieron durante al menos 30 minutos por el programa RotaCount 2.0. Después de ese tiempo, los ratones recibieron una inyección subcutánea de clorhidrato de apomorfina (0.05 mg/kg) en vehículo (solución salina normal con 0.02% de ácido ascórbico). Las rotaciones se midieron durante 60 min, en sentido de las manecillas del reloj (CW) y en sentido contrario de las manecillas del reloj (CCW). Las rotaciones (CCW) se contrastaron entre y dentro de las condiciones espontáneas/apomorfina. Cuando la lesión es eficiente de manera espontánea el ratón gira preferentemente en sentido de las manecillas del reloj (CW). Y en presencia de apomorfina debido a la sobre expresión del receptor, el ratón gira preferentemente en sentido contrario a las manecillas del reloj (CCW) De tal manera que si la proporción CW / CCW de los ratones se invirtió entre las condiciones espontánea y apomorfina, se consideró lesionado. Los giros fueron supervisados durante 60 minutos, los ratones que mostraron > 80% de desequilibrio de giro contralateral (rotaciones contralaterales/totales) se consideraron para seguir con los experimentos. Para minimizar los efectos de cebado del receptor de dopamina, los experimentos se realizaron al menos 10 días después de la evaluación (Morelli, et al., 1989).

3.3 Preparación de las rebanadas cerebrales

Ratones de 29 a 40 días posnatales fueron anestesiados al ser inyectados intraperitonealmente con ketamina (85 mg/kg) -xylacina (15mg/kg) y perfundidos intracardialmente con solución de sacarosa fría (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, fueron rápidamente decapitados y se extrajeron los cerebros. Se tomaron rebanadas horizontales de 250 µm de grosor con un ángulo de 30° en un vibratomo (PELCO easiSlicer Ted Pella, Redding, CA). Para el resto de los procedimientos, las rebanadas se mantuvieron en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, NaCl 126 mM, dextrosa 15 mM, NaHCO₃ 26 mM, tiourea) 0.2 mM, ácido ascórbico 0.2 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1.3 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM y CaCl₂ 2 mM; pH = 7.4; 300 ± 5mOsm/L) continuamente perfundidas con 95% de O₂ y 5% de CO₂.

3.4 Adquisición de datos

Las rebanadas se incubaron durante un período de 40 min a 37 °C en una solución de Calcium Orange (Calcium Orange 8.2 µM, 0.1% DMSO, 0.67% de Ácido Plurónico en ACSF). Se eligió Calcium Orange para este grupo de experimentos porque se requiere la adquisición de datos a largo plazo y el Calcium Orange tiene muy bajo fotoblanqueo (Thomas et al., 2000). Después, las rebanadas se colocaron en una cámara de perfusión con flujo constante de ACSF bajo un objetivo de inmersión de 20X (N20X-PFH -Objetivo 20X Olympus XLUMPLFLN, 1.00 NA, 2.0 mm WD, Center Valley, PA).

El campo de observación fue de 750×750 µm. Un iluminador Lambda LS (instrumentos Sutter, Petaluma, CA) y un filtro de luz de 570/30 nm se utilizaron para la estimulación del fluoróforo y la señal de adquisición. Los videos de fluorescencia se grabaron usando una cámara CoolSnap K4 (Photometrics, Tucson, AZ) controlada a través de Im-Patch ©, un software de acceso abierto diseñado en el entorno de LabView (<http://www.im-patch.com>), tomando de 4-6 cuadros/segundo y 720-2160 cuadros/video. Cada experimento consistió de 7-10 videos de hasta 60 minutos por experimento. Se usaron tres rebanadas por condición: control (Ctrl), mermado en dopamina (deficiente-DA) y mermado de DA+L-DOPA. En todas estas condiciones, se registró la actividad espontánea antes y después de la administración de un único tren de estimulación cortical (CtxS = 10 pulsos, 40 Hz,

1.1-1.3 mA) usando un electrodo bipolar concéntrico (FHC, # CBCFE75, Bowdoin, ME) colocado en la capa V de la corteza. Cuando se requirió L-DOPA, se añadió 10 μ M en el baño de perfusión antes de la estimulación y mantenida hasta el final del experimento. Una solución de KCl 0.5 mM fue administrada al final de cada experimento con el fin de contar todas las células viables durante el experimento. El 85% de las células visibles en el experimento fueron viables y tomadas en cuenta para el análisis.

3.5 Análisis de datos

Los videos se procesaron con Im-Patch ©. Usando este software, se identificaron células. Se calculó el cambio en la señal de fluorescencia (transitorios o señales de Ca^{2+}) y su derivada en el tiempo para cada célula a lo largo del experimento y durante toda su duración. Usando las derivadas en el tiempo de los transitorios de Ca^{2+} , los momentos de actividad eléctrica neuronal fueron inferidos como se ha reportado previamente (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a, 2009b, 2011, 2015; 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, b). Los cuadros cuya derivada de la señal en el tiempo excedió a las 2 desviaciones estándar desde la actividad basal se consideraron cuadros activos. La actividad de cuadros se transfirió a una matriz de actividad donde 1 denota actividad en ese cuadro y 0 no actividad para cada célula. Los experimentos completos están contenidos en matrices y expresados en gráficas de rastreo (raster), donde cada fila muestra la actividad de una sola célula y cada punto un cuadro en el que esa célula está activa (Carrillo-Reid et al., 2008). Las matrices junto con sus coordenadas fueron procesadas para determinar picos de coactividad estadísticamente significativos. La actividad de todas las células en cada cuadro fue sumada para construir un histograma de coactividad. Para determinar picos de coactividad significativos, se utilizaron simulaciones de Monte Carlo (Pérez-Ortega et al., 2016). En resumen, la actividad de cada célula se revolvió en el tiempo y se obtuvieron nuevos histogramas de coactividad aleatorios (1000 iteraciones), los histogramas aleatorios se compararon con el original, contando los cuadros con un número dado de células coactivas (de 0 al número de células). El umbral para considerar picos significativos de actividad se establece con el valor mínimo en el que los datos experimentales mostraron una mayor ocurrencia de eventos celulares coactivos que el 95% de los datos aleatorios. Los picos significativos de actividad se

construyeron a partir de los cuadros en los que el umbral se superó y se utilizó un intervalo de tiempo de 12-18 cuadros ya que la duración de las ráfagas de potenciales de acción es de 2-3 segundos lo que corresponde a 12-18 cuadros. Los picos de coactividad fueron comparados con un índice de similitud calculado como el coseno del ángulo entre vectores obtenido con el producto punto de cada par de vectores con actividad significativa normalizada por su magnitud (Carrillo-Reid et al., 2008). Los picos eran agrupados utilizando análisis de agrupamiento jerárquico para determinar conjuntos neuronales o estados de red mostrados con diferentes colores o tonos en gráficas tipo raster, como anteriormente se reportó (Pérez Ortega et al., 2016). Para comparar la actividad de células individuales a través de diferentes secciones del experimento, la actividad de cada célula se determinó simplemente como el número total de cuadros activos/número total de cuadros de cada condición.

Para cuantificar la cantidad de actividad por experimento, se construyó un diagrama de actividad acumulada: el valor del histograma de coactividad por cuadro se sumó a lo largo del tiempo durante el experimento. Para comparar la actividad de múltiples experimentos, se aproximó un ajuste lineal a la actividad acumulada. Las pendientes de las líneas ajustadas representan la actividad/tiempo acumulado en el transcurso del experimento. Este valor se usó para comparar diferentes experimentos y condiciones experimentales. Para cuantificar los picos significativos de actividad/min, el número de cuadros en los que el valor del histograma de coactividad fue mayor que el umbral determinado por el método de Monte Carlo, se dividió por la duración total del experimento en minutos. Para comparar la actividad celular entre diferentes condiciones experimentales se realizó una función de distribución acumulativa con la actividad celular de todas las células activas en todos los experimentos por sección, control (Ctrl), control más estimulación cortical (Ctrl + CtxS), deficiente-DA, deficiente-DA+CtxS, deficiente-DA+L-DOPA y deficiente-DA+L-DOPA+CtxS. Para las neuronas que pertenecen a diferentes grupos, su actividad celular en cada fragmento del experimento se determinó como se describió anteriormente. Para considerar un aumento o disminución de la actividad fue necesario un cambio de actividad del 20%, ya que la varianza de la población es 10%; de lo contrario, se consideró la actividad neuronal constante. El estado parkinsoniano se caracteriza por un estado dominante altamente recurrente, el cual interrumpe las secuencias de ensambles neuronales encontradas en condiciones control (Jaidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016). Para detectar la aparición de los estados de red patológicos en una muestra de experimentos, calculamos un índice de recurrencia para cada estado con respecto a los

otros estados en cada condición. El índice de recurrencia es la proporción relativa de recurrencia de cualquier estado y se calcula como sigue:

$$R_{Index} = \frac{R_i}{\sum R_{n \neq i}}$$

Donde R_i es la recurrencia de un estado dado, la aparición del estado tiene valor de 1 (aparición uno) hasta R , donde R es la cantidad de veces que el estado apareció repetidamente sin alternancia. Este número fue dividido por la suma de recurrencias de otros estados en el experimento. En el caso de que algunos estados de la red tengan un exceso de recurrencia (estados patológicos dominantes) los circuitos se dividirán en dos poblaciones de red, aquellos con alta y aquellos con baja recurrencia y la varianza de esa muestra reflejará esta separación de muestreo. En los casos donde no hay predominio de ningún estado de la red, todos ellos tendrían un índice de recurrencia y una variación de muestra similar, de esta forma podríamos comparar todos los diferentes estados mediante muestreo de diferentes experimentos utilizando conjuntos neuronales sin importar la duración de las condiciones particulares. En este caso, la recurrencia de estados de red usó la prueba de homogeneidad de varianza de O'Brien para comparar las muestras.

3.6 Análisis estadístico

Para determinar el umbral significativo para los picos de coactividad, se realizaron simulaciones de Monte Carlo (descrito anteriormente), esta prueba fue programada en una secuencia de comandos en MATLAB (MATLAB R2015a; The MathWorks, Inc. Natick, MA). GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) se utilizó para comparar las diferentes métricas de actividad entre los 4 grupos: Ctrl, deficiente en DA, Ctrl+CtxS y deficiente-DA+CtxS.

La prueba de ANOVA Kruskal-Wallis de comparación múltiple con prueba de Dunn post-hoc para comparaciones por pares, la prueba de muestras pareadas T de Wilcoxon con una aproximación de una cola de Spearman para comparar la actividad de la misma muestra de una condición a otra, los gráficos circulares de la prueba comparan la proporción de actividad de cada población celular, la prueba Friedman de ANOVA con prueba de Dunn post hoc se usaron para comparar la actividad de células individuales en

experimentos con 3 diferentes tratamientos, las pruebas de Kolmogorov-Smirnov se usó para comparar la distribuciones de conjuntos de datos (MATLAB) y la homogeneidad de la varianza de O'Brien se usó para comparar el índice de recurrencia en las diferentes condiciones (MATLAB). Las muestras con estados dominantes tienen la varianza aumentada (Hervé Abdi, 2007).

4. Resultados

4.1 Estimulación cortical en rebanadas de estriado

La actividad neuronal espontánea en el estriado dorsal fue registrada durante varios minutos (Ctrl, Fig. 2A) y se caracteriza por baja actividad, pocos o ningún pico de actividad significativos. Un solo tren de 10 pulsos a 40 Hz en la capa V de la corteza o en aferentes corticales (CtxS, Fig. 2A punta de flecha) activan el microcircuito estriatal exhibiendo secuencias continuas de picos significativos de coactividad neuronal durante al menos 30 min. En el control se observan muy pocos picos con poca actividad espontánea y se encuentra prácticamente silente, se puede observar con baja recurrencia del estado dominante, después del estímulo aumenta la alternancia de los ensambles neuronales. Esto es, la activación del microcircuito y la aparición de la alternancia en la actividad de ensambles neuronales formando circuitos reverberantes. Esta actividad evocada de docenas de neuronas se observó simultáneamente usando imagenología de calcio con resolución de célula única en rebanadas horizontales de cerebro de ratón sin agregar ninguna droga a la preparación (Carrillo-Reid et al., 2008). En la figura 2A se muestra la actividad después de tal estímulo en un gráfico tipo raster, cada fila representa la actividad de una sola neurona. Abajo, se muestra un histograma de la actividad sumada, columna por columna (cuadro por cuadro) a lo largo del tiempo, en la que se observan picos significativos de coactividad donde la línea punteada representa el umbral de significancia, determinado con las simulaciones de Monte Carlo ($P < 0.05$). Los picos significativos de coactividad son marcados en la gráfica tipo raster y en la parte inferior del histograma con líneas de colores. En el gráfico de la derecha, se encuentra la actividad celular individual en el transcurso del experimento, esta es medida como la suma de la actividad por célula, dividida por el número de cuadros en que hay actividad. El estímulo en la CtxS evoca un pico de actividad significativo que está compuesto por neuronas estimuladas (morado), que es diferente a los picos espontáneos de coactividad que le siguen. Los picos de coactividad significativos se agruparon y clasificaron de acuerdo con su similitud (ver Material y Métodos), utilizando análisis jerárquico de grupos, como ensambles neuronales o estados de la red. La secuencia temporal de activación de ensambles se muestra en la Figura 2B. Claramente, el CtxS activa el microcircuito incrementando el número de ensambles espontáneamente activos ($n = 5$ rebanadas de diferentes animales). La secuencia de tiempo se resume en ciclos de transición de estados de red antes y después del CtxS (Fig. 2C). Se observa un cambio en el número

de ensambles activos después de CtxS (2 en 3 casos 0 en 2 y 3 ensambles después de la estimulación en todos los casos) y así como la generación dinámica de microcircuitos reverberantes que reflejan mayor actividad y presencia de picos significativos (Carrillo-Reid et al., 2008).

