



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**MODIFICACIONES EN LAS DINAMICAS DE DISPARO DE LA SUSTANCIA NIGRA PARS
RETICULATA: SUS IMPLICACIONES EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
VERONICA ALEJANDRA CACERES CHAVEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSE BARGAS DIAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

COMITÉ TUTOR
DRA. ELVIRA GALARRAGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DR. SALVADOR HERNANDEZ LICEAGA
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, 31 DE MARZO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Greg Dunn design

Innan himlen faller ner (vinter 2018)

-

“El cerebro humano es la más estupenda
masa de materia organizada del Universo
conocido, y su capacidad de recibir,
organizar y almacenar datos supera
ampliamente los requerimientos
ordinarios de la vida”

-Isaac Asimov

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Neurociencia Cognitiva del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz al cual agradezco enormemente por su tutoría, su calidez humana, su paciencia y sus consejos. Gracias también por compartir conocimientos y pasión por la ciencia.

Por su apoyo y asesoría agradezco con mucho cariño a mi comité tutorial conformado por la Dra. Elvira Galarraga y el Dr. Salvador Hernández López.

A la Dra Elvira que siempre me apoyó y me hizo sentir mucha confianza en mis capacidades de investigación, Gracias también por ser cálida y hacerme sentir en confianza y cuidada.

Al Dr. Salvador, siempre haciéndome preguntas que me obligaban a pensar y analizar más profundamente mi proyecto y sus alcances. Gracias también por interesarse y apoyarme en mis planes a futuro en la academia.

A mis revisores de tesis: Dr. Pavel Rueda, Dra. Magdalena Giordano, Dr. Ranier Gutierrez y Dra. Erin McKiernan por su tiempo y sus valiosas observaciones.

A lo largo del Doctorado conté con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 413305/262652), se contó con el apoyo del proyecto CONACyT Frontera 57 y CONACyT 251144, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México: (DGAPA-PAPIIT-UNAM): IN201517 y IN201417, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT-UNAM) IA209817, al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

A mis coautores: Rich, Chucho, Pepe y Marco. Me dio mucho gusto trabajar con ustedes y lograr tan bonito trabajo. Sin su esfuerzo y dedicación no hubiera sido posible.

En especial al Dr. Ricardo Hernández por ser mi mentor en el laboratorio y una persona irremplazable en este periodo de mi vida.

Nuevamente a la Dra. Erin McKiernan, por su gran apoyo al final de mi camino en el doctorado. Gracias por la amistad y las oportunidades que me abriste.

También de nuevo al Dr. Marco Arieli Herrera Valdéz por las puertas que me has abierto, el apoyo, la amistad y el conocimiento compartido.

A la Dra. Yazmín Ramiro Cortés por su asesoría y apoyo para la realización de mi proyecto y su participación en mi formación académica.

A los técnicos del laboratorio que me ayudaron con su trabajo, y guía: Antonio Laville Conde, Dagoberto Tapia Ramírez, Gabriela Xóchitl Ayala Méndez y Ariadna Aparicio Juárez.

Al bioterio y a su personal, en especial a la Dra. Claudia Rivera.

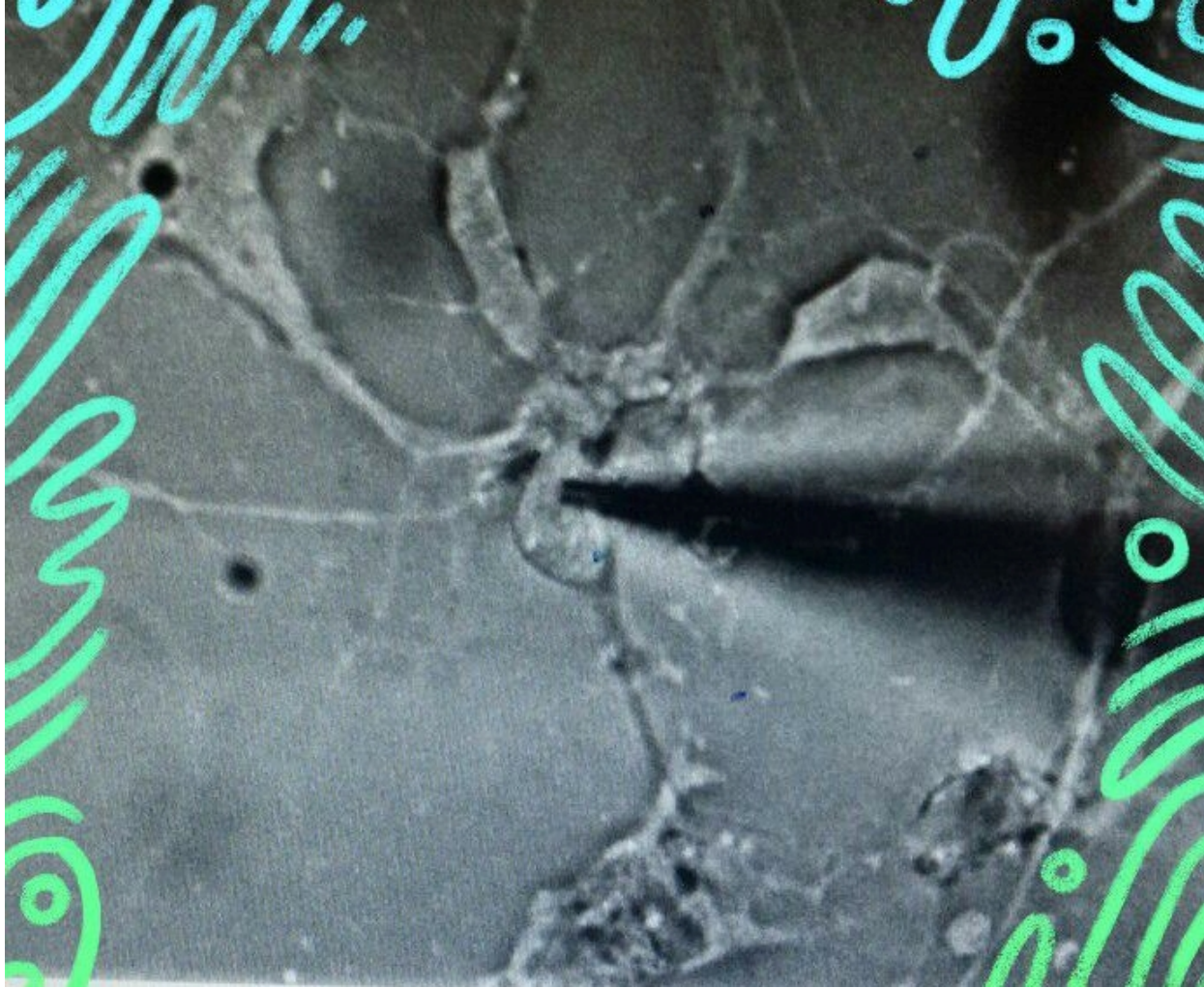
A la unidad de computo por los servicios prestados y pronta resolución en los problemas; Francisco Pérez Eugenio y Ana María Escalante

A Sara Noriega y Miriam Morales por la paciencia, el apoyo recibido en este tiempo.

A mis compañeros del laboratorio y del instituto por las alegrías y los buenos ratos. Sobre todo a Mike y Aldo por su apoyo en la realización de algunos de mis experimentos.

Y a todos aquellos compañeros y amigos que no mencioné pero que están en mi corazón.

¡Gracias a todos ustedes!



Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Regulación dopaminérgica de los ganglios basales	6
La Sustancia Nigra pars reticulata	8
Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson; la pérdida de balance entre dos vías	11
Parkinsonismo inducido por fármacos (DIP)	15
Objetivos.....	17
Objetivos particulares	17
Hipótesis.....	18
Material y Métodos	19
Modelo 6-OHDA de parkinsonismo en roedor	19
Obtención de las rebanadas de cerebro	22
Registros electrofisiológicos	23
Farmacología.....	26
Diseño experimental y análisis estadístico.	26
Análisis de datos.....	28
Resultados.....	32
Actividad espontanea de las neuronas de la SNr en condiciones control, durante el bloqueo agudo de receptores dopaminérgicos y tras la privación de dopamina por lesión con 6-OHDA.....	32
Modificaciones en el patrón de disparo tras el bloqueo agudo de receptores dopaminérgicos o tras la privación de dopamina	40

Análisis de las ráfagas de potenciales de acción.....	44
Graficas de visibilidad paramétrica (PNVGs).....	48
Mecanismos iónicos que contribuyen al disparo en ráfagas: Canales de calcio tipo T y canales catiónicos TRP	52
Patrones temporales de disparo de tipo parkinsoniano inducidos por haloperidol.....	56
Discusión	58
Modificaciones en el patrón de disparo de las neuronas de la SNr	60
Importancia del bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos en la SNr: el parkinsonismo inducido por drogas (DIP).....	62
Mecanismos iónicos que alteran el patrón temporal de disparo de las neuronas de la SNr durante el bloqueo de los receptores dopaminérgicos o después de la pérdida de dopamina	63
Conclusiones	67
Referencias	68
Anexos.....	81

Resumen

La privación de dopamina (DA) en la enfermedad de Parkinson (EP) modifica el patrón de disparo de las neuronas de la sustancia nigra pars reticulata (SNr). El disparo que antes se presentaba quasi-regular ahora se presenta irregular y con ráfagas. Estos patrones de disparo patológicos subyacen a los síntomas motores en los pacientes con EP y en los modelos animales con parkinsonismo (PS). Por otro lado, el parkinsonismo inducido por fármacos (DIP por sus siglas en inglés) representa entre el 20% y el 40% de casos clínicos de PS, lo que representa un problema para el diagnóstico diferencial, el cual no ha sido apropiadamente estudiado usando herramientas fisiológicas. Este padecimiento puede concurrir con discinesia tardía y sus síntomas son frecuentemente confundidos con EP. En el presente trabajo utilizamos una preparación in vitro de rebanadas que contienen la SNr para observar patrones de disparo patológicos inducidos por fármacos utilizando antagonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos (SCH23390 + sulpiride) para comparar estos patrones de disparo con los observados tras la privación crónica de DA en un modelo de animal de la EP (modelo 6-OHDA). La hipótesis principal es que el disparo de las neuronas de la SNr debe ser similar bajo ambas condiciones, lo que conforma un prerrequisito para proponer esta preparación como modelo para probar otras drogas que pueden inducir DIP. El disparo de la SNr fue analizado utilizando tres métodos complementarios, los cuales mostraron similitudes entre la privación de DA y el bloqueo agudo de receptores a DA. Se observó un incremento en la irregularidad del disparo así como la presencia de ráfagas y silencios. Estas modificaciones se acompañaron de una hiperpolarización del potencial de membrana y la disminución de la frecuencia de disparo para ambos casos. Además, el bloqueo de los canales de calcio tipo T CAV3 y el de los canales catiónicos no selectivos produjo en ambas condiciones la hiperpolarización del potencial de membrana y abolió el disparo patológico. Finalmente, se utilizó este modelo in vitro para poner a prueba las modificaciones en el disparo producidas por el fármaco haloperidol, el cual se sabe que produce DIP, observándose que también produce disparo patológico en la SNr. Dado que las modificaciones en el disparo inducidas por el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos fueron similares a las producidas por la privación de DA en el modelo de la EP, las neuronas de salida de los ganglios basales deben de estar fuertemente involucradas en la generación del DIP, por tanto, este estudio propone un método para probar otras drogas que inducen DIP utilizando este modelo in vitro.

Abstract

Dopamine (DA) depletion modifies the firing pattern of neurons in the *substantia nigra pars reticulata* (SNr) shifting their mostly tonic firing towards irregularity and bursting, traits of pathological firing underlying rigidity and postural instability in Parkinson's disease (PD) patients and animal models of Parkinsonism (PS). Drug induced Parkinsonism (DIP) represents about 20-40% of clinical cases of PS becoming a problem for differential diagnosis, still not well studied with physiological tools. It may co-occur with tardive dyskinesia. Here we use *in vitro* slice preparations including the SNr to observe drug induced pathological firing by using drugs that most likely produce it: DA receptors antagonists (SCH23390 plus sulpiride), to compare with firing patterns found in DA-depleted tissue. The hypothesis being that SNr firing would be similar under both conditions, a prerequisite to propose a similar preparation to test other DIP producing drugs. Firing was analyzed with three complementary metrics, showing similarities between DA-depletion and acute DA-receptors blockade. Moreover, blockade of either nonselective cationic channels (NSCC) or Ca_v3 T-type calcium channels hyperpolarized the membrane, abolished bursting and irregular firing, silencing SNr neurons in both conditions. Therefore, currents generating firing in control conditions are in part responsible for pathological firing. Haloperidol, a DIP producing drug, reproduced DA-receptors antagonists firing modifications. Since acute DA-receptor blockade induces SNr neurons firing similar to that found in the 6-OHDA model of PS, output basal ganglia neurons may play a role in generating DIP. Therefore, this study opens the way to test other DIP producing drugs.

Introducción

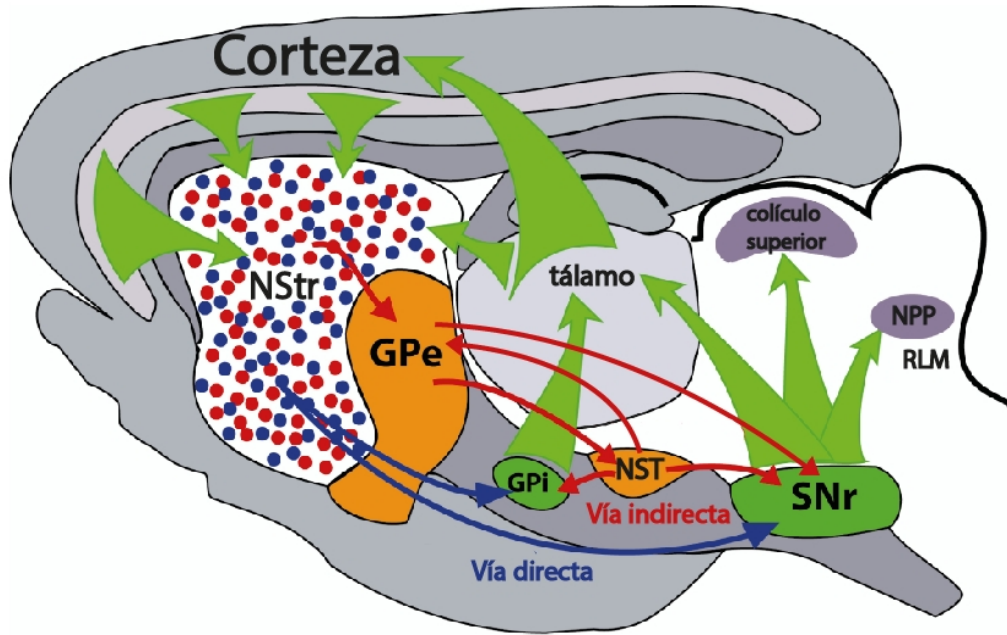
Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales relacionados con los procesos motores voluntarios e involuntarios (posturales), la selección de acciones, algunos procesos cognitivos y en la memoria de procedimientos (Albin et al. 1989; Grillner et al. 2005; Yin y Knowlton 2006); se pueden ver afectados por una variedad de enfermedades neurodegenerativas. Los GB incluyen al neostriado (NStr) (caudado y putamen en primates, felinos y otras especies), el segmento externo del globo pálido (GPe), el segmento interno del globo pálido (GPi), la *sustancia nigra pars reticulata* (SNr), la *sustancia nigra pars compacta* (SNc) y el núcleo subtalámico (NST). El flujo de información a través de los GB inicia con las entradas sinápticas hacia el NStr, las cuales son de naturaleza excitadora y provienen principalmente de vastas regiones de la corteza y el tálamo (Kemp y Powell 1971) (Fig. 1). El NStr es considerado el principal núcleo de entrada de los GB y se postula que su codificación es poblacional, involucrando secuencias temporales de actividad de ensambles neuronales que han sido seleccionados durante el aprendizaje de procedimientos por el proceso de plasticidad sináptica (Carrillo-Reid et al. 2008; Angulo-Garcia et al. 2016; Bakhurin et al. 2016; Barbera et al. 2016; Klaus et al. 2017; Pérez-Ortega y Bargas 2018). Estas secuencias temporales de actividad de los ensambles reflejan, a su vez, los patrones de disparo de las neuronas individuales del NStr, los cuales varían en respuesta a señales relacionadas con la ejecución de tareas motoras, codificando información de secuencias de acciones, inicio y final de la tarea, expectativa de reforzador y características kinemáticas del movimiento entre otras (Barbera et al. 2016; Cui et al. 2014; Jin y Costa 2010; Jin y Costa 2015; Kim et al. 2014; Klaus et al. 2017; Rueda-Orozco y Robbe 2015; Schmidh et al. 2013)

Esta actividad poblacional converge y es codificada por las neuronas del GPi y la SNr, las cuales conforman los principales núcleos de salida de los GB. El código de actividad de los ensambles neuronales estriatales converge en neuronas únicas que convierten el código poblacional a un código de frecuencia, cuyas variaciones, son el resultado del balance entre la excitación e inhibición que reciben de sus entradas sinápticas aferentes (Graybiel 2005;

Grillner et al. 2008; Kravitz et al. 2010; Aceves et al. 2011a; Freeze et al. 2013). El disparo de las neuronas de la SNr es continuo y sus variaciones controlan la ejecución de los programas motores (Hikosaka 2007; Jin y Costa 2010; Schmidt et al. 2013; Barter et al. 2014) proyectando eferentes de regreso hacia el tálamo y de ahí a la corteza, así como a los núcleos descendentes del tallo cerebral (Fig. 1).

El modelo funcional de los GB (Albin et al. 1989; Alexander y Crutcher 1990) propone que la comunicación entre los principales núcleos de entrada y salida ocurre principalmente por dos vías: 1) la vía “directa”, en la cual las neuronas espinosas medianas (NEMs) inhibitorias inervan de manera monosináptica a los núcleos de salida, y 2) la vía “indirecta” en la que las NEMs hacen un relevo en las neuronas inhibitorias del GPe y en las excitatorias del NST, las cuales a su vez inervan las neuronas de salida de la SNr y el GPi. De esta manera las mismas neuronas de los núcleos pueden recibir al mismo tiempo señales inhibitorias de la vía directa (NStr), así como excitatorias (NST) e inhibitorias (GPe) de la vía indirecta. Según este modelo, la vía directa promueve el movimiento a través de la desinhibición de los blancos de los núcleos de salida (circuitos tálamo-corticales y tallo cerebral), y la vía indirecta evita el movimiento al incrementar la actividad inhibitoria de las neuronas de los núcleos de salida sobre estos mismos blancos. Actualmente la interpretación de este modelo ha sufrido modificaciones pues se ha observado que para que se produzca la selección de acciones y el movimiento se requiere la activación de ambas vías de manera concurrente o balanceada (Cui et al. 2014; Tecuapetla et al. 2014; Jin y Costa 2015; Klaus et al. 2017). La actividad de la vía directa selecciona el programa motor deseado mientras que la vía indirecta inhibe programas motores que compiten con éste (Mink 2003).

A



B

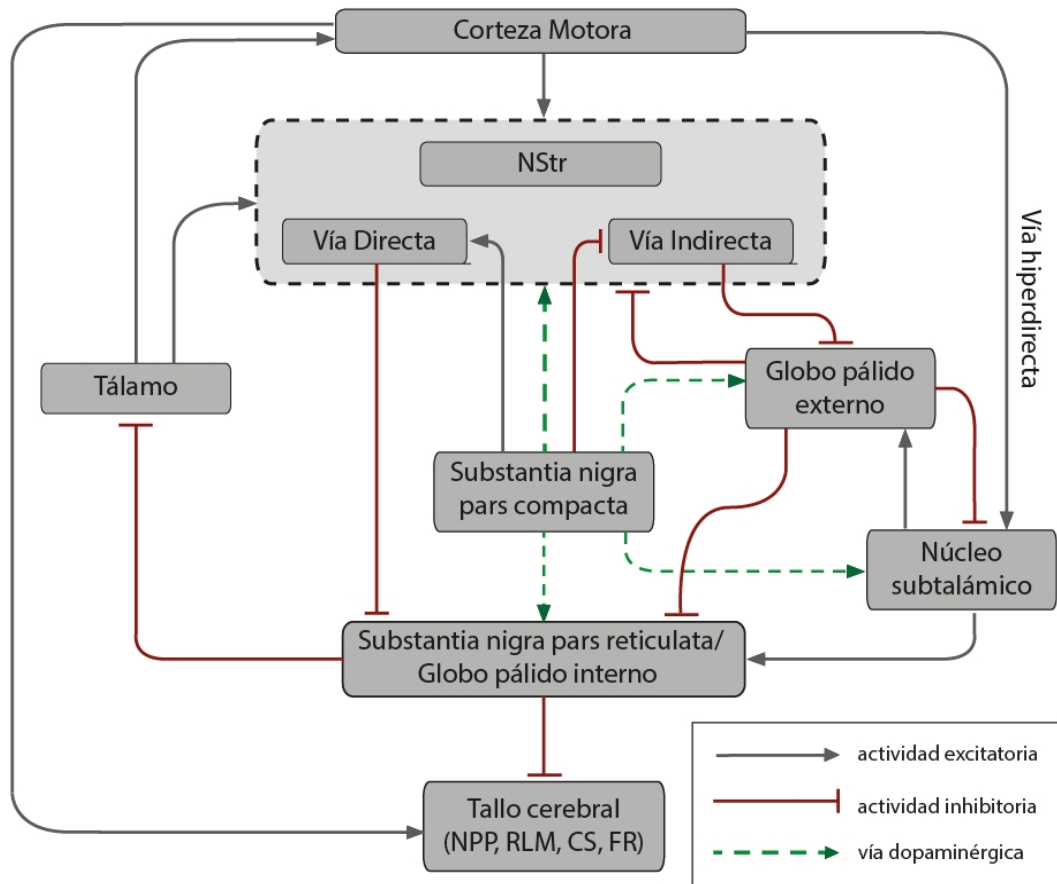


Figura 1. Esquema de los GB. Localización anatómica de los núcleos de los GB y la conectividad entre ellos. En azul se representa la vía directa y en rojo la indirecta. Modelo funcional de los GB. Abreviaturas: NStr, neostriado; GPe, globo pálido externo, GPi, globo pálido interno; NST, núcleo subtalámico; SNr, substantia nigra pars reticulata; NPP, núcleo pedunculopontino; RLM, región locomotora mesencefálica; CS, colículo superior; FR, formación reticular.

Regulación dopaminérgica de los ganglios basales

La actividad de las neuronas de los GB se encuentra altamente regulada por la DA, la cual modula de manera contraria la actividad de ambas vías dependiendo de la expresión de las diferentes clases de receptores dopaminérgicos, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y se dividen en dos grupos: la clase D1 (tipos D1 y D5) y la clase D2 (tipos D2, D3 y D4) (Beaulieu y Gainetdinov 2011). Los receptores de la familia D1 activan a la adenilato ciclasa a través de proteínas $G_{as/olf}$ estimulando la formación de AMP cíclico (AMPC) el cual activa la PKA y la PP1, que entre otras cosas regulan los canales de calcio de la clase Ca_v1 incrementando transitoriamente la corriente de calcio y por tanto la frecuencia de disparo (Pérez-Garci et al. 2003). Los receptores de la clase D2 tienen el efecto opuesto, inhiben a la adenilato ciclasa a través de proteínas G_{oi} reduciendo así la formación de AMPC, y además activan a la PLC (fosfolipasa C) lo que resulta en una disminución de la actividad celular (Beaulieu y Gainetdinov 2011, Hernández-López et al. 2000). Todo lo anterior entre otras vías de señalización involucradas.

Generalmente se asume que los efectos de la DA sobre los circuitos de los GB son principalmente mediados por su regulación al nivel del NStr debido a que es el núcleo que presenta la mayor inervación dopaminérgica (Albin et al. 1989; Alexander y Crutcher 1990; Murer et al. 2002). En el NStr, los receptores D1 se expresan en las NEMs que dan origen a la vía directa y los D2 en las que dan origen a la vía indirecta. Las NEMs de la vía directa e indirecta exhiben respuestas opuestas a la DA. La activación de los receptores D1 en las neuronas de la vía directa facilitan la transmisión de la actividad cortico-estriatal, y la activación de los receptores D2 de la vía indirecta la reducen (Gerfen et al. 1990; Rommelfanger y Wichmann 2010; Gerfen y Surmeier 2011). Sin embargo, es importante

señalar que la actividad de los núcleos de relevo (GPe y NST) y de salida (SNr y GPi) también se encuentra regulada de manera directa por aferencias dopaminérgicas provenientes de la SNc (Cheramy et al. 1981a; Rommelfanger y Wichmann 2010; Hadipour-Niktarash et al. 2012).

Se ha observado la presencia de receptores D1 y D2 en las neuronas de los núcleos intermedios y de salida de los GB. La activación de los receptores D1 en las neuronas del NST incrementan su disparo en ráfagas (Baufreton et al. 2003). En la SNr, los receptores D1 presinápticos reducen el disparo neuronal debido al incremento en la liberación de GABA de las terminales provenientes del estriado (vía estriato-nigral o directa) (Timmerman y Abercrombie 1996; Rosales et al. 1997; Matuszewich y Yamamoto 1999; Trevitt et al. 2002; Kliem et al. 2007; Acosta-García et al. 2009) y modifican sus patrones de disparo, incrementando la presencia de ráfagas (Kliem et al. 2010). Al mismo tiempo, la activación receptores D1 también puede producir excitación de las neuronas de la SNr de manera indirecta debido a un incremento en la liberación de glutamato de las terminales corticales en el NST (Rosales et al. 1997; Ibañez-Sandoval et al. 2006).

Por otro lado, la activación de los receptores D2 presinápticos en el NST promueven el disparo y reducen las ráfagas de rebote (Baufreton y Bevan 2008). En el GPe reducen la liberación de GABA de las terminales estriatales (vía estriato-palidal o indirecta) (Parent y Smith 1987; Gerfen et al. 1990; Cooper y Stanford 2001) y la liberación de glutamato de las terminales del NST (Ibañez-Sandoval et al. 2006; Baufreton y Bevan 2008). En la SNr, la activación de los receptores D2 reduce la liberación de GABA de las terminales provenientes del GPe (vía palido-nigral rama de la vía indirecta) (Acosta-García et al. 2009; Aceves et al. 2011a) o, de manera contraria, produce decremento en la frecuencia de disparo de las neuronas de la SNr a través de la inhibición de las terminales glutamatérgicas del NST (vía subtálamo-nigral rama de la vía indirecta) (Hadipour-Niktarash et al. 2012).

