



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

INTEGRACIÓN DE LA VÍA DIRECTA E INDIRECTA EN LA ACTIVIDAD DE LA
SUSTANCIA NIGRA RETICULATA DE LOS GANGLIOS BASALES Y SU
MODULACIÓN POR CANNABINOIDES

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANA SILVIA BÁEZ CORDERO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. PAVEL E. RUEDA OROZCO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. JOSÉ GERARDO ROJAS PILONI
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA-UNAM

Dr. RANIER GUTIÉRREZ MENDOZA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA CINVESTAV-IPN

JURIQUILLA, QUERÉTARO. NOVIEMBRE 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.

Esta tesis y proyecto experimental fue realizado en el laboratorio A-02 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, supervisada por el Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco con el apoyo de los proyectos PAPIIT: IA201916 y IA201018; CONACyT: FC206_1702. Además del apoyo técnico de: Dra. María Teresa Peña Rangel, Augusto Cuahutli Pacheco y MVZ Martin Garza.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
Los ganglios basales.....	4
Sistemas de proyección estriatal: vía directa e indirecta	5
La sustancia <i>nigra pars reticulata</i>	7
Procesamiento sensoriomotor en la SNr	8
El sistema endocannabinoide.....	10
El receptor CB1 en la SNr	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Sujetos	16
Infecciones virales	16
Protocolos de estimulación	18
Estimulación somatosensorial	18
Estimulación óptica.....	18
Registros electrofisiológicos <i>in vivo</i>	19
Histología	20
Preparación y administración de CP55940	21
RESULTADOS	22
Caracterización de la actividad neuronal en la SNr evocada por la estimulación somatosensorial.....	22
Efectos de la activación del receptor CB1 sobre la actividad de la SNr	25
El RCB1 modula diferencialmente la información somatosensorial en la SNr	26
Manipulación optogenética de la vía directa de los GB	30
Manipulación optogenética de la vía indirecta de los ganglios basales	33
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

Los ganglios basales (BG) integran información proveniente de la corteza y el tálamo a través de dos vías, la directa e indirecta y proyectan al principal núcleo de salida de los BG, la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr). Se sabe que la SNr tiene la mayor expresión del receptor a cannabinoides tipo 1 (CB1R), por lo tanto, la convergencia de ambas vías en la SNr hace que este núcleo sea ideal para estudiar las interacciones entre ambas vías, así como su modulación cannabinérgica. Nuestro objetivo fue caracterizar la actividad de la vía directa/indirecta en la SNr y evaluar el efecto de la activación del RCB1 en su modulación. Para esto, registramos la actividad neuronal multiunitaria con arreglos de multielectrodos de alta densidad en ratas anestesiadas con uretano, donde se registraron las respuestas evocadas por la estimulación somatosensorial y óptica-específica de cada vía en la actividad neuronal de la SNr, bajo administraciones sistémicas del agonista del RCB1 CP55940 (i.p.). La estimulación somatosensorial de las extremidades anteriores produjo respuestas complejas caracterizadas por inactivaciones y activaciones transitorias que reflejan el reclutamiento de las vías directa e indirecta, y dosis diferenciales del agonista CB1 revelaron una clara disminución en el componente de la vía directa. Como resultado, el agonista CP55940 produjo un desbalance entre la actividad de la vía directa-indirecta y favoreció el aumento de las tasas de disparo ante la estimulación somatosensorial, lo que sugiere un posible mecanismo para los efectos motores producidos por los cannabinoides.

ABSTRACT

The basal ganglia (BG) integrate information from the cortex and the thalamus through the direct and indirect pathways, which project into the main output nucleus of BG, the substantia nigra pars reticulata (SNr). The SNr is known to have the highest expression of the receptor to cannabinoids type 1 (CB1R), therefore the convergence of both pathways in the SNr makes it ideal to study both, direct-indirect interactions as well as cannabinergic modulations. Our objective was to characterize the activity of direct/indirect pathways on the SNr and to evaluate the participation of the CB1R in its modulation. To this aim, we recorded multiunit activity with high-density multielectrode arrays in urethane anesthetized rats, where somatosensory and pathway-specific representations were recorded in the SNr under systemic administrations of CP55940 (i.p.). Somatosensory stimulation of the forelimbs produced complex responses characterized by transient inactivations and activations that reflected the recruitment of both, direct and indirect pathways, and differential doses of the CB1R agonist revealed a clear decrease in the direct pathway component. As a result, unbalanced direct-indirect pathway activity increased firing rates by somatosensory stimulation, suggesting a potential locus for cannabinergic motor-related effects.

INTRODUCCIÓN

El cerebro humano identifica su entorno, así como su posición espacial y lleva a cabo acciones en formas que hasta el momento ninguna máquina ha podido acercarse, esto requiere de acciones coordinadas entre los sistemas sensoriales y motores (Zador, 2019). La simple acción de patear un balón implica que la información de la superficie del cuerpo asciende a través de los relevos sensoriales del sistema nervioso a la corteza cerebral y se transforme en comandos motores que desciendan a la médula espinal para ejecutar los movimientos futuros. Estas conductas complejas, requieren la acción integrada de varios núcleos y regiones corticales. Así, la información sobre un estímulo se dirige centralmente a través de una sucesión de regiones subcorticales y luego corticales y en cada nivel de procesamiento, la información se vuelve cada vez más compleja. Además, diferentes tipos de información, incluso dentro de una única modalidad sensorial, se procesan en varias vías anatómicamente discretas.

Los ganglios basales (GB) son un conjunto de núcleos subcorticales interconectados entre sí, que integran la actividad de la corteza y el tálamo en una conducta dirigida, crucial para múltiples funciones. Entre ellas, el aprendizaje motor, la formación de hábitos, el procesamiento sensorial y la selección de acciones (Gerfen & Bolam, 2016).

El procesamiento de la información en los ganglios basales, ocurre a través de dos vías (directa e indirecta) que convergen en los núcleos de salida, y que son indispensables para la ejecución del movimiento. La sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) es el principal núcleo de salida de los GB, sus neuronas proyectan a los núcleos del tálamo ventral y el mesencéfalo dorsal, sintetizan y liberan GABA tónicamente para producir una inhibición sobre sus núcleos objetivo (Hikosaka, 2007).

Por otro lado, se sabe que la actividad de la SNr puede ser modulada por la participación del sistema endocannabinoide, ya que en este existe una alta expresión del receptor a cannabinoides de tipo 1 (RCB1) (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992). El CB1 es un receptor metabotrópico que se encuentra principalmente en las presinapsis y que, tras su activación mediante el acople a una proteína G inhibitoria, disminuye la liberación de neurotransmisor. Además, se ha observado que la administración sistémica de cannabinoides produce efectos motores bifásicos (Katsidoni, Kastellakis, & Panagis, 2013), específicamente con dosis bajas

(0.1mg/Kg de THC) se produce hiperactividad mientras que con dosis altas (1mg/Kg) hipoactividad, lo cual podría deberse a la activación del RCB1 en diferentes sistemas de neurotransmisión, ya que se ha demostrado que en la SNr, la activación del RCB1 en las terminales del núcleo subtalámico disminuye la liberación de glutamato (Szabo, Wallmichrath, Mathonia, & Pfreundtner, 2000), mientras que la activación del RCB1 en las terminales del estriado disminuye la liberación de GABA (Wallmichrath & Szabo, 2002).