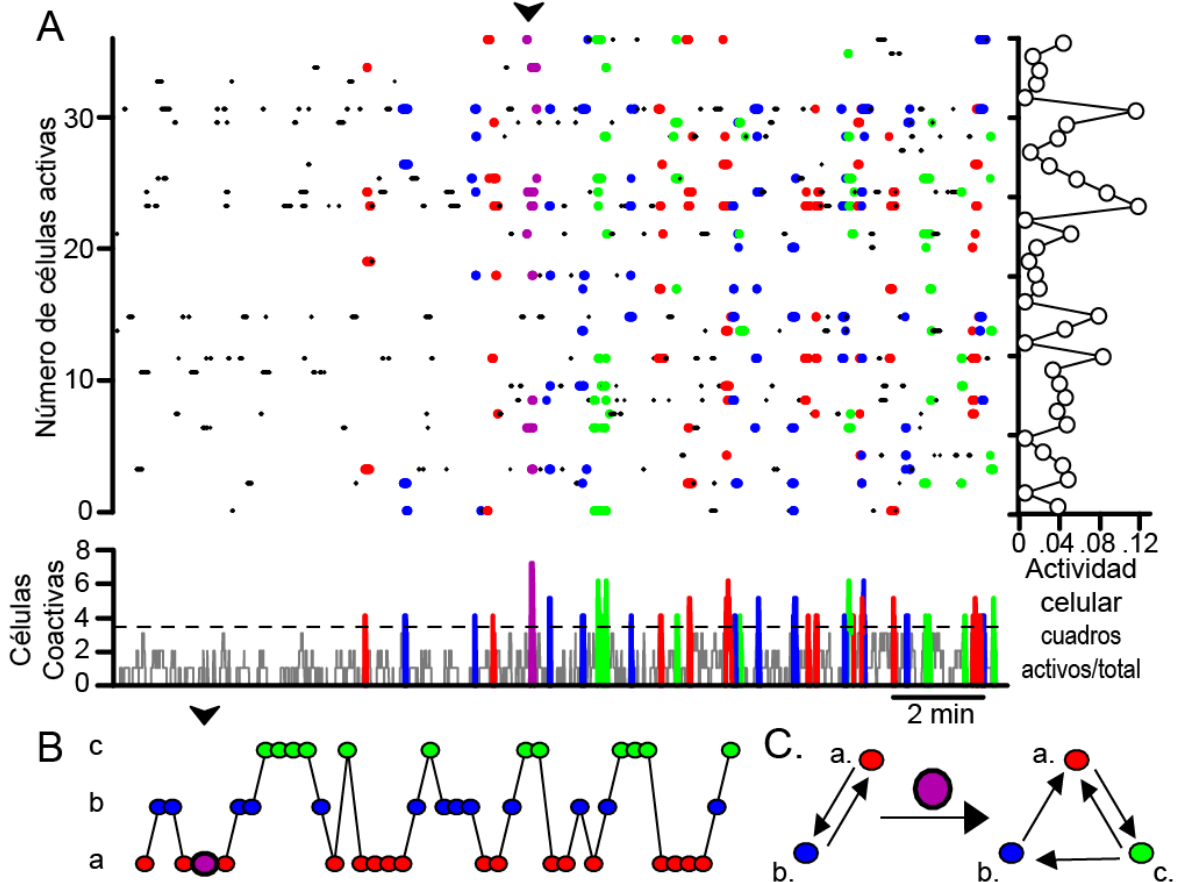


Figura 2. **Un estímulo cortical adecuado activa al microcircuito estriatal por varios minutos.** A. Gráfica tipo raster de la actividad neuronal, antes y después del protocolo de estimulación cortical (CtxS) en una preparación control. El momento de estimulación se muestra con una punta de flecha en la parte superior. Cada fila representa la actividad de una sola célula a lo largo del tiempo. Los puntos de colores representan células que se activan juntas recursivamente de manera significativa. En la parte inferior, se muestra el histograma de coactividad: la suma de las neuronas activas por cuadro. La línea punteada muestra el umbral para los picos de coactividad significativos ($p < 0.05$, después de las simulaciones de Monte Carlo). Los picos de actividad significativos se clasificaron como ensambles neuronales utilizando análisis de grupo jerárquico. Los diferentes ensambles se muestran en el histograma y en el gráfico tipo raster con diferentes colores. El histograma de la derecha representa la actividad celular individual: la suma de los cuadros en que la neurona está activa dividido por el número total de cuadros. Note la relativamente poca actividad antes del estímulo (CtxS) y el aumento de la misma después del mismo. B. Una

vez que los conjuntos de neuronas coactivas eran identificados cada punto en el gráfico en la secuencia de transiciones representa su activación: como pasa la actividad de un grupo de neuronas a otro. Se tomaron en cuenta los estados de la red que alternan su actividad (a-c: inferior, medio y superior). El estímulo está representado en color morado con una punta de flecha en la parte superior. C. Resumen de las transiciones: antes del estímulo, solo dos ensambles eran significativos y raramente activos. Después del estímulo, hubo tres ensambles que se activaron con mayor frecuencia mostrando transiciones entre ellos así como ciclos cerrados (reverberantes) de actividad. La cuantificación del aumento de actividad se discute en la figura 4.

En el estriado deficiente de DA se ha descrito un exceso de actividad neuronal espontánea, no inducida por estímulo alguno, en comparación con el estriado control (Jaidar et al., 2010; Plata et al., 2013a, b; Pérez-Ortega et al., 2016). Esto también se puede observar en el gráfico y el histograma de coactividad de la Figura 3, antes del CtxS. Esta hiperactividad se caracteriza por la recurrencia excesiva de uno de los estados de la red (Jaidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016), (la cuantificación se encuentra en la Figura 11). Esta descripción es involuntariamente metafórica pues refleja lo que sucede con los pacientes: están recurriendo en una postura y no pueden moverse (Banou, 2015). Después del CtxS, la alternancia entre los estados de la red regresa y se vuelve más equilibrada; las transiciones se recuperan (se observó en todas las rebanadas, estadística en figura 11). Esta nueva dinámica se mantiene durante varios minutos después de la estimulación (Fig. 3A; CtxS está marcada con una punta de flecha). La secuencia de activación de ensambles (Fig. 3B) muestra que antes de CtxS hay varios picos de coactividad (Fig 4C) con uno de ellos que presenta alta recurrencia (estado rojo) (Fig. 11), como si el microcircuito estuviera atrapado en el estado rojo. Como consecuencia, los ciclos de transición son comúnmente abiertos (Fig. 3C a la izquierda). Después de la CtxS las transiciones entre ensambles coactivos se vuelven cerradas (a la derecha Fig. 3C; Pérez-Ortega et al., 2016).

Para comparar la actividad global en el microcircuito estriatal bajo diferentes tratamientos, analizamos la actividad acumulada (actividad sumada de células coactivas a lo largo del tiempo; a partir de los histogramas en la parte inferior de las Figs. 2A y 3A) tomando todas las células de cada experimento. Las líneas sólidas en la Figura 4A ilustran la actividad acumulada en un experimento representativo. La línea punteada fue ajustada con una regresión lineal a los datos experimentales. El microcircuito estriatal sin estímulo (Ctrl) muestra la menor actividad espontánea a lo largo del tiempo. Una actividad mayor y

significativa aparece después de la estimulación cortical (CtxS) en condiciones control (Fig 4B, $n = 5$; prueba de Wilcoxon T; $p < 0.01$), y en el microcircuito estriatal deficiente de DA se confirmó que tiene una alta actividad espontánea, mayor que la del control no estimulado (Fig. 4B; las pendientes de las líneas punteadas fueron ajustadas para mostrar gráficas de caja con las distribuciones de las muestras; $p < 0.05$; $n = 7$; ANOVA de Kruskal-Wallis con pruebas post hoc de Dunn). Después de la estimulación cortical, el microcircuito deficiente de DA no aumentó significativamente su actividad acumulada a pesar de los cambios inducidos en el comportamiento del circuito (Fig. 3). Resultados similares se encontraron cuando medimos picos significativos de coactividad (Fig. 4C). Solo el análisis de distribución acumulada de actividad celular individual mostraron que, primero, la distribución de la actividad del circuito control no estimulado es diferente de todas las demás distribuciones ($P = 0.0000124$), y segundo, que la distribución de actividad celular del microcircuito deficiente en DA era diferente al encontrado después del CtxS, tanto en el control ($P = 0.000205$) como en el circuito estimulado deficiente de DA ($P = 0.000043$; Fig. 4D; Ctrl $n = 116$ células, Ctrl + CtxS $n = 161$ células, deficiente-DA $n = 440$ células, deficiente-DA+CtxS $n = 180$ células; Pruebas de Kolmogorov-Smirnov). Debido a que no existen diferencias significativas en la actividad acumulada en el tiempo (Fig 4 B) ni en el número de picos significativos por minuto (Fig 4 C) pero sí en la distribución de actividad de la población (Fig. 4 D) y en el comportamiento de los estados (Fig 2 y 3), llegamos a la conclusión de que las diferencias entre el control y los microcircuitos patológicos no consisten en diferencias en la actividad neuronal, sino en diferencias más sutiles como en la conectividad, el comportamiento y la composición de la red de los microcircuitos.

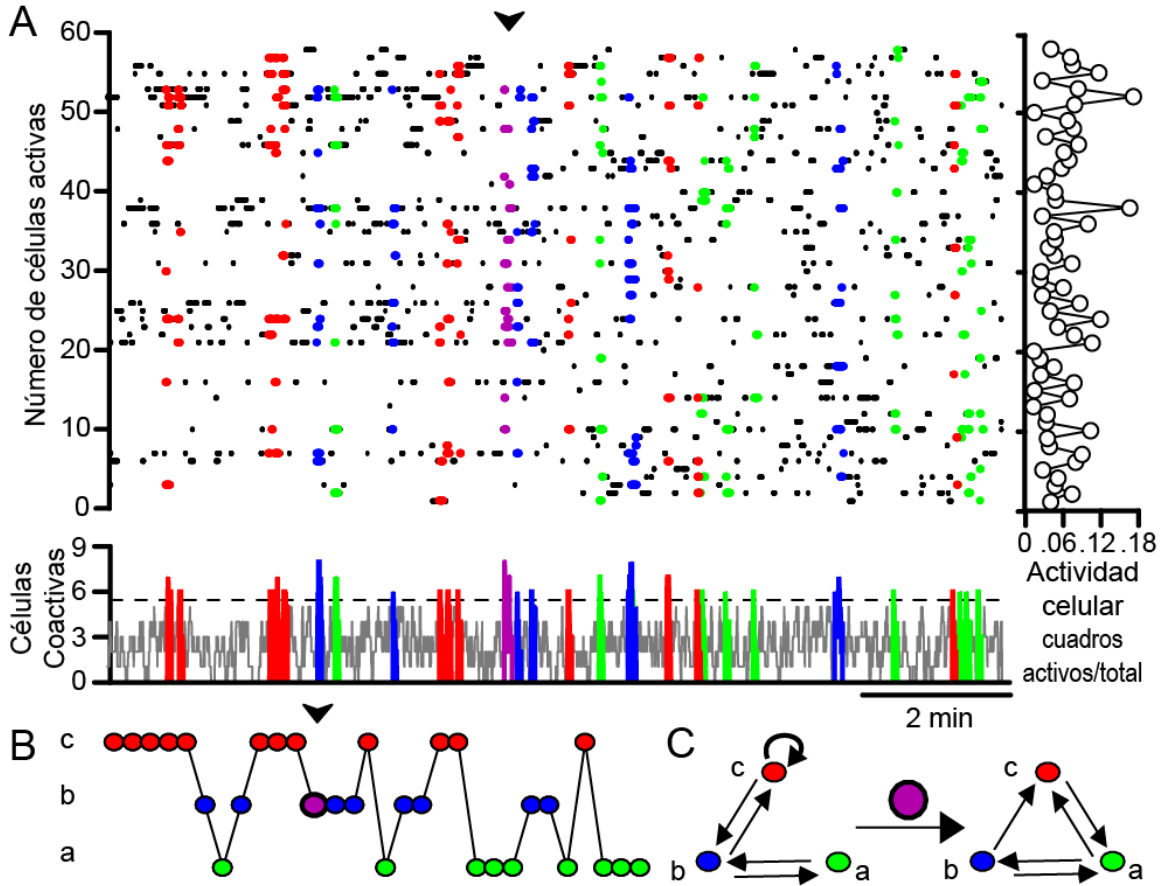


Figura 3. **La estimulación cortical modifica las transiciones de estado de la red en el microcircuito estriado deficiente en DA** A. Gráficos tipo raster de un microcircuito de rebanadas disminuidas en DA antes y después del CtxS. La estimulación se señala con una punta de flecha en la parte superior. Cada fila representa la actividad de una sola neurona a lo largo del tiempo. El histograma de coactividad está en la parte inferior, la suma de las neuronas activas por cuadro. La línea de puntos muestra el umbral para los picos de coactividad significativos. Los picos de coactividad significativos se clasificaron en conjuntos neuronales después del agrupamiento jerárquico. Diferentes ensambles se muestran en el histograma y gráficos tipo raster con diferentes colores. La actividad celular individual, la suma de todos los cuadros activos divididos por el número total de cuadros, está a la derecha. B. Secuencia de activación de ensambles donde los picos significativos están representados por círculos. La posición y colores muestran los ensambles a los que pertenecen. La estimulación está señalada con morado y una punta de flecha en la parte superior. Se tomó en cuenta que en el microcircuito deficiente en DA, un conjunto dominante se activa más recurrentemente que los demás (rojo). Sin embargo, después del CtxS, la actividad de los ensambles vuelve a ser alternante entre los diferentes ensambles. C. Indica los ciclos de las transiciones entre los estados de la red. Antes del CtxS, un estado de la red se activa de forma más recurrente (pseudo-loop) con poca participación de otros estados. Después del estímulo, las transiciones entre los estados se vuelven más frecuentes mostrando ciclos cerrados y dinámica reverberante (Fig. 11).