Dados los efectos opuestos de la DA en ambas vías de los GB así como sus efectos a lo largo de sus diferentes núcleos, se ha propuesto que además de las acciones sobre el NStr, la falta de dopamina en núcleos extraestriatales contribuye de manera significativa a las anomalías que se observan en estados Parkinsonianos (Obeso et al. 2008;

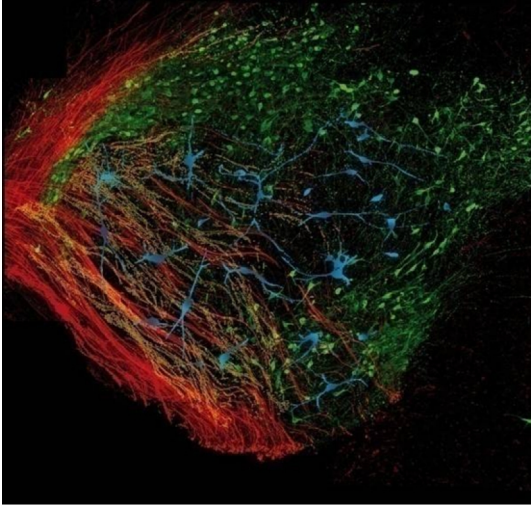
Rommelfanger y Wichmann 2010; Fan et al. 2012; Wichmann y Smith 2013; Lourens et al. 2015). Son precisamente estas anomalías las que no responden bien a la L-DOPA (Aristieta et al. 2016).

La Sustancia Nigra pars reticulata

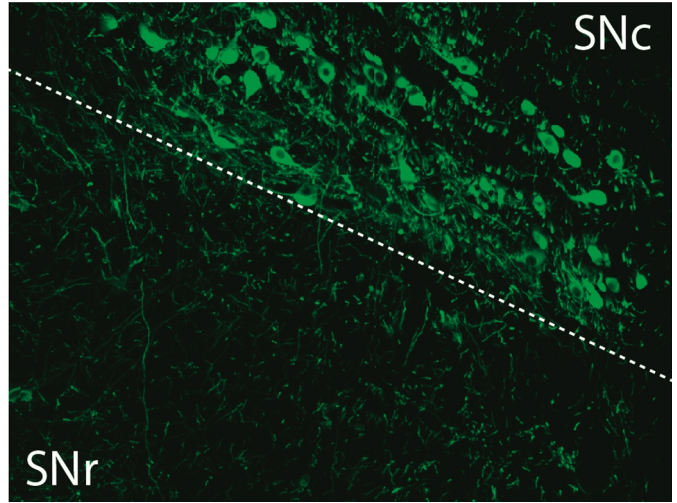
El interés de este proyecto está en las neuronas GABAérgicas de los núcleos de salida, en particular las de la SNr. Después del NStr, la SNr es el segundo núcleo en recibir la mayor inervación dopaminérgica. En condiciones normales, las neuronas de la SNr presentan un disparo tónico regular o irregular (Richards et al. 1997; Atherton y Bevan 2005; Lee y Tepper 2007a) y en raras ocasiones un disparo en forma de ráfagas espontáneas (Ibáñez-Sandoval et al. 2007; Wang et al. 2010). La actividad tónica de las neuronas de este núcleo mantiene una inhibición tónica sobre sus núcleos blanco, inhibiendo los músculos que generan movimiento y mantienen el tono postural. Las variaciones en su disparo son de importancia ya que estas resultan en la modulación del movimiento. Sus aferencias siguen una organización topográfica que se conserva desde las aferencias provenientes de la corteza motora (Deniau et al. 1996) y se preserva en sus proyecciones SNr-tálamo-corticales encargadas de producir movimientos dirigidos a metas (Tsumori et al. 2002; Takakusaki et al. 2003; Antal et al. 2014).

En la SNr la DA es liberada por dendritas locales de neuronas del *tier* ventral de la SNc (Nieoullon et al. 1977; Cheramy et al. 1981b; Zhou et al. 2009; Hadipour-Niktarash et al. 2012) (Fig. 2 B) y como mencionamos previamente, es capaz de modular su disparo de manera directa e indirecta, produciendo cambios en la frecuencia y patrón de disparo de sus neuronas (Ruffieux y Schultz 1980; Waszczak y Walters 1983; Martin y Waszczak 1996; Acosta-García et al. 2009; Zhou et al. 2009; Aceves et al. 2011a).

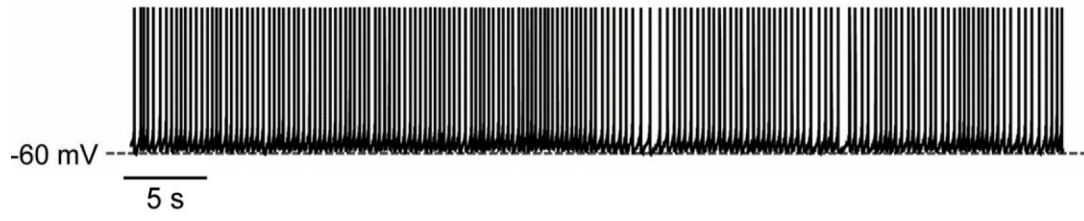
A



B



C



otras aun no bien conocidas (FR, PPN) (Fig. 2 A). El balance entre todas estas aferencias permite la selección y ejecución de programas motores mediante la regulación de la tasa y patrón de disparo de las neuronas de proyección de la SNr (Graybiel 2005; Hikosaka 2007; Grillner et al. 2008; Kravitz et al. 2010; Aceves et al. 2011b; Barter et al. 2014). La integración de sus entradas sinápticas, a su vez, modula la actividad tálamo-cortical y de otras estructuras blanco de la SNr situadas en el tallo cerebral como son el colículo superior, el núcleo pedúnculo pontino (NPP), la región locomotora media (RLM) y la formación reticular (FR) (Redgrave et al. 1992; Bolam et al. 2000; Takakusaki et al. 2003; Edgerton y Jaeger 2014). Estos centros echan a andar los centros generadores de pautas (CPGs), regulando el tono muscular, las posturas, así como las respuestas motoras estereotipadas o rítmicas tales como la marcha y la locomoción (Takakusaki et al. 2003; Grillner et al. 2008; Barter et al. 2014) (Fig. 1 B).

Cuando las neuronas de la SNr son aisladas de sus entradas sinápticas, su disparo tónico se conserva y se vuelve más regular por lo que se dice que presentan actividad marcapaso o disparo autónomo (Richards et al. 1997; Atherton y Bevan 2005; Lee y Tepper 2007a). Se sabe que entre los canales requeridos para el mantenimiento de su disparo marcapaso se encuentran los canales catiónicos TRP (transient receptor potential), los de Na⁺, los canales catiónicos no selectivos (NSCC) y los de ATP sensibles a K⁺ (KATP) (Atherton y Bevan 2005; Lee y Tepper 2007b; Lee et al. 2011, 2013, Lutas et al. 2014, 2016), pero aun no se ha podido describir por completo todos los canales que participan en el disparo autónomo de la SNr, el cual además es altamente dependiente del metabolismo de la célula (Lutas et al. 2016).

La presencia de estas corrientes catiónicas le confiere una zona con pendiente negativa (ZCPN) a la relación corriente-voltaje (curva IV con biestabilidad) de estas neuronas (Ibáñez-Sandoval et al. 2007; Aceves et al. 2011a; Zhou y Lee 2011). Cuando una neurona presenta la ZCPN en su curva IV, se sabe que las entradas sinápticas pueden generar en ella potenciales de membrana en meseta y disparo en ráfagas (Izhikevich et al. 2003; Ibáñez-Sandoval et al. 2007), es decir, que la actividad de la neurona presenta biestabilidad. La activación de los receptores NMDA en las neuronas de la SNr inducen la presencia de ráfagas (Ibáñez-Sandoval et al. 2007) por la amplificación de las propiedades de biestabilidad mediante una

interacción de las entradas sinápticas y las corrientes intrínsecas. Otras condiciones en las que se ha observado el disparo en ráfagas en las neuronas de la SNr son tras la pérdida de modulación dopaminérgica durante la EP (Hutchison et al. 2004; Alavi et al. 2013; Quiroga-Varela et al. 2013; Mastro et al. 2017) y tras el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 (Aceves et al. 2011a; Maurice et al. 2015). Recientemente se ha mostrado que algunas de las conductancias intrínsecas que contribuyen al disparo en ráfagas en las neuronas de la SNr son conductancias catiónicas a través de canales de Ca^{2+} tipo T (Ibáñez-Sandoval et al. 2007) y canales NSCC como los canales tipo TRP (Lee et al. 2013), pero estas observaciones únicamente se han realizado con las ráfagas inducidas por NMDA y no se han estudiado en las condiciones de privación dopaminérgica.

Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson; la pérdida de balance entre dos vías

Durante la enfermedad de Parkinson (EP), la degeneración de las neuronas dopaminérgicas resulta en una pérdida en la liberación de dopamina en los núcleos de los GB (Javoy-Agid et al. 1981; Boyson et al. 1986). De manera general se ha observado un marcado decremento en la actividad de la vía directa, y de manera contraria, un incremento de la actividad de la vía indirecta (Graybiel 1996; Murer et al. 1997; Day et al. 2006; Weinberger y Dostrovsky 2011; Parker et al. 2016) así como modificaciones sinápticas en ambas vías de los GB (Day et al. 2006; Belujon et al. 2010; Bellucci et al. 2016; Parker et al. 2016). Lo que conlleva a varias modificaciones fisiológicas en los circuitos de los GB, lo que resulta en un desbalance entre la vía directa e indirecta.

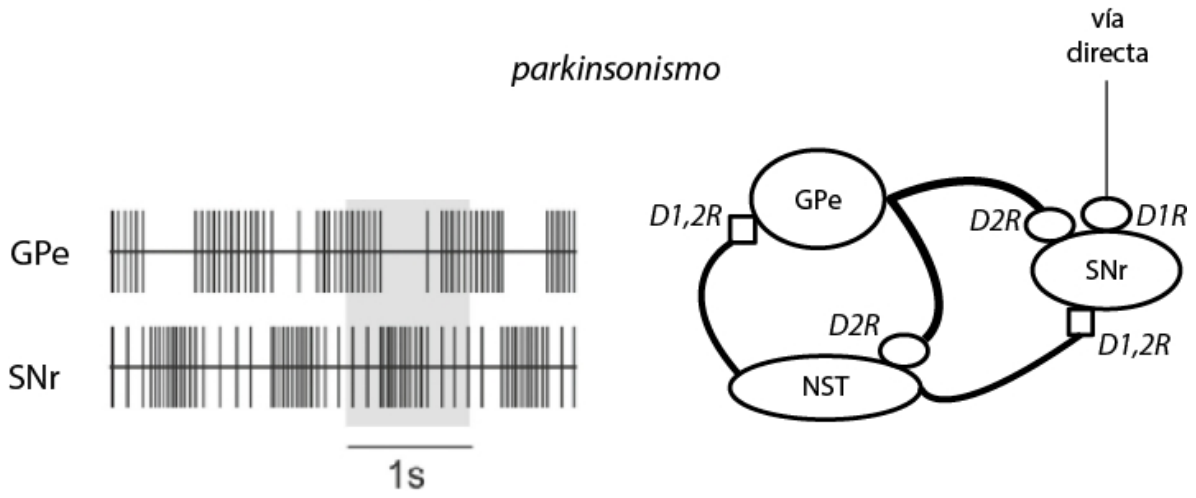
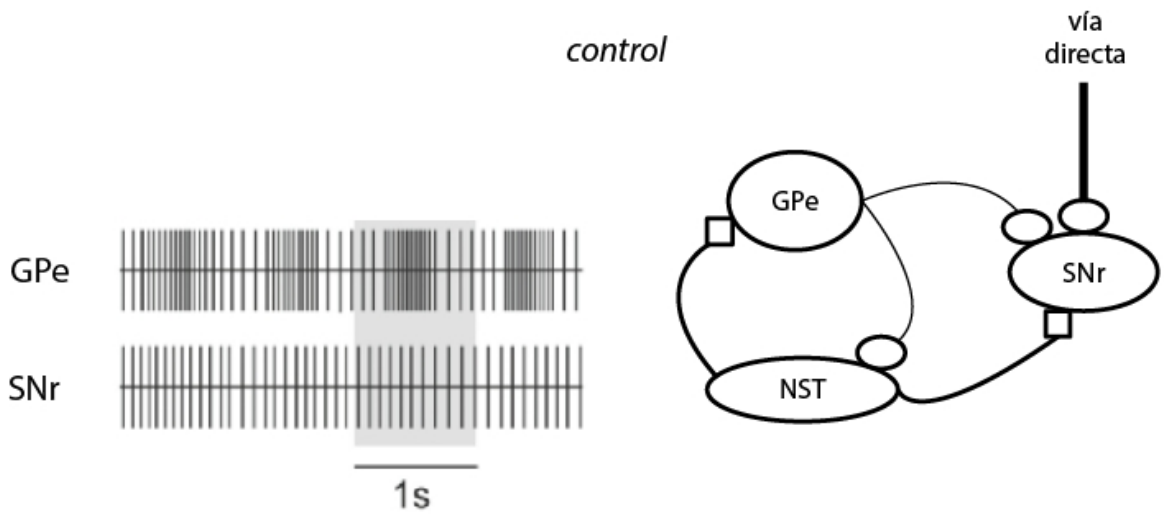
Las descripciones previas han enfatizado los cambios en las frecuencias de disparo de las neuronas de los diferentes núcleos de los GB, especialmente en las estructuras que pertenecen a la vía indirecta. Se han observado cambios en la frecuencia de disparo en las neuronas del GPe, NST, el GPi y la SNr (Murer et al. 1997; Tseng et al. 2001; Wang et al. 2010; Tai et al. 2011; Miguez et al. 2012). Además de estos cambios, algunos de los estudios iniciales también describieron anomalías en los patrones de disparo en varias de las

estructuras de los GB, las cuales consisten en el incremento de la actividad de tipo irregular, oscilatoria, sincrónica o en ráfagas a lo largo de todos los núcleos de los GB (e.g.: Tseng et al. 2001; Hutchison et al. 2004; Chen et al. 2010; Pogosyan et al. 2010; Brazhnik et al. 2012). Estas anomalías en el patrón de disparo son muy importantes en el estudio de la EP ya que conforman el único signo patognomónico que es común a los pacientes humanos y los modelos de la enfermedad (Avila et al. 2010; Brazhnik et al. 2012; Wilson 2013), sobre todo en los núcleos de salida como la SNr (e.g.: Weick y Walters 1987; Murer et al. 1997; Lee et al. 2001; Maurice et al. 2003; Wang et al. 2010).

Las neuronas de la SNr así como las del GPi reciben al mismo tiempo aferencias de la vía directa y la indirecta, la modulación de su disparo es resultado de la convergencia de sus aferentes (Aceves et al. 2011b; Freeze et al. 2013; Obeso et al. 2014). Ambas vías presentan diferencias en su actividad sináptica y los mecanismos de inducción de plasticidad (Aceves et al. 2011a; Rueda-Orozco et al., 2009; Rommelfanger y Wichmann 2010). El balance entre la vía directa y la indirecta impacta en el patrón de disparo de las neuronas de los núcleos de salida, el cual normalmente es regular, tónico y decorrelacionado tanto entre las neuronas de un mismo núcleo como entre los diferentes núcleos de los GB (Fig. 2 C, 3 arriba), pero durante la EP este disparo se vuelve sincrónico y con mayor presencia de ráfagas (Lemaire et al. 2012; Miguelez et al. 2012; Alavi et al. 2013; Lobb y Jaeger 2015) (Fig. 3 abajo), resultando en varios signos motores como rigidez y temblor (Mallet et al. 2008b; Obeso et al. 2008). Además, después de la pérdida crónica de dopamina se presentan modificaciones plásticas en las sinapsis extraestriatales y junto con los que suceden en el NStr, estas modificaciones deben estar incrementando la actividad oscilatoria y la sincronía (Smith y Villalba 2008a; Rommelfanger y Wichmann 2010). Especialmente se observa que la sincronía y la conectividad recíproca entre el NST y el GPe se encuentran incrementadas (Bevan et al. 2002; Mallet et al. 2008a; Fan et al. 2012), y al mismo tiempo la comunicación de la vía hiperdirecta así como la de el GPe y el NST con los núcleos de salida se encuentran potenciadas (Smith y Villalba 2008b; Acosta-García et al. 2009), lo que en suma resulta en un oscilador acoplado sostenido entre el GPe y el NST el cual censa más fuertemente las oscilaciones corticales y las disemina hacia los núcleos de salida.

En nuestro y otros laboratorios se ha demostrado que uno de los factores que favorecen la aparición del disparo en ráfagas en la neuronas de la SNr es el desbalance entre las vías directa e indirecta de los GB (Ibáñez-Sandoval et al. 2007; Walters et al. 2007; Aceves et al. 2011a; Lee et al. 2013). De esta manera, cualquier maniobra que disminuya la actividad de la vía directa o aumente la de la vía indirecta (a través del NST) genera un patrón de actividad de tipo Parkinsoniano en la SNr. Basta bloquear agudamente los receptores dopaminérgicos con sus antagonistas selectivos para generar actividad oscilatoria en ráfagas recurrentes en la SNr (Aceves et al. 2011a) (Fig. 3) presumiblemente a través de un efecto combinado entre la modulación de la eficiencia sináptica y cambios en la excitabilidad de la membrana (Ibáñez-Sandoval et al. 2007; Aceves et al. 2011a). Estas evidencias son importantes, no solo porque nos ayudan a entender el mecanismo de aparición del disparo patológico, sino que además, indican que las neuronas de la SNr pueden estar jugando un rol en los efectos colaterales del tratamiento con neurolépticos tales como el haloperidol, el cual es un bloqueador de receptores dopaminérgicos (Meltzer 2013).

La actividad oscilatoria o en ráfagas en las neuronas de la SNr cobra especial importancia ya que parece incrementar con la cronicidad de la EP (Sanderson et al. 1986; MacLeod et al. 1990; Rohlfis et al. 1997b; Walters et al. 2007) y se le atribuyen muchos de los signos motores (Hutchison et al. 2004; Alavi et al. 2013; Quiroga-Varela et al. 2013) como son la aparición del temblor en reposo, la bradicinesia (enlentecimiento del movimiento) y la rigidez o catatonía (Bergman et al. 1994; Takakusaki et al. 2003; Hutchison et al. 2004; Quiroga-Varela et al. 2013; Thompson et al. 2014; Maurice et al. 2015), debido a que la SNr proyecta a los centros que regulan estos signos: PPN (tono muscular), MLR (locomoción y balance), FR (músculos antigravitatorios), entre otros. Además, el tratamiento con L-DOPA no reduce tan bien la actividad oscilatoria y en ráfagas en la SNr lo que marca los límites a la acción benéfica de la L-DOPA (Alavi et al. 2013; Aristieta et al., 2016), señalando a la actividad en ráfagas como un signo blanco terapéutico en el tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, los mecanismos iónicos que sustentan estos patrones de disparo se desconocen



.Recientemente se ha comenzado a estudiar la composición de canales iónicos que originan estas ráfagas oscilatorias patognomónicas de la enfermedad aunque generadas con el uso de altas concentraciones de NMDA (Lee et al. 2013). Algunas evidencias previas argumentan la participación de los canales TRP, Ca^{2+} , Na^+ , catiónicos no selectivos y K_{ATP} (Atherton y Bevan 2005; Ibáñez-Sandoval et al. 2007; Lee y Tepper 2007b; Lee et al. 2011, 2013, Lutas et al. 2014, 2016).

Parkinsonismo inducido por fármacos (DIP)

Así como el haloperidol, varios fármacos considerados útiles en el tratamiento de varias patologías producen de manera colateral el llamado Parkinsonismo inducido por drogas (DIP, por sus siglas en inglés) con signos similares a los de la EP. Entre algunos ejemplos relevantes de estos fármacos se encuentran: neurolépticos (antipsicóticos), antagonistas de canales de calcio, antidepresivos, anticolinérgicos, anticonvulsivos y procinéticos intestinales (Bondon-Guitton et al. 2011; López-Sendón et al. 2013). Estas drogas pueden general el síndrome parkinsoniano por sí mismas, empeorar la EP o acelerar su aparición (Lee et al. 2017), conformando así la segunda causa de Parkinsonismo con el 20-40% de los casos, llegando a niveles epidémicos, frecuentemente subestimados (López-Sendón et al. 2013; Mukilan et al. 2018). Este problema es una de las principales razones por las que es necesario un diagnóstico diferencial cauteloso y es una de las causas por las que la psiquiatría ha sido acusada de abuso por organizaciones de derechos humanos (ver: <http://www.cchr.mx/>).

En el DIP los síntomas motores de la EP como son temblor, bradicinesia y rigidez pueden aparecer unos pocos días después de la administración del fármaco o de un cambio de dosis del mismo, en otros casos pueden pasar varios meses antes de que se presenten los síntomas. El temblor suele presentarse bilateral y simétrico, además puede concurrir con discinesia tardía (DT), el cual es un trastorno en el que se producen movimientos involuntarios que frecuentemente se presentan en la parte inferior de la cara (López-Sendón et al. 2013). En los casos reversibles de DIP, los síntomas desaparecen después de la retirada de los

fármacos ya que estos pacientes, a diferencia de los que tienen EP, cuentan con integridad de la vía dopaminérgica de los ganglios basales (Meltzer 2013).

La hipótesis principal para explicar el DIP es que este se produce por efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos, pero existen pocos ensayos fisiológicos que permitan la comparación entre fármacos que producen DIP. Estudiar el efecto de neurolépticos como el haloperidol sería un primer paso para corroborar esta hipótesis dado que actúa como antagonista dopaminérgico (Meltzer 2013; Maurice et al. 2015). Dado que los síntomas motores que se producen durante el DIP son similares a los de la EP, entonces, la actividad neuronal de las neuronas de la SNr y otros núcleos de los GB también deberían presentar patrones temporales de disparo patológico. Al respecto, un par de estudios in vivo han mostrado que tras la inyección sistémica de neurolépticos en roedores se produce un estado cataléptico, similar al que se observa en animales parkinsonianos, y que este se asocia con el incremento de disparo en ráfagas en las SNr (Degos 2005; Maurice et al. 2015), sin embargo, a la fecha no conocemos estudios fisiológicos in vitro que comparen claramente los efectos de estos fármacos con los que se observan en modelos animales de la EP.

En el presente trabajo proponemos un modelo de estudio in vitro en el cual, utilizando diferentes métodos de análisis, podemos comparar el patrón de disparo de las neuronas de la SNr en condiciones ampliamente estudiadas como son en el animal control y los modelos parkinsonianos tradicionales (6-OHDA), con condiciones poco estudiadas como son el bloqueo agudo por bloqueadores dopaminérgicos (SCH-2339 + sulpiride) y por neurolépticos como el haloperidol. Estas comparaciones son de utilidad para poder establecer las bases y los parámetros para futuros estudios los cuales se deberán enfocar en dos puntos: (I) las posibles modificaciones en el patrón de disparo tras la administración de otros fármacos que inducen DIP, y (II) el nivel de recuperación del disparo a condiciones control tras el uso de las alternativas terapéuticas, como por ejemplo, el remplazo celular utilizando células dopaminérgicas diferenciadas a partir de células troncales diferenciadas.

Objetivos

Comparar las alteraciones en el patrón de disparo de las neuronas de proyección de la SNr, tras el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos como un modelo inicial del parkinsonismo inducido por drogas (DIP) con la supresión de dopamina, utilizando el modelo 6-OHDA de la enfermedad de Parkinson.

Elucidar el papel de los canales de calcio tipo T y los canales catiónicos no selectivos en el disparo patológico de tipo Parkinsoniano en las neuronas de proyección de la SNr, tras el bloqueo agudo de la respuesta dopaminérgica, y tras la supresión crónica de dopamina. Observar si estos mecanismos iónicos son los mismos en ambos casos.

Objetivos particulares

1.- Comparar las modificaciones en el patrón de disparo de las neuronas GABAérgicas de la SNr tras la privación crónica de la respuesta dopaminérgica (modelo 6-OHDA) con las observadas tras el bloqueo agudo de la respuesta dopaminérgica (administrando antagonistas D1 y D2).

2.- Explorar el efecto del bloqueo de los canales de calcio tipo T y de los canales catiónicos no selectivos en la generación del disparo en ráfagas tras el bloqueo agudo de los receptores de las clases D1 y D2.

3.- Explorar el efecto del bloqueo de los canales de calcio tipo T y de los canales catiónicos no selectivos en la generación del disparo en ráfagas en el modelo 6-OHDA.

4.- Mostrar las modificaciones en el patrón de disparo de las neuronas GABAérgicas de la SNr tras el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos con el fármaco haloperidol.

Hipótesis

Las modificaciones en los patrones de disparo de las neuronas de la SNr tras la privación crónica de la respuesta dopaminérgica (modelo 6-OHDA) serán similares a las observadas tras el bloqueo agudo de la respuesta dopaminérgica (administrando antagonistas D1 y D2).

Los mecanismos iónicos del disparo en ráfagas en las neuronas de la SNr se conservarán independientemente de si éstas son inducidas por el bloqueo agudo de los receptores a DA o por la privación crónica de DA.

El bloqueo de los canales de calcio tipo T abolirá el disparo en ráfagas inducido tanto por bloqueo agudo de los receptores D1 y D2 así como tras la lesión de la SNc con 6-OHDA.

El bloqueo de los canales catiónicos no selectivos abolirá el disparo en ráfagas inducido tanto por bloqueo agudo de los receptores D1 y D2 así como tras la lesión de la SNc con 6-OHDA.

La adición aguda de haloperidol será capaz de producir modificaciones en el patrón de disparo similares a las observadas en el modelo 6-OHDA en las neuronas de la SNr.

Material y Métodos

Todos los procedimientos fueron ejecutados de acuerdo a “the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (8th ed.)” (National Research Council 2011), y los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de uso y cuidado de animales de laboratorio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (NOM-062-Z00-1999, Numero de protocolo de laboratorio: JBD-59-15).

Modelo 6-OHDA de parkinsonismo en roedor

Usamos ratones CD-1 (21 días) machos y hembras los cuales se mantuvieron en cajas grupales y en un ciclo luz oscuridad 12-12, con agua y alimentos *ad libitum* y temperatura controlada de 25-28 °C. Fueron anestesiados profundamente con una mezcla de ketamina (85 mg/kg) y xilacina (15 mg/kg) para ser inmovilizados en un aparato estereotáxico. Cada ratón fue inyectado con 6-hidroxidopamina (6-OHDA 8 µg en 0.2 µL de 0.9% NaCl, con 0.2 mg/ml de ácido ascórbico; 1 µL/min; Sigma-Aldrich Química, S.L. Toluca, México) en la SNc del hemisferio derecho en las coordenadas estereotáxicas: 2.5 mm anteroposterior; 1.2 mm mediolateral a bregma y 4.5 mm dorsoventral de la dura. La jeringa se dejó en el lugar de inyección durante 10 minutos para permitir la difusión y maximizar la retención de la solución en el tejido. Después del procedimiento, los ratones se mantuvieron sobre una plancha caliente para que mantuvieran una temperatura corporal óptima durante el periodo de recuperación y posteriormente fueron regresados a su caja hogar.