Debido a los relevos en el circuito de los GB y su confluencia en la SNr, el acople entre la activación de la vía directa e indirecta, así como su modulación por parte del sistema cannabínérgico, son esenciales para producir una respuesta coordinada. Sin embargo, cómo es que la SNr integra la información, sigue siendo un enigma. Por lo que, en el presente trabajo mediante manipulaciones optogenéticas y farmacológicas estudiamos los mecanismos de integración de ambas vías en la actividad neuronal de la SNr y evaluamos los efectos de la activación del sistema cannabínérgico.

ANTECEDENTES

Los ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales que se encuentran interconectados en una serie de circuitos en paralelo (Albin, Young, & Penney, 1989). Estas conexiones actúan mediante la integración, el procesamiento y la conducción de la información proveniente de las cortezas y el tálamo para su participación en procesos motores, cognitivos y emocionales (Obeso & Lanciego, 2011). Los mecanismos específicos por los cuales el movimiento está controlado por la actividad de los GB siguen sin estar claros, sin embargo, actualmente se han planteado varias hipótesis, entre ellas, la selección y supresión de acciones, el control de la escala de movimiento, la corrección de errores motores en línea, el aprendizaje motor y la retención de habilidades motoras naturales o bien aprendidas (Turner & Desmurget, 2010).

El circuito de los GB está conformado por el núcleo caudado y el putamen, en roedores estas estructuras no se encuentran diferenciadas y reciben el nombre de estriado; el globo pálido constituido por un segmento interno (GPi) y otro externo (GPe); el núcleo subtalámico (Sth), y la sustancia nigra, en la cual se distinguen dos subnúcleos, la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) y la sustancia *nigra pars reticulata* (Groenewegen, 2003).

El estriado constituye el principal núcleo de entrada al circuito de los ganglios basales, y a su vez el GPi y la SNr representan los principales núcleos de salida de los GB, formando un circuito que proyecta la información procesada hacia el tálamo y posteriormente a la corteza cerebral (Obeso & Lanciego, 2011).

Sistemas de proyección estriatal: vía directa e indirecta

El estriado está conformado principalmente por las neuronas espinosas medianas (NEM) hasta en un 95%, que reciben ese nombre debido a sus características morfológicas, ya que tienen un cuerpo celular con un diámetro de 12 a 20 μm , moderadamente ramificado y densamente lleno de espinas dendríticas, se distribuyen de manera homogénea y son neuronas de proyección. Las aferencias de la corteza al estriado forman conexiones principalmente con las NEM, por lo que estas neuronas son consideradas el principal objetivo de entrada y la mayor proyección del estriado. Todas las NEM son neuronas inhibitorias que utilizan GABA como neurotransmisor, sin embargo, se diferencian en dos poblaciones importantes de acuerdo con sus núcleos objetivo y a diferentes fenotipos, los cuales se describirán más adelante (Gerfen & Bolam, 2016).

La población restante (5%) del estriado son interneuronas, las cuales establecen importantes contactos sinápticos con las NEM y se clasifican de acuerdo con su neuroquímica y morfología. Un grupo importante de neuronas se caracterizan por tener cuerpos celulares de gran tamaño (40 μm) y dendritas largas (Bolam, Wainer, & Smith, 1984), utilizan a la acetilcolina como neurotransmisor y electrofisiológicamente tienen un patrón de disparo continuo y constante, por lo que también se les conoce como neuronas tónicamente activas (TAN). Otra población primordial son las interneuronas GABAérgicas, que además expresan a la proteína de unión a calcio parvalbúmina, y son consideradas neuronas de disparo rápido (FSI, por sus siglas en inglés) debido a sus características neurofisiológicas, como tener un potencial de reposo hiperpolarizado, potenciales de acción con corta duración,

y disparos abruptos y repetitivos (Gerfen & Bolam, 2016). Tanto las TAN como FSI modulan la excitabilidad de las neuronas de proyección estriatal, las primeras a través de la inhibición presináptica de las entradas glutamatérgicas provenientes de la corteza, y las segundas mediante la estimulación que reciben de las neuronas piramidales corticales, que a su vez produce una inhibición sobre las NEM, por lo que en conjunto forman un complejo microcircuito intraestriatal (Obeso & Lanciego, 2011).

Entre el estriado y los núcleos de salida existen dos sistemas de proyección GABAérgicos, que surgen de dos poblaciones neuronales diferentes. El primero es la denominada vía directa, la cual se origina de las neuronas espinosas medianas que proyectan principalmente al GPi o a la SNr (núcleos de salida) con algunos axones colaterales al GPe (Figura 1 A, neurona azul), expresan predominantemente al receptor dopaminérgico D1, además de sustancia P y dinorfina como neuromoduladores (Figura 1 B, azul). Las neuronas que dan lugar al segundo sistema de proyección, expresan al receptor dopaminérgico D2, de adenosina A₂A y co-localizan con encefalina (Figura 1B). Estas neuronas no proyectan sus terminales más allá del GPe (Figura 1 A, neurona anaranjado), por lo que se denomina la vía indirecta, ya que después de hacer contacto con el GPe en un primer relevo, éste envía sus eferencias GABAérgicas al núcleo subtalámico (Sth, segundo relevo), el cual, finalmente envía sus proyecciones glutamatérgicas a los núcleos de salida (Gerfen & Bolam, 2016).

Una vez que la información es integrada en estos núcleos, posteriormente se dirige a varias regiones, de las cuales se destacan los núcleos ventral-anterior (VA), ventral-lateral (VL) y mediodorsal (MD) del tálamo (Albin et al., 1989); los cuales, a su vez forman conexiones con la corteza (principalmente motora) e influyen sobre las proyecciones que descienden desde el tallo cerebral hasta el aparato motor espinal, para la modulación del movimiento o una conducta determinada (Parent & Hazrati, 1995), y que clásicamente se ha relacionado que la actividad de la vía indirecta inhibe el movimiento, mientras que la vía directa lo favorece (Albin et al., 1989).