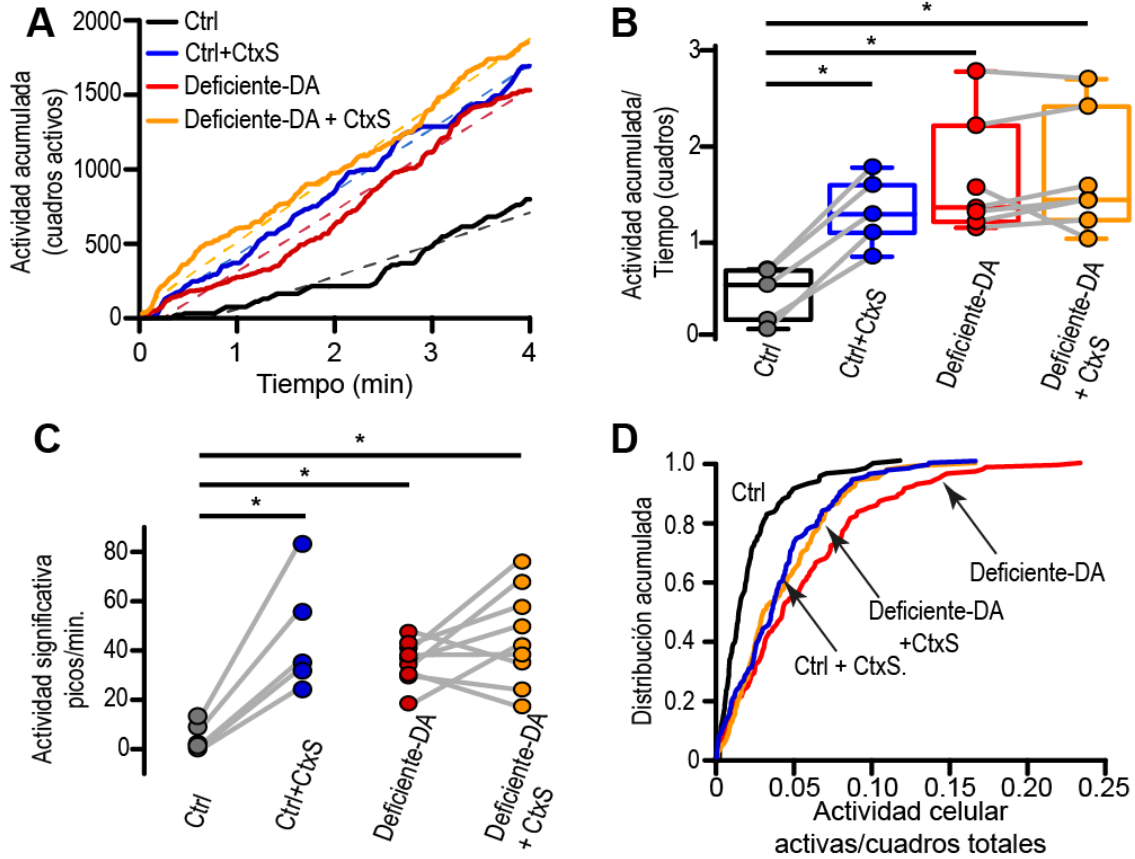


Figura 4. Actividad neuronal acumulada en el tiempo del microcircuito estriatal bajo diferentes condiciones A. Líneas continuas: actividad acumulada (suma de células coactivas por cuadro a lo largo del tiempo) de experimentos representativos únicos bajo diferentes condiciones: control sin estímulo (Ctrl), estimulación cortical en condiciones control (Ctrl + CtxS), microcircuito estriatal deficiente en DA sin estímulo (mermado-DA) y microcircuito estriatal deficiente de DA después de un estímulo cortical (mermado-DA + CtxS). La línea punteada es un ajuste lineal a los datos. B. La actividad acumulada en el tiempo para todos los experimentos. Los diagramas de caja muestran la distribución de pendientes de las líneas ajustadas a la actividad acumulada (que se muestra en A) para todos los experimentos y condiciones. Hay un aumento significativo en la actividad neuronal después de que CtxS en condiciones control ($P < 0.05$). La deficiencia en DA también muestra una mayor actividad en comparación con los controles aun sin estimulación ($P < 0.05$). No hay un aumento significativo en la actividad entre el control estimulado y microcircuitos deficientes de DA. El CtxS no aumenta significativamente la actividad total del microcircuito deficiente de DA, sólo cambia el comportamiento del circuito (Figura 3). C. El número de picos de coactividad significativos antes y después del CtxS en Ctrl y microcircuitos privados de DA ($P < 0.05$). D. Promedio de distribuciones acumuladas de la actividad celular a lo largo del tiempo para todos los experimentos y condiciones. La distribución acumulada de la actividad celular en los controles no estimulados es diferente a todas las demás condiciones ($P \leq 0.000124$). La distribución de actividad del circuito control estimulado es similar a la de los microcircuitos estimulados deficientes en DA ($P \leq 0,000205$; Ctrl $n=116$ células, Ctrl + CtxS $n=161$ células, deficientes en DA $n=440$ células, deficiente-DA + CtxS $n = 180$ células; pruebas de Kolmogorov-Smirnov y ANOVA global de Kruskal-Wallis para B y C: $P < 0.05$).

4.2 Actividad celular en el estriado deficiente en DA antes y después de la estimulación cortical

Los cambios en la actividad neuronal global no pueden explicar los cambios en el comportamiento del microcircuito deficiente en DA después de la CtxS. Por lo tanto, nos preguntamos si la CtxS induce cambios en las subpoblaciones neuronales que componen la actividad del circuito. Por lo que decidimos comparar la actividad neuronal presente en el circuito antes y después de la CtxS. Las células se clasificaron en 3 clases (i, ii, iii) de acuerdo a su actividad antes y después de la CtxS (Figura 5A): Las células que disminuyeron su actividad después de la CtxS (i), las células con actividad constante antes y después de CtxS (ii), y las células cuya actividad incrementó o que se reclutó por el CtxS (iii). Una disminución o aumento en el 20% de la actividad celular se utilizó como umbral para clasificar las neuronas en diferentes grupos. Si la actividad cambiaba en una proporción menor, las células se consideraban como células de actividad constante (ii). Las células que cambiaron su actividad (i, iii) se ilustran en la Figura 5B. Este análisis mostró que, si bien algunas células detenían o disminuían su actividad después del CtxS, otras comenzaron o aumentaron su actividad después del mismo. Finalmente, cuantificamos la contribución de cada población antes y después de CtxS, para todos los experimentos. Antes de CtxS, la mayoría de la actividad fue generada por el grupo "i" (62%). Después de CtxS, la mayor parte de la actividad provino de grupo "iii" (64%). Este cambio en las subpoblaciones neuronales activas explicaría los cambios en la dinámica del microcircuito, observada en la Figura 3. Por lo tanto, además de cambiar la actividad del microcircuito, el CtxS recluta nuevas subpoblaciones neuronales y detiene el disparo de las neuronas que mantenían el disparo parkinsoniano. Este efecto de la CtxS duró al menos 30 min. Durante períodos de tiempo más largos (> 30min) el efecto del estímulo se perdió.

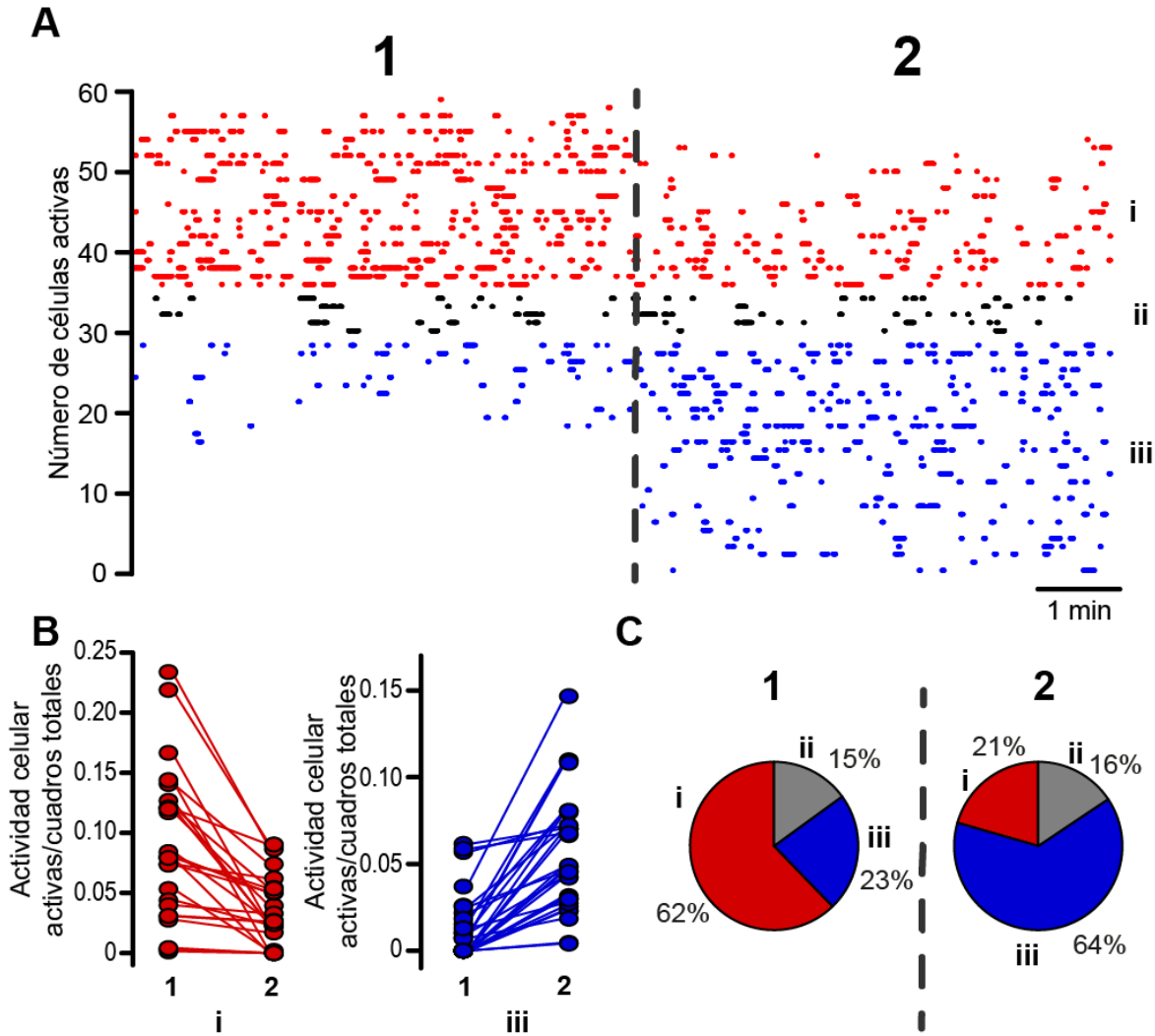


Figura 5. **Cambios en las subpoblaciones neuronales del microcircuito estriatal parkinsoniano después de la estimulación.** A. Gráfico tipo raster de un experimento representativo con CtxS en una rebanada deficiente de DA. Cada fila representa la actividad de una sola neurona a lo largo del tiempo. Las neuronas se clasificaron y agruparon de acuerdo con la actividad anterior al CtxS (1) y después del mismo (2, línea discontinua). Las neuronas en la parte superior: tenían una mayor actividad antes del estímulo y reducían o paraban su actividad después del estímulo (i). Las neuronas en la parte inferior incrementan su actividad después del estímulo o fueron reclutadas por el estímulo, por lo tanto, no estaban activas antes (iii). El umbral para considerar un cambio significativo de actividad fue una disminución o aumento en un 20% de una época a la otra. B. Actividad de las neuronas clasificadas en cada grupo antes y después de la estimulación. Las células en el grupo "i" disminuyeron significativamente su actividad después del CtxS (prueba T de Wilcoxon < 0.0001 , con una aproximación de cola de Spearman $P = 0.006$). Muchas de estas células pararon su actividad después del CtxS. La actividad de las células en el grupo iii incrementó significativamente su actividad después del CtxS (T de Wilcoxon $P < 0.0001$, con aproximación de Spearman $P = 0.0009$). Muchas otras células en este grupo fueron reclutadas por el CtxS. C. Gráficos de pastel que ilustran porcentajes de actividad generados por neuronas clasificadas en grupos i-iii, en cada época, para todos los experimentos. Hubo un cambio

significativo en las subpoblaciones neuronales activas ($n = 10$ microcircuitos, 451 células, contingencia de gráficos circulares $P < 0.0001$) después del CtxS.