Para evaluar la eficiencia de la lesión, los ratones fueron sometidos a una prueba de conducta de giro 14 días después de la cirugía, cuando las terminales dopaminérgicas en el NStr ya deberían de haber desaparecido (Fig. 4A). Los animales se sitúan en rotómetros automatizados por 10 minutos antes de que inicie la prueba para permitirles aclimatarse. La conducta de giro se mide contando los giros ipsi y contralaterales relativos a la lesión tras la administración intraperitoneal de apomorfina (0.05 mg/kg). La conducta se monitorea por 60 min y solo los animales que muestran un desbalance contralateral mayor al 80% (contralateral/total) son utilizados para los experimentos posteriores (Ungerstedt y Arbuthnott

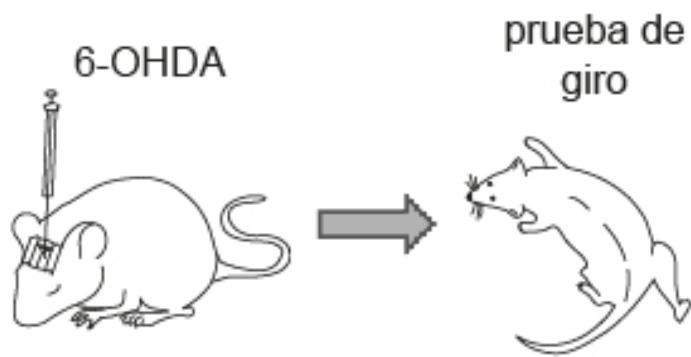
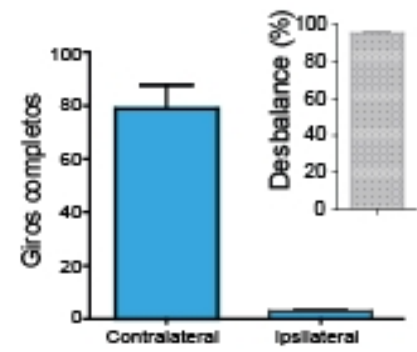
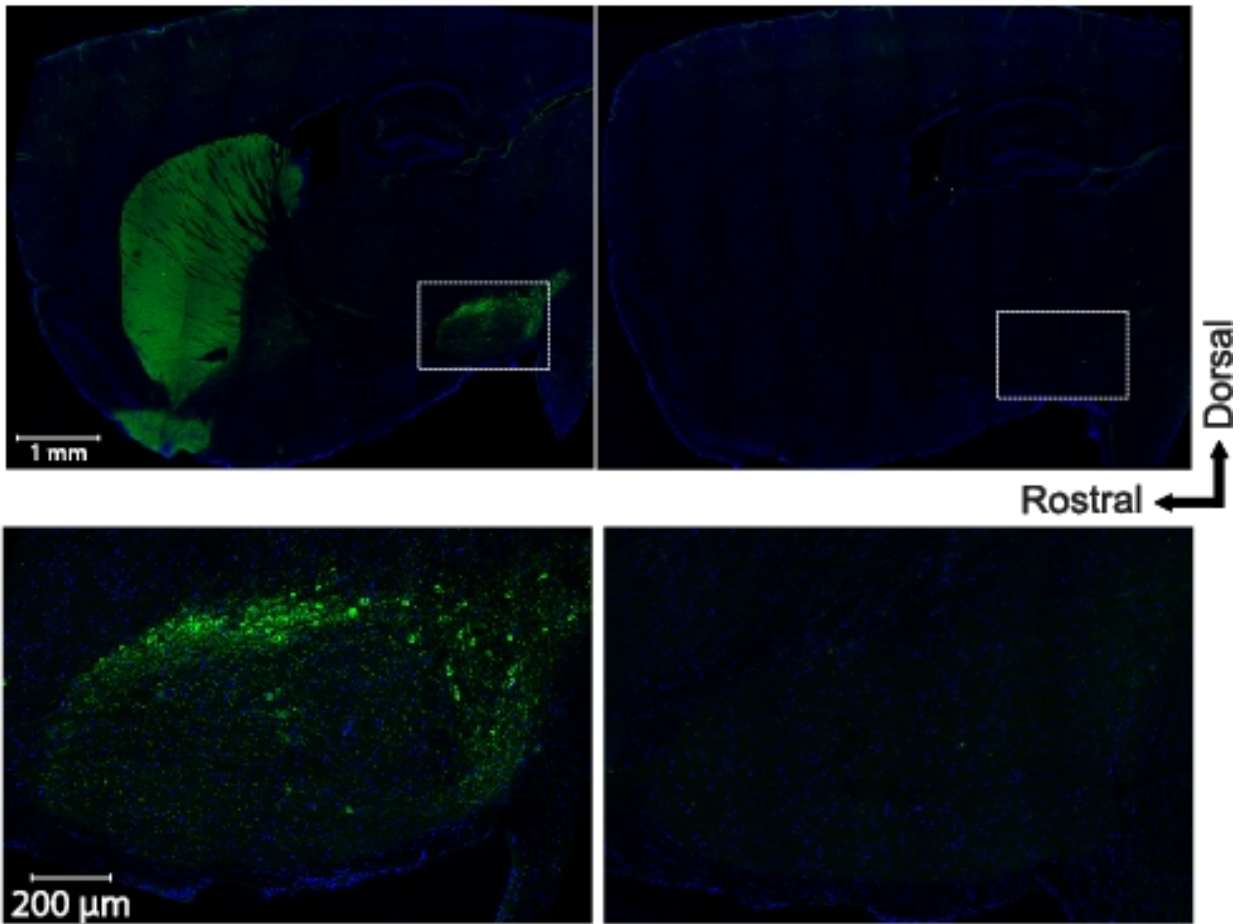
A**B****C**

Figura 4. Modelo animal de la EP. A) Los animales del grupo lesionado recibieron una inyección de 6-OHDA en la substantia nigra pars compacta (SNc) y la cantidad de la lesión fue evaluada con la prueba conductual de giro evocado por apomorfina. B) Giros cuantificados en la prueba y el desbalance calculado (giros contralaterales: 79, SD: 51, IQR: 38-109; giros ipsilaterales: 2.9, SD: 3.7, IQR: 0-5; desbalance: 95%, SD: 7.1, IQR 93-100; n=31). C) Rebanadas parasagitales (ver Fig. 5) obtenidas de un ratón lesionado con 6-OHDA. En el lado contralateral a la lesión (izquierda) se observa en verde la inmunoreactividad a tirosina hidroxilasa (TH+) en el neostriado y la SNc, mientras que el lado lesionado (derecha) se observa sin fibras ni somas TH+ en ambas estructuras. En los insertos (abajo) se muestran la magnificación de la región de la sustancia nigra, nótese que las células de la sustancia nigra pars reticulata se encuentran preservadas en ambos hemisferios (en azul los núcleos teñidos con DAPI).

En algunos animales que pasaron la prueba conductual se corroboró la pérdida de las neuronas y fibras dopaminérgicas en el hemisferio lesionado mediante inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa (TH) (n=4). Las rebanadas se fijaron en una solución 4% de paraformaldehído durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron con una solución amortiguadora de fosfato de potasio (KPBS) durante 10 minutos, por tres veces para quitar el exceso de fijador. Después ésta se incubó 30 minutos con albumina bovina al 1% para bloquear los sitios inespecíficos. A continuación cada rebanada se incubó por 24 horas con un anticuerpo monoclonal de conejo contra tirosina hidroxilasa (anti-TH; 1:2000, Abcam, disuelto en PBS conteniendo 0.25% de Triton-X). Las rebanadas luego se enjuagaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anticonejo, extraído de cabra, durante una hora y conjugado con FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Después las rebanadas fueron montadas con medio de montaje vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y puestas en portaobjetos y cubiertas con cubreobjetos para ser observadas con diferentes filtros de fluorescencia.

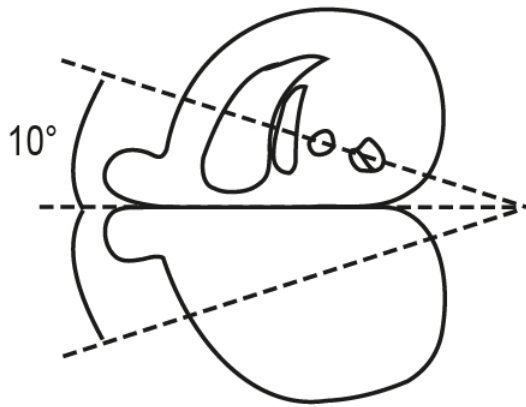
Posteriormente se obtuvieron imágenes con un microscopio confocal (Zeiss LSM710) ajustando los mismos parámetros para las rebanadas de cerebro ipsi y contralateral a la lesión. Se obtuvieron imágenes de dos canales de manera separada y secuencial utilizando un objetivo 10X (Plan-Apochromat) para generar una reconstrucción de la rebanada y con un

objetivo 20X (Plan-Apochromat) para las imágenes magnificadas (Fig. 4C). Se observó un alto porcentaje de desbalance motor y de pérdida de terminales y somas dopaminérgicos con lo que corroboramos los signos del parkinsonismo en nuestras muestras (Iancu et al. 2005).

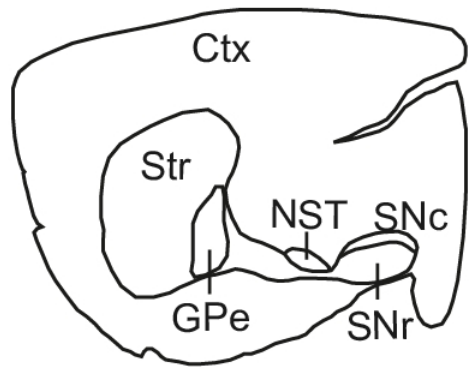
Obtención de las rebanadas de cerebro

Las rebanadas de cerebro se obtuvieron de ratones de la cepa CD-1 (42-50 días) provenientes del grupo control o lesionado. Tras anestesiarlos profundamente con una mezcla de ketamina (85 mg/kg) y xilacina (15 mg/kg) se perfundieron intracardiamente con solución de colina cuya composición fue (en mM): 124 (CH₃)₃N (Cl) CH₂CH₂OH, 2.5 KCl, 1.3 MgCl₂, 2.4 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, y 10 glucosa (~4°C, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂), después se decapitaron. Usando como base la parte media de cada uno de los hemisferios cerebrales, cada hemisferio se adhirió por separado, con cianocrilato a una base de agar con inclinación de 10° la cual se encuentra adherida al piso de una caja de Petri. Se obtuvieron rebanadas parasagitales con un ángulo anteroposterior de 10°, de 250-300 µm de espesor (Beurrier et al. 2006) usando un vibratomo (Vibratome® 1000 Classic, Warner instruments) (Fig. 5). Una vez obtenidas, las rebanadas de cerebro se dejaron equilibrar durante una hora a temperatura ambiente (~25°C) en una solución con líquido cerebral artificial cuya composición fue (en mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 glucosa, 0.2 ácido ascórbico y 0.2 tiourea (pH=7.4; 25-27°C; 298 mOsm/L, saturada con carbógeno: 5% CO₂ y 95% O₂).

A

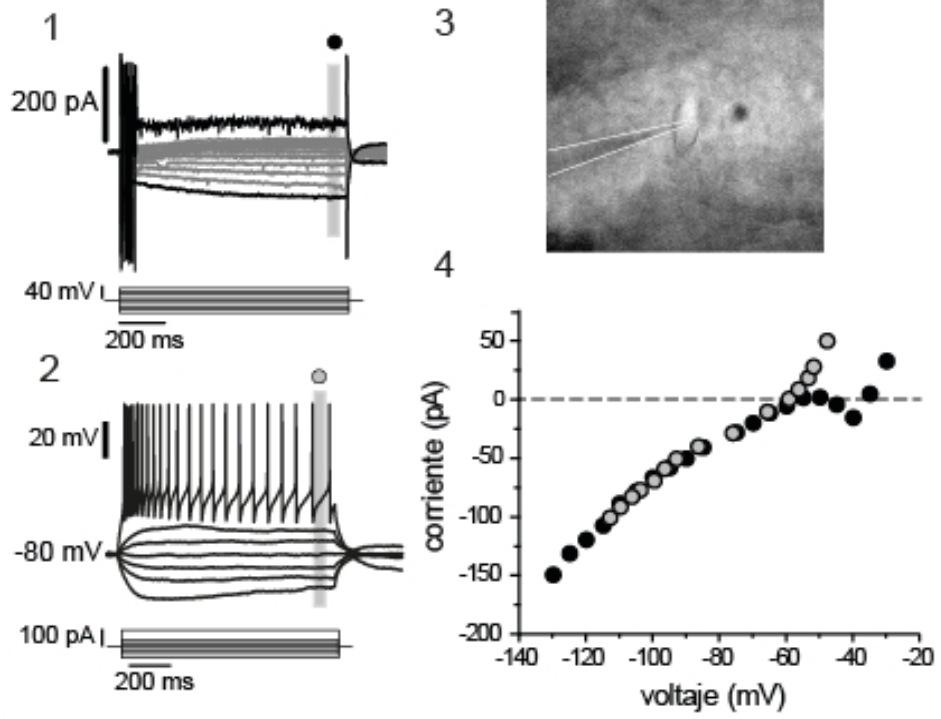


B

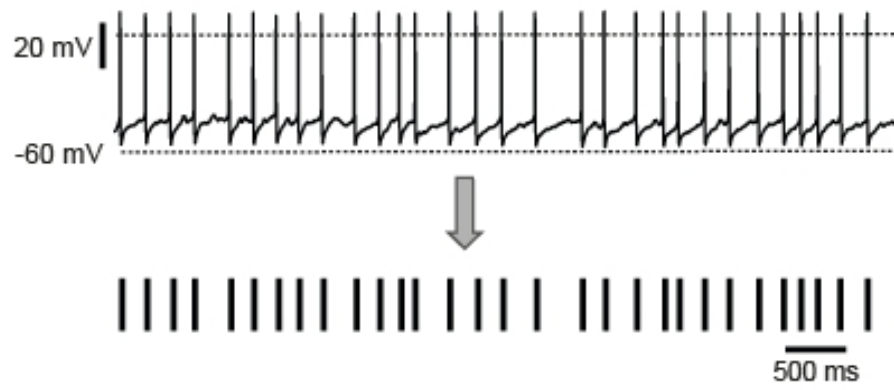


video microscopía diferencial de interferencia infraroja usando un objetivo de inmersión 40X Nikon Instruments, Melville, NY) y una cámara CCD (Cool Snap ES2, Photometrics, Tucson AZ, USA). Los registros fueron hechos con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA) y los datos fueron adquiridos con el software de acceso libre Im-Patch© diseñado con el ambiente LabView (National Instruments, México City, México; www.im-patch.com). Registramos potenciales de acción extracelulares (cell attached) e intracelulares y se obtuvieron las relaciones corriente voltaje tanto en fijación de voltaje como en fijación de corriente (curvas I-V), las cuales nos permitieron corroborar que las neuronas registradas correspondían a células GABAérgicas. Las diferencias entre éstas y las neuronas dopaminérgicas de la SNr ya se han reportado de manera extensa en trabajos previos (Ibañez-Sandoval et al. 2006, ver Resultados). Las curvas I-V obtenidas en fijación de corriente se superponen con las obtenidas en fijación de voltaje (Fig. 6A), sugiriendo que el balance del puente y la compensación de la resistencia en serie no representaron un problema. Para obtener los patrones temporales de disparo espontáneos, se obtuvieron registros en la modalidad de fijación de corriente en corriente cero ($I=0$) (Fig. 6B).

A



B



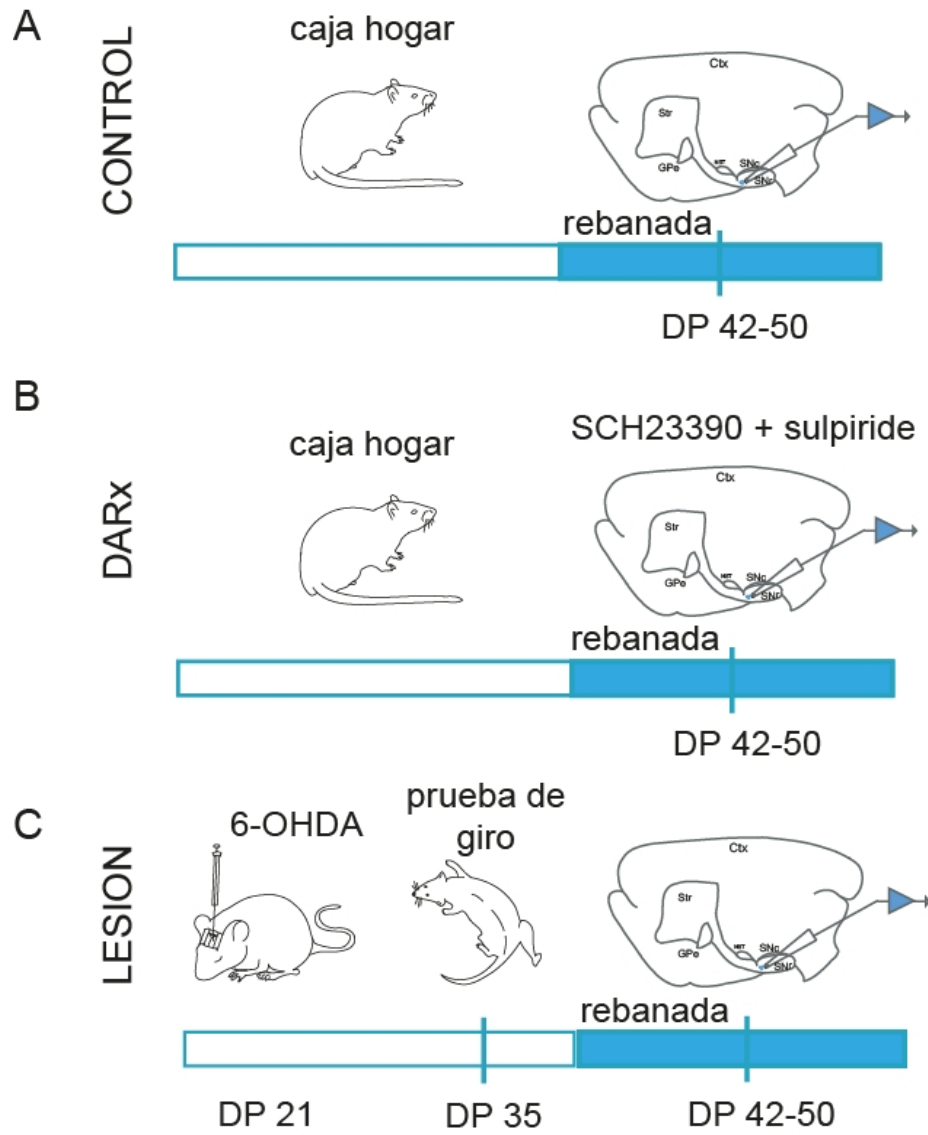
Corriente en función del voltaje graficada para ambas configuraciones (gráfica corriente-voltaje (I-V)): los puntos negros corresponden a la fijación de voltaje y los grises la fijación de corriente. Note la superposición de las graficas I-V con ambos circuitos. Las gráficas divergen cuando la región de conductancia negativa es evidente en la modalidad de fijación de voltaje y el disparo inicia en la modalidad de fijación de corriente. B) Ejemplo de la actividad de disparo espontáneo a corriente cero. Los potenciales de acción fueron extraídos como líneas verticales para hacer las gráficas tipo raster.

Farmacología

Los fármacos fueron guardados en soluciones concentradas para ser disueltas a las concentraciones finales en la solución salina de perfusión. Los fármacos utilizados así como su concentración fueron: 1 μ M SCH 23390 (7-chloro-8-hydroxy- 3-methyl-1-phenyl-2, 3, 4, 5-tetrahydro-1H-3-benzazepine); 1 μ M sulpiride (\pm -N-1-Ethylpyrrolidin-2-ylmethyl-2-methoxy- 5-sulfamoylbenzamide); 100 μ M ácido flufenámico (N-(3-[Trifluoromethyl] phenyl) anthranilic acid); 1 μ M haloperidol (4-[4-(4-Chlorophenyl)-4-hydroxy-1-piperidiny]-1-(4-fluorophenyl)-1-butanone) obtenidos de Sigma-Aldrich, y 50 μ M NNC 55-0396 dihydrochloride, obtenido de Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Diseño experimental y análisis estadístico.

Las muestras de disparo neuronal espontaneo de neuronas de proyección de la SNr fueron obtenidas bajo cuatro condiciones: (1) rebanadas de cerebro control de ratones sin tratamiento, (2) bloqueo agudo de receptores dopaminérgicos (DARx) con la presencia continua de los antagonistas dopaminérgicos añadidos a la solución salina del baño (1 μ M SCH 23390 + 1 μ M sulpiride), (3) privación crónica de dopamina tras la lesión unilateral en la SNc de ratones con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Jaidar et al. 2010) y (4) bloqueo agudo inespecífico de los receptores dopaminérgicos mediante la presencia continua de haloperidol añadido a la solución salina del baño (1 μ M haloperidol). Los antagonistas de ambos grupos de receptores dopaminérgicos (D1 y D2) fueron usados para emular en la medida de lo posible



Los datos electrofisiológicos digitalizados se importaron y fueron analizados en Python (python.org), Origin v8, Microcal (Northampton, MA, USA), y MatLab (The Mathworks Inc. Natick, MA, USA). Se presentan las medias \pm la desviación estándar (DE) y el rango intercuartilar (RIQ). Fueron analizados con las pruebas estadísticas no paramétricas: prueba T de Wilcoxon para las muestras pareadas y ANOVA Kruskal-Wallis con prueba post hoc de Dunn cuando fueron comparadas las muestras de diferentes tratamientos. La significancia estadística se consideró cuando los valores de P fueron menores a 0.05.

Análisis de datos

Los trenes de potenciales de acción espontáneos a $I=0$ fueron obtenidos de los trazos de voltaje en periodos de al menos 180 segundos y al menos 10 minutos después de establecer los registros de célula entera, cuando el disparo se mantenía estable. Los registros de disparo extracelular se obtuvieron de la misma duración y en tiempos similares. Se utilizaron las amplitudes máximas, los intervalos interespiga (IIEs), las frecuencias de disparo instantáneas, y las tasas de disparo promedio para construir distribuciones normalizadas del intervalo entre disparos, histogramas de frecuencia de disparo e histogramas de auto correlación de las muestras de los disparos. Los patrones de disparo fueron clasificados inicialmente utilizando un método que aproxima la función de auto correlación con sumas de funciones Gaussianas para posteriormente poder aplicar los criterios de inspección visual del autocorrelograma resumidos por Bingmer et al., (2011) en el siguiente cuadro:

Clasificación	Inspección visual del Autocorrelograma
Disparo regular	Ausencia de pico al Lag de tiempo 0, ≥ 3 picos laterales
Disparo irregular	Ausencia de pico al Lag de tiempo 0, < 3 picos laterales
Disparo con ráfagas	Pico al Lag de tiempo 0 seguido de un valle y picos laterales
Disparo irregular con ráfagas	Pico al Lag de tiempo 0 sin valle y picos laterales

Posteriormente se implementó una cuantificación de las ráfagas presentes en los trenes de disparo utilizando el análisis “ISI_N” desarrollado por Bakkum et al. (2014). En este análisis si t_i denota el tiempo del i th (igésimo) potencial de acción, entonces el intervalo después de N potenciales de acción es $y_i^N = t_{i+N} - t_i$. Entonces la distribución de probabilidad en el intervalo del N h (enésimo) orden $\{y_i^N\}$ fue calculada de cada tren de disparo proveniente de cada célula y fue graficado en escala log-log. Los histogramas ($\log y_i^N$) de los trenes de potenciales de acción con ráfagas casi siempre mostraban al menos dos modos para alguna N . Siguiendo el criterio de este análisis, se implementa una definición de trabajo para los IIEs en ráfaga como aquellos intervalos contenidos en el primer modo del histograma multimodal ($\log y_i^N$) utilizando la menor N posible que mostrara una clara separación entre los primeros dos modos. Como consecuencia, los IIEs que no pertenecen a las ráfagas son aquellos N h intervalos que no se encuentran en el primer modo del histograma. Estos intervalos pueden incluir disparo regular e irregular conteniendo largos IIEs. Para las distribuciones de IIEs de N h orden, identificamos el intervalo de tiempo τ_N en el cual se encuentran los mínimos locales entre los dos primeros modos. Este τ_N se utiliza como el umbral para separar los grupos de IIE (intervalo interespiga) de orden N (IIE_N). De esta manera, cuando $y_i^N < \tau_N$, entonces las espigas $\{i, \dots, i + N\}$ se consideran dentro de una ráfaga. Finalmente se calcula el porcentaje de disparos identificados como disparos en ráfaga en relación al número total de disparo en cada tren, y las medianas de la frecuencia de los intervalos dentro de las ráfagas, de los intervalos entre las ráfagas y de la cantidad de disparos por ráfaga (ver Fig. 12).

En la mayoría de las neuronas control de la SNr el disparo es tónico y altamente regular con pequeñas fluctuaciones en la tasa de disparo. En este caso, usualmente el umbral τ_1 define incrementos breves de frecuencia como ráfagas intercaladas dentro del tren de disparos. Adicionalmente, nosotros implementamos una modificación al análisis IIE_N para poder identificar los periodos de silencio en el tren de espigas. Es posible usar $N = 1$ para definir el umbral que separa los IIEs más largos y detectarlos como silencios en el tren de disparos. De esta manera, si $y_i > \tau_1$, entonces un silencio ocurren entre las espigas t_{i-1} y t_i . Los periodos de silencio se reportaron como la proporción de tiempo total de silencios entre el tiempo total del registro. En algunos casos podría suceder que el histograma de distribución

IIE no mostrara de manera clara los múltiples modos, en estos casos es posible encontrar el umbral utilizando aproximaciones geométricas. Vale la pena destacar que el objetivo principal de utilizar este análisis es el de determinar cuáles trenes de potenciales de acción presentan una mayor cantidad de IIEs interpretados como ráfagas (dado por τ_N para cada distribución IIE_N) sin usar ningún supuesto o definición previas, a diferencia de otros métodos (e.g., Lobb y Jaeger, 2015), y comparar el control con los registros durante el bloqueo de receptores dopaminérgicos y durante la privación crónica de dopamina.

Se obtuvieron las funciones de distribución acumulada (FDA) tanto de los porcentajes de ráfagas como de los periodos de silencio. Se graficaron de manera conjunta las medianas grupales \pm la desviación absoluta de la mediana (MAD) de las FDA de cada grupo en los cuales se incluían los trenes de disparo con las diferentes modalidades de disparo (con y sin ráfagas).