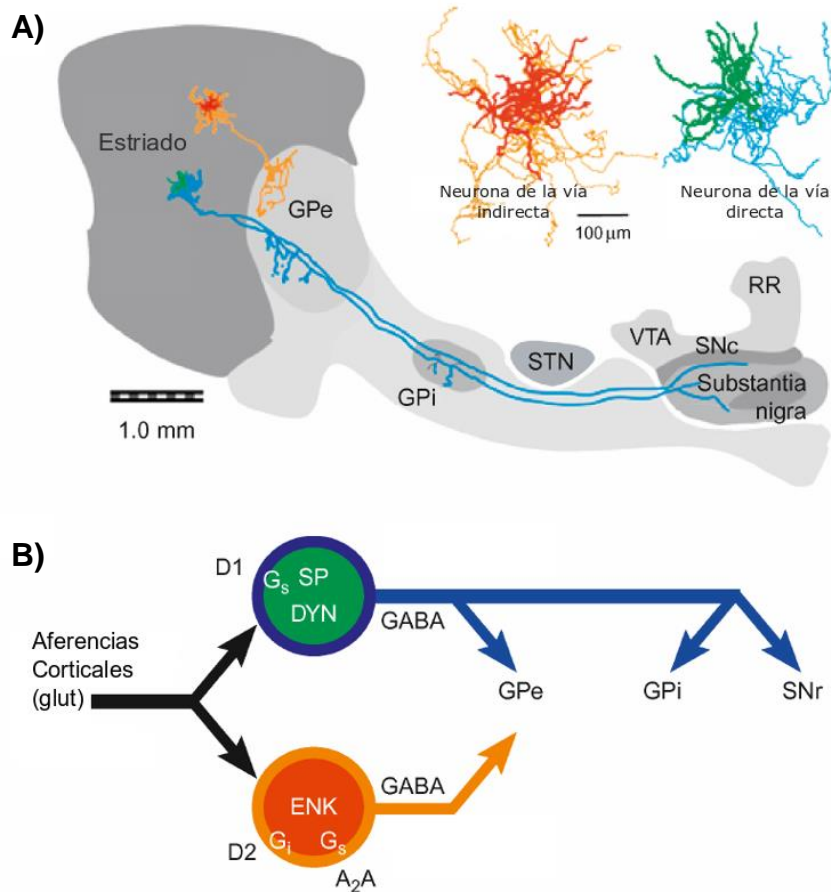


Figura 1. Esquema de las vías directa e indirecta de los ganglios basales. A) Esquema de un corte sagital de cerebro de roedor. En azul se observa una neurona representativa de la vía directa, la cual proyecta a los núcleos de salida (GPi/SNr) con algunos axones colaterales hacia el GPe. En anaranjado se representa una neurona de la vía indirecta, que proyecta un axón y se arboriza ampliamente en el GPe. Arriba a la derecha se esquematiza un aumento de estas neuronas, en rojo y verde se representan sus dendritas y en anaranjado y azul sus axones. **B)** Neuroquímica de las neuronas de las vías directa e indirecta. Ambas neuronas son GABAérgicas que reciben entradas glutamatérgicas de la corteza. Las neuronas de la vía directa (azul) expresan al receptor D1, sustancia P (SP) y dinorfina (DYN). Las neuronas de la vía indirecta (anaranjado) expresan los receptores D2, A₂A y encefalina (ENK). GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno, STN; núcleo subtalámico, SNc; sustancia nigra compacta, SNr; sustancia nigra reticulata; VTA, área ventral tegmental; RR, área retrorubral. (modificado de Gerfen & Bolam, 2016).

La sustancia nigra pars reticulata

La SNr es el principal núcleo de salida de los GB, donde se da la etapa final del procesamiento de la información dentro de este circuito. A nivel celular se caracteriza por tener neuronas de proyección GABAérgicas de disparo rápido, que integran las entradas de todos los otros núcleos de los GB y envían el mensaje elaborado por este circuito a las estructuras extrínsecas (Deniau, Mailly, Maurice, & Charpier, 2007). Las neuronas de

proyección de la SNr reciben una entrada masiva de GABA principalmente de las neuronas estriado-nigrales (vía directa), pero también una entrada adicional importante de las proyecciones del GPe (vía indirecta), por otro lado, también recibe aferencias glutamatérgicas del Sth (vía indirecta). A su vez, la SNr proyecta al tálamo, el colículo superior, el cerebro medio y la formación reticular pontina, para producir una inhibición tónica a sus núcleos objetivo (Zhou, 2016). Además de proyectar a los núcleos extrínsecos, se sabe que las neuronas de la SNr forman axones colaterales que proyectan de vuelta a la sustancia nigra, proporcionando una retroalimentación intrínseca que regula la salida de los GB, y que además responden ante un estímulo somatosensorial, generando una respuesta fásica en su actividad neuronal (Brown, Pan, & Dudman, 2014).

Los núcleos del tálamo son objetivo de las neuronas de la SNr, estudios realizados con trazadores anterógrados y retrógrados en varias especies indican que las neuronas nigrotalámicas proyectan principalmente a los núcleos ventral anterior, mediodorsal, ventral lateral, ventromedial y ventroposterolateral (Antal, Beneduce, & Regehr, 2014; Zhou, 2016). Además, estudios realizados con trazadores anterógrados sugieren que los núcleos talámicos a los que proyecta la SNr tienen aferencias corticales y que estos participan de manera crítica en la comunicación cortical y en las funciones del control sensoriomotor (Gulcebi et al., 2012; Murray Sherman & Guillery, 2011). Por lo tanto, las proyecciones nigrotalámicas tienen una base anatómica para inhibir de manera importante las neuronas talamocorticales y afectar el procesamiento de la información cortico-tálamo-cortical e influir en el control motor y otras funciones cerebrales de una manera indirecta (Zhou, 2016). Por otro lado, la SNr también proyecta de manera importante al tallo cerebral, Takakusaki, Habaguchi, Ohtinata-Sugimoto, Saitoh, & Sakamoto (2003) demostraron que las proyecciones GABAérgicas nigrotegumentales modulan la locomoción y el tono muscular, y que los trastornos en los GB normalmente van acompañados con alteraciones en la marcha.

Procesamiento sensoriomotor en la SNr

Integrar la información sensorial y producir una salida motora adecuada son funciones elementales del sistema nervioso, y las redes neuronales implicadas a estas dos funciones están íntimamente relacionadas. Actualmente se sabe que de las múltiples funciones en las que participan los GB, todas requieren de la integración sensorial, y el núcleo que más han estudiado al respecto es el estriado dorsolateral (DLS, por sus siglas en inglés), ya que es el

principal núcleo de entrada a este circuito y que recibe múltiples entradas corticales, incluidas las cortezas sensoriales, motoras y prefrontales (Redgrave et al., 2010).

Las neuronas espinosas medianas del estriado proyectan a los núcleos de salida de los GB, a través de dos circuitos divergentes (vía directa e indirecta), con técnicas de optogenética se ha demostrado que la activación de neuronas de la vía directa facilita el movimiento, mientras que la activación de neuronas de la vía indirecta lo inhibe (Kravitz et al., 2010). Sin embargo, una teoría moderna propone que existe una sincronización coordinada entre ambas vías, ya que nuevos hallazgos han mostrado que durante la ejecución del movimiento existe una activación concurrente de las MSN en ambas vías (Cui et al., 2013), además ambos tipos neuronales son sensibles a la estimulación somatosensorial, pues Coffey, Nader, Bawa, & West (2017) mediante estimulaciones optogenéticas en el DLS de ratones transgénicos Cre-D1 o Cre-D2, les permitió identificar de manera específica a las neuronas de la vía directa o indirecta respectivamente, y observaron que ambas incrementaban su frecuencia de disparo ante la estimulación somatosensorial, respaldando la teoría de una sincronización coordinada entre la vía directa e indirecta, crítica para una adecuada ejecución del movimiento. Si bien esto aporta información importante en cuanto a la integración de los GB, poco se ha estudiado en los demás núcleos de este circuito.

Las observaciones de integración sensorial realizadas en el estriado aún no se han demostrado en otros núcleos de los GB, sin embargo, existen estudios electrofisiológicos en gatos y primates no humanos que han descrito una representación multisensorial en la SNr y que la han relacionado con el control motor (Nagy, Paróczy, Norita, & Benedek, 2005; Schultz, 1986; Schwarz, Sontag, & Wand, 1984). Además de estos hallazgos y debido a la convergencia de la vía directa e indirecta, se ha hipotetizado que las neuronas de la SNr funcionan como detectores de coincidencia de manera crítica para la integración sensoriomotora y esto permita elegir la sincronización adecuada al sistema para el control y aprendizaje motor (Aceves, Rueda-Orozco, Hernandez-Martinez, Galarraga, & Bargas, 2011).

El sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) es considerado un sistema de señalización de lípidos ubicuo, constituido por dos tipos de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas $G_{i/o}$, el CB1 y CB2, sus ligandos endógenos (endocannabinoides), la proteína de recaptura de dichos compuestos y las enzimas encargadas de su metabolismo (de Fonseca et al., 2005).