La figura 6 muestra un experimento en el que se siguió la actividad neuronal durante un periodo de tiempo más largo. La Figura 6A es el gráfico tipo raster de la actividad neuronal. Cada fila representa la actividad de una sola célula en el transcurso del experimento y tres segmentos temporales o las épocas de actividad se muestran divididas por líneas de puntos verticales (1-3). La época 1 es una muestra de actividad antes de la estimulación en el tejido deficiente en dopamina, la época 2 es el período inmediatamente posterior al CtxS, y la época 3 se registró 30 minutos después de la estimulación. De acuerdo con la actividad de cada época, las células se dividieron en cinco grupos (i-v, parte derecha del raster), según su disminución, aumento o ningún cambio en su actividad en cualquiera de las tres épocas, utilizando un cambio del 20% como umbral. Como se muestra en la figura 6C, el grupo i redujo su actividad después de CtxS pero tiene alta actividad antes y después del CtxS y a los 30 min (épocas 1 y 3). Las células del grupo ii tienen alta actividad antes de CtxS pero su actividad disminuye después de CtxS y no regresa más tarde (épocas 2 y 3). El grupo iii se vuelve más activo inmediatamente después de CtxS e incluso más activo 30 minutos después de CtxS (épocas 2 y 3). En el grupo iv las células muestran la mayor actividad justo después de CtxS. El grupo v tiene actividad casi constante todo el tiempo. Hicimos histogramas de coactividad para cada población y los comparamos con el histograma de coactividad total (Fig. 6B; histograma gris en el fondo) para ilustrar mejor la contribución de cada grupo de neuronas al total de la actividad del circuito. Por ejemplo, la mayor contribución justo después del CtxS fue la del grupo iv. Para concluir, la actividad neuronal individual cambió después de CtxS y este cambio se revierte 30 minutos después del estímulo.

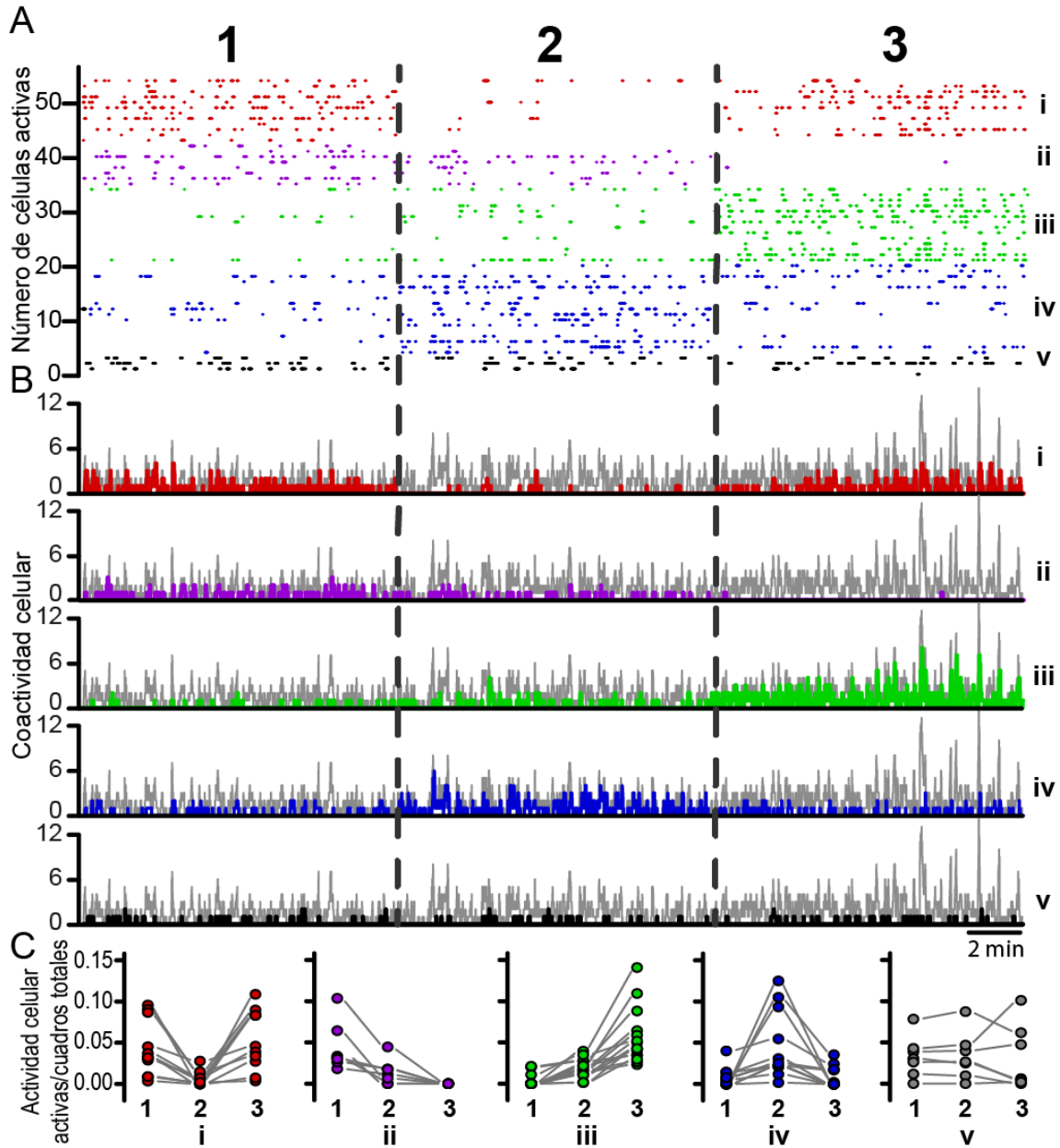


Figura 6. **El efecto de la estimulación cortical en el microcircuito deficiente en DA es temporal.** El presente experimento representativo se dividió en 3 épocas (1-3). 1. Antes de la estimulación, 2. Justo después de la CtxS, 3. > 30 min después de CtxS. A. El gráfico tipo raster de la actividad neuronal muestra tres fragmentos de cada época divididos por líneas punteadas verticales, el momento de CtxS fue removido. Cada fila representa la actividad de una neurona durante las tres épocas. Las neuronas se dividieron en 5 subpoblaciones de acuerdo a su actividad en cada época: i. Neuronas que tuvieron una alta actividad antes de la CtxS (estado Parkinsoniano) y que bajan su actividad justo después de la CtxS (cuando se elimina el estado Parkinsoniano), pero se recuperan a los 30 minutos después de la CtxS (cuando se recupera el estado Parkinsoniano). ii. Neuronas que tenían una actividad alta antes de la CtxS, la disminuyen después de la CtxS y no recuperaron su actividad 30 minutos después de la CtxS. iii. Neuronas con baja actividad o inactivas antes de la CtxS, que aumentan su actividad después del CtxS y la

aumentan aún más 30 minutos después del CtxS. iv. Neuronas con la mayor actividad después de la CtxS pero con menos actividad antes y 30 min después del CtxS. v. Neuronas que mantuvieron su actividad constante antes y después de CtxS. El umbral para considerar un cambio significativo en la actividad fue del 20%. B. La contribución de cada subpoblación neuronal al histograma de coactividad total. El histograma de cada subpoblación neuronal (i-v, por colores) se muestra sobre el histograma total (gris) para demostrar la contribución de cada subpoblación por época. C. Actividad de cada grupo celular por época (1-3), dividido en las diferentes subpoblaciones (i-v).

4.3 Cambios en la arquitectura y dinámica del microcircuito deficiente en DA después de la estimulación cortical

La conectividad funcional de la red neuronal basada en la coactividad se utilizó para seguir los cambios que induce la CtxS en el estriado deficiente en DA (Fig. 7). En cada gráfico, los nodos son neuronas activas representadas por círculos en la periferia de una visualización circular y las conexiones funcionales se eligieron como los momentos de coactividad neuronal en un pico de actividad. Un tipo del gráfico usó los grupos de células como se definen en la Figura 6: las neuronas se agruparon de acuerdo con los cambios de actividad que sufren después de la CtxS (Fig. 7A2 y 30 minutos después de CtxS; Fig. 7A3). Se puede observar que ciertos grupos de neuronas monopolizan la mayoría de las conexiones antes de la CtxS (i y ii), mientras que después de la CtxS, otros grupos entran en acción y se vuelven altamente conectados (iii y iv) aunque los grupos i y ii permanezcan activos.

Treinta minutos después de la CtxS muchos grupos conectados cambian de nuevo: el grupo i recupera sus conexiones y sorprendentemente el grupo iii permanece fuertemente conectado, mientras que el grupo iv es severamente reducido en el número de neuronas y conexiones (Fig.7A3). Tomados en conjunto, estos datos indican que el microcircuito se remodela temporalmente por la CtxS.

También utilizamos una forma más tradicional de agrupar las mismas neuronas: las neuronas que componen los picos de actividad significativa en los histogramas de coactividad, construidos a partir de las gráficas tipo raster de actividad neuronal en las Figuras 2 y 3; los definimos como ensambles neuronales (Carrillo-Reid et al., 2008; 2011; Pérez-Ortega et al., 2016). Esta definición de ensamble neuronal se basa en la evidencia Hebbiana que supone que las neuronas que disparan juntas tienen conexiones preferenciales entre ellas y trabajan en conjunto (Carrillo-Reid et al., 2016), los nodos se ven de nuevo como círculos en el perímetro.

Las diferentes formas de analizar los grupos de neuronas no coinciden pues en este caso las neuronas pueden pertenecer a más de un ensamble neuronal (las neuronas que participaron en más de un ensamble están indicadas por etiquetas). Las conexiones funcionales de todas formas se definen como momentos de coactividad. Pero a pesar de los diferentes métodos de agrupación, ambas redes muestran fenómenos similares después de la CtxS, lo que sugiere una robustez intrínseca. Antes de la CtxS (Fig. 7B1) muchas conexiones eran monopolizadas por el ensamble rojo ("b"), este estado de cosas cambia después de la CtxS (Fig.7B2) cuando varios conjuntos se conectan entre sí y un grupo de neuronas participa en todos los conjuntos. Finalmente, 30 minutos después del estímulo (Fig. 7B3), el ensamble "b" se convierte de nuevo en el dominante el cual tiene más neuronas y obtiene la mayoría de las conexiones. Para resumir, ambos métodos de la representación gráfica muestran que la CtxS cambia a las neuronas que participan en el circuito tanto como por sus conjuntos neuronales como por su conectividad.

Por lo tanto, las secuencias de tiempo de las transiciones entre los estados de la red muestran que antes de CtxS (figura 7C1) el estado "b" es dominante ya que es el más recurrente y atrae más transiciones. Justo después del estímulo (Fig. 7C2) las transiciones entre los tres ensambles principales están más equilibrados. Treinta minutos después del estímulo (figura 7C3) la dinámica patológica regresa: el estado rojo se convierte en el más recurrente y las transiciones disminuyen llevando el microcircuito a una condición con un estado dominante nuevamente. Para concluir, un estímulo cortical cambia la arquitectura y la dinámica del microcircuito deficiente en DA, incluso si la actividad neuronal sigue siendo alta en comparación con el microcircuito control no estimulado (Fig. 4B). El trabajo previo ha mostrado que la aplicación de L-DOPA reduce la actividad del microcircuito deficiente en DA, hasta dejarlo como el microcircuito control no estimulado (Plata et al., 2013a).