Finalmente se implementó el análisis de “graficas de visibilidad paramétrica” (PNVG) (Snarskii and Bezudnov 2016) a secuencias de IIEs obtenidos de trenes de disparo de diferente duración. Primero, las secuencias temporales de los IIE fueron normalizadas por su desviación estándar, asegurando que su varianza equivaliera a 1. Entonces, los IIEs normalizados fueron mapeados en graficas de visibilidad en lo que los nodos representan a los IIEs y las conexiones entre los nodos representa líneas de visibilidad entre cada IIE dado y todos los IIE subsecuentes visibles adelante en el tiempo usando ángulos de visibilidad particulares α (ver Fig. 13). Las series temporales de IIEs $\{(n, y_n)\}$ para cada tren de potenciales de acción fueron mapeadas en una gráfica en la que dos nodos (n, y_n) y $(n + m, y_{n+m})$ con $m \geq 1$, estaban conectadas con cada uno de los otros nodos $(n + k, y_{n+k})$ con $0 < k < m$ entre ellos

$$\frac{y_{n+m} - y_n}{m} > \frac{y_{n+k} - y_n}{k} .$$

de esta manera, si existe “visibilidad” entre los nodos (n, y_n) y $(n + m, y_{n+m})$. El ángulo de visibilidad entre dos IIEs, en grados respecto a la línea horizontal, está dada por

$$\alpha_{n,n+m} = \frac{180}{\pi} a \left(\frac{y_{n+m} - y_n}{m} \right)$$

lo que significa que el ángulo de visibilidad puede variar de -90° (visibilidad completa) a 90° (sin visibilidad). La visibilidad puede ser condicionada al restringir la visibilidad con respecto al ángulo máximo de visibilidad α . En consecuencia, es posible construir una gráfica para cada α . Cuando la gráfica de la red de nodos con el máximo número de conexiones para cada serie temporal es construida con el ángulo de 90° entonces tenemos la “gráfica de visibilidad natural” (Lacasa et al. 2008). Al decrementar de manera gradual el ángulo de visibilidad se modifican las propiedades de la red, como es la cantidad de fragmentos conectados. Los ángulos decrementaron de 90° a -90° . Cuando la gráfica está totalmente conectada a 90° se considera un solo fragmento. Mientras los ángulos de visibilidad decremantan, la PNVG se rompe en fragmentos $Q_{-1}(\alpha)$, representados como el número de componentes conectados en la grafica entre número total de nodos (Bezsudnov y Snarskii 2014). Finalmente, para cada serie temporal medimos el promedio de $Q_{-1}(\alpha)$ de entre 1 y 10 muestras con 80 IIEs continuos, y calculamos las áreas bajo la curva y los anchos medios de las curvas promedio de $Q_{-1}(\alpha)(-90^\circ \leq \alpha \leq 90^\circ)$. Las áreas bajo la curva así como los anchos promedio de las muestras de las diferentes condiciones fueron datos que se utilizaron para poder cuantificar diferencias entre los patrones temporales contenidos en las secuencias de tiempo de los trenes de disparo.

Resultados

Actividad espontánea de las neuronas de la SNr en condiciones control, durante el bloqueo agudo de receptores dopaminérgicos y tras la privación de dopamina por lesión con 6-OHDA

Al adquirir las relaciones corriente-voltaje de las neuronas GABAérgicas de la SNr se observaron las características electrofisiológicas previamente reportadas que permiten su identificación. En la modalidad de fijación de voltaje se observan pequeñas corrientes entrantes de activación lenta en la modalidad de fijación de voltaje (Fig. 6 A1) las cuales corresponden a “sags” moderados durante hiperpolarizaciones en fijación de corriente (Fig. 6A2)(Ibañez-Sandoval et al. 2006; Lee y Tepper 2007a). Además, estas neuronas presentan potenciales de acción rápidos (≈ 1 ms) y disparo a altas frecuencias durante las despolarizaciones (Tabla 1, Fig. 6) los cuales se presentan con poca o ninguna adaptación tanto en frecuencia como en amplitud de la espiga. Frecuentemente, las neuronas de la SNr muestran una región de conductancia con pendiente negativa que aparece por arriba de los -60 mV en la gráfica de la curva I-V en fijación de voltaje (Fig. 6 A4) (Atherton y Bevan 2005; Ibañez-Sandoval et al. 2007; Lutas et al. 2016).

Una de las características neurofisiológicas de estas neuronas es su disparo tónico (10–15 Hz para registros in vitro) y sus espigas de corta duración (~ 1 ms), lo que las distingue de las dopaminérgicas, las cuales poseen un disparo sostenido de baja frecuencia (1-4 Hz) así como espigas de mayor duración (~ 2.5 ms). En nuestros registros a corriente cero encontramos que la mayoría de las neuronas ($\sim 50\%$) en condición control presentaron disparo espontáneo altamente regular, tónico, y sólo en algunos casos mostraron disparo irregular o en ráfagas (Figs. 8B, 8A panel 1) (Ibañez-Sandoval et al. 2007; Lee y Tepper 2007a). Previamente sólo se habían reportado los porcentajes de neuronas activas de manera regular en comparación con otros patrones de disparo con registros de tipo extracelular en cerebro de ratas in vivo en los que se encontraron resultados similares (Murer et al. 1997; Wang et al. 2010).

La duración de los potenciales de acción a la amplitud media (1.1 ms, SD 0.33, IQR 0.84-1.3, n= 30) y el umbral de disparo definido como el punto de inflexión durante la subida del potencial de acción (-46 mV, SD 4.7, IQR -50, -43, n= 30) coincidió con las características para las neuronas GABAérgicas de la SNr y fueron similares entre todas las muestras estudiadas (Tabla 1). Los valores promedio del potencial de membrana entre el umbral y el pico de post hiperpolarización (Fig. 8D), las resistencias de entrada (R_N) (Ibañez-Sandoval et al. 2006; Lee y Tepper 2007a), las constantes de tiempo de la membrana (τ_m) y capacitancia neuronal C_N (τ_m/R_N) fueron similares a las reportadas por estudios previos considerando la edad y la especie de los animales (ver Tabla 1)(Richards et al. 1997; Atherton y Bevan 2005; Ibañez-Sandoval et al. 2007; Lee and Tepper 2007a, 2007b).

Tras la administración aguda de los antagonistas de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 (1 μ M SCH23390 + 1 μ M sulpiride) en la solución del baño (grupo DARx) se observó una significativa hiperpolarización del potencial de membrana con respecto al control como se puede observar en los trazos de voltaje en la Fig. 8 A, en los que la línea punteada sirve como referencia (Figs. 8B panel 1; cf., Fig. 8A, Tabla 1). De la misma manera, en las neuronas del grupo lesionado (grupo 6-OHDA) se observó el mismo fenómeno (Fig. 8C, Tabla 1). Se construyeron histogramas de frecuencia de disparo promedio en los que se observa que la hiperpolarización del potencial de membrana en las neuronas de los grupos DARx y 6-OHDA se encuentra aparentemente acompañada de la presencia de ráfagas, periodos de silencio y en ocasiones disparo irregular.

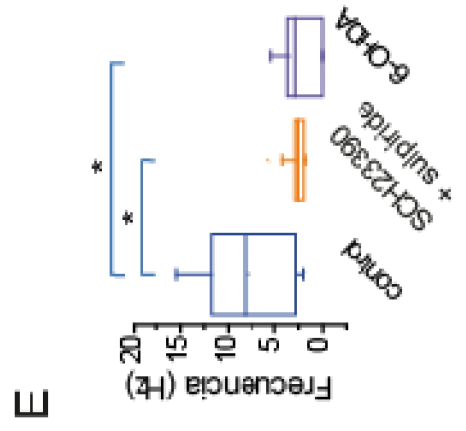
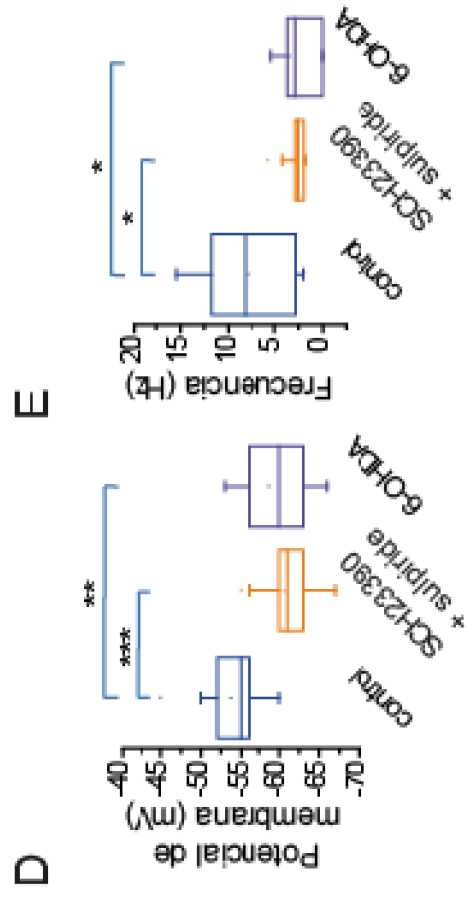
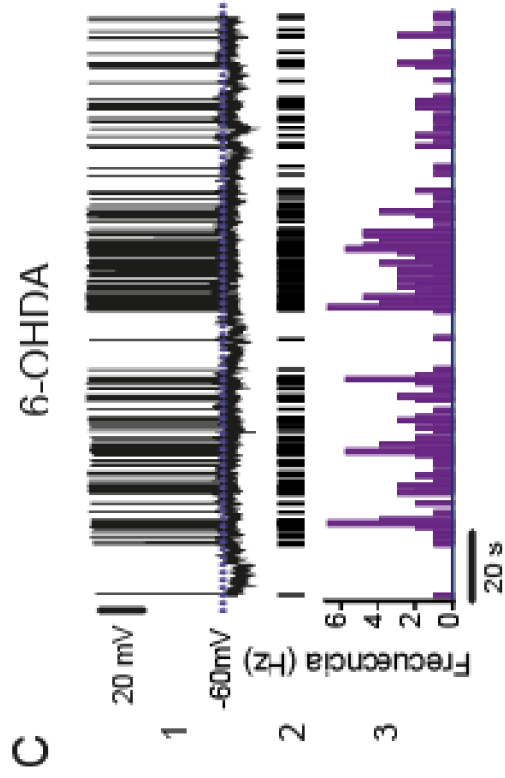
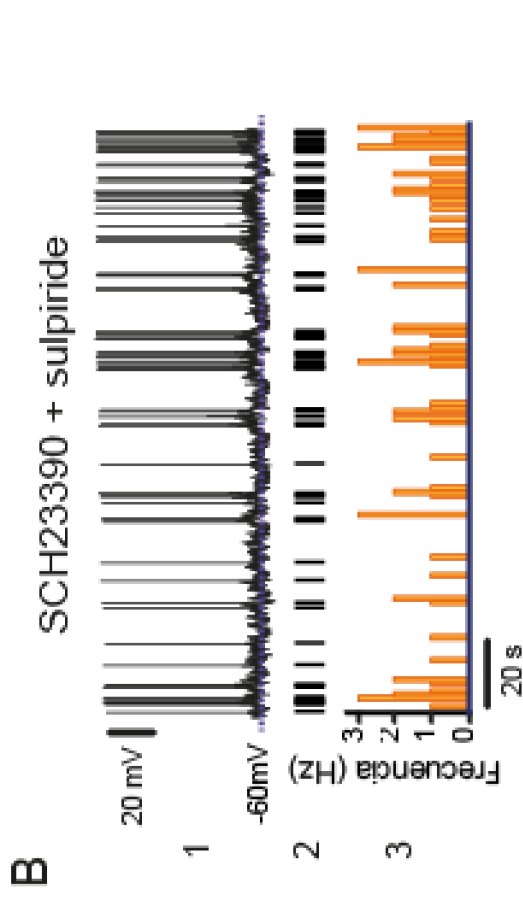
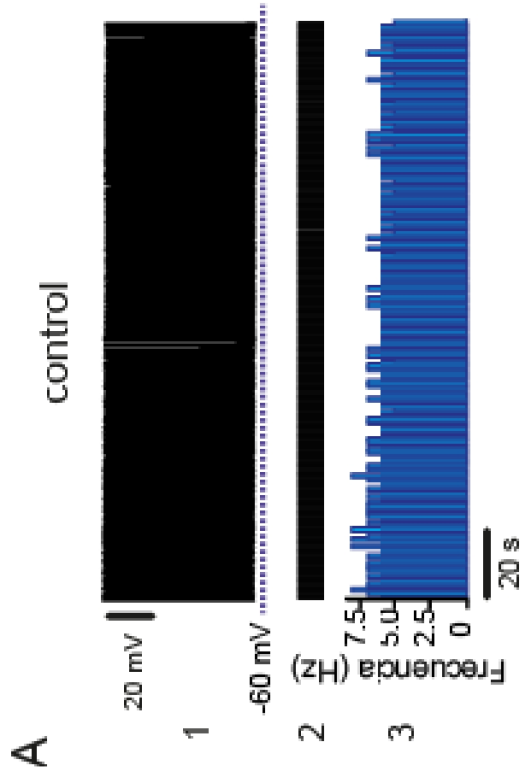
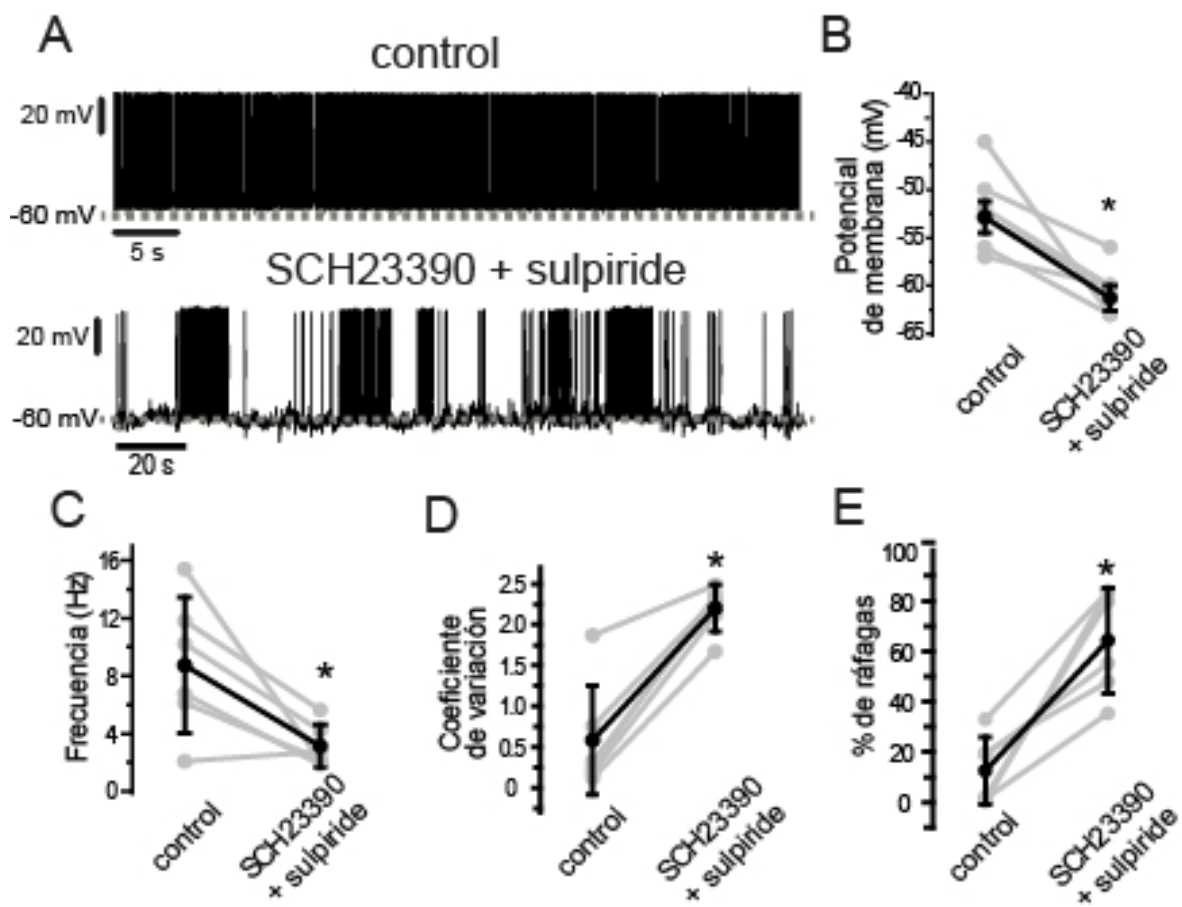


Figura 8. Cambios representativos en el disparo espontáneo de las neuronas de la sustancia nigra pars reticulata (SNr) durante el bloqueo de los receptores dopaminérgicos o la privación de dopamina. Registros del disparo espontáneo en fijación de corriente a corriente cero (A1-C1), gráfica raster con las espigas detectadas (A2-C2) e histogramas de la frecuencia de disparo instantánea (A3-C3). A) En el grupo control se observa disparo regular de espiga única con una tasa de disparo casi constante. Línea punteada= -60 mV. B) Tras la adición de los antagonistas D1 y D2 (1 μ m SCH23390 + 1 μ m sulpiride) se induce una hiperpolarización del potencial de membrana (ver línea punteada) y el disparo se vuelve irregular con ráfagas aparentes y pausas. C) El registro representativo del grupo lesionado con 6-OHDA también muestra hiperpolarización del potencial de membrana acompañado por disparo irregular con ráfagas aparentes. D) Durante el bloqueo de los receptores dopaminérgicos y tras la lesión con 6-OHDA el potencial de membrana se encuentra significativamente más hiperpolarizado que los controles (**P < 0.01; ***P < 0.001). E) La frecuencia de disparo promedio obtenida en registros de una duración de al menos 180 s y tras al menos 10 min después de establecer la configuración de célula completa fue comparada entre los 3 grupos. Se observa una notable reducción de la frecuencia de disparo para los grupos experimentales comparados contra el control (*P < 0.05).

Las frecuencias de disparo instantáneas promedio registradas a corriente cero para el grupo control fueron de 9.5 Hz (SD 3.6, IQR 6.4-12; n = 13), esta frecuencia promedio coincide con los reportes previos de registros in vitro (Richards et al. 1997; Lee y Tepper 2007b; Zhou et al. 2008; Lee et al. 2011). Las cuales son menores a las que se registran in vivo (25-30 Hz) debido a que se registran a menor temperatura (temperatura ambiente alrededor de 25°C-30°C). Para las muestras de los grupos experimentales se registró una disminución significativa de las frecuencias de disparo espontáneas comparadas con el grupo control (Kruskal-Wallis, P < 0.0001; con pruebas post hoc de Dunn; Fig. 8E), bajando a 2.8 Hz (SD 1.6, IQR 1.4-4.1, n = 16; P < 0.0001) para el grupo DARx y de manera similar a 2.3 Hz para el grupo 6-OHDA (SD 1.8, IQR 0-3.5, n = 13; P < 0.0001). Estos registros se obtuvieron aproximadamente 10 minutos después de establecer la configuración de célula completa y los periodos de tiempo que se utilizaron para el análisis fueron similares entre los grupos, considerándose únicamente los registros con una duración mayor de 180 s.

Para comprobar que las frecuencias y patrones de disparo no sean resultado de el lavado del medio intracelular, se realizaron registros en la modalidad "cell-attached" para los tres diferentes grupos, replicándose los mismos resultados (no se muestra figura), las frecuencias espontaneas promedio en los registros control (15 Hz, SD 4.8, IQR 11-20, n= 8) fueron significativamente mayores que las de las muestras experimentales (DARx = 7.3 Hz, SD 4.7, IQR 3.7-11, n= 13; 6-OHDA = 7.7 Hz, SD 4.7, IQR 4.5-12, n = 14; $P = 0.0219$ y $P = 0.0377$, respectivamente; Kruskal-Wallis, $P = 0.0158$; con pruebas post hoc de Dunn). Adicionalmente, en una sub-muestra de neuronas añadimos los antagonistas de los receptores D1 y D2 después de registrar sus condiciones control (grupo control vs. DARx) y observamos que efectivamente se presenta una hiperpolarización del potencial de membrana en respuesta al bloqueo de los receptores dopaminérgicos, cambiando de -52 mV (SD 4.4, IQR -56 a -49) en control a -60 mV (SD 2.6, IQR -63, -59, n = 6; $P = 0.0156$; prueba T de Wilcoxon; Figs. 9A-B) y nuevamente se observó que estos valores más negativos en el potencial de membrana neuronal se acompañan de un decremento en la frecuencia de disparo de 8.7 Hz (SD 4.7, IQR 5.1-13) a 3.1 Hz (SD 1.5, IQR 2-4.6, n = 6; $P = 0.0313$; prueba T de Wilcoxon T; Fig. 9C). Los patrones de disparo también se vieron modificados, apreciándose nuevamente la aparición de ráfagas aparentes, las cuales fueron analizadas y se reportan en las siguientes secciones de resultados.



Gracias a que realizamos estos experimentos con la técnica de patch-clamp en la modalidad de célula completa, en este trabajo estamos mostrando por primera vez el efecto que tiene el bloquear los receptores dopaminérgicos sobre el potencial de membrana neuronal, el cual puede ser el responsable de los efectos, y además nos permite sugerir que estas modificaciones pueden ser las responsables de los cambios en las frecuencias y los patrones de disparo en estas neuronas, los cuales son cambios reportados en el disparo de la SNr durante el parkinsonismo (e.g.: Weick y Walters 1987; Murer et al. 1997; Lee et al. 2001; Maurice et al. 2003; Wang et al. 2010). Con respecto al efecto que podría tener que los registros se realizaron a temperatura ambiente, se ha observado que estas neuronas exhiben cambios en su metabolismo dependientes de la temperatura, lo que se refleja, como mencionamos previamente, en menores tasas de disparo pero no se ha observado que la temperatura tenga algún efecto tanto en el potencial de membrana como en los patrones de disparo (Lutas et al. 2016), los cuales se mantienen altamente regulares para la condición control como se ha descrito previamente.

Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del grupo control, el DARx y el lesionado con 6-OHDA también fueron comparadas. De manera interesante, no encontramos diferencias en las resistencias de entrada neuronal ni en la capacitancia, únicamente la constante de tiempo de la membrana en el grupo lesionado se observó ligeramente más rápida (Tabla 1) sugiriendo que las diferencias en los patrones y frecuencia de disparo no pueden ser atribuidos a cambios en las propiedades pasivas de las neuronas. La inspección inicial realizada hasta este momento sugiere que en ambos grupos experimentales, la falta de activación de los receptores dopaminérgicos en las neuronas de la SNr ya sea como resultado del bloqueo de los mismos o por la lesión de las neuronas de la SNc, inducen cambios similares en los valores del potencial de membrana y en el patrón de disparo. Sin embargo, a continuación se realizó un análisis más detallado.

	control (n= 9)	SCH23390 + sulpiride (n = 9)	6-OHDA (n = 9)
Potencial de membrana (mV) (p = 0.0001)	-54 (4.3, -53 -51) (n = 17)	-61 (3.3, -63 -60) ^{***} (n = 12) (p = 0.0004 vs. control)	-59 (5.2, -63 -56) ^{**} (n = 16) (p = 0.0037 vs. control)
Resistencia de entrada (R_N, MΩ)	415 (153, 302-531)	417 (144, 297-534)	501 (182, 347-698)
Constante de tiempo de la membrana (τ_m, ms); (p = 0.0341)	52 (18, 45-60)	41 (14, 27-57)	32 (12, 22-41) [*] (p = 0.0284 vs. control)
Capacitancia de la membrana (C_N, pF)	91 (43, 54-118)	105 (40, 79-131)	67 (27, 45-90)
Umbral del potencial de acción (mV)	-45 (2.7, -48 -43)	-48 (4.3, -52 -44)	-46 (6.2, -50 -42)
Amplitud media del potencial de acción (ms)	0.9 (0.32, 0.61-1.1)	1.2 (0.38, 0.83-1.5)	1.1 (0.21, 0.97-1.3)

Tabla 1. Comparación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de la sustancia nigra pars reticulata bajo el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos o tras la privación crónica de dopamina. Los datos se presentan como la media (desviación estándar y rango intercuartil) Kruskal-Wallis ANOVA (col. 1) con prueba post hoc de Dunn con respecto al control. La n de los datos corresponde a la indicada en la fila de título a excepción de la primera columna, en la cual se indica la n específica para los datos de potencial de membrana (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

Modificaciones en el patrón de disparo tras el bloqueo agudo de receptores dopaminérgicos o tras la privación de dopamina

Para comparar de manera más precisa los cambios en el patrón de disparo utilizamos una serie de análisis complementarios (Figs. 10-13). 1) Los registros a corriente cero en fijación de corriente (panel 1 en Figs. 10 A-C) continuamente mostraban disparo de espigas aisladas en el control, y ráfagas con pausas así como disparo irregular en los grupos experimentales. 2) Los intervalos inter espigas (IIEs) en función del intervalo previo en animales control se encuentran agrupados alrededor de una misma duración, difiriendo de los obtenidos de las muestras DARx y 6-OHDA en los que los histogramas de los IIEs se observan asimétricos, confirmando la aparición de disparo irregular (cf., panel 2 en Fig. 10 A-C). 3) Mientras que los histogramas de autocorrelación en el grupo control muestra picos periódicos siguiendo la función de autocorrelación, los de los grupos experimentales no muestran una periodicidad clara (cf., panel 3 in Fig. 10 A-C). Los ajustes de las funciones de autocorrelación cumplieron con los criterios de inspección visual para disparo en ráfagas y disparo irregular (ver Tabla 1 en métodos; Bingmer et al. 2011). Estos datos son similares a los hallados tras la privación crónica de dopamina en modelos de parkinsonismo in vivo (MacLeod et al. 1990; Rohlf et al. 1997b; Lobb y Jaeger 2015). 4) Finalmente, el histograma de los IIEs control es altamente simétrico (asimetría = 2.0, SD 2.1, IQR 0.66-2.1, n = 9) comparado con el de los grupos DARx (6.3, SD 2.1, IQR 4.8-8.3, n = 11; P= 0.0041 vs. control) y 6-OHDA (7, SD 5.8, IQR 2.6-11, n = 10; P= 0.0216 vs. control), los cuales presentan colas largas en su distribución, revelando un incremento en la ocurrencia de IIEs cortos intercalados con IIEs más prolongados (panel 4 in Fig. 10 A-C; Kruskal-Wallis, P = 0.003; prueba post hoc de Dunn).