Los endocannabinoides son moléculas de señalización que se unen a receptores cannabinoides y otros receptores ionotrópicos y metabotrópicos. La anandamida y el 2-araquidonoilglicerol, los dos ejemplos mejor estudiados, se liberan bajo demanda principalmente de la postsinapsis, dependiente de la actividad de esta, a partir de precursores fosfolipídicos de membrana capaces de activar sus receptores y actuar como mensajeros retrógrados de la señalización neuronal (Figura 3). Por lo que desempeñan un papel clave en la modulación de la neurotransmisión y la plasticidad sináptica en múltiples áreas del cerebro (Giuffrida & Seillier, 2012). Los receptores CB1 se distribuyen abundantemente en el SNC, como se observa en la Figura 2, principalmente en el hipocampo, la corteza, los GB y el cerebelo (Herkenham et al., 1990).

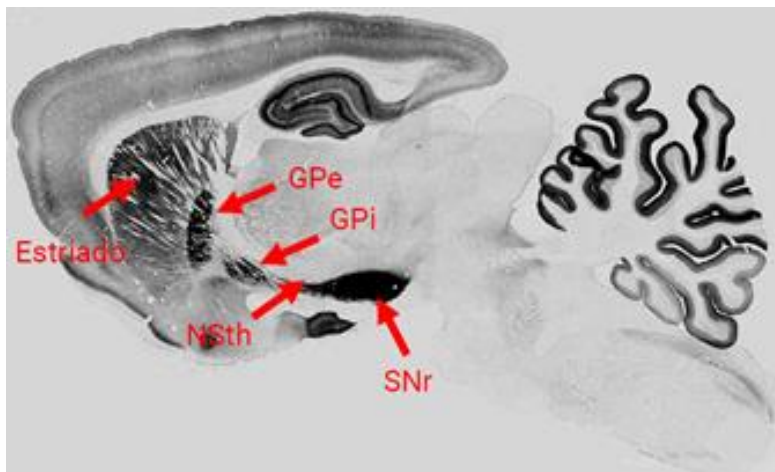


Figura 2. Receptor CB1 en cerebro de rata. Inmunohistoquímica para el RCB1 en un corte sagital de cerebro de rata. Se observa una alta expresión de la proteína en varias partes del SNC, en especial en los GB: estriado, globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPi), núcleo subtalámico (NStH), donde la sustancia *nigra reticulata* (SNr) tiene la mayor expresión (cortesía de Martínez-Vargas M y Prospéro-García O)

En el SNC, la amplia distribución de los elementos de señalización del SEC, principalmente en terminales GABAérgicas y glutamatérgicas, refleja claramente la importancia de este sistema en la transmisión sináptica (de Fonseca et al., 2005). La ubicuidad del RCB1 (Figura 2) concuerda con los efectos que ejercen los cannabinoides sobre la modulación de la función motora, debido a que la mayor densidad de estos receptores se encuentra en los GB (principalmente GPe y SNr) y cerebelo (Herkenham et al., 1990). Además, se han observado cambios en el SEC, tanto de humanos afectados por enfermedades neurodegenerativas como en roedores con trastornos motores inducidos experimentalmente, como en la enfermedad de Parkinson, lo que hace del sistema endocannabinoide una diana importante en el control del movimiento.

El receptor CB1 en la SNr

El RCB1, pertenece a la familia de receptores metabotrópicos, por lo que consta de un extremo N-terminal extracelular, 7 dominios transmembranales conectados por tres asas intracelulares y tres extracelulares, un extremo C-terminal intracelular, y se acopla principalmente a proteínas $G_{i/o}$ (Howlett, 1998). La activación del RCB1, mediante la subunidad α de la proteína G, inhibe a la enzima adenilatociclasa (Ac) y disminuye la formación de AMPc, lo cual provoca una disminución en la fosforilación por la proteína cinasa A (PKA). Por otra parte, las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína $G_{i/o}$, bloquean la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q y estimulan la apertura de los canales de K^+ (Figura 3). Estas acciones han sugerido que los receptores juegan un importante papel como moduladores de la liberación de neurotransmisores (de Fonseca et al., 2005).

La SNr es una de las regiones del cerebro con una alta expresión del RCB1 (Herkenham, Lynn, de Costa, & Richfield, 1991), pero a su vez, de las regiones con la menor cantidad de RNAm para dicho receptor (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992). Sin embargo, tanto el estriado como el Sth tienen una mayor cantidad de RNAm y una menor expresión del receptor, de tal manera que el RCB1 se sintetiza en los somas de las NEM y del núcleo Sth, pero viajan a través del axón hasta llegar a las terminales que se encuentran en la SNr (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992).