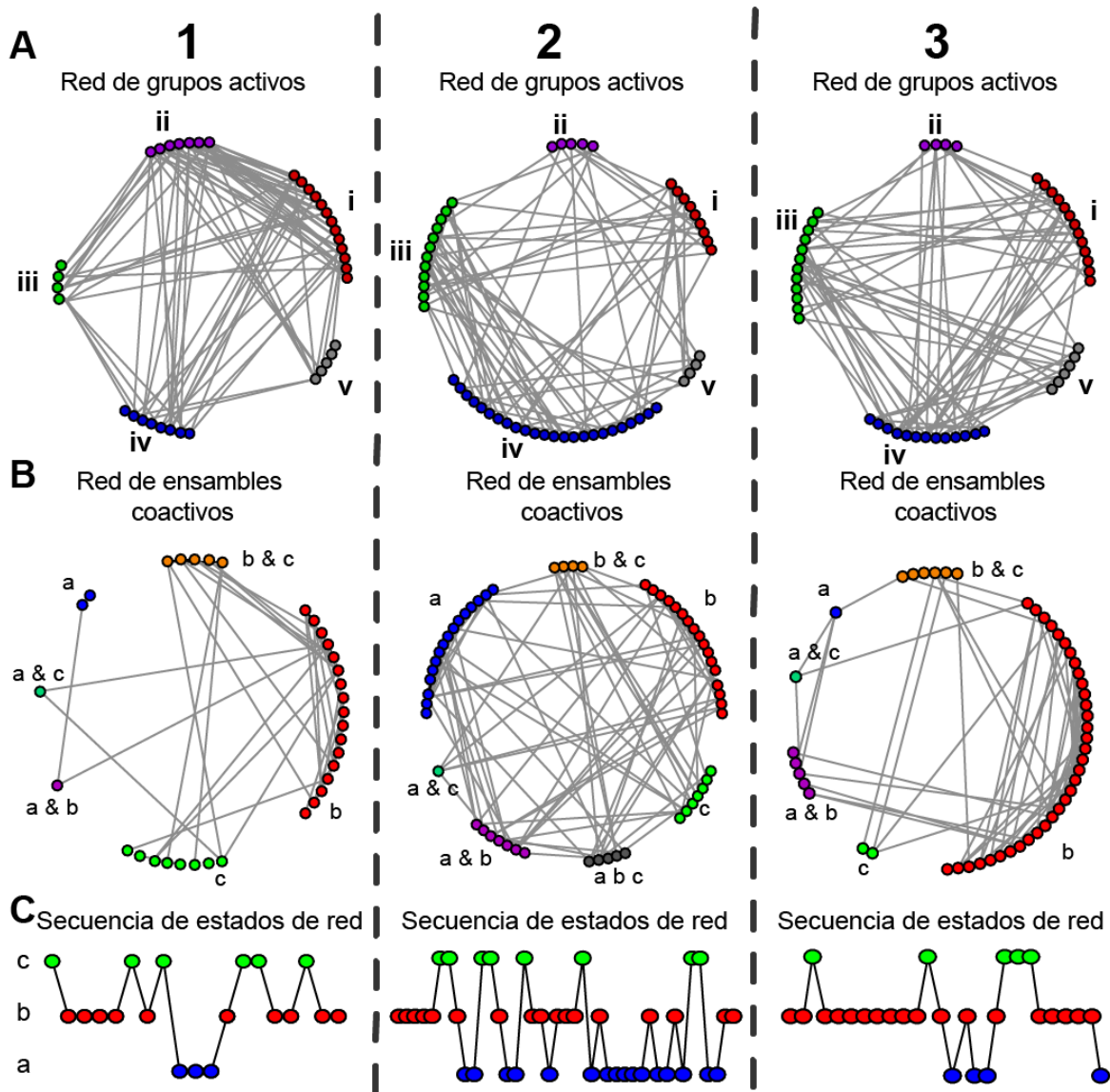


Figura 7. **El efecto de la estimulación corticoestriatal en la arquitectura y dinámica del microcircuito.** Ilustramos la arquitectura del microcircuito con dos tipos de grafos: uno basado en redes de grupos activos y otro basado en la coactividad de ensamblajes neuronales. A. Actividad de grupos de redes separan grupos de neuronas (nodos representados por círculos en el perímetro) según su actividad antes (1), justo después (2) y 30 minutos después (3) del estímulo cortical. Las conexiones funcionales entre ellos (líneas grises, ver métodos) indican momentos de coactividad en picos de actividad significativa. Solo se representan las neuronas activas durante una época determinada. Antes de CtxS los grupos i y ii obtienen la mayoría de las conexiones, después de CtxS el grupo iii y iv tienen más conexiones, pero los miembros de los grupos i y ii permanecen conectados. Treinta minutos después del CtxS el grupo i recupera muchas conexiones y sorprendentemente el grupo iii permanece fuertemente conectado mientras el grupo iv está severamente disminuido. B. Las redes de coactividad de ensamblajes son grupos de neuronas (nodos visto como círculos en la periferia) que forman picos significativos de coactividad en el histograma de coactividad obtenidos de las gráficas tipo raster (Figuras 2 y 3). Puede haber

neuronas que pertenecen a más de un conjunto. Las conexiones funcionales también se definen como momentos de coactividad. Los grupos de neuronas en A y B no coinciden, ya que ilustran métodos distintos para definir grupos neuronales; sin embargo, muestran fenómenos similares. Neuronas que participaron en más de un conjunto están indicadas por etiquetas. Aún así, antes de CtxS (1) la mayoría de las conexiones están monopolizadas por el conjunto b, justo después del estímulo (2) varios ensambles comparten conexiones y uno de ellos tiene neuronas que pertenecen a todos los ensambles, y finalmente, 30 minutos después del estímulo (3), el conjunto b ha reclutado más miembros y obtiene la mayoría de las conexiones de nuevo. C. Las secuencias de tiempo de los estados de la red B ilustran la dinámica de las arquitecturas de red: antes de CtxS la mayoría de las transiciones ocupan el estado b (1), justo después de CtxS (2) el número de transiciones aumenta entre los conjuntos principales y 30 minutos después de CtxS (3) el conjunto dominante regresa, las transiciones disminuyen y la red queda atrapada más tiempo en el estado de la red b.

4.4 Efectos de la estimulación cortical en presencia de L-DOPA en un microcircuito deficiente en DA

La Figura 8 es similar a la Figura 6, muestra cambios en la actividad neuronal en el microcircuito deficiente en DA bajo diferentes tratamientos: primero, la administración de 10 μ M de L-DOPA, y después de la estimulación cortical (CtxS) durante la acción de la L-DOPA. El objetivo fue ver si la actividad del circuito en presencia de L-DOPA, al ser estimulado, corresponde a un circuito control estimulado o de lo contrario, corresponde a un circuito patológico. Los tejidos fueron registrados por más de 30 min. Las neuronas se dividieron en cinco grupos (i-v), de acuerdo con su cambio en la actividad durante las diferentes épocas del experimento. El raster (figura 8A1) y el histograma de coactividad (figura 8B1) muestran las subpoblaciones neuronales activas en el microcircuito deficiente de DA antes del estímulo: i y ii. Después de agregar L-DOPA a la perfusión, la actividad de todas las neuronas disminuyó (Figuras 8A, B2; Plata et al., 2013a), por lo tanto, la época 2 cuando se administró L-DOPA no se consideró para comparar cambios de actividad ya que no había picos significativos de coactividad. Después de la CtxS la actividad claramente aumentó (Figuras 8A, B3). Se observan diferentes subpoblaciones neuronales contribuyendo a la actividad del circuito, el cual se parece a un circuito control estimulado (iii y iv) y no a uno patológico. Alejándose de la actividad patológica inicia 30 min después de la CtxS en presencia de L-DOPA (Figuras 8A, B4), un conjunto de neuronas que estaban activas antes de la administración del fármaco y la CtxS, se reactivan. Una subpoblación de neuronas (v) no cambia su actividad a lo largo del experimento. La contribución de cada subpoblación a el total de actividad se muestra en el histograma de la Figura 8B. La Figura 8C muestra la actividad de cada conjunto de

neuronas durante las épocas 1, 3 y 4. Concluimos que el microcircuito deficiente de DA se reconfigura a sí mismo después de L-DOPA y que la CtxS cambia diferencialmente la actividad de diversas subpoblaciones de neuronas.

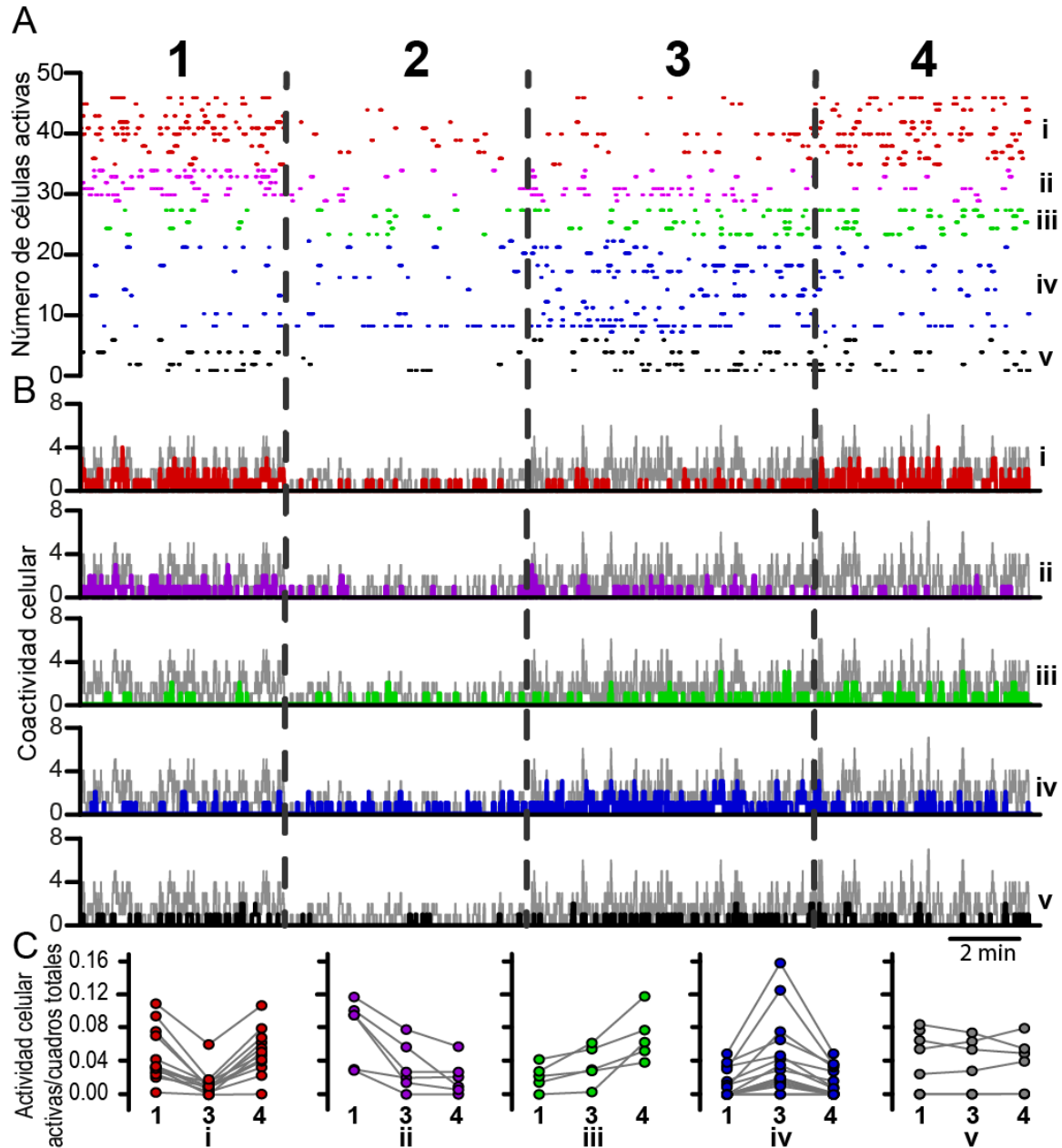


Figura 8. **Estimulación corticoestriatal del microcircuito deficiente en DA durante la acción de L-DOPA.** Durante el aumento de la actividad neuronal espontánea de un microcircuito deficiente en DA (1), se administraron 10 μ M L-DOPA en el baño (2), luego, se estimuló a la corteza (3), la actividad inducida fue seguida por más de 30 minutos (4). Como en la Figura 6, las neuronas fueron ordenadas en el gráfico tipo raster (A) y en los histogramas de coactividad (B) de acuerdo con su disminución o aumento de actividad. La actividad total se ilustra con el histograma

pálido de fondo. El umbral para considerar un cambio significativo en la actividad fue de 20%. Durante la administración de L-DOPA, toda la actividad neuronal disminuye a los niveles encontrados en los microcircuitos control no estimulados (2). Sin picos significativos de coactividad. Por lo tanto, los cambios de actividad comparados a continuidad no incluyen la época 2 si no sólo las épocas 1, 3 y 4 dividiendo a las neuronas en cinco subpoblaciones como lo hicimos anteriormente. A. En los gráficos tipo raster, cada fila representa la actividad de una sola célula a lo largo del tiempo. B. Los histogramas de coactividad antes de la estimulación (1) era monopolizada por los grupos de neuronas i y ii (C). Después de L-DOPA (2) la actividad disminuye en todos los grupos. Después de la CtxS en presencia de L-DOPA (3) la actividad regresa. Grupos nuevos de neuronas como los iii y iv, ahora contribuyen a la actividad junto con algunas neuronas de los grupos i y ii. Después de 30 minutos de la CtxS (3) la actividad en los grupos i y iii regresa mientras que en los grupos ii y iv disminuye. Las neuronas en el grupo v no cambian su actividad. C. Actividad de subpoblaciones neuronales durante las épocas 1, 3 y 4.

A continuación, nos preguntamos cómo la arquitectura y la dinámica del microcircuito remodelado cambian bajo estas condiciones. Para apreciar la remodelación en la arquitectura del microcircuito y su dinámica, construimos dos tipos de redes (Fig. 9; Fig. 7): uno que indica la subpoblaciones de neuronas que cambian su actividad después de administrar L-DOPA y la CtxS (Fig. 9A épocas 1, 3, 4) y el otro que muestra los ensambles neuronales durante los picos significativos de coactividad (Fig. 9B épocas 1, 3, 4). En el primer caso, el número de elementos que hacen que los grupos y sus conexiones cambien después de L-DOPA y la CtxS, tiende a regresar al circuito original después de 30 min. Note el ensamble dominante rojo en el microcircuito original deficiente en DA (Jaidar et al., 2010, Pérez- Ortega et al., 2016) que claramente permanece después de L-DOPA y CtxS. Sin embargo, permite más transiciones entre ensambles después de la CtxS en presencia de L-DOPA y su predominio no regresa después de 30 min. Cuando seguimos la secuencia temporal de las transiciones entre ensambles principales o estados de la red (Fig. 9C épocas 1, 3, 4), claramente el número de transiciones entre los tres estados aumenta. A diferencia del experimento sin L-DOPA, la alternancia en la actividad entre ellos permanece después de 30 min.