El coeficiente de variación (CV= SD/media) de los IIEs reveló otras importantes diferencias, observándose valores significativamente altos en ambos grupos experimentales (DARx: 1.8, SD 0.53, IQR 1.4-2.3, n = 11; 6-OHDA: 1.5, SD 0.74, IQR 1-1.9, n = 10; Fig. 10D) con respecto al control (0.51, SD 0.56, IQR 0.18-0.73, n = 9, Kruskal-Wallis, P = 0.0018; post-hoc Dunn, P = 0.0017 para DARx vs. control, y P = 0.0284 para 6-OHDA vs. control). En la submuestra control-DARx también observamos incrementos del CV de 0.59 (SD 0.67, IQR 0.17-1) a 2.2 (SD 0.29, IQR 2.0-2.4, n = 6; P = 0.0292; prueba T de Wilcoxon; Fig. 9D). Los

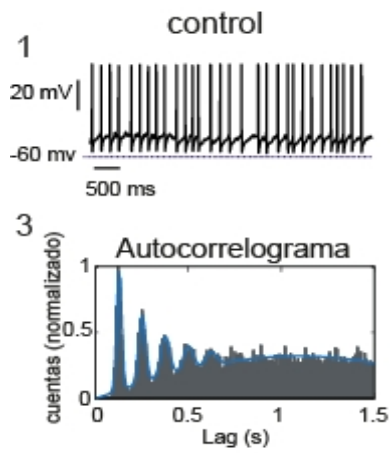
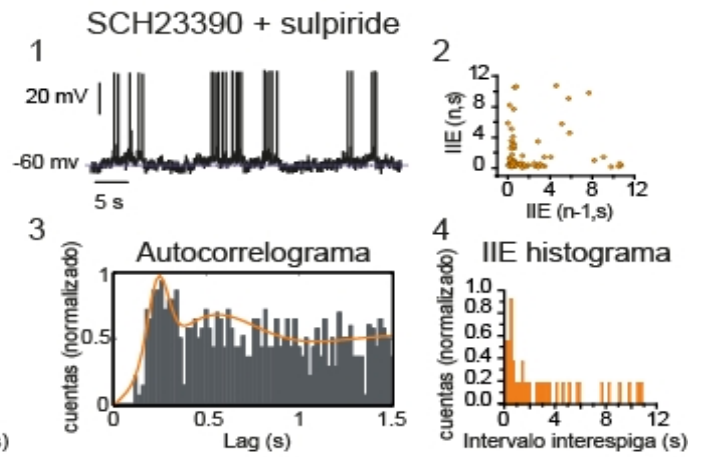
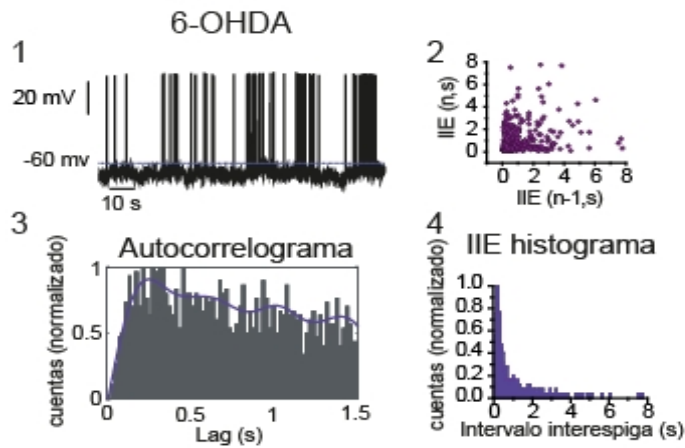
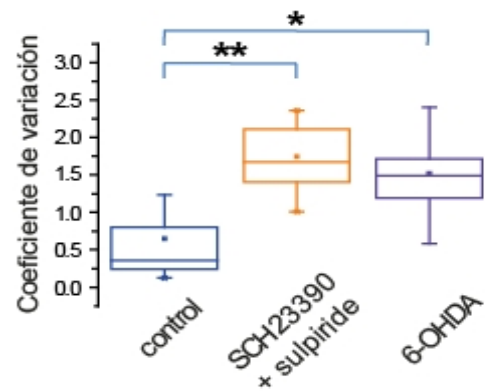
A**B****C****D**

Figura 10. Los patrones temporales de disparo de las neuronas de la SNr se vuelven irregulares y con ráfagas durante el bloqueo de receptores dopaminérgicos y la privación de dopamina. A1-C1) Ejemplos de los registros en fijación de corriente a corriente cero. A2-C2) Gráfica de los intervalos interespiga (IIE) en función de intervalos los previos. A3-C3) Autocorrelogramas del disparo neuronal con un ajuste que aproxima la función de autocorrelación usando sumas de funciones Gaussianas. A4-C4) Histogramas de los intervalos interespiga. A) En control se muestra una célula con disparo espontáneo regular (A1), la distribución de sus IEE con respecto a los intervalos previos presenta un solo agrupamiento (A2), su autocorrelograma se ajusta a una función altamente periódica (A3) y su histograma de IIEs presenta una distribución que se acerca a una función Gaussiana. B y C) En contraste, en los grupos experimentales se muestran registros con irregularidades y ráfagas (B1 y C1), sus distribuciones de IIEs con respecto a los previos se observan dispersas (B2 y C2), el ajuste de sus autocorrelogramas muestran la pérdida de el periodo observado en control mostrando ráfagas e irregularidad (B3: disparo en ráfagas, C3: disparo irregular con ráfagas). La distribución de los histogramas de IIEs se observa oblicua y con cola larga revelando la presencia de IIEs cortos y largos en el mismo tren de disparo. D) Los coeficientes de variación de los IIEs de las muestras con bloqueadores dopaminérgicos D1 y D2 y las del grupo lesionado con 6-OHDA presentan diferencias significativas comparadas con el control (*P < 0.005; **P < 0.01).

La distribución de los parámetros de los trenes de espigas sugieren la existencia de una variabilidad en el disparo de las neuronas de la SNr en control (González-Hernández y Rodríguez 2000; Lee y Tepper 2007a) que no había sido enfatizada lo suficiente por los trabajos previos. Estas neuronas poseen la capacidad intrínseca de presentar disparo en ráfagas, como había sido descrito previamente con registros de célula completa (Ibáñez-Sandoval et al. 2007; Lee et al. 2013) y en registros extracelulares (Wang et al. 2010). Por tanto, los resultados mostrados aquí son la base para poder realizar futuras comparaciones con los patrones de disparo que se registren en animales con lesiones que presenten mayor nivel de cronicidad, o en diferentes modelos de DIP producidos con otras drogas. En la figura 11 A-C se muestra 9 neuronas elegidas por cada muestra para ilustrar la variedad de patrones de disparo en las neuronas de la SNr. Usando los criterios de inspección visual del autocorrelograma (resumidos por Bingmer et al. 2011, ver métodos; Figs. 10 A-C panel 3), cuantificamos las proporciones de neuronas con patrón regular, irregular, ráfaga e irregular

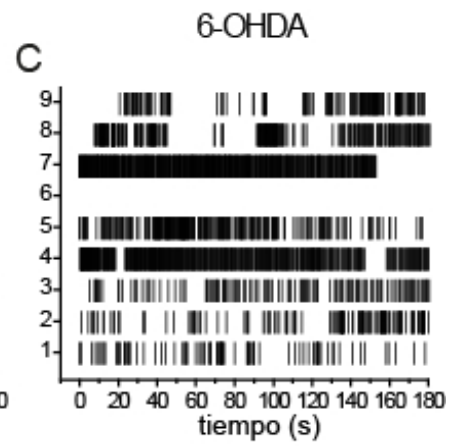
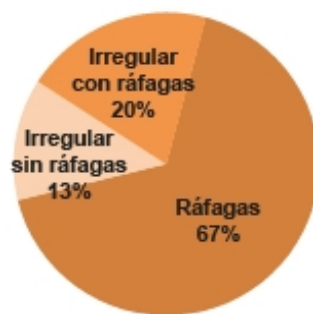
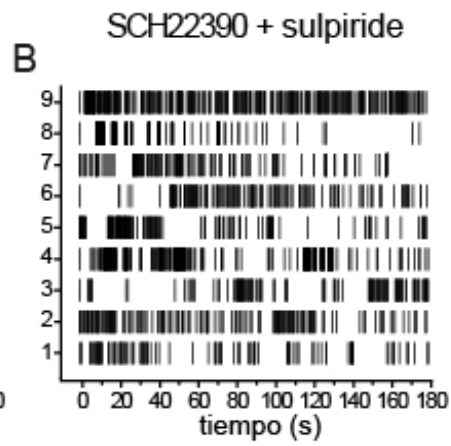
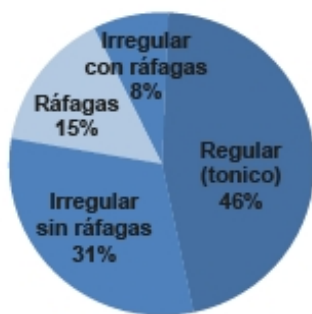
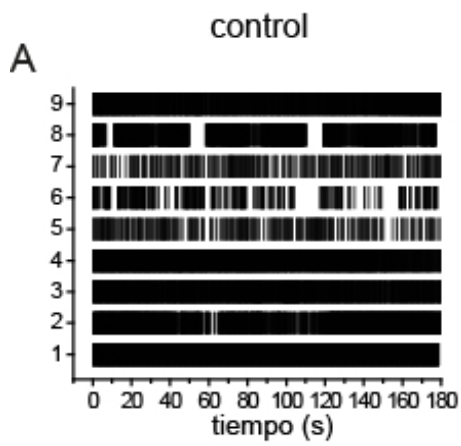
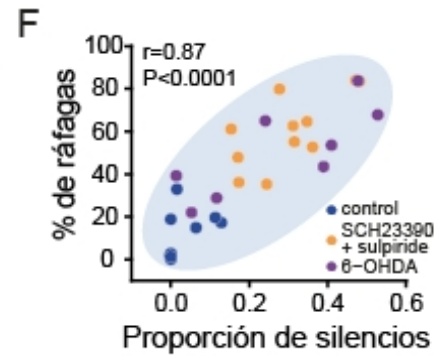
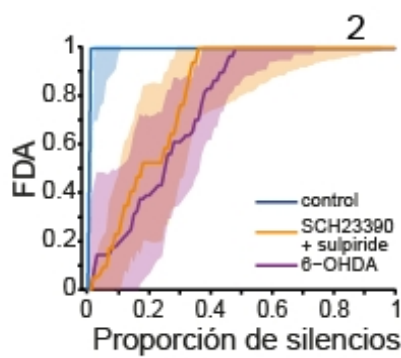
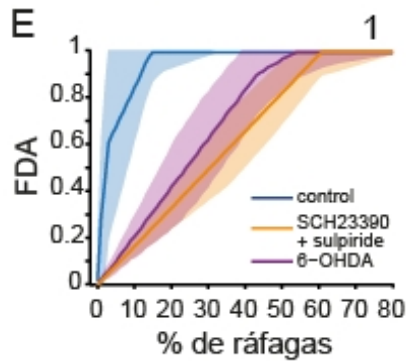
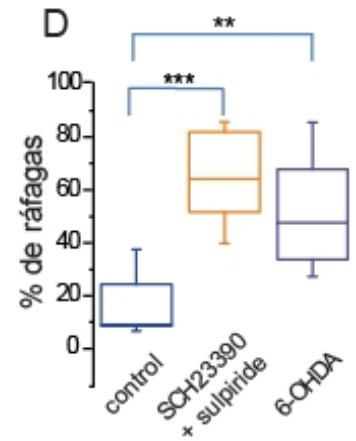
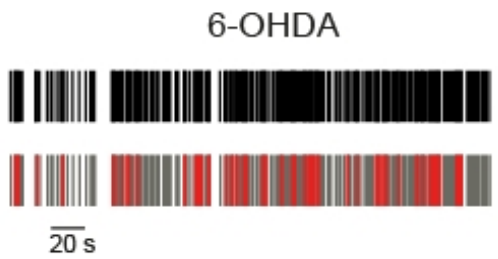
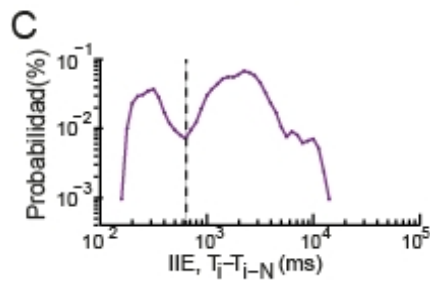
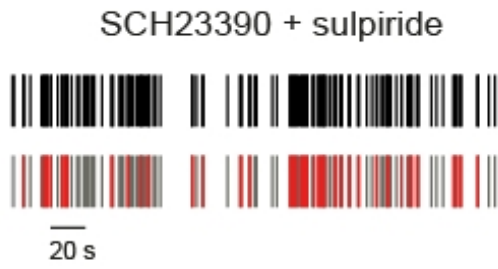
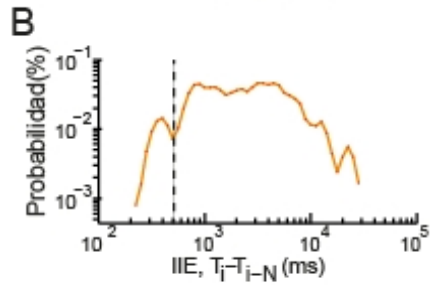
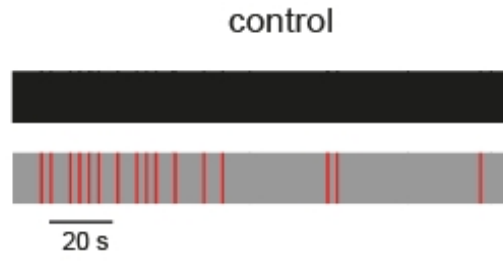
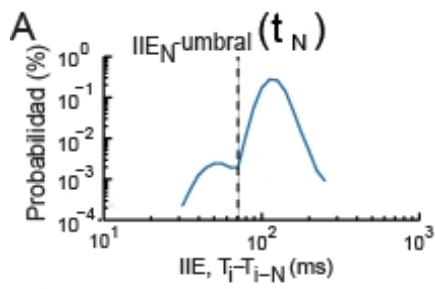


Figura 11. Gráficas tipo raster de los trenes de disparo de células escogidas en condiciones control y patológicas para mostrar la diversidad en los patrones temporales de disparo. Se muestran las gráficas tipo raster de 9 diferentes neuronas registradas por condición (arriba). Las gráficas de pastel muestran el porcentaje de neuronas con cada patrón de disparo identificado por la inspección visual de los autocorrelogramas (ver métodos y Bingmer et al., 2011; control n=17, SCH23390 + sulpiride n=15, 6-OHDA n=16). Note que los diferentes patrones de disparo se observan en las diferentes muestras, pero el disparo regular se observa únicamente en la condición control y el disparo silente es exclusivo del grupo lesionado con 6-OHDA.

Análisis de las ráfagas de potenciales de acción

Las definiciones de que es un ráfaga y los métodos para su detección y análisis han estado en constante discusión (Robin et al. 2009; Bingmer et al. 2011; Ko et al. 2012; Bakkum et al. 2014), varios de estos métodos se basan en múltiples supuestos definidos por el investigador como por ejemplo determinar de manera subjetiva una frecuencia mínima del disparo en ráfaga para la detección del mismo. Para poder cuantificar y comparar las ráfagas entre los grupos decidimos utilizar el método con la menor cantidad de supuestos: el detector de ráfagas desarrollado por Bakkum et al. (2014). En las figuras 12 A-C se muestran histogramas de probabilidad de las distribuciones de los IIEs en porcentaje para cada condición y en escala log-log. Los mínimos locales en el valle entre los primeros dos modos de la distribución definidos como τ_N (línea punteada) se utilizaron como el umbral de detección de las ráfagas (ver Materiales y Métodos). Los IIEs que se encuentran por debajo del umbral ($< \tau_N$) son considerados como IIEs que pertenecen a una ráfaga. En el centro de la Figura 12 se pueden observar graficas tipo raster de trenes de disparo significativos en los que se muestra el mismo tren arriba y abajo antes y después de la detección de ráfagas (en rojo). Cabe señalar que con este método se detectó una pequeña cantidad de ráfagas en los trenes de disparo de los registros control, los cuales corresponden a pequeños incrementos en las frecuencias de disparo. Al respecto, la presencia de ráfagas en los registros en animales control ha sido un dato controversial que no ha sido discutido ampliamente en estudios anteriores, pero dado que no es de interés particular para la pregunta de investigación, nos referiremos principalmente a las diferencias con los grupos experimentales.



disparo regular o irregular y pausas. A-C, derecha: Gráficas raster de trenes representativos que se muestran en negro antes del análisis (arriba) y tras el análisis se muestran los disparos detectados en ráfaga con color rojo y los demás disparos en gris (abajo). D) El porcentaje de disparo en ráfagas detectado en los trenes de disparo de las muestras en relación al total número de disparo para cada tren muestra incrementos significativos para los grupos experimentales (**P < 0.01; ***P < 0.001). E) Gráficas de las funciones de distribución acumulada (FDA) del disparo en ráfagas (E1) y de los periodos silentes (E2) sobre el tiempo total del registro en las 3 condiciones diferentes. Las líneas muestran la mediana y las sombras muestran la desviación absoluta de la mediana. F) Se muestra correlación positiva entre el porcentaje de ráfagas y los periodos silentes, cada punto representa una neurona de cada condición.

Este método cuantitativo demostró que el porcentaje de ráfagas presente en el disparo de los grupos DARx y 6-OHDA fue significativamente mayor que en el control (Tabla 2; Fig. 12D, 12E panel 1). Así mismo, la proporción de periodos silentes en los registros control fue menor que en los grupos experimentales (Tabla 2; Fig. 12E panel 2). Además, se observó que entre los grupos DARx y 6-OHDA no hay diferencias significativas tanto en los periodos silentes como en el porcentaje de ráfagas (Fig. 12E panel 2).

Se hizo un análisis de correlación entre el porcentaje de ráfagas (con relación a el número total de disparos) en cada tren de disparo con la proporción de periodos silentes (con relación al tiempo total del registro) y se encontró que la correlación fue positiva (Fig. 12F; Spearman rango $r(29) = 0.87$; $P < 0.0001$) mostrando que a mayor cantidad de ráfagas se encuentra mayor cantidad de periodos silentes en las neuronas de la SNr. Los registros pareados en el subgrupo control vs. DARx también mostraron un incremento en el porcentaje de ráfagas de 13% (SD 13, IQR 1.1-23) a 64% (SD 21, IQR 45-84) tras la aplicación aguda de los antagonistas dopaminérgicos ($n = 6$; $P = 0.0156$; prueba T de Wilcoxon; Fig. 9E).

El mismo análisis fue realizado en los registros extracelulares obtenidos en la modalidad de "cell attached" bajo las mismas 3 condiciones, confirmando el incremento de disparo en ráfagas en las células de los grupos DARx y 6-OHDA (DARx: 56%, SD 33, IQR 27-85, $n = 13$; 6-OHDA: 52%, SD 25, IQR 37-73, $n = 14$) comparadas con el control (0.76%, SD

0.82, IQR 0.18-1.4 ; n = 6; Kruskal-Wallis, P = 0.0011; post hoc Dunn: P = 0.0014 para DARx vs. control, y P = 0.003 para 6-OHDA vs. control; no se muestra). Estos resultados demuestran que en ambos casos: tras la privación de dopamina en el modelo de 6-OHDA y tras el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos se presenta mayor disparo en ráfagas y que con este método de análisis es difícil discernir diferencias entre ambos grupos. Las diferencias entre el control y los grupos experimentales denotan que la capacidad de codificación de las neuronas de la SNr se encuentra severamente afectada por la ausencia de la señalización dopaminérgica aun cuando los receptores dopaminérgicos sean bloqueados de manera aguda. Concluimos que es suficiente bloquear los receptores a DA para inducir disparo similar al patológico que se observa en el parkinsonismo. Esta actividad patológica debe estarse produciendo también, de manera aguda o crónica, con la variedad de fármacos que se piensa que están actuando de manera directa o indirecta como bloqueadores de receptores dopaminérgicos, siendo éste su principal mecanismo para producir DIP (Lee et al. 2017; Mukilan et al. 2018).

	control (n= 9)	SCH23390 + sulpiride (n = 11)	6-OHDA (n = 8)
% de ráfagas (p = 0.0001)	8.7 (8.6, 1.5-18)	61 (17, 48-80) ^{***} (p = 0.0002 vs. control)	50 (21, 31-67) ^{**} (p = 0.0048 vs. control; p > 0.99 vs. DARx)
Proporción de periodos silentes sobre el tiempo total del registro (p= 0.0004)	0.034 (0.054, 0-0.89)	0.29 (0.11, 0.17-0.36) ^{***} (p = 0.0007 vs. control)	0.28 (0.2, 0.07-0.46) ^{**} (p = 0.0061 vs. control; p > 0.99 vs. DARx)
Duración de las ráfagas (s) (p= 0.1493)	0.34 (0.49, 0.6-0.1)	0.52 (0.28, 0.33-0.75) (p = 0.1697 vs. control)	0.47 (0.36, 0.16-0.77) (p = 0.5601 vs. control; p > 0.99 vs. DARx)
Frecuencia de disparo intraráfaga (Hz) (p= 0.0407)	23 (15, 6.1-6)	6.4 (3.3, 4.0-9.7) [*] (p = 0.035 vs. control)	7.7 (4.3, 5.1-7.5) (p = 0.4135 vs control; p > 0.99 vs. DARx)
Número de espigas intraráfaga (p= 0.5055)	4.3 (3.2, 2-6.6)	4.5 (1.6, 3.1-5.9) (p = 0.7979 vs. control)	4.3 (1.5, 3.1-5.3) (p > 0.99 vs. control; p > 0.99 vs. DARx)
Intervalo interráfaga (s) (p= 0.0031)	12 (23, 1.8-7.8)	8.0 (2.5, 6.8-10) (p = 0.1625 vs. control)	2.7 (0.95, 2-3.5) ^{**} (p = 0.46 vs. control; p = 0.0024 vs. DARx)

Tabla 2. Características del disparo en ráfagas de las neuronas de la SNr. Los datos se presentan en medias (desviación estándar, rango intercuartil) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control; ++ $p < 0.01$ 6-OHDA vs. DARx). Prueba ANOVA Kruskal-Wallis con post hoc Dunn.

Graficas de visibilidad paramétrica (PNVGs)

Dado que no se encontraron diferencias claras entre los grupos DARx y 6-OHDA con el análisis de detección de ráfagas, buscamos el uso de otros algoritmos para poder revelar las diferencias más sutiles entre ambos. Utilizamos el método de graficas de visibilidad paramétrica (PNVGs por sus siglas en inglés; Fig. 13; ver métodos; Bezsudnov y Snarskii 2014) con el objetivo de comparar de manera más precisa las capacidades de codificación de las neuronas de la SNr. Para esto, los trenes de potenciales de acción fueron transformados en series de tiempo los cuales posteriormente fueron mapeados en gráficas espaciales, cuyos nodos representaron cada uno de los IIEs y las uniones representan “líneas de visibilidad” entre un IIE dado y los IIEs que ocurren delante de él en el tiempo (Fig. 13A).

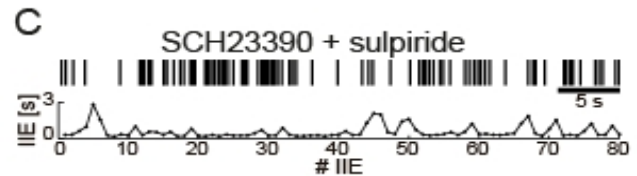
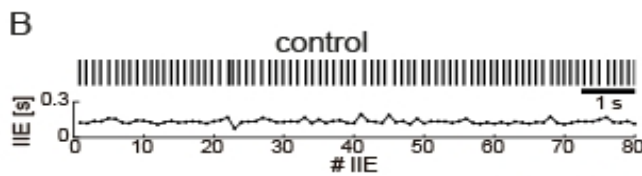
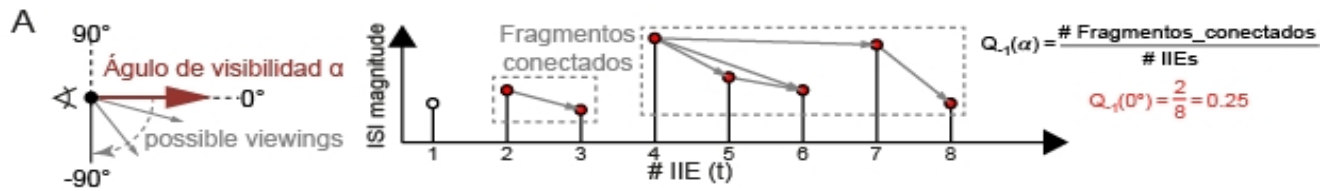
Las series de tiempo de los IIEs conectados pueden ser pensadas en términos de representaciones espaciales. Para cada grupo comparamos muestras de 80 IIEs tomados de los trenes de disparos sin importar la duración del tren. Para cada secuencia de IIEs construimos promedios de PNVGs cuyos ángulos de visibilidad variaron de -90° a 90° y se construyó una curva de la proporción de fragmentos de gráfica conectados en función del ángulo de visibilidad, $Q_{-1}(\alpha)$ (Figs. 13B-D). Cuando todos los IIEs fueron de un tamaño similar (disparo regular), el valor máximo teórico de $Q_{-1}(\alpha) = 0.5$, lo que significa que cada IIE tiene sólo una conexión con el siguiente IIE. Si se presenta un IIE prolongado en un tren de disparos, éste puede “ver” varios IIEs adelante en el tiempo y se “conecta” con ellos (Figs. 13B-D).

Con respecto a los ángulos de visibilidad, las graficas se encuentran altamente conectadas cuando el ángulo de visibilidad se aproxima a 90° , pero se rompe en fragmentos a medida que va descendiendo hacia los -90° . Por ejemplo, las conexiones entre los IIEs en los trenes de disparo control empiezan a perderse cuando los ángulos son menores a -10° , a

pesar de que muchos de los IIEs se mantienen conectados con sus vecinos inmediatos, dejan una alta cantidad de fragmentos desconectados (Fig. 13B). Entonces, la fragmentación en pequeños pedazos está asociado a pequeños IIEs y al disparo regular como se puede observar en la gráfica de hasta arriba en la Fig. 13B ($Q_{-1}(\alpha) \sim 0.2$ entre -10° y -30°). En contraste, las PNVGs de los grupos DARx y 6-OHDA donde los IIEs se desconectan en menor cantidad de pedazos los cuales son más grandes mientras el ángulo va decreciendo (Fig. 13 C-D), indicando IIEs de mayor tamaño. Sin embargo, con este análisis se mostraron las sutiles diferencias entre los dos grupos experimentales.

Para el grupo DARx se observó una fragmentación gradual en fragmentos de tamaño medio ($Q_{-1}(\alpha) \sim 0.1$ entre -10° y -30°), y para el grupo 6-OHDA se encontró un pico a los -3° ($Q_{-1}(\alpha) \sim 0.13$) y una fragmentación acelerada mientras el ángulo se acercaba a los -30° ($Q_{-1}(\alpha) \sim 0.05$), dejando muchos IIEs desconectados. Nótese que la escala de tiempo fue mayor en el ejemplo que proviene del grupo 6-OHDA para obtener el mismo número de IIEs que en los otros dos grupos. De manera global, las áreas bajo la curva de $Q_{-1}(\alpha)$ mostraron diferencias significativas entre las muestras control (Fig. 13E; 10.5, SD 2.2, IQR 9.2-12.25, n = 8), DARx (6.6, SD 1.6, IQR 5.6-8.2 n = 11; P = 0.011) y 6-OHDA (5.7, SD 1.1, IQR 5-8.2, n = 7; P = 0.0019; Kruskal-Wallis, P = 0.0012; pruebas post hoc de Dunn).