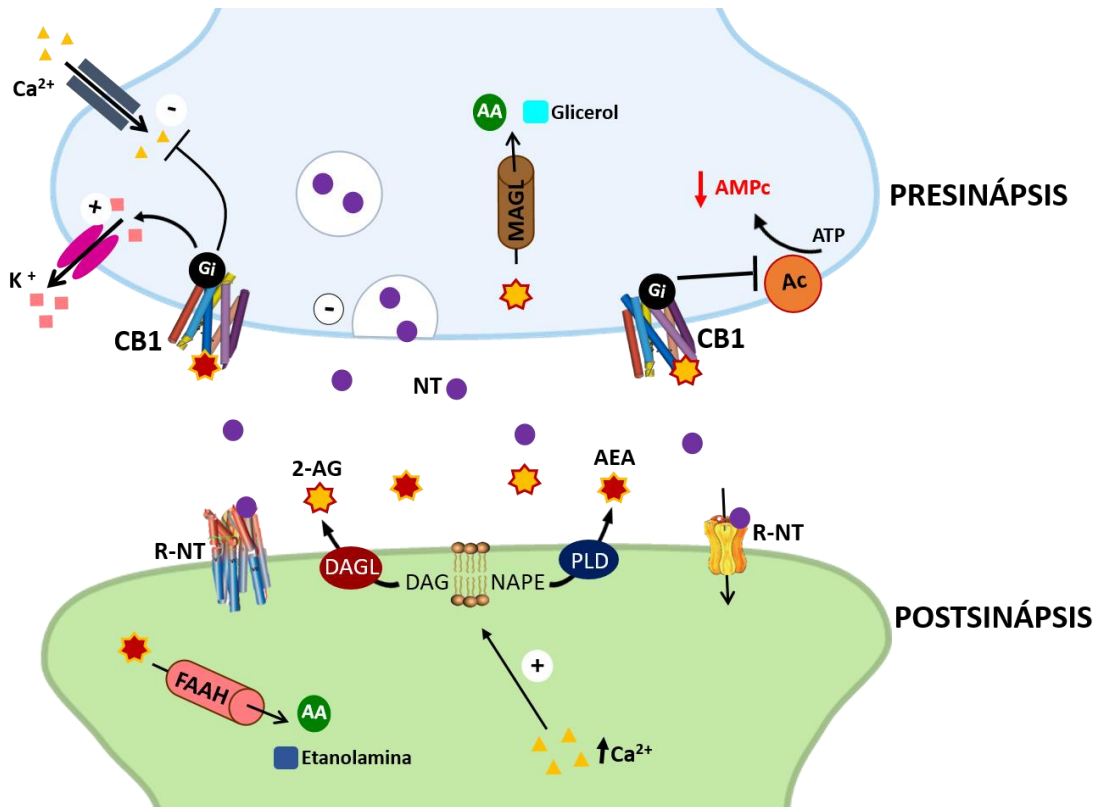


Figura 3. Señalización retrógrada de los endocannabinoides. Los endocannabinoides son sintetizados a partir de fosfolípidos de membrana en terminales postsinápticas: anandamida (AEA) se genera a partir de la hidrólisis de N-araquidilfosfatidiletanolamina (NAPE) por la acción de la fosfolipasa D (PLD); y 2-AG mediante la diacilglicerol lipasa (DAGL) a través de la hidrólisis del diacilglicerol (DAG). La AEA y el 2-AG se difunden retrógradamente hacia la presinápsis y se unen a los receptores CB1 acoplados a una proteína Gi. La unión de los cannabinoides a los RCB1 desencadena la activación de la proteína Gi, sin embargo, su activación también bloquea la actividad de los canales de Ca^{2+} y estimulan la apertura de los canales de K^{+} provocando una hiperpolarización de las terminales presinápticas, y en consecuencia disminuye la probabilidad de liberación de neurotransmisores. Los endocannabinoides son degradados por la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) que se encarga principalmente de la degradación de la anandamida para producir ácido araquidónico (AA) y etanolamina, en las membranas postsinápticas, mientras que el 2-araquidilglicerol es degradado por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) en AA y glicerol, en las membranas de neuronas presinápticas (de Fonseca et al., 2005).

La mayor expresión del RCB1 en la SNr se atribuye a las terminales de las neuronas GABAérgicas estriado-nigrales (DLS-SNr), ya que con modelos experimentales cuando se dañan dichas neuronas la expresión del RCB1 disminuye considerablemente en la SNr (Herkenham et al., 1991), además, otra pequeña porción de los RCB1 se encuentra en las terminales de las neuronas glutamatérgicas subtalámico-nigrales (Sth-SNr). En cuanto a la función que pueda tener el RCB1 en la SNr, se ha demostrado en experimentos *in vitro* que la activación de estos receptores con agonistas a cannabinoides (WIN55,212-2, CP55940) en las terminales de la vía indirecta (Sth-SNr) disminuye las corrientes postsinápticas

excitatorias (Figura 4 A) registradas en las neuronas de la SNr, debido a la disminución en la liberación de glutamato. Mientras que, la activación del RCB1 en las terminales de la vía directa (DLS-SNr), disminuye la liberación de GABA y en consecuencia también las corrientes postsinápticas inhibitorias registradas en la SNr (Szabo, Wallmichrath, Mathonia, & Pfreundtner, 2000; Wallmichrath & Szabo, 2002). Sin embargo, aún no es claro cuál es la contribución específica de la activación del RCB1 en las terminales de las vías directa e indirecta sobre la actividad poblacional de la SNr, crucial para el entendimiento de la neurofisiología de la SNr, ya que se ha propuesto que las neuronas de la SNr funcionen como compuertas lógicas con un alto nivel de integración para mantener el balance entre ambas vías de los GB (Aceves et al., 2011).

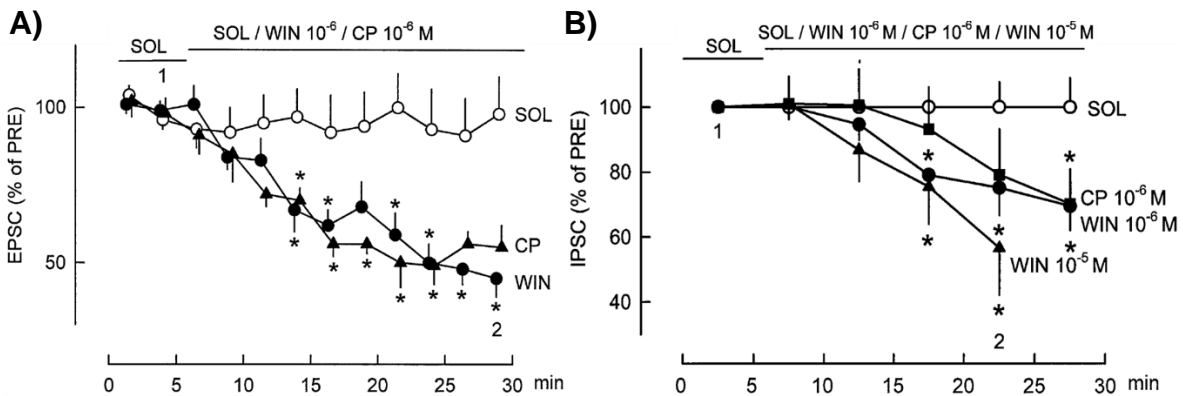


Figura 4. Efectos de los cannabinoides sobre las corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias en la SNr. A) Registro de las corrientes postsinápticas excitatorias en neuronas de la SNr bajo el efecto de los cannabinoides WIN55,212-2 y CP55940 estimulando las fibras provenientes del núcleo subtalámico, vía indirecta (Szabo et al., 2000). **B)** Registro de las corrientes postsinápticas inhibitorias en neuronas de la SNr bajo el efecto de los cannabinoides WIN55,212-2 y CP55940 estimulando las fibras de neuronas GABAérgicas, vía directa (Wallmichrath & Szabo, 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las neuronas de la SNr tienen dos características importantes, son de naturaleza GABAérgica y tienen actividad tónica, lo cual significa que los núcleos a los que llegan sus eferencias se encuentran bajo una inhibición constante (Deniau et al., 2007). Sin embargo, para ejecutar alguna acción es necesario que la actividad neuronal de la SNr se modifique, esto dependerá de la información que lleven la vía directa e indirecta de los GB y de cómo este núcleo integra la información de ambas vías, lo cual es crucial para el correcto funcionamiento del circuito (Brown et al., 2014; Freeze, Kravitz, Hammack, Berke, & Kreitzer, 2013). Actualmente existe evidencia electrofisiológica que indica que las proyecciones sensoriales a los ganglios basales (Coffey et al., 2017; Sippy, Lapray, Crochet, & Petersen, 2015) producen incrementos en la actividad de ambas, las neuronas de las vías directa e indirecta en la entrada de este circuito (estriado). Mientras que, la activación optogenética de la vía directa e indirecta produce decrementos e incrementos en la tasa de disparo de la SNr, respectivamente (Freeze et al., 2013; Kravitz et al., 2010). Sin embargo, aún se desconoce como la activación de ambas vías producida por una estimulación sensorial modula de manera específica la actividad neuronal de la SNr.

Por otro lado, la SNr tiene la más alta expresión del RCB1 (Herkenham et al., 1990), y se sabe que su activación disminuye la liberación de glutamato de las terminales de la vía indirecta (Szabo et al., 2000) o de GABA en las terminales de la vía directa (Wallmichrath & Szabo, 2002). Con base en estos antecedentes la activación del RCB1 indica posibles efectos diferenciales sobre ambas vías de los ganglios basales en la SNr. No obstante, estos efectos aún no se han caracterizado por completo *in vivo*, y lo que es más importante, aún no son claros los efectos específicos de la activación del RCB1 en cada vía y su contribución final en la salida de los GB.

En este contexto, caracterizar las contribuciones de las vías directa e indirecta a las respuestas integradas por la estimulación somatosensorial en el SNr y la contribución específica de la activación del RCB1 en este fenómeno, nos permitió estudiar la integración que lleva a cabo la SNr. Estudiar esta integración en los núcleos de salida de los GB puede ayudarnos a entender la contribución de este macrocircuito en el procesamiento sensoriomotor.