Concluimos primero, que L-DOPA disminuye la actividad del microcircuito deficiente en DA de una manera que los picos significativos de coactividad se vuelvan difíciles de observar, disolviendo así la actividad recurrente del ensamble dominante (Plata et al., 2013a). Además, cuando la actividad del circuito se induce por la CtxS en presencia de L-DOPA, este no se comporta como el circuito patológico deficiente en DA, si no que muestra actividad alternada entre sus ensambles. A diferencia de la CtxS sin L-DOPA,

este comportamiento permanece después de 30 min. Por lo tanto, el microcircuito estriatal queda funcional por un período más largo de tiempo.

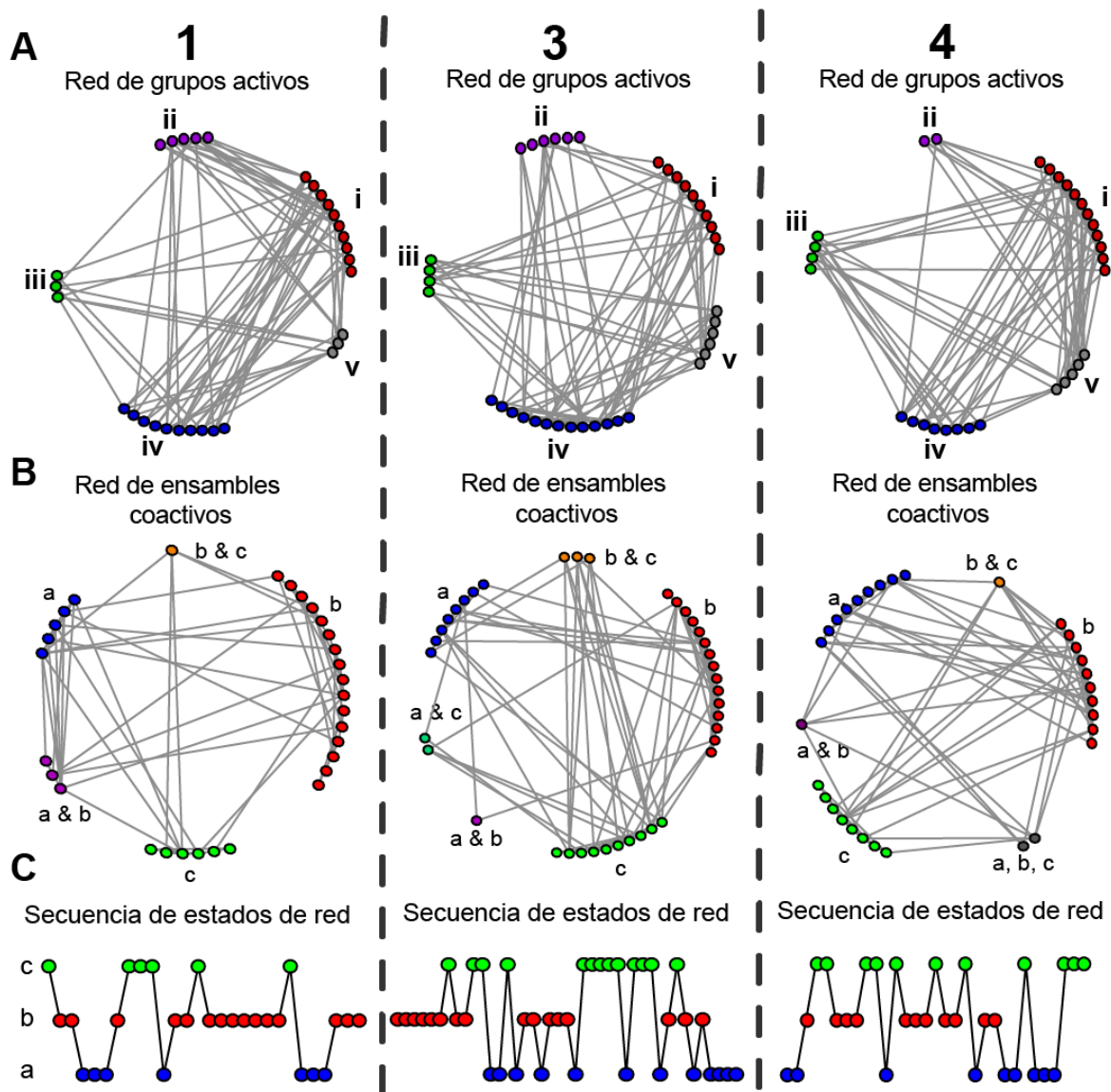


Figura 9. **Acciones de L-DOPA en conjunto con la estimulación corticoestriatal en arquitectura y la dinámica de los microcircuitos deficientes de DA.** A. Microcircuito construido con subpoblaciones neuronales que cambiaron su actividad después de los tratamientos: redes neuronales por época: 1. El microcircuito deficiente en DA antes del CtxS, el circuito mientras se administra L-DOPA es omitido (2), 3. En presencia de L-DOPA, microcircuito inmediatamente después de la CtxS (4) y estímulo 30 minutos después. Cada neurona es un nodo (círculos en el perímetro) cada enlace es un momento de coactividad. Solo las neuronas activas en una época determinada están representadas y se clasifican en grupos de acuerdo a la Figura 8 (i-v). Ver los cambios en la cantidad de elementos y conexiones de cada grupo después de la CtxS. B. Conjuntos de redes de coactividad compuestos por neuronas que hacen picos significativos de coactividad: principales ensambles a-c, las neuronas que participan en más de un ensamble se

agrupan por separado según lo indicado por las etiquetas. Los cambios en los conjuntos y la conectividad son obvios después de la CtxS en presencia de L-DOPA. C. Secuencias temporales por época. El estado más recurrente (b) no se pierde, pero permite más transiciones a otros estados después de L-DOPA y CtxS (3). A diferencia de sólo CtxS (Fig. 7), las transiciones persisten después de 30 min en presencia de L-DOPA.

Las distribuciones acumuladas de la actividad celular mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Fig. 4D). Comparamos estas distribuciones con las obtenidas con los estímulos corticales sin y con L-DOPA (Fig. 10), tomando en cuenta todas las células de las muestras. En el caso del CtxS, la distribución acumulada para microcircuitos deficientes en DA tienen una diferencia significativa con la distribución control ($P \leq 0.0135$; Figs. 4D y Fig. 10A). Sin embargo, esta diferencia se pierde 30 min después del estímulo (Fig. 10A).

En el caso de la CtxS sumada a las acciones de la L-DOPA, la Figura 10B muestra primero que la L-DOPA reduce la actividad celular en el microcircuito deficiente en DA ($n = 7$, prueba T de Wilcoxon $P = 0.015$). En segundo lugar, después de la CtxS durante la acción de la L-DOPA, la distribución acumulada de la actividad celular aumenta a medida que se activa el circuito (Figuras 3, 8, 9) y se mantiene significativamente diferente respecto de la distribución de actividad celular del microcircuito deficiente en DA ($P = 0.00000003$). En tercer lugar, a diferencia del caso sin L-DOPA, el circuito permanece con este nivel de actividad después de 30 min. Esto significa que en presencia de L-DOPA la actividad inducida por la CtxS se asemeja al circuito control estimulado y permanece así por períodos de tiempo más largos. Los gráficos circulares de las Figuras 10C y D muestran la contribución de los grupos de neuronas según lo definido por su actividad celular (Figuras 6, 8: i-v) bajo cada condición y para todos los experimentos. Los gráficos circulares y las pruebas de contingencia muestran que no hay una diferencia significativa entre las diferentes condiciones experimentales en ambos grupos de experimentos: deficiente en DA + CtxS (Figura 10C) vs. deficiente de DA + L-DOPA + CtxS (Figura 10D). Para las neuronas deficientes de DA, la mayoría de la actividad proviene de las subpoblaciones i y ii en todos los experimentos ($P = 0.6227$ comparando circuitos deficientes en DA de ambos conjuntos de experimentos). 30 minutos después de la CtxS el grupo i regresa y la actividad del grupo iv disminuye en ambas muestras, pero muchas neuronas del grupo iii siguen sin mostrar diferencias significativas con o sin L-DOPA

(Figuras 10C3, D4; $P = 0.2078$). Concluimos que la CtxS reconfigura las poblaciones neuronales activas en presencia o ausencia de L-DOPA.

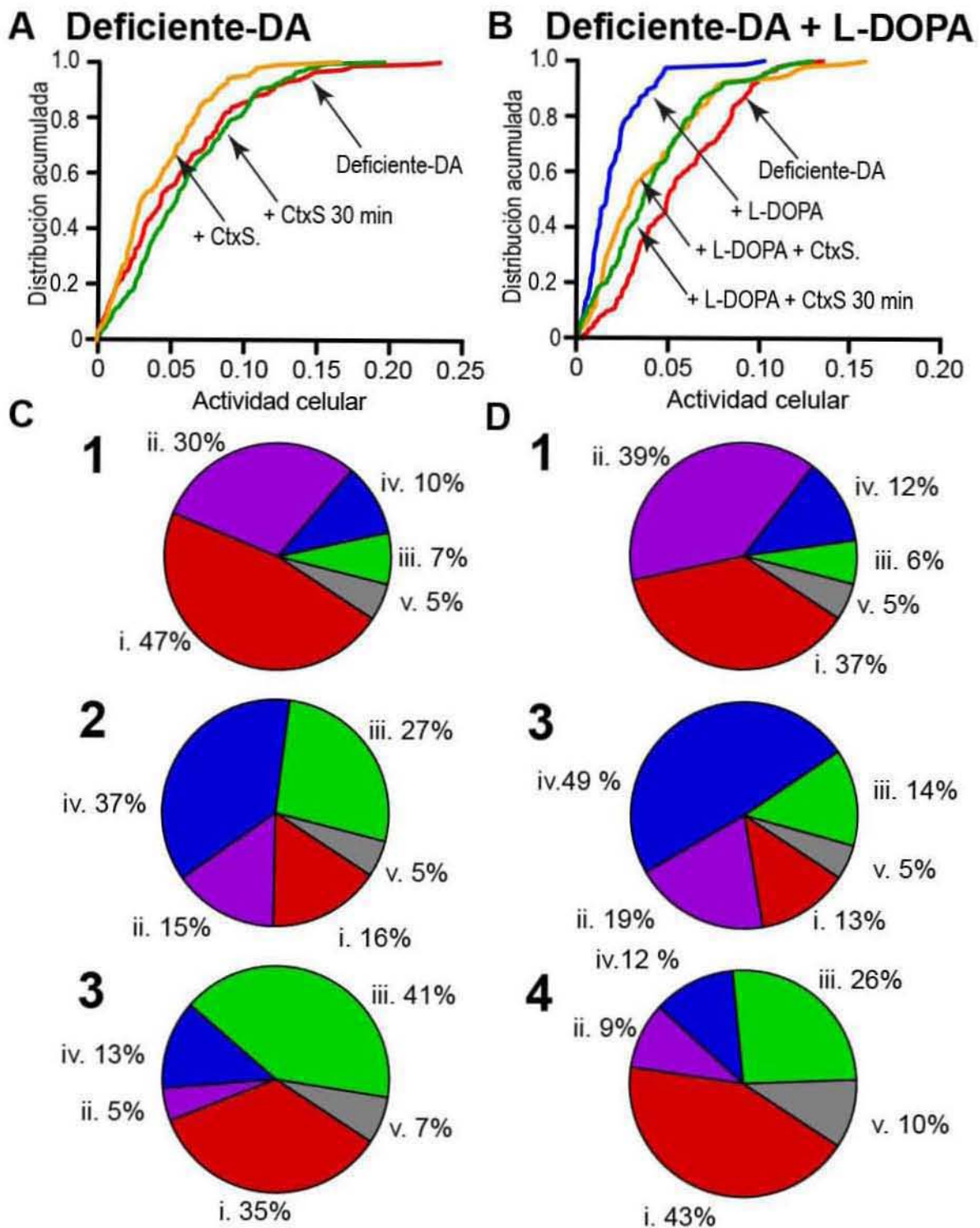


Figura 10. **Grupos de actividad celular bajo diferentes condiciones.** (A) Actividad acumulada del microcircuito deficiente en DA y tratado con CtxS: hay una diferencia significativa ($P \leq 0.0135$).

La diferencia desaparece después de 30 min después del estímulo. (B) Actividad celular acumulada para los casos con L-DOPA y CtxS; hay una diferencia significativa después de la administración de L-DOPA ($P = 9.4 \times 10^{15}$). La actividad se recupera después del CtxS en presencia de L-DOPA y permanece significativamente diferente a la del microcircuito deficiente en DA ($P = 0,00025$). En contraste con el CtxS, la distribución de la actividad sigue siendo significativamente diferente después de 30 minutos si está en presencia de L-DOPA ($P = 0.0253$; pruebas de Kolmogorov-Smirnov) (C, D) Los gráficos circulares ilustran la contribución de las diferentes subpoblaciones neuronales, clasificadas por su actividad antes y después del CtxS (ver Figuras 6 y 8) para todos los experimentos agrupados. (1) Los grupos i y ii fueron predominantes en los circuitos deficientes en DA en ambos casos ($P = 0.6227$, C1 vs D1). Después del CtxS se observó un recambio significativo de las subpoblaciones neuronales que componen los circuitos sin (C2) y con L-DOPA (D3). Un aumento en las neuronas del grupo iv fue evidente en ambos casos ($P < 0.0001$, C2 vs C1 y D3 vs D1), pero no hubo una diferencia significativa en esta redistribución neuronal sin o con L-DOPA ($P = 0.16$, C2 vs D3). Treinta minutos después del CtxS, el grupo i regresa y el grupo iv disminuye en ambos casos ($p = 0.2078$ comparando C3 vs D4; pruebas de contingencia).