Sin embargo, las formas de las curvas se observaban diferentes por lo que medimos su amplitud media, observando que en este caso las muestras control (42.6, SD 7.5, IQR 38-48, n = 8) y DARx (39.5, SD 9.3, IQR 33-49.8, n = 11) no difirieron significativamente (Fig. 13F; Kruskal-Wallis P = 0.9569; con prueba post hoc de Dunn) indicando que varios de los ángulos produjeron una fragmentación similar, pero al comparar con el grupo 6-OHDA, tanto el grupo control como el DARx difirieron de manera significativa (22.3, SD 11.4, IQR 14.3-26.8, n = 7; P = 0.0118 y P = 0.0242, respectivamente) revelando que las neuronas del grupo lesionado exhibieron IIEs más largos y fragmentos más irregulares.



Gráficas de visibilidad paramétrica

● Conectado
○ Desconectado

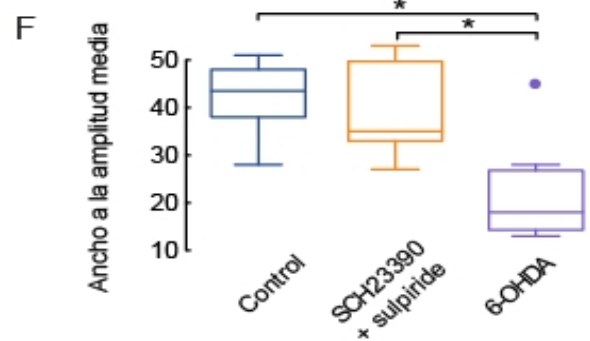
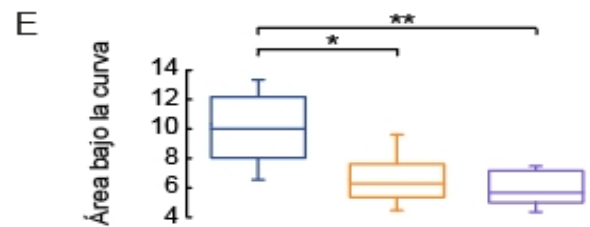
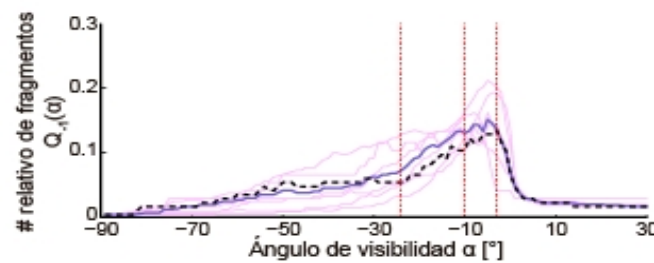
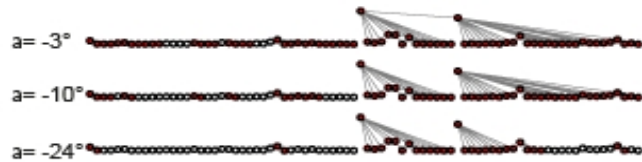
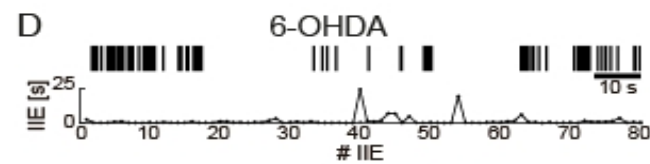
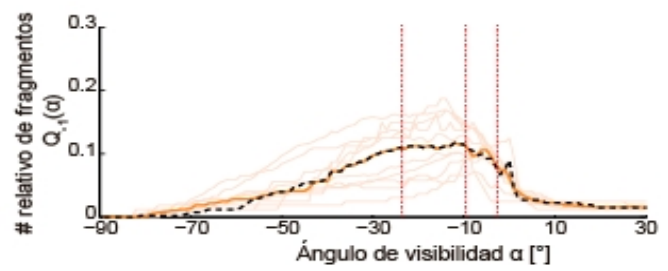
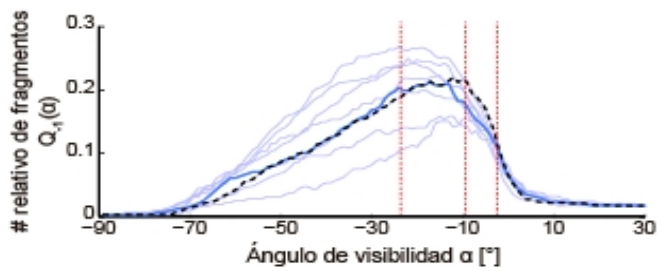
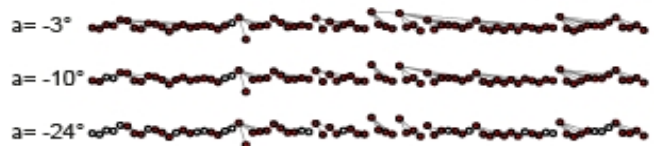


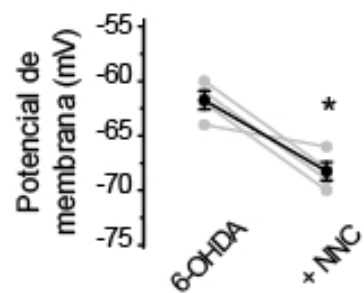
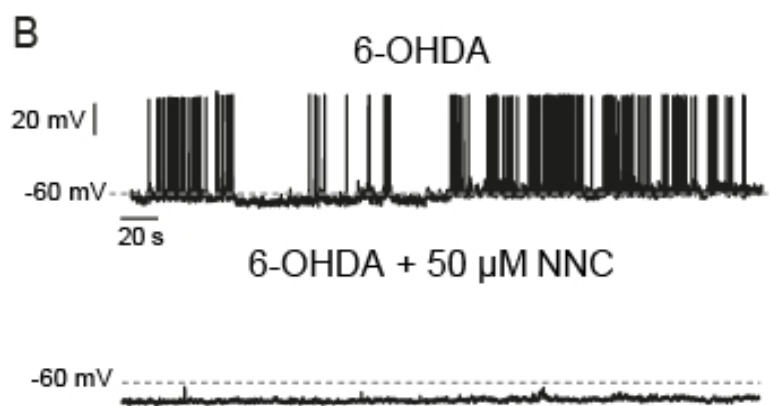
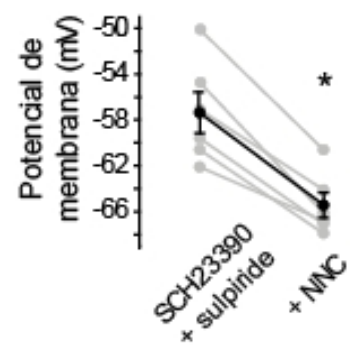
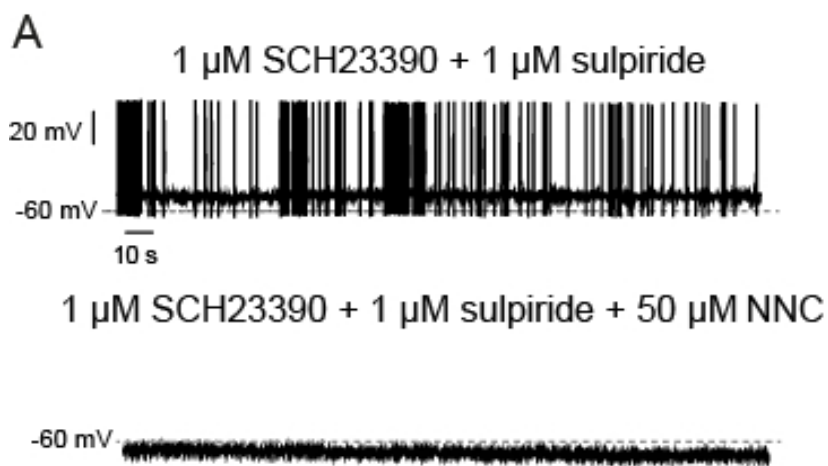
Figura 13. Análisis gráfico utilizando gráficas de visibilidad paramétricas para separar el disparo control del patológico. A) Ilustración gráfica del método de las gráficas de visibilidad paramétricas (PNVG). Primero, los trenes de disparo se convierten en series de tiempo de intervalos interespiga (IIE). La magnitud de los IIE limita la cantidad de IIE que son visibles para un IIE dado de acuerdo con el ángulo de visibilidad α . La grafica de la derecha muestra cuantos IIEs pueden ser “vistos” (flechas rojas). Note que la gráfica ahora está dividida en dos fragmentos de elementos conectados y un fragmento desconectado cuando $\alpha=0$ y el número relativo de fragmentos $Q_{-1}(0)= 0.025$. B-D) Ejemplos representativos de trenes de disparo para cada muestra (81 disparos por tren) las cuales son convertidas en series de tiempo de sus correspondientes 80 IEEs. Note que las diferencias en las escalas de tiempo corresponden a la misma cantidad de IEEs. Las siguientes 3 filas muestran las gráficas creadas con las series de tiempo de los IEE fijando 3 ángulos de visibilidad diferentes ($\alpha= -3^\circ$, -10° y -24°). Los nodos rellenos corresponden a fragmentos conectados y los vacíos a fragmentos desconectados. Las gráficas de abajo muestran la cantidad relativa de fragmentos conectados en función del ángulo de visibilidad $Q_{-1}(\alpha)$. Las líneas de color suave representan experimentos individuales en neuronas únicas, las líneas gruesas representan la mediana y las líneas negras punteadas son los experimentos representativos mostrados. B) $Q_{-1}(\alpha)$ la mayoría de los registros control muestran una separación en varios fragmentos de pequeños tamaños mientras el ángulo de visibilidad decrementa mostrando un pico entre -30° y -10° , indicando IIEs bastante regulares o con menor presencia de ráfagas. C) Durante el bloqueo de los receptores dopaminérgicos $Q_{-1}(\alpha)$ muestra una separación gradual en menos fragmentos de tamaño intermedio cuando el ángulo de visibilidad decrementa, indicando mayor cantidad de silencios (IIE largos) y ráfagas. La misma proporción de fragmentos se mantiene durante varios ángulos de visibilidad (-10° a -30°). D) en la muestra privada de dopamina los fragmentos $Q_{-1}(\alpha)$ son más largos indicando mayor cantidad de silencios y ráfagas de distinto tamaño, se muestra un pico abrupto entre 0° y -30° . E) Comparación entre las áreas bajo la curva y los anchos a la amplitud media en las 3 diferentes condiciones. Note que las áreas bajo la curva son diferentes entre las muestras patológicas y el control, mientras que los anchos a la amplitud media difieren entre las dos muestras patológicas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

La variabilidad que se observa alrededor de la mediana en el grupo DARx (Fig. 13C) sugiere que las diferentes neuronas registradas en la SNr mostraron diferentes grados de sensibilidad a los antagonistas de los receptores dopaminérgicos, y en el grupo lesionado con 6-OHDA, sugiere variaciones en el nivel de privación de dopamina a pesar de que todos los

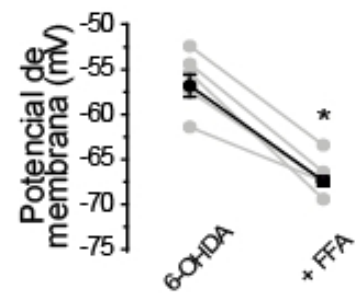
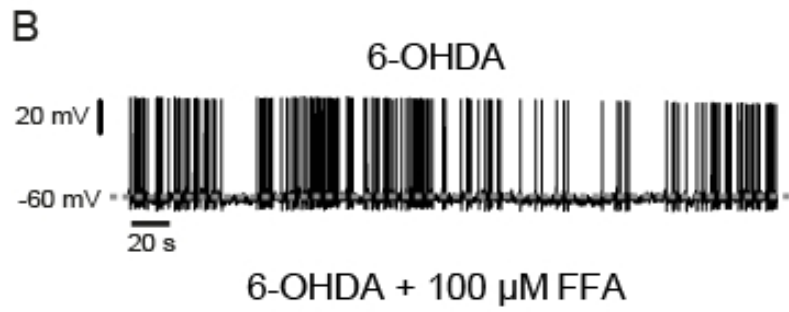
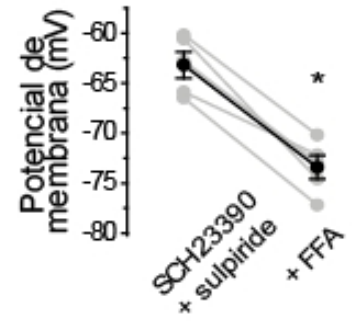
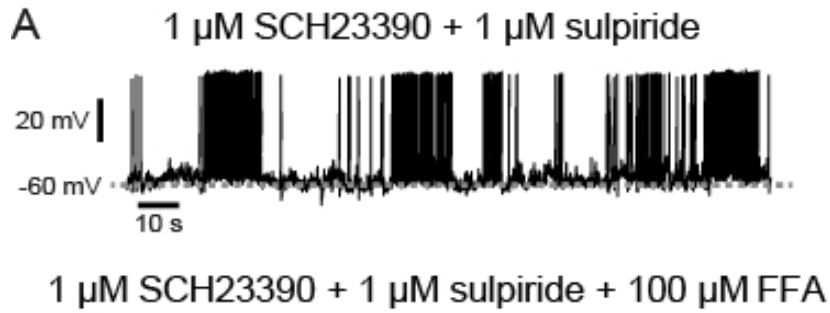
animales utilizados para este grupo pasaron la prueba conductual de manera similar. Con estos datos concluimos que el método de PNVGs permite cuantificar de manera más precisa las diferencias sutiles que se presentan en las series de tiempo de potenciales de acción, permitiendo diferir entre patrones de disparo producidos por la privación crónica de dopamina de los producidos por el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos, lo que puede ser de utilidad durante el estudio y diagnóstico de DIP.

Mecanismos iónicos que contribuyen al disparo en ráfagas: Canales de calcio tipo T y canales catiónicos TRP

En trabajos previos del laboratorio se ha mostrado que las ráfagas inducidas por NMDA en las neuronas de las SNr pueden ser abolidas por el bloqueo de canales de calcio tipo Ca_v3 (T) (Ibáñez-Sandoval et al. 2007). Por tanto, nos preguntamos si la actividad de estos canales también es necesaria para que se mantengan las ráfagas que observamos en las condiciones patológicas (DARx y 6-OHDA). Para probar esta hipótesis, aplicamos 50 μ M de NNC 55-0396, un antagonista selectivo de los canales de calcio de la clase Ca_v3 (Huang et al. 2004) a rebanadas de cerebro de los grupos DARx y 6-OHDA. La aplicación del bloqueador durante los registros de las neuronas DARx resultó en el cese del disparo y en un cambio en el potencial de membrana a valores aún más hiperpolarizados, de -57 mV (SD 4.4, IQR -61, -63) a -65 mV (SD 2.7, IQR -67, -63, n = 6; Fig. 14A inserto de la derecha; P = 0.016; prueba T de Wilcoxon de una cola). El potencial de membrana promedio cambió de manera similar en el grupo 6-OHDA tras la aplicación del NNC 55-0396 (Fig. 14B inserto de la derecha) de -60 mV (SD 3.8, IQR -63, -57) a -67 mV (SD 3.2, IQR -70 a -64, n = 5; P = 0.024; prueba T de Wilcoxon de una cola). Estos resultados muestran que los canales de calcio Ca_v3 (T) son necesarios para producir el disparo patológico en ambas muestras experimentales de manera similar que cuando se generó con NMDA en un estudio previo (Ibáñez-Sandoval et al. 2007).



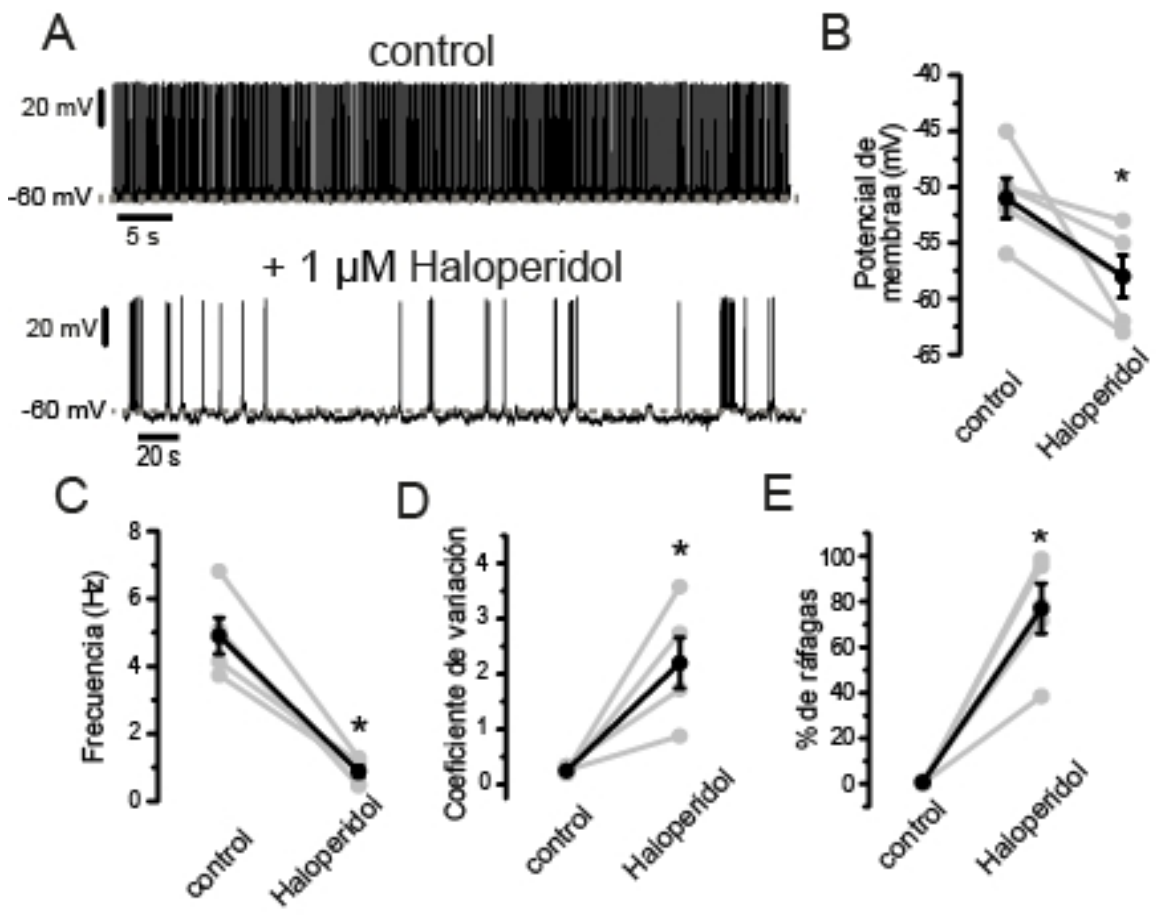
participa como una corriente intrínseca que despolariza de manera tónica a las neuronas de la SNr (Zhou et al. 2008) y el canal de tipo NALC que es un canal de sodio de fuga o “leak” que también mantiene el potencial de membrana despolarizado permitiendo el disparo espontáneo (Lutas et al. 2016), sin embargo existe controversia al respecto de cuáles son los canales esenciales para el mantenimiento del disparo espontáneo estas neuronas en condiciones control. Para estudiar esto, estudios previos han utilizado el ácido flufenámico (FFA) ya que es un bloqueador inespecífico de los canales con conductancias catiónicas no selectivas (NSCC), es decir, bloquea tanto a los canales TRP como a los NALC (Lutas et al. 2016) así como los potenciales de meseta presentes en las ráfagas inducidas por NMDA en las neuronas de la SNr (Lee y Tepper 2007b; Zhou et al. 2008; Lee et al. 2013). Por tanto, nosotros adicionamos FFA a las neuronas registradas en nuestras condiciones experimentales para saber si tenía algún efecto sobre el disparo patológico. La adición de 100 μM de FFA a las rebanadas del grupo DARx produjo el cese del disparo mientras que el potencial de membrana llegaba a valores significativamente más hiperpolarizados, cambiando de -62 mV (SD: 3.3; IQR: -66, -60) a -72 mV (SD: 4.4, IQR: -75, -69, n = 6; Fig. 15A; P = 0.016; prueba T de Wilcoxon de una cola). Para las neuronas del grupo 6-OHDA el FFA produjo respuestas similares, cambiando el potencial de membrana de -57 mV (SD: 2.8; IQR: -60, -56) a -68 mV (SD: 1.2; IQR: -69 a -67, n = 5; Fig. 15B; P = 0.031; prueba T de Wilcoxon de una cola). Se ha reportado que para esta concentración de FFA (100 μM) en condiciones control sólo se observan decrementos en la frecuencia de disparo, pero no el cese del disparo (Lutas et al. 2016). Al observar estos resultados y los de los estudios previos de los efectos del FFA en las ráfagas inducidas por NMDA en neuronas de la SNr (Lee et al. 2013) sugerimos que estas corrientes catiónicas son necesarias para mantener el potencial de membrana que permite el disparo espontáneo de las neuronas de la SNr durante el bloqueo de los receptores dopaminérgicos o tras la privación de dopamina. Este neurotransmisor debe estar modulando la actividad de los canales NALC y algunas clases de TRP (Lee et al. 2013; Lutas et al. 2016). Investigaciones futuras deberán tratar de identificar el rol que pueda tener la dopamina en la modulación de la actividad de los canales catiónicos y otros canales expresados en las neuronas de la SNr.



Patrones temporales de disparo de tipo parkinsoniano inducidos por haloperidol

Por último, para probar que tan rápido pueden actuar los neurolepticos clásicos que se sabe son capaces de inducir DIP, registramos los patrones de disparo de las neuronas de la SNr usando la misma preparación que hemos presentado en los experimentos previos de este trabajo. De esta manera, tras añadir haloperidol al baño podemos observar si se genera un cambio en el disparo de las neuronas registradas. El haloperidol es un antagonista de receptores dopaminérgicos inespecífico con preferencia por los receptores de tipo D2 y de uso típico en el tratamiento antipsicótico (Meltzer 2013; Maurice et al. 2015). Tras la adición de este fármaco a la solución de baño de neuronas de la SNr registradas en condiciones control (grupo control vs. haloperidol) observamos una hiperpolarización significativa del potencial de membrana de -51 mV (SD: 4.0; IQR: -54, -48) a -60 mV (SD: 4.2; IQR: -63 a -56, n = 5; P = 0.0313; prueba T de Wilcoxon; Figs. 16A-B). Este cambio en el potencial de membrana se vio acompañado por un decremento en la frecuencia de disparo promedio de 5.3 Hz (SD 2.0, IQR: 3.9-6.9) a 0.74 Hz (SD: 0.31, IQR: 0.48-1.1, n = 5; P = 0.0313; prueba T de Wilcoxon; Fig. 16C). De manera similar al grupo control vs. DARx, en los registros control vs. haloperidol también se registraron incrementos significativos en el CV de 0.22 (SD: 0.09, IQR: 0.15-0.29) a 2.7 (SD: 0.72, IQR: 2.0-3.3, n = 5; P = 0.0313 prueba T de Wilcoxon; Fig. 16D) y en el porcentaje de disparo en ráfagas de 0.68% (SD: 0.58, IQR: 0.18-1.3) a 89% (SD: 13, IQR: 75-99) en respuesta a la aplicación del neuroleptico (n = 5; P = 0.0313; prueba T de Wilcoxon; Fig. 16E).

Estos resultados sugieren que los fármacos antipsicóticos relacionados a DIP, que tienen propiedades antagonistas de los receptores dopaminérgicos, pueden inducir patrones de disparo parkinsoniano de manera rápida en las neuronas de la SNr en nuestra preparación. De esta manera concluimos que el disparo de las neuronas de la SNr debe estar fuertemente relacionado con la patofisiología del DIP. Sugerimos que nuestra preparación debe ser tomada en cuenta en investigaciones futuras donde se ponga a prueba el efecto de los otros fármacos que son capaces de inducir DIP.



Discusión

Ligeras variaciones en el patrón temporal y en la frecuencia de disparo tónico de las neuronas de la SNr son necesarias para la correcta ejecución de los programas motores. En el presente trabajo mostramos en un modelo *in vitro* cómo el disparo de estas neuronas cambia de un patrón quasi-regular a un disparo irregular y con ráfagas con tan solo bloquear de manera aguda y simultánea los receptores dopaminérgicos de las clases D1 y D2. También mostramos que estos patrones de disparo son similares a los que podemos registrar en rebanadas de ratones parkinsonianos, tras una privación de dopamina por lesión en la sustancia nigra pars compacta. La intención de usar antagonistas de los receptores D1 y D2 fue probar de manera directa la principal hipótesis de la patogénesis del DIP, el bloqueo central de receptores dopaminérgicos, debido a que los fármacos de primera generación utilizados en el tratamiento antipsicótico, como el haloperidol, tienen principalmente este mecanismo de acción y son los que presentan una mayor probabilidad de generar la patología (Bondon-Guitton et al. 2011; Maurice et al. 2015).

A pesar de que el cambio en los patrones de disparo en las neuronas de la SNr durante la EP ha sido estudiado ampliamente en estudios *in vivo*, a nuestro conocimiento nuestros resultados muestran por primera vez este fenómeno *in vitro* y de manera más importante, también muestran que el mismo fenómeno puede ser inducido únicamente bloqueando los receptores dopaminérgicos D1 y D2 simultáneamente de manera aguda, lo cual fue analizado con tres métodos complementarios (Bingmer et al. 2011; Bakkum et al. 2014; Snarskii y Bezsudnov 2016) que compararon el modelo 6-OHDA con el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D1 y D2. Dicha comparación no se habían llevado a cabo en nuestros previos trabajos *in vitro* (Acebes et al. 2011a; Ibañez-Sandoval et al. 2007) y fueron realizadas para mostrar de manera más fina que las similitudes y diferencias entre los patrones de disparo de las diferentes condiciones. Así mismo, estos hallazgos fueron corroborados con registros en la modalidad “cell-attached”, en la cual la integridad de el medio intracelular no se ve alterada, sugiriendo que los mismos no se deben a algún efecto de la técnica “whole cell” por si misma. Además, fue demostrado que el cambio en el patrón de disparo se da de manera aguda, después de unos minutos de la aplicación de los bloqueadores dopaminérgicos, así como se

observó en las muestras donde se registraron las condiciones control y adicionando los fármacos a las mismas células.

Este resultado permite dilucidar el mecanismo de la inducción de patrones de disparo patológico en la SNr durante la EP y el DIP, demuestra que se producen por la falta de acción de la dopamina sobre sus receptores, sin la necesidad de la muerte de las neuronas dopaminérgicas y puede inducirse de manera aguda. Es decir, las modificaciones crónicas que se dan durante la cronicidad en la EP como son el cambio en la expresión de receptores, modificaciones en la morfología de las células y/o el cambio en la liberación de otros neurotransmisores como acetilcolina (Obeso et al. 2008; French y Muthusamy 2018), no son esenciales para que los patrones de disparo patológico aparezcan. Al respecto se ha observado que en modelos animales de la enfermedad, el cambio en el patrón de disparo puede aparecer poco tiempo después de la muerte de las neuronas dopaminérgicas y preceden a la aparición de los síntomas motores (Miller y DeLong 1988; Murer et al. 2002).