HIPÓTESIS

1. La SNr integra la información somatosensorial de las vías directa e indirecta de los GB.
2. La activación del receptor CB1 producirá efectos opuestos sobre la actividad de la SNr, de acuerdo al sistema de neurotransmisión en el que actúe. Incremento (activación del RCB1 en la vía directa) o disminución (activación del RCB1 en la vía indirecta) de la actividad neuronal.

OBJETIVO GENERAL

Registrar la actividad neuronal de la SNr *in vivo* para determinar si la estimulación somatosensorial produce activaciones de las vías directa e indirecta y evaluar los efectos de administraciones sistémicas de agonistas cannabinérgicos en estas activaciones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la actividad neuronal de la SNr en registros electrofisiológicos *in vivo* y analizar las respuestas evocadas por la estimulación somatosensorial.
2. Implementar un modelo de control optogenético (estimulación) de las vías directa e indirecta.
3. Evaluar el efecto de la administración sistémica de agonistas cannabinérgicos sobre las respuestas evocadas por la estimulación somatosensorial y optogenética en la SNr.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos

Se utilizaron ratas adultas Long Evans silvestres y Long Evans transgénicas D1-cre (LE-Tg-Drd1a-iCre-3Ottc) de entre 3 y 6 meses de edad. La línea transgénica se adquirió del Rat Resource & Research Center en la Universidad de Missouri. Los animales fueron alojados en el vivario del laboratorio A-02 dentro de cajas de policarbonato, con ciclos de luz/oscuridad de 12h, temperatura a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los protocolos de cuidado y manejo de animales fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología, UNAM y con fundamento en la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Infecciones virales

Para la estimulación optogenética, era necesario que los núcleos de interés tuvieran la expresión de una Canalrodopsina de tipo 2 (ChR2), que permite el flujo de cationes al activarse ante una estimulación óptica con una longitud de onda específica (465 nm), para ello se realizaron infecciones virales mediante cirugía estereotáxica en animal anestesiado. La anestesia se indujo con una solución de Ketamina (80mg/kg) y Xilacina (10mg/kg). Durante la cirugía se monitoreo la respiración constantemente (~2 respiraciones/segundo), así como el reflejo nociceptivo y de ser necesario, se mantuvo la anestesia con gas a bajas concentraciones de Sevofluorano (0.2-0.8 %).

Las microinyecciones de los virus fueron de un volumen de 800-1000nL para el DLS y de 500-600nL para el Sth. Se realizaron unilateralmente en las regiones de interés, tomando como referencia las coordenadas propuestas en el atlas de Paxinos & Watson (2007), para el estriado dorso lateral (AP: 0.6mm, L: 3.5mm y V: -4.4mm) y el núcleo subtalámico (AP: -3.6mm, L: 2.5mm y V: -7.9mm). Las administraciones se realizaron a través de una microjeringa Hamilton® (Neuro-Syringe 7001, 1µL) acoplada a una bomba de infusión para microjeringas (modelo WPI-UJP3) con una velocidad de 200nL/min. Una vez que terminó la administración, esperamos 10 min antes de retirar la jeringa y suturar la piel del cráneo, además se realizaron los cuidados postoperatorios pertinentes.

En relación con los objetivos planteados para este proyecto, los sitios de infección viral y de la fibra óptica, dependieron de la vía en la que se caracterizó su actividad de manera

específica. Para la manipulación optogenética de la vía indirecta utilizamos ratas silvestres que fueron infectadas con el vector viral rAAV5-CamKIIa-hChR2-(H134R)-EYFP en el Sth, último relevo de la vía indirecta. Mientras que, para la manipulación de la vía directa utilizamos ratas transgénicas D1-cre, la cuales fueron previamente identificadas como positivas a la Cre-recombinasa al analizar una muestra de tejido de su cola por PCR. Para estos animales se infectó el DLS con el virus rAAV5-EF1a-DIO-hChR2-(H134R)-EYFP, el cual promueve la expresión de la canalrodopsina únicamente en las células que expresan a la Cre-recombinasa, es decir, solo infectó a las neuronas de la vía directa ya que esta proteína se expresa bajo el promotor del receptor D1. En la Figura 5 se esquematiza la metodología empleada para la manipulación de cada vía.

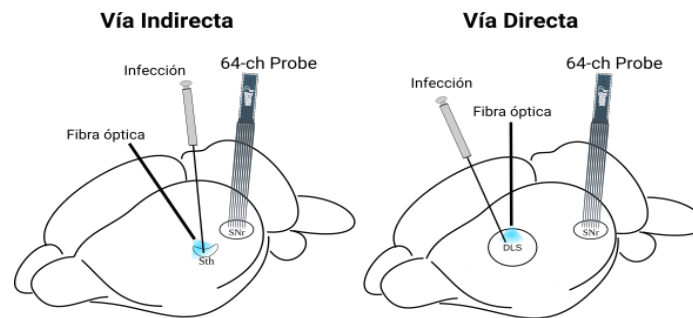


Figura 5. Esquema de las manipulaciones optogenéticas. Metodología empleada para abordar la caracterización de la estimulación de: Izquierda, vía indirecta. Infección viral e implante de la fibra óptica en el núcleo subtalámico, registro electrofisiológico en la SNr. Derecha, vía directa. Infección viral e implante de fibra óptica en el estriado dorso lateral y registro electrofisiológico en la SNr.

Todos los experimentos que implicaron estimulación optogenética, se realizaron por lo menos 3 semanas posteriores a la infección viral para asegurarnos que la expresión de la Canalrodopsina se encontrara estable. Los virus utilizados se obtuvieron de la University of North Carolina Vector Core.

Protocolos de estimulación

Estimulación somatosensorial

El modelo *in vivo* de rata anestesiada con el que trabajamos presenta actividad neuronal robusta en la corteza somatosensorial (Mochol, Hermoso-Mendizabal, Sakata, Harris, & De La Rocha, 2015) y el DLS (Hidalgo-Balbuena, Luma, Pimentel-Farfan, Peña-Rangel, & Rueda-Orozco, 2019) provocada por la estimulación sensorial, y ha sido bien documentado que los GB reciben una importante proyección sensorial. De manera particular la SNr también muestra respuestas evocadas ante la estimulación sensorial (Nagy et al., 2005), esto nos permitió evaluar la actividad en respuesta a un estímulo externo de manera fisiológica. Para ello, en algunos experimentos se colocó debajo de la palma de la extremidad superior contralateral al sitio de registro, una palanca de plástico conectada a una válvula solenoide y controlada por una entrada digital desde la computadora. En el resto de los experimentos se utilizó un electrodo bipolar insertado en la pata contralateral al sitio de registro, entre los cojinetes medial y lateral (Figura 6, y Figura 9C), los resultados electrofisiológicos de esta estimulación fueron prácticamente idénticos que la estimulación mecánica, por lo que no hicimos una distinción entre registros.

Para el protocolo de estimulación somatosensorial aplicamos 50 ensayos con un intervalo de 5 segundos. Cada ensayo consistía en un tren de 5 estímulos, cada estímulo tenía una duración de 5ms y entre cada estímulo había 300 ms de intervalo, como se esquematiza en la Figura 6.