Las Figuras 11 A y B ilustran los patrones de recurrencia de los estados de la red bajo diferentes condiciones en dos muestras de experimentos (ver índice de recurrencia en Material y Métodos): deficiente en DA + CtxS (Fig. 11A) deficiente en DA + L-DOPA + CtxS (Fig. 11B). Cuando un solo estado de la red tiene una recurrencia mucho más alta que el resto de los estado, como se observó previamente en circuitos patológicos (Jaidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016), exhibe dos diferentes grupos de índice de recurrencia y por ello la varianza aumenta (Figuras 11 A, B). Cuando ningún estado de la red tiene una mayor recurrencia la distribución es homogénea mostrando un único grupo con estados de red no dominantes (Figuras 11A, B; circuitos deficientes de DA + CtxS y deficiente en DA + L-DOPA + CtxS). Es decir, la CtxS elimina el ensamble patológico en ambos casos ($P = 0.007586$; prueba O'Brien para la Homogeneidad de la Varianza en este y otros valores P de esta sección) y con L-DOPA ($P = 0.03712$), restaurando la alternancia entre los ensambles neuronales ($n = 12$ estados de red desde 4 experimentos en cada condición obtenidos a partir de 8 diferentes rebanadas y animales).

Sin embargo, una diferencia entre las dos condiciones fue evidente 30 minutos después de la CtxS: sin L-DOPA los ensambles patológicos recurrentes regresan (Fig. 11A caja derecha; $P=0.01532$ en comparación con CtxS) aún más recurrentes que en la condición inicial deficiente en DA ($P= 0.01869$) como si el estado Parkinsoniano regresara peor que antes. Por el contrario, en presencia de L-DOPA el microcircuito permanece sin ensambles altamente recurrentes, 30 minutos después de la CtxS (Fig. 11B caja derecha; $P = 0.03582$ en comparación con los circuitos originales deficientes en DA). Tomado en

experimento (ver Materiales y métodos). En caso de que algunos estados de la red tengan un exceso de recurrencia (estados patológicos dominantes), el circuito estará dividido en dos poblaciones, aquellos con alta y aquellos con baja recurrencia y la varianza de esa muestra reflejará esta separación. En los casos donde no hay predominancia de ningún estado de la red, se tendrá recurrencia similar para todos los estados y la varianza de la muestra será pequeña. (A) Gráficos de caja comparando la recurrencia de estados de la red en circuitos deficientes en DA antes y después de la CtxS: antes de la CtxS, claramente hay dos subpoblaciones de estados de red uno de ellos con mayor recurrencia que los demás (izquierda). Después de la CtxS, todos los estados de la red tienden a agruparse juntos (centro, $P = 0.007586$ con respecto a circuitos deficientes en DA). Sin embargo, 30 minutos después de la CtxS, los estados de la red se separan nuevamente y los estados de dominantes o más recurrentes reaparecen (derecha; $P=0.01532$ con respecto a CtxS y $P = 0.01869$ con respecto a circuitos privados de DA antes de CtxS), lo que sugiere que el estado Parkinsoniano regresa. (B) Comparación de la recurrencia de los estados de la red antes y después de CtxS más L-DOPA. Los circuitos deficientes en DA mostraron estados de red con alta y baja recurrencia (izquierda). Después del CtxS durante las acciones de L-DOPA, todos los estados de la red tienden a tener la misma recurrencia (centro, $P = 0.03712$ con respecto a los circuitos deficientes en DA). A diferencia del caso sin L-DOPA, 30 minutos después de la CtxS los circuitos permanecen con estados de red con la misma incidencia de recurrencia (derecha; $P = 0.03582$ con respecto a los circuitos deficientes en DA). $N = 12$ estados de red tomados de cuatro diferentes circuitos y rebanadas de diferentes animales. (Homogeneidad O'Brien de la prueba de varianza). *¹ Indica significación estadística.

5. Discusión

En este trabajo comprobamos que un tren de estimulación cortical es capaz de activar el microcircuito estriatal por más de 30 min, aún en ausencia de otro estímulo. Además, este mismo estímulo es capaz de eliminar la actividad patológica observada en un microcircuito parkinsoniano por un corto periodo de tiempo, a través de silenciar a una población neuronal y activar a otra. Este efecto puede trabajar de manera sinérgica con L-DOPA de modo que cuando se agrega L-DOPA al microcircuito parkinsoniano la actividad del mismo baja. Pero al activar al microcircuito con estimulación cortical en presencia de L-DOPA, la actividad evocada no tiene las mismas características ni se activa la misma población de neuronas que el microcircuito patológico. Después, de 30 min, aunque la población de neuronas activas en el microcircuito patológico se reactiva, la red no regresa a un estado patológico. Este efecto se mantuvo durante el curso de nuestros experimentos.

5.1 Estimulación cortical en el control y microcircuitos deficientes en DA

Se discute si los signos y síntomas del Parkinsonismo tienen un origen cortical (Arbutnott y Garcia-Muñoz, 2016) ya que las oscilaciones patológicas se presentan en la corteza motora antes de que aparezcan los signos motores de la enfermedad (Li et al., 2012). Algunas influencias corticales sobre el circuito del estriado y sus cambios durante el parkinsonismo ya han sido descritas (Calabresi et al., 1996; 2015; Hammond et al., 2007; Pérez-Ortega et al., 2016). La estimulación cortical extradural en pacientes (Cillia et al., 2007; Bentivoglio et al., 2012), la estimulación magnética transcraneal de la corteza en pacientes y roedores (Kanno et al., 2004; Gonzalez-Garcia et al., 2011; Dileone et al., 2017), la estimulación directa de la corteza motora en primates y pacientes (Drouot et al., 2004; Benninger et al., 2010), la estimulación optogenética cortical en roedores (Gradinaru et al., 2008; Sanders y Jaeger, 2016) y la estimulación antidrómica de los axones corticofugales en roedores (Li et al., 2007; 2012), todas alivian los signos parkinsonianos. En el presente trabajo, nos preguntamos cuáles son los mecanismos para que la estimulación cortical alivie el parkinsonismo. Por lo que nuestro objetivo fue observar los cambios producidos en el microcircuito estriatal por estimulación cortical *in vitro* en rebanadas de cerebro de estriado deficiente en DA.

El microcircuito control del estriado se caracteriza por tener baja actividad espontánea, la cual aumenta durante el inicio de una acción (Cui et al., 2013). *In vitro*, hemos demostrado

que la actividad del microcircuito aumenta después de agregar un impulso excitador a la solución salina de perfusión tal como NMDA a bajas concentraciones (Grillner et al., 2006). Una vez activado, el microcircuito se caracteriza por exhibir picos espontáneos significativos de coactividad neuronal que se asemejan a los ensambles neuronales, cuyas neuronas funcionan en concierto (Carrillo-Reid et al., 2008). Usamos la coactividad neuronal en un marco de tiempo determinado para construir conexiones funcionales y las representaciones de los microcircuitos (Carrillo-Reid et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2016). La actividad de la red revela un procesamiento de alto orden ya que los ensambles muestran recurrencia y actividad que se alterna con reverberaciones y ciclos cerrados durante varios minutos (Carrillo-Reid et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2016). Esta actividad es modulada de diferentes maneras por agonistas colinérgicos y dopaminérgicos (Carrillo-Reid et al., 2009; 2011). La investigación *in vivo* ha demostrado que, en efecto, esta actividad codifica acciones motoras en el espacio (Klaus et al., 2017). Aquí mostramos que es posible evocar el comportamiento de esta red sin agregar activadores químicos como el NMDA, pues basta utilizar un estímulo eléctrico adecuado en la corteza (ver Material y métodos Fig.2). Una vez que es inducida, la actividad del microcircuito se puede seguir durante más de 30 minutos en rebanadas de cerebro *in vitro*. La actividad registrada en el estriado surge de varias subpoblaciones neuronales. Algunas interneuronas colinérgicas y GABAérgicas tienen actividad espontánea (Goldberg & Wilson 2010, Tepper et.al. 2010), lo que sugiere que están participando en el microcircuito. Además, se demostró recientemente tanto las interneuronas low-threshold spiking de bajo umbral y las interneuronas colinérgicas se comunican entre sí a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Elghaba et al., 2016).

El microcircuito Parkinsoniano deficiente en DA tiene una dinámica que difiere radicalmente de la del microcircuito control (Jaidar et al., 2010; Lopez-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013a; Pérez-Ortega et al., 2016). Aparece un ensamble neuronal dominante con un alto nivel de recurrencia al cual pertenecen la mayoría de las neuronas y conexiones funcionales, manteniendo a la red en un solo estado durante la mayor parte del tiempo (Figuras 3, 10, 11). Usando una medida de recurrencia (ver Material y métodos y Fig. 11) encontramos que los microcircuitos deficientes en DA dividen sus ensambles neuronales en alta y baja recurrencia aumentando la varianza. Debido a que los reportes anteriores muestran que la estimulación cortical mejora los signos de la enfermedad de Parkinson, quisimos confirmar esto *in vitro*. Tratamos de observar si los ensambles con alta recurrencia disminuyen. Por lo tanto, el principal hallazgo de este trabajo es que la

estimulación cortical modifica la actividad del microcircuito eliminando el estado Parkinsoniano, lo que permite que la red regrese a la alternancia entre los ensamblajes neuronales y a las de las transiciones entre ellos. Observando gráfos de microcircuitos contruidos con neuronas individuales como nodos y tiempos de coactividad como conexiones funcionales, observamos una alta recurrencia de ensamblajes que monopolizan la mayoría de la actividad y las conexiones. El CtxS libera momentáneamente al circuito de esta situación. En pacientes, este fenómeno se observa durante la *Kinesia Paradoxa*, en los que una entrada sensorial fuerte puede aliviar temporalmente los signos de la enfermedad de Parkinson (Banou, 2015). El CtxS promueve nuevas subpoblaciones neuronales en el circuito activo y disminuye las subpoblaciones neuronales que sostienen el estado patológico, las cuales dejan de disparar. Unas neuronas reducen su actividad mientras que otras la aumentan. Una hipótesis del trabajo para explicar cómo algunas neuronas son silenciadas y otras reclutadas implicaría la acción de las interneuronas inhibitoras del estriado conocidas por recibir un gran número de sinapsis corticales (Bennett y Bolam, 1994; Gittis et al., 2010; Planert et al., 2010). Estas interneuronas se conectan densamente con neuronas de proyección estriatal (SPN, Straub et al., 2016) y son necesarias para la actividad de la red control, así como para la alternancia de ensamblajes neuronales y el comportamiento reverberante (Pérez-Ortega et al., 2016). Para concluir, se encontró un sustrato celular que puede explicar cómo la estimulación cortical puede estar actuando para aliviar el Parkinsonismo. Este hallazgo se correlaciona con los cambios en la plasticidad sináptica a largo plazo encontrada en las sinapsis estriatales deficientes en DA (Calabresi et al., 1996; Ghiglieri et al., 2012). No obstante, los efectos del CtxS en el microcircuito deficiente en DA sólo duran pocos minutos. Después de 30 minutos, en todos los experimentos realizados (n=4) la actividad del microcircuito volvió al estado Parkinsoniano y las subpoblaciones neuronales que estaban activas durante el estado Parkinsoniano se activaron nuevamente.

El tratamiento más utilizado para la enfermedad de Parkinson (EP) es la L-DOPA, que mejora notablemente los signos motores (Mercuri y Bernardi, 2005) y las respuestas somatosensoriales (Ketzer et al., 2017). *In vitro*, la L-DOPA ha demostrado ayudar en la recuperación del control de la plasticidad sináptica a largo plazo (Ghiglieri, et al., 2012). De acuerdo con los datos anteriores, el resultado actual demuestra que la L-DOPA devuelve al microcircuito estriatal deficiente en DA a una baja actividad, similar al que se encuentra en condiciones control (Plata et al., 2013a). Por lo tanto, una pregunta a responder fue, si en presencia de L-DOPA, la actividad inducida en el microcircuito

estriatal deficiente en DA corresponde a la actividad control con alternancia entre los ensambles neuronales tal y como se encuentra en condiciones de control, o si por el contrario, el circuito patológico entra en acción. Encontramos que la estimulación cortical (CtxS) durante la acción de la L-DOPA induce a que se recluten nuevas subpoblaciones de neuronas y que las que estaban activas durante la actividad patológica se callan. En presencia de L-DOPA, la CtxS produjo una actividad de red similar a la de los circuitos control estimulados. Sin embargo, en contraste con la CtxS sin L-DOPA, esta última permite que los circuitos permanezcan en condiciones similares a las del control por períodos de tiempo más largos. La distribución acumulada de la actividad celular no volvió a parecerse a la del microcircuito deficiente en DA durante el período de registro a pesar de que las células que participan en el estado patológico se reactivan. Por lo tanto, no todos los fenómenos pueden ser explicados con cambios en la participación neuronal. En presencia de L-DOPA, los cambios en la dinámica de la red inducida por la estimulación cortical, tales como la alternancia entre ensambles neuronales y ciclos cerrados de actividad reverberante. Los ensambles neuronales que monopolizan la mayor parte de la actividad en el microcircuito patológico se disuelven y las conexiones se hacen más equilibradas: la alternancia con otros ensambles permanece. Si pensamos en la estimulación cortical como el comando que inicia la acción, esta, en presencia de L-DOPA fue más parecida al microcircuito control estimulado, que al patológico.