Entre las observaciones que hicimos, son de importancia clínica el hallazgo al respecto de que tanto la aplicación de bloqueadores selectivos de los receptores dopaminérgicos (SCH23390 + sulpiride) así como del haloperidol, el cual es un bloqueador dopaminérgico no selectivo con preferencia por el receptor D2, pueden generar por si solos y de manera aguda disparo patológico similar al observado en el modelo animal de EP (6-OHDA), lo que demuestra que estos fármacos pueden generar un Parkinsonismo a nivel de cambios en el patrón de disparo en la SNr. Al respecto, únicamente se contaba con un estudio previo en el cual se observó el cambio en el patrón de disparo de la SNr *in vivo* tras la administración de haloperidol en ratas (Maurice et al. 2015), lo que demuestra que hay una falta de investigaciones al respecto de las modificaciones en el disparo de las neuronas de los GB durante el DIP y otros tipos de parkinsonismos. Por tanto, estos fenómenos se deben de tener en cuenta ante el uso clínico de estos y otros fármacos relacionados con el DIP, tomando en cuenta el historial de uso de fármacos del paciente para poder realizar un diagnóstico diferencial más cuidadoso.

Gracias a la preparación que utilizamos (registro en rebanadas parasagitales que preservan las conexiones entre los núcleos de los GB) y a los métodos rigurosos de análisis

utilizados en este trabajo proponemos que éstos pueden ser útiles para detectar el efecto patogénico de fármacos bloqueadores de dopamina sobre el disparo neuronal de la SNr con la finalidad de poder diagnosticar de manera pronta el inicio del DIP y diferenciarlo de la EP. Además, proponemos que este método se puede utilizar como modelo *in vitro* para el estudio de otros fármacos que se presupone pueden generar DIP ya sea de manera aguda o crónica. Así mismo, este modelo también podría poner a prueba la efectividad de diferentes tratamientos novedosos propuestos para la EP, como por ejemplo la re-inervación dopaminérgica de células implantadas en las terapias de reemplazo celular. De ser efectivos, éstos implantes de células troncales programadas deberían restablecer el patrón de disparo de las neuronas de la SNr a las condiciones control. Es importante decir que la L-DOPA reestablece el disparo normal en muchos GB, e.g., el estriado, pero no lo restablece en la SNr (Aristieta et al., 2016) lo que se correlaciona con signos motores no corregidos por la L-DOPA, tales como cambios en la postura y dificultad para la locomoción.

Modificaciones en el patrón de disparo de las neuronas de la SNr

Como mencionamos previamente, las neuronas de la SNr disparan de manera autónoma, tónica y de manera regular. Este disparo se presenta con transiciones momentáneas en su frecuencia de disparo como resultado de la actividad polisináptica excitadora e inhibidora provenientes del NST (Ibañez-Sandoval et al. 2006; Shen y Johnson 2006), del GPe y el NStr (Ibañez-Sandoval et al. 2006; Aceves et al. 2011a) y de otras entradas provenientes de tallo cerebral (Misgeld 2004). Cuando se encuentran aisladas, el disparo de la SNr se vuelve más regular (Atherton y Bevan 2005). Es decir que la actividad de estas neuronas en condiciones control se debe a sus corrientes intrínsecas las cuales son susceptibles a la modulación de la actividad de las entradas sinápticas y a cambios metabólicos (Zhou y Lee 2011; Freeze et al. 2013; Rossi et al. 2013; Lutas et al. 2014; Mamad et al. 2015). Las neuronas de salida de los GB muestran cambios sutiles durante la ejecución de programas motores (Schultz 1986; Freeze et al. 2013; Rossi et al. 2013; Barter et al. 2015) y ajustes posturales (Barter et al. 2014) lo que sugiere que los cambios dinámicos y flexibles en su disparo son necesarios para producir las señales necesarias para la ejecución de las conductas motoras.

Para analizar los patrones de disparo neuronal se han utilizado varios métodos. Los métodos utilizados aquí indicaron incrementos en irregularidad y ráfagas en el disparo de las neuronas de la SNr después de la privación dopaminérgica crónica (modelo 6-OHDA) como había sido mostrado en estudios previos. Cambios similares en el patrón de disparo se han observado en otros núcleos de los GB durante el parkinsonismo, causándose correlaciones espurias entre las neuronas de cada núcleo y entre los diferentes núcleos (Sanderson et al. 1986; MacLeod et al. 1990; Murer et al. 1997; Rohlf et al. 1997a; Walters et al. 2007; Peng et al. 2010; Lobb y Jaeger 2015). Este fenómeno es el principal signo electrofisiológico que puede ser observado tanto en los diferentes modelos de la enfermedad como en pacientes, convirtiéndose en un marcador objetivo de la patología. A pesar de la discusión existente al respecto de si la EP puede realmente ser modelada en animales ya sea lesionando la SNc con toxinas (6-OHDA; rotenona) o si bien estos sólo son correlatos útiles para la búsqueda de drogas anti-Parkinsonianas, a falta de algo mejor, en este trabajo estamos mostrando que la aparición y/o el incremento de patrones de disparo en ráfagas es sucede en los tres modelos de parkinsonismo que utilizamos. Concretamente, lo que es indudable es que cuando las neuronas de la SNr se encuentran enganchadas en estos patrones de disparo se producen, entre otros signos, extrema rigidez y fallas en el control de la postura (Takakusaki et al. 2003; Barter et al. 2014; Maurice et al. 2015), haciendo notar la necesidad de estudiar más a profundidad el mecanismo de disparo patológico.

Al respecto, previamente habíamos sugerido que el cambio en el patrón de disparo en respuesta al bloqueo agudo y simultáneo de los receptores D1 y D2 se debe a una combinación entre cambios en la eficiencia sináptica y en la excitabilidad de la membrana. El bloqueo de los receptores D1 reduce la amplitud de las corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSCs; por sus siglas en inglés) de la vía estriato-nigral o directa, mientras que el bloqueo de los receptores D2 incrementa la amplitud de las IPSCs de la vía palido-nigral (Aceves et al. 2011a) y los EPSCs de la vía subtálamo-nigral (Ibañes-Sandoval et al., 2007), por lo tanto, tras el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos se produce un inbalance entre estas aferentes de acaso similar a el que se produce durante la EP, lo que habría que estudiar en el futuro. Este inbalance podría hipotetizarse como una causa de la presencia de ráfagas e irregularidades en el disparo de la SNr. Cabe señalar que ésta es la principal razón por la que

para nuestro modelo *in vitro* se requiere el uso de rebanadas parasagitales con un ángulo de 10° que preserve en mayor grado las conexiones entre los núcleos intermedios y el NStr con la SNr (Beurrier et al. 2006), pues si éstas conexiones no se preservan el elemento presináptico no estaría presente y el fenómeno no podría ser reproducido. Además, éstos resultados en conjunto sugieren que los cambios en la fuerza sináptica de las vías directa e indirecta observados por Aceves et al (2011) también deben de estar sucediendo tras la privación crónica de DA en el modelo de 6-OHDA.

Importancia del bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos en la SNr: el parkinsonismo inducido por drogas (DIP)

Nosotros mostramos que tras el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos se pierde el disparo cuasi-regular en las neuronas de la SNr, lo que sugiere que este tipo de neuronas requiere de una modulación dopaminérgica continua. Este hallazgo relaciona a las neuronas de la SNr en la fisiopatología del DIP, el cual se ha convertido en un problema que adquiere cada vez mayor relevancia ya que varios fármacos útiles en el tratamiento de otras patologías lo producen (Bondon-Guitton et al. 2011; Mukilan et al. 2018). Tanto los antipsicóticos de primera generación como lo más nuevos, incluyendo los atípicos pueden producir DIP (Lopez-Sendon et al. 2013), por lo tanto, una pregunta importante sería cuántos y cuáles de estos fármacos modifican el disparo de las neuronas de la SNr, las cuales son el blanco más cercano de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Ruffieux y Schultz 1980; Cheramy et al. 1981a; Waszczak y Walters 1983; Zhou et al. 2009).

En éste estudio iniciamos explorando el efecto del haloperidol dado que se conoce como uno de los fármacos que tienen una mayor proporción de pacientes que han desarrollado DIP tras un periodo de administración del mismo (Munhoz et al. 2017). Inclusive, en la investigación básica se cuentan con varios estudios en los que se muestra que altas dosis de haloperidol producen rigidez en roedores, por lo que se ha propuesto inclusive como un método de catalepsia experimental (Morelli et al. 1981). Nuestros resultados sugieren que la rigidez extrema observada por dichos experimentos está acompañada por disparo

patológico en la SNr y posiblemente en otros núcleos de los GB, y que esta rigidez se debe de tomar en cuenta como uno de los signos de DIP.

Algunos otros fármacos relacionados con el DIP, y que se usan de manera rutinaria en la clínica, requieren ser estudiados de manera cuidadosa ya que aparentemente no presentan efectos adversos en el corto tiempo pero es posible que después de una administración crónica empiecen a mostrar los síntomas parkinsonianos. Entre estos fármacos se encuentran, por ejemplo, los antagonistas de canales de calcio como el verapamil, por lo que investigaciones futuras deberán buscar el papel de este inhibidor de calcio en la regulación dopaminérgica del sistema con la finalidad de encontrar su mecanismo patogénico (Bondon-Guitton et al. 2011). Al respecto se ha sugerido que algunos de los fármacos que pueden producir DIP podrían estar actuando de manera indirecta y, por otro lado, podrían estar produciendo la muerte de las neuronas de la SNc en el caso de la existencia de una predisposición a desarrollar EP. También podrían estar acelerando su aparición por lo que es posible que los efectos adversos de estos fármacos no sean reversibles, y por lo tanto, se deba prohibir su uso en algunos casos, o bien monitorearlos con más cuidado (EMG, EEG).

Mecanismos iónicos que alteran el patrón temporal de disparo de las neuronas de la SNr durante el bloqueo de los receptores dopaminérgicos o después de la pérdida de dopamina

Además de las entradas sinápticas, las corrientes intrínsecas juegan un papel en el patrón de disparo de las neuronas de la SNr. Las relaciones corriente-voltaje de estas neuronas frecuentemente muestran una región de conductancia con pendiente negativa, sugiriendo que las corrientes de entrada tónicamente activas mantienen su disparo espontáneo (Atherton y Bevan 2005; Ibáñez-Sandoval et al. 2007; Lee y Tepper 2007b; Zhou et al. 2008; Lutas et al. 2016). Algunas de estas corrientes pueden estar moduladas por DA (Zhou et al. 2009; Zhou y Lee 2011).

Algunos de los componentes iónicos que participan en condiciones control también contribuyen al disparo patológico, lo que lleva a varias preguntas acerca de cómo diferentes proporciones de estos componentes pueden estar modificados durante el bloqueo de los receptores a DA. Por ejemplo, se ha observado que déficits en los canales NALCN están asociados con problemas locomotores, distonia y síndrome de “piernas inquietas” entre otros (Cochet-Bissuel et al. 2014; Lutas et al. 2016). Estas enfermedades pueden estar relacionadas con el disparo patológico de la SNr.

Aun se encuentra en debate cuáles de las corrientes que conforman a las corrientes catiónicas no específicas (NSCC) son responsables de mantener el disparo tónico, cuasi-regular de estas neuronas, pero ninguna por sí sola puede explicarlo completamente (Zhou et al. 2009; Zhou y Lee 2011; Lutas et al. 2016). Los candidatos que parecen tener un papel más importante son la corriente de sodio de fuga (NALCN) que puede ser bloqueada por FFA (Lutas et al. 2016) y los canales TRP que también se bloquean con FFA a concentraciones similares. Ambas corrientes catiónicas sustentan el mantenimiento del disparo tónico en condiciones control al mantener una corriente entrante persistente que despolariza el potencial de membrana, manteniéndolo en los valores umbral del potencial de acción (Lee y Tepper 2007b; Lee et al. 2011, 2013, Lutas et al. 2014, 2016).

Dado que nuestros registros se realizaron *in vitro* en la modalidad de célula entera, nos fue posible registrar el potencial de membrana de nuestras células en todas las condiciones donde fueron privadas de la activación de los receptores dopaminérgicos, encontramos que el potencial de membrana alcanzó valores más hiperpolarizados que en control, indicando que alguna o ambas corrientes NSCC se encontraban disminuidas. Nosotros observamos que el bloqueo de las NSCC silencia el disparo patológico tanto en el modelo de 6-OHDA como tras la aplicación de los bloqueadores de receptores D1 y D2 y produce una mayor hiperpolarización del potencial de membrana. El efecto hiperpolarizante del bloqueador en estas mismas neuronas nos sugiere que parte de estas corrientes se encontraban aun activas después de la privación de la respuesta dopaminérgica.

Las corrientes NSCC están conformadas por subgrupos de diferentes canales, por lo que sería interesante realizar estudios de proteómica y/o genética para observar si alguno de

ellos se encuentra afectado durante la EP. Al respecto se ha señalado que entre los TRP, la subespecie TRP capsaicina 3 (TRPC3) participan de manera muy importante durante el disparo control y es susceptible a regulación por DA (Zhou et al. 2008), por lo que proponemos que parte importante de la actividad, se ve afectada a la baja tras el bloqueo de los receptores dopaminérgicos así como en el modelo de la EP. Debido a que el TRPC3 es un canal catiónico no selectivo persistente, una disminución en su actividad produce hiperpolarización en el potencial de membrana. Por otro lado, es importante recalcar que otra subespecie de canal TRP, el canal TRP melastatina 2 (TRPM2), puede estar jugando un papel importante en el disparo patológico ya se es sensible al aumento de Ca^{2+} intracelular y a H_2O_2 (Guinamard et al. 2013), los cuales se incrementan en las neuronas de la SN durante la patología de la EP. Su bloqueo revierte las ráfagas inducidas por la adición de H_2O_2 en las neuronas de la SNr (Lee et al. 2013) y además, se ha observado la expresión de una variante heterocigota del gen para este canal en pacientes de la isla Guam, los cuales tienen un alta prevalencia de EP genético (Hermosura et al. 2008). Al respecto nosotros sugerimos que cuyo se pierde la regulación dopaminérgica la actividad de esta subespecie de TRP podría estar incrementada y debido a que es un canal de tipo transitorio, sus aperturas participarían en las despolarizaciones momentáneas que dan lugar al inicio de las mesetas del potencial de membrana y el disparo en ráfagas. Dado lo anterior, una posibilidad es que en las neuronas registradas tras la aplicación de FFA se quedaran silentes debido al bloqueo de estos canales en específico (TRPM2) y la subsecuente hiperpolarización puede ser debida al bloqueo de alguna proporción de TRPC3 que aun se mantuviera activa y/o al bloqueo de canales NALCN. Estas preguntas podrían ser respondidas con el desarrollo de bloqueadores específicos para cada canal.

De manera similar al efecto del FFA observamos que el bloqueo de los canales Ca_v3 silencia el disparo patológico de las neuronas de la SNr. La presencia de canales Ca_v3 se ha mostrado previamente en las neuronas de la SNr (Ibáñez-Sandoval et al. 2007). Este canal está presente en varios de los tipos neuronales que tienen la capacidad de disparar en ráfagas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Park et al. 2013), mediante la generación de espigas de bajo umbral en respuesta a potenciales de membrana hiperpolarizados, en respuesta a entradas inhibitorias, produce oscilaciones de membrana,

resonancia neuronal y sincronización. Su deinactivación debido a la hiperpolarización del potencial de membrana debe de amplificar las oscilaciones en la SNr (Ibáñez-Sandoval et al. 2007). Algunos bloqueadores de el canal Ca_v3 de Ca^{2+} como la zonisamida (Okada y Kaneko 2008; Bermejo et al. 2010; Tai et al. 2011; Yang et al. 2014) decrementan la actividad en ráfagas en las neuronas del NST y mejoran los síntomas de la EP, lo que indica que el bloqueo de éste canal puede ser un buen blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad.

A pesar de que los efectos de la privación crónica de dopamina han sido descritos para las neuronas de la SNr (Sanderson et al. 1986; MacLeod et al. 1990; Murer et al. 1997; Rohlfis et al. 1997b; Walters et al. 2007; Wang et al. 2010; Lobb y Jaeger 2015), aun no se cuenta con suficiente información al respecto de los mecanismos iónicos que mantienen y participan en el disparo patológico así como si los diferentes fármacos que producen DIP actúan de la misma manera sobre estos mecanismos. La preparación aguda que utilizamos en el presente estudio puede ser de gran utilidad para poder dilucidar estos cuestionamientos y estudiar los diferentes posibles mecanismos. Por último, los datos de la presente Tesis han sido publicados en un trabajo extenso (ver anexo; Cáceres-Chávez et al., 2018).

Conclusiones

1. En condiciones control, las neuronas de la SNr son capaces de producir diferentes patrones temporales de disparo pero predomina el disparo tónico cuasi-regular.
2. Basta bloquear agudamente los receptores dopaminérgicos de las clases D1 y D2 para producir modificaciones en el patrón de disparo de las neuronas de la SNr semejantes a las producidas en el modelo 6-OHDA de la enfermedad de Parkinson.
3. Las modificaciones consisten en aumento en los patrones de disparo en ráfagas e irregular.
4. La supresión de la respuesta dopaminérgica produce una hiperpolarización del potencial de membrana y una disminución en la tasa de disparo tónica en las neuronas de la SNr.
5. El bloqueo de los canales catiónicos TRP y los catiónicos no selectivos impide la generación del disparo en ráfagas pero no se regresa al disparo tónico del control.
6. Tanto el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos con haloperidol como el producido con los bloqueadores selectivos de los receptores dopaminérgicos de las clases D1 y D2 producen modificaciones patológicas del patrón de disparo de las neuronas de la SNr lo que constituye un modelo de parkinsonismo inducido por drogas o DIP
6. Dado que la SNr es el primer blanco de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, una manera de evaluar los tratamientos farmacológicos o de implantes de células troncales sería evaluando el disparo de las neuronas de la SNr.

Referencias

- Aceves JDJ, Rueda-Orozco PE, Hernández R, Plata V, Ibañez-Sandoval O, Galarraga E, Bargas J.** Dopaminergic Presynaptic Modulation of Nigral Afferents: Its Role in the Generation of Recurrent Bursting in Substantia Nigra Pars Reticulata Neurons. *Front Syst Neurosci* 5, 2011a.
- Aceves JJ, Rueda-Orozco PE, Hernandez-Martinez R, Galarraga E, Bargas J.** Bidirectional plasticity in striatonigral synapses: A switch to balance direct and indirect basal ganglia pathways. *Learn Mem* 18: 764–773, 2011b.
- Acosta-García J, Hernández-Chan N, Paz-Bermúdez F, Sierra A, Erij D, Aceves J, Florán B.** D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H]GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 57: 725–730, 2009.
- Alavi M, Dostrovsky JO, Hodaie M, Lozano AM, Hutchison WD.** Spatial extent of beta oscillatory activity in and between the subthalamic nucleus and substantia nigra pars reticulata of Parkinson's disease patients. *Exp Neurol* 245: 60–71, 2013.
- Albin RL, Young AB, Penney JB.** The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12: 366–375, 1989.
- Alexander GE, Crutcher MD.** Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13: 266–271, 1990.
- Angulo-García D, Berke JD, Torcini A.** Cell Assembly Dynamics of Sparsely-Connected Inhibitory Networks: A Simple Model for the Collective Activity of Striatal Projection Neurons. *PLoS Comput Biol* 12: 1–29, 2016.
- Antal M, Beneduce BM, Regehr WG.** The Substantia Nigra Conveys Target-Dependent Excitatory and Inhibitory Outputs from the Basal Ganglia to the Thalamus. *J Neurosci* 34: 8032–8042, 2014.
- Aristieta A, Ruiz-Ortega JA, Miguez C, Morera-Herreras T, Ugedo L.** Neurobiology of Disease Chronic L-DOPA administration increases the firing rate but does not reverse enhanced slow frequency oscillatory activity and synchronization in substantia nigra pars reticulata neurons from 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurobiol Dis* 89: 88–100, 2016.
- Atherton JF, Bevan MD.** Ionic Mechanisms Underlying Autonomous Action Potential Generation in the Somata and Dendrites of GABAergic Substantia Nigra Pars Reticulata Neurons In Vitro. *J Neurosci* 25: 8272–8281, 2005.

- Avila I, Parr-Brownlie LC, Brazhnik E, Castañeda E, Bergstrom D a., Walters JR.** Beta frequency synchronization in basal ganglia output during rest and walk in a hemiparkinsonian rat. *Exp Neurol* 221: 307–319, 2010.
- Bakhurin KI, Mac V, Golshani P, Masmanidis SC.** Temporal correlations among functionally specialized striatal neural ensembles in reward-conditioned mice. *J Neurophysiol* 115: 1521–32, 2016.
- Bakkum DJ, Radivojevic M, Frey U, Franke F, Hierlemann A, Takahashi H.** Parameters for burst detection. *Front Comput Neurosci* 7: 193, 2014.
- Barbera G, Liang B, Zhang L, Gerfen CR, Culurciello E, Chen R, Li Y, Lin D-T.** Spatially Compact Neural Clusters in the Dorsal Striatum Encode Locomotion Relevant Information. *Neuron* 92: 202–213, 2016.
- Barter JW, Castro S, Sukharnikova T, Rossi MA, Yin HH.** The role of the substantia nigra in posture control. *Eur J Neurosci* 39: 1465–1473, 2014.
- Barter JW, Li S, Sukharnikova T, Rossi MA, Bartholomew RA, Yin HH.** Basal Ganglia Outputs Map Instantaneous Position Coordinates during Behavior. *J Neurosci* 35: 2703–2716, 2015.
- Baufreton J, Bevan MD.** D2-like dopamine receptor-mediated modulation of activity-dependent plasticity at GABAergic synapses in the subthalamic nucleus. *J Physiol* 586: 2121–2142, 2008.
- Baufreton J, Garret M, Rivera A, de la Calle A, Gonon F, Dufy B, Bioulac B, Taupignon A.** D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *J Neurosci* 23: 816–25, 2003.
- Beaulieu J-M, Gainetdinov RR.** The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev* 63: 182–217, 2011.
- Bellucci A, Mercuri NB, Venneri A, Faustini G, Longhena F, Pizzi M, Missale C, Spano P.** Parkinson's disease: From synaptic loss to connectome dysfunction. *Neuropathol Appl Neurobiol* 42: 77–94, 2016.
- Belujon P, Lodge DJ, Grace AA.** Aberrant striatal plasticity is specifically associated with dyskinesia following levodopa treatment. *Mov Disord* 25: 1568–76, 2010.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR.** The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism [Online]. *J Neurophysiol* 72: 507–520, 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7983515>.
- Bermejo PE, Ruiz-Huete C, Anciones B.** Zonisamide in managing impulse control disorders in Parkinson's disease. *J Neurol* 257: 1682–1685, 2010.

- Beurrier C, Ben-Ari Y, Hammond C.** Preservation of the direct and indirect pathways in an in vitro preparation of the mouse basal ganglia. *Neuroscience* 140: 77–86, 2006.
- Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson CJ.** Move to the rhythm: Oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci* 25: 525–531, 2002.
- Bezsudnov I V., Snarskii AA.** From the time series to the complex networks: The parametric natural visibility graph. *Phys A Stat Mech its Appl* 414: 53–60, 2014.
- Bingmer M, Schiemann J, Roeper J, Schneider G.** Measuring burstiness and regularity in oscillatory spike trains. *J Neurosci Methods* 201: 426–437, 2011.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD.** Synaptic organisation of the basal ganglia [Online]. *J Anat* 196 (Pt 4: 527–542, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10923985>.
- Bondon-Guitton E, Perez-Lloret S, Bagheri H, Brefel C, Rascol O, Montastruc JL.** Drug-induced parkinsonism: A review of 17 years' experience in a regional pharmacovigilance center in France. *Mov Disord* 26: 2226–2231, 2011.
- Boyson SJ, McGonigle P, Molinoff PB.** Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain [Online]. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 6: 3177–3188, 1986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3534157>.
- Brazhnik E, Cruz A V., Avila I, Wahba MI, Novikov N, Ilieva NM, McCoy AJ, Gerber C, Walters JR.** State-dependent spike and local field synchronization between motor cortex and substantia nigra in hemiparkinsonian rats. *J Neurosci* 32: 7869–7880, 2012.
- Cáceres-Chávez VA, Hernández-Martínez R, Pérez-Ortega J, Herrera-Valdez MA, Aceves JJ, Galarraga E, Bargas J.** 2018. Acute dopamine receptor blockade in substantia nigra pars reticulata: a possible model for drug-induced Parkinsonism. *J Neurophysiol* 120: 2922–2938.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Bargas J.** Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99: 1435–1450, 2008.
- Chen CC, Hsu YT, Chan HL, Chiou SM, Tu PH, Lee ST, Tsai CH, Lu CS, Brown P.** Complexity of subthalamic 13-35 Hz oscillatory activity directly correlates with clinical impairment in patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol* 224: 234–240, 2010.
- Cheramy A, Leviel V, Glowinski J.** Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. [Online]. *Nature* 289: 537–42, 1981a. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6258083> [10 May 2017].

- Cheramy A, Leviel V, Glowinski J.** Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289: 537–542, 1981b.
- Cochet-Bissuel M, Lory P, Monteil A.** The sodium leak channel, NALCN, in health and disease. *Front Cell Neurosci* 8: 1–17, 2014.
- Cooper AJ, Stanford IM.** Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABAA IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41: 62–71, 2001.
- Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, Costa RM.** Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494: 238–242, 2014.
- Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ.** Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9: 251–259, 2006.
- Degos B.** Neuroleptic-Induced Catalepsy: Electrophysiological Mechanisms of Functional Recovery Induced by High-Frequency Stimulation of the Subthalamic Nucleus. *J Neurosci* 25: 7687–7696, 2005.
- Deniau JM, Menetrey a., Charpier S.** The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: Segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *Neuroscience* 73: 761–781, 1996.
- Edgerton JR, Jaeger D.** Optogenetic activation of nigral inhibitory inputs to motor thalamus in the mouse reveals classic inhibition with little potential for rebound activation. *Front Cell Neurosci* 8: 36, 2014.
- Fan KY, Baufreton J, Surmeier DJ, Chan CS, Bevan MD.** Proliferation of External Globus Pallidus-Subthalamic Nucleus Synapses following Degeneration of Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci* 32: 13718–13728, 2012.
- Freeze BS, Kravitz A V, Hammack N, Berke JD, Kreitzer AC.** Control of Basal Ganglia Output by Direct and Indirect Pathway Projection Neurons. *J Neurosci* 33: 18531–18539, 2013.
- French IT, Muthusamy KA.** A Review of the Pedunculopontine Nucleus in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 10: 99, 2018.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR.** D1 and D2 dopamine receptor regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science (80-)* 250: 1429–1432, 1990.
- Gerfen CRR, Surmeier DJ.** Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 2: 441–466, 2011.