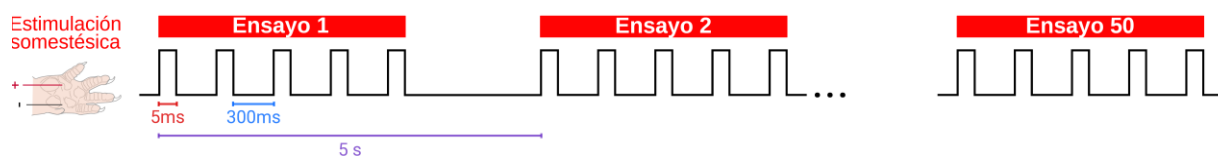


Figura 6. Protocolo de estimulación somestésica. El protocolo de estimulación somestésica consistía en 50 ensayos, en cada ensayo se aplicaba un tren de 5 estímulos, cada estímulo con una duración de 5 ms y con un intervalo entre cada estímulo de 300 ms.

Estimulación óptica

Para opto estimular los sitios de interés se utilizaron fibras ópticas con un diámetro de 200µm, que estaban conectadas a un LED de 50 µm de diámetro y que emite una luz azul

con una longitud de onda de 465 nm. De acuerdo con el objetivo de estudio, las fibras se implantaron en el DLS (AP: 0.6mm, L: 3.5mm y V: -4.2mm) o en el Sth (AP: -3.6mm, L: 2.5mm y V: -7.6mm). El protocolo de estimulación óptica se realizó con los mismos parámetros que la estimulación somestésica, excepto que la duración de cada estímulo fue de 10 ms (Figura 7).

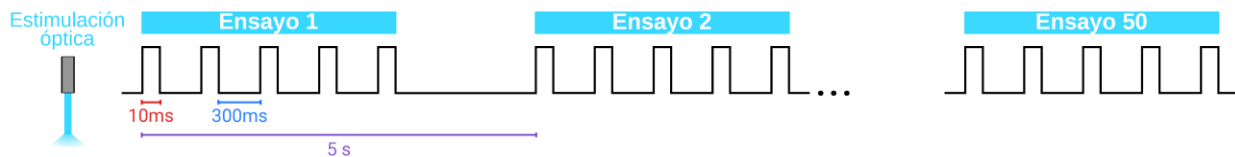


Figura 7. Protocolo de estimulación óptica. El protocolo de estimulación somestésica consistía en 50 ensayos, en cada ensayo se aplicaba un tren de 5 pulsos, cada estímulo con una duración de 10 ms y con un intervalo entre cada estímulo de 300 ms.

Registros electrofisiológicos *in vivo*

Para los registros electrofisiológicos trabajamos con un modelo en rata anestesiada con uretano. Bajo estas condiciones se pueden obtener representaciones somatosensoriales, pero no motoras (BermudezContreras et al., 2013; Hidalgo-Balbuena et al., 2019; Mochol et al., 2015), por lo que tiene la ventaja de evitar la interferencia relacionada a los circuitos motores. Para anestesiarse a las ratas utilizamos una dosis de uretano de 1.1 g/Kg (i.p.) dividida en tres inyecciones con media hora entre cada inyección. Mediante cirugía estereotáxica se realizó una craneotomía sobre la sustancia *nigra reticulata* (sitio donde se realizaron todos los registros) con un área de 2 mm x 1.8 mm y coordenadas centrales en AP: -5.5 mm y L:2.4 mm. Para introducir el arreglo de multielectrodos (sonda de silicón) de alta densidad y registrar la actividad neuronal se retiró la dura madre. Además, se implantaron dos tornillos de acero inoxidable con un diámetro de 500 μ m en el cráneo de la rata, que funcionaron como la tierra y la referencia.

Se utilizó la técnica de registros multiunitarios de alta densidad mediante los arreglos de multielectrodos, estos permiten el registro simultáneo de varias decenas de neuronas. Para ello utilizamos una sonda de silicón, modelo Buszaki-64L el cual mide 1.4 mm de ancho y 10mm de largo, con 8 puntas y en cada una de ellas se encuentran 8 microelectrodos (Figura 8), de manera que tuvimos un total de 64 canales de registro. Las señales neurofisiológicas de banda ancha (0.1-8000hz) fueron amplificadas 1000 veces mediante el sistema Intan

RHD2000 y registradas de forma continua a 20 kHz. La sonda de silicón fue insertada lentamente hasta llegar a la SNr (profundidad de 7.3 a 8.2 mm) con una orientación sagital o coronal y en ambas formas se abarcó una gran longitud de registro en dicho núcleo.

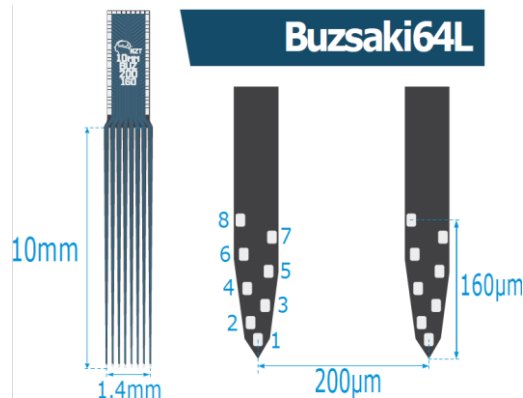


Figura 8. Sonda de silicón Buzsaki64L. Esquema representativo del arreglo de multielectrodos Buzsaki64L (NeuroNexus®). A la izquierda, se muestra el esquema completo de la sonda de silicón con 8 puntas y a la derecha, una ampliación de dos puntas y se ejemplifica la distribución de los 8 microelectrodos en cada una.

Para la visualización y procesamiento de la información recabada en los registros electrofisiológicos se utilizaron los programas Neuroscope y NDManager (<http://neurosuite.sourceforge.net>). Posteriormente se realizó spike sorting de forma semiautomática utilizando el software (<http://klustakwik.sourceforge.net>) de clustering KlustaKwik y la aplicación gráfica de spike sorting Klusters (<http://klusters.sourceforge.net>). Con estos programas obtenemos el aislamiento de neuronas individuales (Hazan, Zugaro, & Buzsáki, 2006) y posteriormente con códigos *ad hoc* en Matlab se realizaron los análisis de los resultados.

Histología

Para realizar la verificación histológica, previo a la cirugía, los electrodos fueron teñidos con el trazador fluorescente Dil (Sigma-Aldrich®) para ver el seguimiento de la sonda de silicón. Al finalizar los registros, los animales fueron administrados con una dosis letal de pentobarbital y perfundidos de manera intracardiaca, primero con 60 mL de solución salina al 0.9% y después con 60 mL de paraformaldehído al 4%, posteriormente se extrajeron los cerebros y fueron almacenados en paraformaldehído al 4%. Para la confirmación del sitio de infección y registro electrofisiológico, los cerebros fueron cortados coronalmente con un

grosor de 50 µm en un vibratomo Leica® VTS1200. Posteriormente los cortes, de los sitios de interés, fueron montados en portaobjetos gelatinizados y cubiertos con VECTASHIELD®. Las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia Axio Imager 2 ZEISS, se tomaron microfotografías de todo el corte con un enfoque 10X y se realizó la reconstrucción de la rebanada con ayuda del software ZEN 2012 LITE.

Preparación y administración de CP55940

Para la evaluación de la activación del RCB1, utilizamos el fármaco CP5590 (5-(1,1-Dimethylheptyl)-2-[5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl)cyclohexyl]-phenol) de Sigma-Aldrich® o Cayman®, para disolver el fármaco utilizamos una solución de Cremophor (Sigma-Aldrich®), DMSO (Sigma-Aldrich®) y solución salina (0.9%), en una relación de 5%:5%:90% respectivamente.