En conclusión, la L-DOPA y la estimulación cortical trabajan sinérgicamente usando mecanismos distintos: la estimulación cambia los ensambles neuronales mientras la L-DOPA modifica la plasticidad sináptica. Por lo tanto, la pregunta es si ambos tratamientos pueden equilibrarse de alguna manera de tal forma que se pueda reducir la dosis de L-DOPA, si se desarrollan dispositivos de estimulación cortical continua. Esto podría retardar la aparición de discinecias, el cual es el mayor problema del tratamiento con L-DOPA.

6. Referencias

- Andén, N.E., Carlsson, Dahlström, A., Fuxe, K. , Hillarp, N.-Å. & Larsson, K. (1964) Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci.*, 3, 523-530.
- Arbuthnott, G.W. & Garcia-Munoz, M. (2016) Are the Symptoms of Parkinsonism Cortical in Origin? *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 15, 21-25.
- Arias-García MA, Tapia D, Laville JA, Calderón VM, Ramiro-Cortés Y, Bargas J, Galarraga E. (2017) Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Struct Funct.* doi: 10.1007/s00429-017-1536-6.
- Banou, E. (2015) Kinesia paradoxa: a challenging Parkinson's phenomenon for simulation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 822, 165-177.
- Barabási AL, Oltvai ZN. (2004) Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet.* (2):101-13.
- Bennett, B.D. & Bolam, J.P. (1994) Synaptic input and output of parvalbuminimmunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neuroscience*, 62, 707-719.
- Benninger, D.H. & Hallett, M. (2015) Non-invasive brain stimulation for Parkinson's disease: Current concepts and outlook. *NeuroRehabilitation*, 37, 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, 1105-1111
- Bentivoglio, A.R., Fasano, A., Piano, C., Soleti, F., Daniele, A., Zinno, M., Piccininni, C., De Simone, C., Policicchio, D., Tufo, T., Meglio, M. & Cioni, B. (2012) Unilateral extradural motor cortex stimulation is safe and improves Parkinson disease at 1 year. *Neurosurgery*, 71, 815–825.
- 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, 819-833.
- 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: colocalization at synapses with the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 3721-3736.

Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K. & Seitelberger, F. (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.*, 20, 415-455.

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, e28168.

Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A. & Bevan, M.D. 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.*, 196, 527–542.

Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N. B. & Bernardi, G. (1996) The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 19, 19–24.

Calabresi, P., Ghiglieri, V., Mazzocchetti, P., Corbelli, I. & Picconi, B. (2015) Levodopa-induced plasticity: a double-edged sword in Parkinson's disease? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 370, 20140184.

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, 1435–1450.

Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibáñez-Sandoval, O., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E. & Bargas, J., (2009a). 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., (2009b). Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J Neurophysiol.*, 102(2):682-90.

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., Lopez-Huerta, V.G., Garcia-Munoz, M., Theiss, S. & Arbuthnott, G.W. (2015) Cell assembly signatures defined by short-term synaptic plasticity in cortical networks. *Int. J. Neural Syst.* 25, 1550026.

Carrillo-Reid, L., Yang, W., Bando, Y., Peterka, D. S. & Yuste, R. (2016) Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science*, 353, 691-694.

Cilia, R., Landi, A., Vergani, F., Sganzerla, E., Pezzoli, G. & Antonini, A. (2007) Extradural motor cortex stimulation in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 22, 111-114.

Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M. & Costa, R. M. (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, 494, 238-242.

Dauer, W. & Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 11,889-909.

Dileone, M., Carrasco-López, M. C., Segundo-Rodriguez, J. C., Mordillo-Mateos, L., López- Ariztegui, N., Alonso-Frech, F., Catalan-Alonso, M. J., Obeso, J. A., Oliviero, A. & Foffani, G. (2017) Dopamine-dependent changes of cortical excitability induced by transcranial static magnetic field stimulation in Parkinson's disease. *Sci. Rep.*, 7,4329.

Doig NM1, Moss J, Bolam JP.(2010) Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci.* 30(44):14610-8.

Drouot, X., Oshino, S., Jarraya, B., Besret, L., Kishima, H., Remy, P., Dauguet, J., Lefaucheur, J. P., Dollé, F., Condé, F., Bottlaender, M., Peschanski, M., Kéravel, Y., Hantraye, P. & Palfi, S. (2004) Functional recovery in a primate model of Parkinson's disease following motor cortex stimulation. *Neuron*, 44, 769–778.

Ehringer, H. & Hornykiewicz, O. (1960) Distribution of noradrenaline and dopamine (3- hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin. Wochenschr.*, 15,1236-1239.

Elghaba, R., Vautrelle, N. & Bracci, E. (2016) Mutual Control of Cholinergic and Low- Threshold Spike Interneurons in the Striatum. *Front Cell Neurosci.* 10,111.

Feng, Z. J., Zhang, X. & Chergui, K. (2014) Allosteric modulation of NMDA receptors alters neurotransmission in the striatum of a mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 255, 154-60.

Fieblinger, T., Graves, S. M., Sebel, L. E., Alcacer, C., Plotkin, J. L., Gertler, T. S., Chan C. S., Heiman, M., Greengard, P., Cenci, M.A. & Surmeier, D. J. (2014) Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Commun.*, 31,5316.

- 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. *Front. Sys. Neurosci.* 4, 1-14.
- 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.
- Gerfen CR1, Miyachi S, Paletzki R, Brown P. (2002) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci.*, 22(12):5042-54.
- Gerfen, C. R. & Surmeier, D. J. (2011) Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.*, 34, 441–466.
- Gerfen, C. R., Wilson CJ. (1996) The basal ganglia. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, ed. LW Swanson, A Bjorklund, T Hokfelt. Amsterdam: Elsevier., pp. 365-62.
- Gerfen, C. R., and Young, W. S. III (1988). Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460, 161–167.
- Geurts M1, Maloteaux JM, Hermans E. (2003) Altered expression of regulators of G-protein signaling (RGS) mRNAs in the striatum of rats undergoing dopamine depletion. *Biochem Pharmacol.*, 66(7):1163-70.
- Ghiglieri, V., Bagetta, V., Pendolino, V., Picconi, B. & Calabresi, P. (2012) Corticostriatal Plastic Changes in Experimental L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Parkinsons Dis.*, 358176.
- 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, 2223–2234.
- Goldberg, J.A. & Wilson, C.J. (2010) The Cholinergic Interneurons of the Striatum: Intrinsic Properties Underlie Multiple Discharge Patterns. Steiner H. & Tseng, K.Y. (eds), *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. Academic Press, Inc, Elsevier B.V. pp 137-157.
- González-García, N., Armony, J. L., Soto, J., Trejo, D., Alegría, M. A. & Drucker-Colín, R. (2011) Effects of rTMS on Parkinson's disease: a longitudinal fMRI study. *J. Neurol.*, 258, 1268-1280.

Gradinaru, V., Mogri, M., Thompson, K. R., Henderson, J. M. & Deisseroth, K. (2008) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science*, 324, 354–359.

Graybiel Ann M. (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Current Opinion in Neurobiology*, Volume 5, Issue 6, 733-741.

Grillner, S. (2006) Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron*, 52, 751–766.

Grillner S, Markram H, De Schutter E, Silberberg G, LeBeau FE. (2005) Microcircuits in action--from CPGs to neocortex. *Trends Neurosci* (10):525-33.

Hammond, C., Bergman, H. & Brown, P. (2007) Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci*. 30, 357–364.

Hebb, D. O. *The organization of behavior*. New York; Wiley: 1949.

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 M4-type receptors. *Neuropharmacology*, 89,232-244.

Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ. (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β 1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci.*, 20(24):8987-95.

Hervé Abdi. (2007) O'Brien Test for Homogeneity of Variance. *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. Thousand Oaks (CA).

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, 11326– 11336.

Jankovic J, McDermott M, Carter J, Gauthier S, Goetz C, Golbe L, Huber S, Koller W, Olanow C, Shoulson I, et al. (1990). Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology*. 40(10):1529-34.

Kalia, L. V. & Lang, A. E. (2015) Parkinson's disease. *Lancet*, 386, 896-912.

Kanno, M., Matsumoto, M., Togashi, H., Yoshioka, M. & Mano, Y. (2004) Effects of acute repetitive transcranial magnetic stimulation on dopamine release in the rat dorsolateral striatum. *J. Neurol. Sci.*, 217, 73-81.

Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., and Emson, P. C. (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18, 527–535.

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.

Kenneth D. Harris. (2005) Neural signatures of cell assembly organization. *Nat Rev Neurosci.* 6 (5):399-407.

Ketzef, M., Spigolon, G., Johansson, Y., Bonito-Oliva, A., Fisone, G. & Silberberg, G. (2017) Dopamine depletion impairs bilateral sensory processing in the striatum in a pathway-dependent manner. *Neuron*, 94, 855-865.

Klaus A, Martins GJ, Paixao VB, Zhou P, Paninski L & Costa RM. (2017) The spatiotemporal organization of the striatum encodes action space. *Neuron* 95, 1171-1180.

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. *J. Neurosci.*, 36, 4976-4992.

Li, S., Arbuthnott, G. W., Jutras, M. J., Goldberg, J. A. & Jaeger, D. (2007) Resonant antidromic cortical circuit activation as a consequence of high-frequency subthalamic deepbrain stimulation. *J. Neurophysiol.*, 98, 3525–3537.

Li, Q., Ke, Y., Chan, D. C., Qian, Z. M., Yung, K. K., Ko, H., Arbuthnott, G. W. & Yung, W. H. (2012) Therapeutic deep brain stimulation in Parkinsonian rats directly influences motor cortex. *Neuron*, 76, 1030-1041.

López-Huerta, V. G., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Fiordeliso, T., Drucker-Colin, R. & Bargas, J. (2013) The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of parkinsonism. *J. Neurosci.*, 33, 4964-4975.

Mercuri, N. G. & Bernardi, G. (2005) The 'magic' of l-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharm. Sci.*, 26, 341-344.

Mink JW. (2003) The Basal Ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns. *Arch Neurol.* 60(10):1365-8.

Morelli, M., Fenu, S., Garau, L. & Di Chiara, G. (1989). Time and dose dependence of the “priming” of the expression of dopamine receptor supersensitivity. *Eur J Pharmacol.* 162(2), 329-35.

Neve KA1, Seamans JK, Trantham-Davidson H. (2004) Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res.* 2004 Aug;24(3):165-205.

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- 361.

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.*, 472676.

Picconi, B., Piccoli, G. & Calabresi, P. (2012) Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 970, 553-572.

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, 3499-3507.

Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J. E., Barroso-Flores, J., Galarraga, E. & Bargas, J. (2013a) Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of Parkinsonian tissue in vitro. *Biomed. Res. Int.*, 519184.

Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J., Hernández-Martínez, R., Rueda-Orozco, P., Galarraga, E., Drucker-Colín, R. & Bargas, J. (2013b) Global actions of nicotine on the striatal microcircuit. *Front. Syst. Neurosci.*, 7, 78.

Polymeropoulos MH1, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.*, 276(5321):2045-7.

Sanders, T. H. & Jaeger, D. (2016) Optogenetic stimulation of cortico-subthalamic projections is sufficient to ameliorate bradykinesia in 6-OHDA lesioned mice. *Neurobiol. Dis.*, 95, 225–237.

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.

Smith Y, Raju DV, Pare JF, Sidibe M. (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci*, 27(9):520-7.

Stoof JC, Keibian JW. (1984) Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sci*, 35(23):2281-96.

Straub, C., Saulnier, J. L., Bègue, A., Feng, D.D., Huang, K. W. & Sabatini, B. L. (2016) Principles of Synaptic Organization of GABAergic Interneurons in the Striatum. *Neuron*, 92, 84-92.

Svenningsson P1, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P. (2004) DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:269-96.

Tepper, J.M., Tecuapetla, F., Koós, T. & Ibáñez-Sandoval, O. (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front. Neuroanat*. 4,150. doi: 10.3389/fnana.2010.00150.

T H Brown, Y Zhao, and V Leung. (2009) *Hebbian Plasticity*. Elsevier, 1049-1056.

Thomas, B. & Beal, M. F. (2010) Mitochondrial therapies for Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 25, S155-160.

Thomas, D. Tovey, S.C., Collins, T.J., Bootman, M.D., Berridge, M.J. & Lipp, P. (2000) A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* 28, 213-223.

Ungerstedt, U., & Arbuthnott, G. W. (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.*, 24, 485-493.

Wei Gao, Hualong Wu, Muhammad Kamran Siddiqui, Abdul Qudair Baig. (2017) Study of biological networks using graph theory. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 1212–1219.

Znamenskiy, P. & Zador, A. M. (2013) Corticostriatal neurons in auditory cortex drive decisions during auditory discrimination. *Nature*, 497, 482-485.