- González-Hernández T, Rodríguez M.** Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol* 421: 107–135, 2000.
- Graybiel AM.** Basal ganglia: New therapeutic approaches to Parkinson's disease. *Curr Biol* 6: 368–371, 1996.
- Graybiel AM.** The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol* 15: 638–644, 2005.
- Grillner S, Markram H, De Schutter E, Silberberg G, LeBeau FEN.** Microcircuits in action--from CPGs to neocortex. *Trends Neurosci* 28: 525–533, 2005.
- Grillner S, Wallén P, Saitoh K, Kozlov A, Robertson B.** Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates--an overview. *Brain Res Rev* 57: 2–12, 2008.
- Guinamard R, Simard C, Del Negro C.** Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacol Ther* 138: 272–284, 2013.
- Hadipour-Niktarash A, Rommelfanger KS, Masilamoni GJ, Smith Y, Wichmann T.** Extrastriatal D2-like receptors modulate basal ganglia pathways in normal and parkinsonian monkeys. *J Neurophysiol* 107: 1500–1512, 2012.
- Hermosura MC, Cui AM, Go RC V, Davenport B, Shetler CM, Heizer JW, Schmitz C, Mocz G, Garruto RM, Perraud A-L.** Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18029–34, 2008.
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ.** 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: 8987–8995, 2000.
- Hikosaka O.** GABAergic output of the basal ganglia. *Prog Brain Res* 160: 209–26, 2007.
- Hutchison WD, Dostrovsky JO, Walters JR, Courtemanche R, Borraud T, Goldberg J, Brown P.** Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci* 24: 9240–9243, 2004.
- Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G.** Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res* 162: 1–10, 2005.
- Ibáñez-Sandoval O, Carrillo-Reid L, Galarraga E, Tapia D, Mendoza E, Gomora JC, Aceves J, Bargas J.** Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: possible

relevance for Parkinson disease. *J Neurophysiol* 98: 2311–2323, 2007.

Ibañez-Sandoval O, Hernández A, Florán B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erij D, Aceves J, Bargas J, Flora B. Control of the Subthalamic Innervation of Substantia Nigra Pars Reticulata by D 1 and D 2 Dopamine Receptors Control of the Subthalamic Innervation of Substantia Nigra Pars Reticulata by D 1 and D 2 Dopamine Receptors. *J Neurophysiol* : 1800–1811, 2006.

Izhikevich EM, Desai NS, Walcott EC, Hoppensteadt FC. Bursts as a unit of neural information: Selective communication via resonance. *Trends Neurosci* 26: 161–167, 2003.

Jaidar O, Carrillo-Reid L, Hernandez A, Drucker-Colin R, Bargas J, Hernandez-Cruz A. Dynamics of the Parkinsonian Striatal Microcircuit: Entrainment into a Dominant Network State. *J Neurosci* 30: 11326–11336, 2010.

Javoy-Agid F, Taquet H, Ploska A, Cherif-Zahar C, Ruberg M, Agid Y. Distribution of catecholamines in the ventral mesencephalon of human brain, with special reference to Parkinson's disease [Online]. *J Neurochem* 36: 2101–2105, 1981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7241152>.

de Jesús Aceves J, Rueda-Orozco PE, Hernández R, Plata V, Ibañez-Sandoval O, Galarraga E, Bargas J, de Jesús Aceves J, Rueda-Orozco PE, Hernández R, Plata V, Ibañez-Sandoval O, Galarraga E, Bargas J. Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons. *Front Syst Neurosci* 5: 6, 2011.

Jin X, Costa RM. Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning. *Nature* 466: 457–462, 2010.

Jin X, Costa RM. Shaping action sequences in basal ganglia circuits. *Curr Opin Neurobiol* 33: 188–196, 2015.

Kemp JM, Powell TP. The termination of fibres from the cerebral cortex and thalamus upon dendritic spines in the caudate nucleus: a study with the Golgi method. [Online]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262: 429–39, 1971. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4107496> [10 May 2017].

Kim N, Barter JW, Sukharnikova T, Yin HH. Striatal firing rate reflects head movement velocity. *Eur J Neurosci* 40(10):3481–3490, 2014.

Klaus A, Martins GJ, Paixao VB, Zhou P, Paninski L, Costa RM. The Spatiotemporal Organization of the Striatum Encodes Action Space. *Neuron* 96: 949, 2017.

Kliem M A., Pare J-FF, Khan ZU, Wichmann T, Smith Y. Ultrastructural localization and function of dopamine D1-like receptors in the substantia nigra pars reticulata and the

internal segment of the globus pallidus of parkinsonian monkeys. *Eur J Neurosci* 31: 836–851, 2010.

Kliem MA, Maidment NT, Ackerson LC, Chen S, Smith Y, Wichmann T. Activation of nigral and pallidal dopamine D1-like receptors modulates basal ganglia outflow in monkeys. *J Neurophysiol* 98: 1489–500, 2007.

Ko D, Wilson CJ, Lobb CJ, Paladini C a. Detection of bursts and pauses in spike trains. *J Neurosci Methods* 211: 145–158, 2012.

Kravitz AV V, Freeze BSS, Parker PRLRL, Kay K. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466: 622–626, 2010.

Lacasa L, Luque B, Ballesteros F, Luque J, Nuno JC. From time series to complex networks: the visibility graph. *Proc Natl Acad Sci* 105: 4972–4975, 2008.

Lee CR, Machold RP, Witkovsky P, Rice ME. TRPM2 Channels Are Required for NMDA-Induced Burst Firing and Contribute to H₂O₂-Dependent Modulation in Substantia Nigra Pars Reticulata GABAergic Neurons. *J Neurosci* 33: 1157–1168, 2013.

Lee CR, Tepper JM. Morphological and Physiological Properties of Parvalbumin- and Acidergic Neurons in the Substantia Nigra. 972: 958–972, 2007a.

Lee CR, Tepper JM. A Calcium-Activated Nonselective Cation Conductance Underlies the Plateau Potential in Rat Substantia Nigra GABAergic Neurons. *J Neurosci* 27: 6531–6541, 2007b.

Lee CR, Witkovsky P, Rice ME. Regulation of Substantia Nigra Pars Reticulata GABAergic Neuron Activity by H₂O₂ via Flufenamic Acid-Sensitive Channels and KATP Channels. *Front Syst Neurosci* 5: 14, 2011.

Lee J II, Shin HJ, Nan DH, Kim JS, Hong SC, Shin HJ, Park K, Eoh W, Kim JH, Lee WY. Increased burst firing in substantia nigra pars reticulata neurons and enhanced response to selective D2 agonist in hemiparkinsonian rats after repeated administration of apomorphine. *J Korean Med Sci* 16: 636–642, 2001.

Lee SH, Kim HK, Lee YG, Lyoo CH, Ahn SJ, Lee MS. Clinical Features Indicating Nigrostriatal Dopaminergic Degeneration in Drug-Induced Parkinsonism. *J Mov Disord* 10: 35–39, 2017.

Lemaire N, Hernandez LF, Hu D, Kubota Y, Howe MW, Graybiel AM. Effects of dopamine depletion on LFP oscillations in striatum are task- and learning-dependent and selectively reversed by L-DOPA. *Proc Natl Acad Sci* 109: 18126–18131, 2012.

Lobb CJ, Jaeger D. Bursting activity of substantia nigra pars reticulata neurons in mouse parkinsonism in awake and anesthetized states. *Neurobiol Dis* 75: 177–185, 2015.

- López-Sendón J, Mena MA, G de Yébenes J.** Drug-induced parkinsonism. *Expert Opin Drug Saf* 12: 487–496, 2013.
- Lourens MAJ, Schwab BC, Nirody JA, Meijer HGE, van Gils SA.** Exploiting pallidal plasticity for stimulation in Parkinson's disease. *J Neural Eng* 12: 26005, 2015.
- Lutas A, Birnbaumer L, Yellen G.** Metabolism regulates the spontaneous firing of substantia nigra pars reticulata neurons via KATP and nonselective cation channels. *J Neurosci* 34: 16336–47, 2014.
- Lutas A, Lahmann C, Soumillon M, Yellen G.** The leak channel NALCN controls tonic firing and glycolytic sensitivity of substantia nigra pars reticulata neurons. *Elife* 5: 1–19, 2016.
- MacLeod NK, Ryman A, Arbuthnott GW.** Electrophysiological properties of nigrothalamic neurons after 6- Hydroxydopamine lesions in the rat. *Neuroscience* 38: 447–456, 1990.
- Mallet N, Pogosyan A, Márton LF, Bolam JP, Brown P, Magill PJ.** Parkinsonian beta oscillations in the external globus pallidus and their relationship with subthalamic nucleus activity. *J Neurosci* 28: 14245–58, 2008a.
- Mallet N, Pogosyan A, Sharott A, Csicsvari J, Bolam JP, Brown P, Magill PJ.** Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *J Neurosci* 28: 4795–4806, 2008b.
- Mamad O, Delaville C, Benjelloun W, Benazzouz A.** Dopaminergic control of the globus pallidus through activation of D2 receptors and its impact on the electrical activity of subthalamic nucleus and substantia nigra reticulata neurons. *PLoS One* 10: 1–16, 2015.
- Martin LP, Waszczak BL.** Dopamine D2, receptor-mediated modulation of the GABAergic inhibition of substantia nigra pars reticulata neurons. [Online]. *Brain Res* 729: 156–69, 1996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8876984> [17 Dec. 2016].
- Mastro KJ, Zitelli KT, Willard AM, Leblanc KH, Kravitz A V., Gittis AH.** Cell-specific pallidal intervention induces long-lasting motor recovery in dopamine-depleted mice. *Nat Neurosci* 20: 815–823, 2017.
- Matuszewich L, Yamamoto BK.** Modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra. *Synapse* 32: 29–36, 1999.
- Maurice N, Deltheil T, Melon C, Degos B, Mourre C, Amalric M, Goff LK Le.** Bee venom alleviates motor deficits and modulates the transfer of cortical information through the basal ganglia in rat models of Parkinson's disease. *PLoS One* 10: 1–18, 2015.
- Maurice N, Thierry A-M, Glowinski J, Deniau J-M.** Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 23: 9929–9936, 2003.

- Meltzer HY.** Update on Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. *Annu Rev Med* 64: 393–406, 2013.
- Migueluez C, Morin S, Martinez A, Goillandeau M, Bezard E, Bioulac B, Baufreton J.** Altered pallido-pallidal synaptic transmission leads to aberrant firing of globus pallidus neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Physiol* 590: 5861–75, 2012.
- Miller WC, DeLong MR.** Parkinsonian symptomatology. An anatomical and physiological analysis. *Ann N Y Acad Sci* 515: 287–302, 1988.
- Mink JW.** The Basal Ganglia and Involuntary Movements. *Arch Neurol* 60: 1365, 2003.
- Misgeld U.** Innervation of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318: 107–114, 2004.
- Morelli M, Porceddu ML, Imperato A, Di Chiara G.** Role of substantia nigra pars reticulata neurons in the expression of neuroleptic-induced catalepsy. *Brain Res* 217: 375–379, 1981.
- Mukilan D, Praveen D, Chowdary PR, Aanandhi MV.** Drug-induced parkinsonism : A review. *Drug Invent Today* 10: 212–215, 2018.
- Munhoz RP, Bertucci Filho D, Teive HAG.** Not all drug-induced parkinsonism are the same: the effect of drug class on motor phenotype. *Neurol. Sci.* (2017). doi: 10.1007/s10072-016-2771-y.
- Murer MG, Riquelme LA, Tseng KY, Pazo JH.** Substantia nigra pars reticulata single unit activity in normal and 60HDA-lesioned rats: Effects of intrastriatal apomorphine and subthalamic lesions. *Synapse* 27: 278–293, 1997.
- Murer MG, Tseng KY, Kasanetz F, Belluscio M, Riquelme LA.** Brain oscillations, medium spiny neurons, and dopamine. *Cell Mol Neurobiol* 22: 611–632, 2002.
- Nieoullon A, Cheramy A, Glowinski J.** Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra. *Nature* 266: 375–377, 1977.
- Obeso J a., Marin C, Rodriguez-Oroz C, Blesa J, Benitez-Temiño B, Mena-Segovia J, Rodríguez M, Olanow CW.** The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Ann Neurol* 64 Suppl 2: S30---46, 2008.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Stamelou M, Bhatia KP, Burn DJ.** The expanding universe of disorders of the basal ganglia. *Lancet* 384: 523–531, 2014.
- Okada M, Kaneko S.** Different Mechanisms Underlying the Antiepileptic and Antiparkinsonian Effects of Zonisamide. *Brain*. .
- Parent A, Smith Y.** Differential dopaminergic innervation of the two pallidal segments in the

squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain Res* 426: 397–400, 1987.

Park Y-G, Kim J, Kim D. The potential roles of T-type Ca²⁺ channels in motor coordination. *Front Neural Circuits* 7: 172, 2013.

Parker PRL, Lalive AL, Kreitzer AC. Pathway-Specific Remodeling of Thalamostriatal Synapses in Parkinsonian Mice. *Neuron* 89: 734–740, 2016.

Peng Y, Zhao J, Gu Q-HH, Chen R-QQ, Xu Z, Yan J-ZZ, Wang S-HH, Liu S-YY, Chen Z, Lu W. Distinct trafficking and expression mechanisms underlie LTP and LTD of NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Hippocampus* 20: 646–658, 2010.

Pérez-Garci E, Bargas J, Galarraga E. The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14: 1253–1256, 2003.

Pérez-Ortega J, Bargas J. Changes in the Striatal Network Connectivity in Parkinsonian and Dyskinetic Rodent Models in Changes in the Striatal Network Connectivity Parkinsonian and Dyskinetic Rodent Models Jesús Pérez-Ortega and José Bargas. , 2018.

Pogosyan a, Yoshida F, Chen CC, Martinez-Torres I, Foltynie T, Limousin P, Zrinzo L, Hariz MI, Brown P. Parkinsonian impairment correlates with spatially extensive subthalamic oscillatory synchronization. *Neuroscience* 171: 245–257, 2010.

Quiroga-Varela A, Walters JR, Brazhnik E, Marin C, Obeso J a. What basal ganglia changes underlie the parkinsonian state? The significance of neuronal oscillatory activity. *Neurobiol. Dis.* 58Elsevier Inc.: 242–248, 2013.

Redgrave P, Marrow L, Dean P. Topographical organization of the nigrotectal projection in rat: Evidence for segregated channels. *Neuroscience* 50: 571–595, 1992.

Richards CD, Shiroyama T, Kitai ST. Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 80: 545–557, 1997.

Robin K, Maurice N, Degos B, Deniau JM, Martinerie J, Pezard L. Assessment of bursting activity and interspike intervals variability: A case study for methodological comparison. *J Neurosci Methods* 179: 142–149, 2009.

Rohlf A, Nikkhah G, Rosenthal C, Rundfeldt C. Hemispheric asymmetries in spontaneous firing characteristics of substantia nigra pars reticulata neurons following a unilateral 6-hydroxydopamine lesion of the rat nigrostriatal pathway. *Brain Res* 761: 352–356, 1997a.

Rohlf A, Nikkhah G, Rosenthal C, Rundfeldt C, Brandis A, Samii M, Löscher W. Hemispheric asymmetries in spontaneous firing characteristics of substantia nigra pars reticulata neurons following a unilateral 6-hydroxydopamine lesion of the rat nigrostriatal

pathway. *Brain Res* 761: 352–356, 1997b.

- Rommelfanger KS, Wichmann T.** Extrastriatal dopaminergic circuits of the basal ganglia. *Front Neuroanat* 4: 1–17, 2010.
- Rosales MG, Martinez-Fong D, Morales R, Nuñez A, Flores G, Góngora-Alfaro JL, Flóran B, Aceves J.** Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study. [Online]. *Neuroscience* 80: 803–10, 1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276495> [17 Dec. 2016].
- Rossi MA, Fan D, Barter JW, Yin HH.** Bidirectional Modulation of Substantia Nigra Activity by Motivational State. *PLoS One* 8: 1–15, 2013.
- Rueda-Orozco, P.E., Mendoza, E., Hernandez, R., Aceves, J.J., Ibanez-Sandoval, O., Galarraga, E., Bargas, J.** Diversity in long-term synaptic plasticity at inhibitory synapses of striatal spiny neurons. *Learn. Memory*, 16, 474–478, 2009.
- Rueda-Orozco PE, Robbe D.** The striatum multiplexes contextual and kinematic information to constrain motor habits execution. *Nat Neurosci.* 18(3):453-60, 2015.
- Ruffieux A, Schultz W.** Dopaminergic activation of reticulata neurones in the substantia nigra. *Nature* 285: 240–241, 1980.
- Sanderson P, Mavoungou R, Albe-Fessard D.** Changes in substantia nigra pars reticulata activity following lesions of the substantia nigra pars compacta. *Neurosci Lett* 67: 25–30, 1986.
- Schmidt R, Leventhal DK, Mallet N, Chen F, Berke JD.** Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nat Neurosci* 16: 1118–1124, 2013.
- Schultz W.** Activity of pars reticulata neurons of monkey substantia nigra in relation to motor, sensory, and complex events [Online]. *J Neurophysiol* 55: 660–677, 1986.
- Shen KZ, Johnson SW.** Subthalamic stimulation evokes complex EPSCs in the rat substantia nigra pars reticulata in vitro. *J Physiol* 573: 697–709, 2006.
- Smith Y, Villalba R.** Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: An overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov. Disord.* 23(2008a).
- Smith Y, Villalba R.** Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord* 23 Suppl 3: S534–47, 2008b.
- Snarskii AA, Bezudnov I V.** Phase transition in the parametric natural visibility graph. *Phys Rev E* 94: 042137, 2016.

- Tai CH, Yang YC, Pan MK, Huang CS, Kuo CC.** Modulation of subthalamic T-type Ca²⁺ channels remedies locomotor deficits in a rat model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 121: 3289–3305, 2011.
- Takakusaki K, Habaguchi T, Ohtinata-Sugimoto J, Saitoh K, Sakamoto T.** Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: A new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience* 119: 293–308, 2003.
- Tecuapetla F, Matias S, Dugue GP, Mainen ZF, Costa RM.** Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nat Commun* 5: 1–10, 2014.
- Thompson JA, Lanctin D, Ince NF, Abosch A.** Clinical implications of local field potentials for understanding and treating movement disorders. *Stereotact Funct Neurosurg* 92: 251–263, 2014.
- Timmerman W, Abercrombie ED.** Amphetamine-induced release of dendritic dopamine in substantia nigra pars reticulata: D1-mediated behavioral and electrophysiological effects. *Synapse* 23: 280–91, 1996.
- Trevitt T, Carlson B, Correa M, Keene A, Morales M, Salamone JD.** Interactions between dopamine D1 receptors and gamma-aminobutyric acid mechanisms in substantia nigra pars reticulata of the rat: neurochemical and behavioral studies. *Psychopharmacology (Berl)* 159: 229–37, 2002.
- Tseng KY, Kasanetz F, Kargieman L, Pazo JH, Murer MG, Riquelme LA.** Subthalamic nucleus lesions reduce low frequency oscillatory firing of substantia nigra pars reticulata neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 904: 93–103, 2001.
- Tsumori T, Yokota S, Ono K, Yasui Y.** Synaptic organization of GABAergic projections from the substantia nigra pars reticulata and the reticular thalamic nucleus to the parafascicular thalamic nucleus in the rat. [Online]. *Brain Res* 957: 231–41, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445965> [4 Dec. 2018].
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW.** Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24: 485–493, 1970.
- Walters JR, Hu D, Itoga CA, Parr-Brownlie LC, Bergstrom DA.** Phase relationships support a role for coordinated activity in the indirect pathway in organizing slow oscillations in basal ganglia output after loss of dopamine. *Neuroscience* 144: 762–776, 2007.
- Wang Y, Zhang QJ, Liu J, Ali U, Gui ZH, Hui YP, Chen L, Wang T.** Changes in firing rate and pattern of GABAergic neurons in subregions of the substantia nigra pars reticulata in rat models of Parkinson's disease. *Brain Res* 1324: 54–63, 2010.

- Waszczak BL, Walters JR.** Dopamine modulation of the effects of gamma-aminobutyric acid on substantia nigra pars reticulata neurons [Online]. *Science* (80-) 220: 218–221, 1983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6828891> [10 May 2017].
- Weick BG, Walters JR.** Effects of D1 and D2 dopamine receptor stimulation on the activity of substantia nigra pars reticulata neurons in 6-hydroxydopamine lesioned rats: D1/D2 coactivation induces potentiated responses. *Brain Res* 405: 234–246, 1987.
- Weinberger M, Dostrovsky JO.** A basis for the pathological oscillations in basal ganglia: The crucial role of dopamine. *Neuroreport* 22: 151–156, 2011.
- Wichmann T, Smith Y.** Extrastriatal plasticity in parkinsonism. *Basal Ganglia* 3: 5–8, 2013.
- Wilson CJ.** Active decorrelation in the basal ganglia. *Neuroscience* 250C: 467–482, 2013.
- Yang YC, Tai CH, Pan MK, Kuo CC.** The T-type calcium channel as a new therapeutic target for Parkinson's disease. *Pflugers Arch* 466: 747–755, 2014.
- Yin HH, Knowlton BJ.** The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* 7: 464–76, 2006.
- Zhou F-M, Lee CR.** Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience* 198: 69–94, 2011.
- Zhou F-W, Jin Y, Matta SG, Xu M, Zhou F-M.** An Ultra-Short Dopamine Pathway Regulates Basal Ganglia Output. *J Neurosci* 29: 10424–10435, 2009.
- Zhou F-W, Matta SG, Zhou F-M.** Constitutively Active TRPC3 Channels Regulate Basal Ganglia Output Neurons. *J Neurosci* 28: 473–482, 2008.

RESEARCH ARTICLE | *Nervous System Pathophysiology*

Acute dopamine receptor blockade in substantia nigra pars reticulata: a possible model for drug-induced Parkinsonism

Verónica Alejandra Cáceres-Chávez,¹ Ricardo Hernández-Martínez,¹ Jesús Pérez-Ortega,² Marco Arieli Herrera-Valdez,³ Jose J. Aceves,⁴ Elvira Galarraga,¹ and José Bargas¹

¹División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México; ²Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México; ³Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México; and ⁴Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, México

Submitted 28 August 2018; accepted in final form 19 September 2018

Cáceres-Chávez VA, Hernández-Martínez R, Pérez-Ortega J, Herrera-Valdez MA, Aceves JJ, Galarraga E, Bargas J. Acute dopamine receptor blockade in substantia nigra pars reticulata: a possible model for drug-induced Parkinsonism. *J Neurophysiol* 120: 2922–2938, 2018. First published September 26, 2018; doi:10.1152/jn.00579.2018.—Dopamine (DA) depletion modifies the firing pattern of neurons in the substantia nigra pars reticulata (SNr), shifting their mostly tonic firing toward irregularity and bursting, traits of pathological firing underlying rigidity and postural instability in Parkinson's disease (PD) patients and animal models of Parkinsonism (PS). Drug-induced Parkinsonism (DIP) represents 20–40% of clinical cases of PS, becoming a problem for differential diagnosis, and is still not well studied with physiological tools. It may co-occur with tardive dyskinesia. Here we use in vitro slice preparations including the SNr to observe drug-induced pathological firing by using drugs that most likely produce it, DA-receptor antagonists (SCH23390 plus sulpiride), to compare with firing patterns found in DA-depleted tissue. The hypothesis is that SNr firing would be similar under both conditions, a prerequisite to the proposal of a similar preparation to test other DIP-producing drugs. Firing was analyzed with three complementary metrics, showing similarities between DA depletion and acute DA-receptor blockade. Moreover, blockade of either nonselective cationic channels or Ca_v3 T-type calcium channels hyperpolarized the membrane and abolished bursting and irregular firing, silencing SNr neurons in both conditions. Therefore, currents generating firing in control conditions are in part responsible for pathological firing. Haloperidol, a DIP-producing drug, reproduced DA-receptor antagonist firing modifications. Since acute DA-receptor blockade induces SNr neuron firing similar to that found in the 6-hydroxydopamine model of PS, output basal ganglia neurons may play a role in generating DIP. Therefore, this study opens the way to test other DIP-producing drugs.

NEW & NOTEWORTHY Dopamine (DA) depletion enhances substantia nigra pars reticulata (SNr) neuron bursting and irregular firing, hallmarks of Parkinsonism. Several drugs, including antipsychotics, antidepressants, and calcium channel antagonists, among others, produce drug-induced Parkinsonism. Here we show the first comparison between SNr neuron firing after DA depletion vs. firing found after acute blockade of DA receptors. It was found that firing in both

conditions is similar, implying that pathological SNr neuron firing is also a physiological correlate of drug-induced Parkinsonism.

dopamine; drug-induced Parkinsonism; firing patterns; ion channels; 6-OHDA; substantia nigra

INTRODUCTION

Substantia nigra reticulata (SNr) neurons are one of the outputs of basal ganglia (BG) processing used to attain motor control, and they are a target of substantia nigra compacta (SNc) dopaminergic cells (Zhou et al. 2009). They exhibit autonomous regular spiking (Atherton and Bevan 2005; Lee and Tepper 2007a; Richards et al. 1997) and some sparse bursting (Ibáñez-Sandoval et al. 2007; Wang et al. 2010). Evidence arguing for transient receptor potential (TRP), Na⁺, cation, and K_{ATP} channel participation in SNr firing is under debate (Atherton and Bevan 2005; Lee and Tepper 2007b, 2011, 2013; Lutas et al. 2014, 2016). However, none of these channels completely explain SNr neuron firing, which highly depends on metabolism (Lutas et al. 2016). In contrast, during Parkinsonism (PS), when modulation of BG neurons is lost, pathological signs include increased bursting, irregular firing, and oscillatory synchronous activity in both patients and animal models (e.g., Hutchison et al. 2004; Maurice et al. 2015; Quiroga-Varela et al. 2013; Weick and Walters 1987). Interestingly, various useful drugs induce the so-called drug-induced Parkinsonism (DIP) with similar signs. Relevant examples of drugs inducing DIP are neuroleptics, calcium channel antagonists, antidepressants, anticholinergics, anticonvulsants, and gastrointestinal prokinetics, among others (Bondon-Guitton et al. 2011; López-Sendon et al. 2013). These drugs may generate a Parkinsonian syndrome themselves, worsen Parkinson's disease (PD), or disclose PD ahead of time (Lee et al. 2017); are the second cause of PS, or ~20–40% of the cases, reaching epidemic proportions; and are frequently overlooked (López-Sendon et al. 2013; Mukilan et al. 2018). This problem is a main reason for a careful differential diagnosis. In some cases DIP may be generated a few days after a drug is administered or its dosage is changed (Mukilan et al.

Address for reprint requests and other correspondence: J. Bargas, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Univ. Nacional Autónoma de México, México City, México 04510 (e-mail: jbargas@ifc.unam.mx).