Después de haber registrado las respuestas evocadas por la estimulación somatosensorial y optogenética en la SNr como condición control, grabamos 10 minutos de la actividad neuronal basal, posteriormente administramos el cannabinoide CP55940 y grabamos nuevamente 10 minutos de actividad neuronal espontánea para evaluar el efecto de la activación del RCB1. Después, se evaluaron nuevamente las respuestas evocadas a los protocolos de estimulación, pero ahora bajo el efecto del cannabinoide. Utilizamos tres dosis diferenciales y acumuladas del fármaco (0.1, 0.3 y 0.5 mg/Kg, i.p.), de manera que para cada una de las administraciones de CP55940, se grabó la actividad neuronal espontánea antes y después de cada inyección y también las respuestas evocadas a la estimulación somestésica y óptica.

RESULTADOS

Caracterización de la actividad neuronal en la SNr evocada por la estimulación somatosensorial

Una de las principales funciones de los GB es interpretar la información sensoriomotora proveniente de las cortezas y el tálamo, crucial para el monitoreo y actualización de cualquier comportamiento (Robbe, 2018). Se ha demostrado, mediante registros electrofisiológicos, que en la SNr existe una representación sensorial en diferentes especies, gatos, murinos y primates no humanos (Nagy et al., 2005; Schultz, 1986; Schwarz et al., 1984; Brown et al., 2014). Sin embargo, se desconoce cómo esta entrada sensorial es procesada a través del circuito de los GB y cómo converge en la SNr, si sea favorecida por una vía en particular (directa o indirecta) como en las teorías relacionadas al control motor.

Lo que se sabe hasta el momento de manera clásica es que la entrada de la información llega principalmente al estriado, núcleo de entrada de este circuito. Entonces la información es procesada a través de dos vías para llegar a los núcleos de salida. Con la implementación de técnicas optogenéticas se han identificado y caracterizado la actividad de las dos distintas poblaciones y se ha observado que tanto las neuronas de la vía directa como las de la vía indirecta responden ante estímulos somatosensoriales (Coffey et al., 2017) y que además, ambos tipos neuronales se despolarizan ante la entrada de un solo estímulo somatosensorial, registrados en célula única (Sippy et al., 2015). Pero entonces, ¿cómo converge esta información en la población neuronal de la SNr? Para resolver este cuestionamiento, realizamos registros extracelulares multiunitarios en la SNr de ratas anestesiadas con uretano (Figura 9 A), las cuales fueron estimuladas eléctricamente en la palma de la pata delantera (Figura 9 C) contralateral al sitio de registro (Figura 9 B). Para este proyecto hemos registrado un total de 678 neuronas en 25 animales a una profundidad entre 7.3 y 8.2 mm en la SNr, de las cuales 597 se mantuvieron activas durante todo nuestro protocolo experimental y, por lo tanto, los análisis que a continuación se presentan fueron realizados en esta subpoblación.

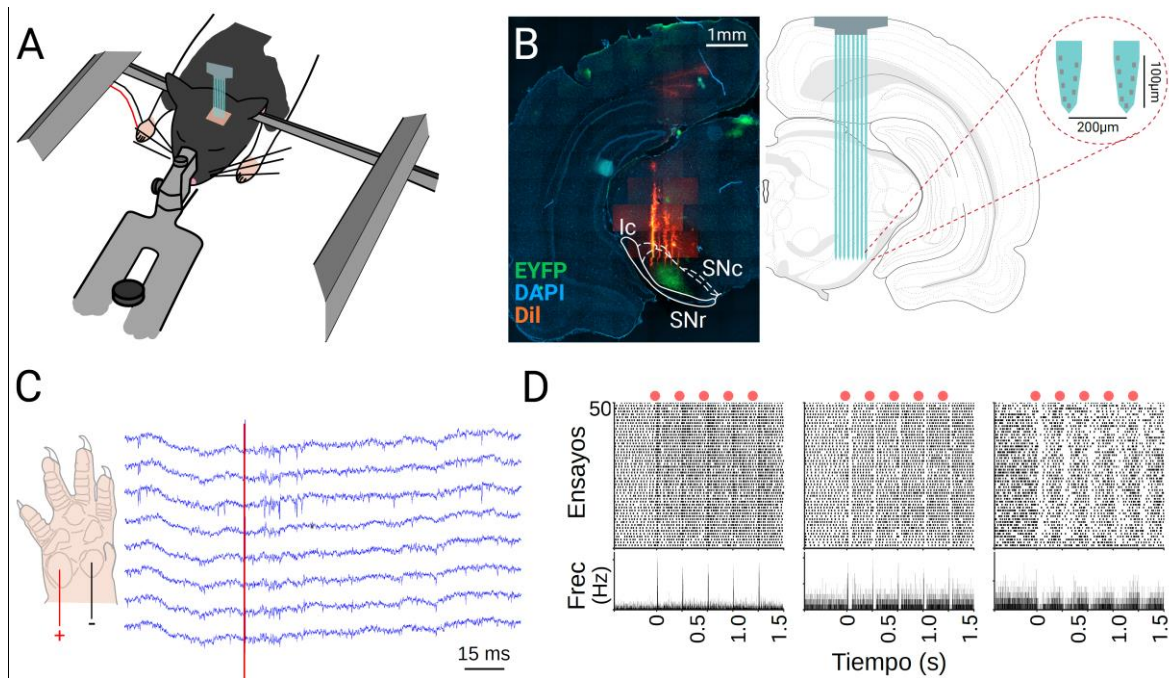


Figura 9. Modelo experimental. **A)** Esquema del registro electrofisiológico en rata anestesiada, montada en un estereotáxico y a la cual se le estimuló eléctricamente la pata delantera contralateral al sitio de registro. **B)** Izquierda: fotografía de fluorescencia de un corte coronal de rata, en verde se observa la transfección mediante la expresión de la proteína EYFP, en azul la marca de DAPI, y en rojo la trayectoria de la sonda de silicón teñida con el trazador Dil. Ic: cápsula interna, SNc: sustancia *nigra compacta*, SNr, sustancia *nigra reticulata*. Derecha: esquema que representa la sonda de silicón en la SNr y el arreglo de microelectrodos utilizado en los registros electrofisiológicos. **C)** Representación de la estimulación eléctrica en la palma de la pata delantera de rata y, un trazo representativo para cada uno de los ocho microelectrodos que conforman una punta de la sonda de silicón en una ventana de 150ms. La línea roja indica el momento en que se aplicó un estímulo eléctrico. **D)** Raster plots representativos de tres diferentes neuronas e histogramas peri estímulo de la frecuencia de disparo debajo de cada una de ellas, alineadas al primer estímulo somestésico (primer punto rojo) de cada uno de los ensayos.

La estimulación somatosensorial de las extremidades anteriores produjo respuestas complejas en la actividad neuronal de la SNr, caracterizadas por inactivaciones y activaciones transitorias como se observa en los gráficos de barrido, conocidos como raster plots (Figura 9 D), representativos de tres diferentes neuronas. Algunas células incrementan de manera fásica su tasa de disparo, otras células también incrementan su frecuencia de disparo, pero regresa paulatinamente a su actividad basal y finalmente, otras células presentan una inhibición transitoria.

La SNr se caracteriza por tener una alta frecuencia de disparo de manera espontánea, en roedores despiertos se han registrado frecuencias entre 25 y 50 Hz, mientras que en registros *in vitro* también han observado una alta tasa de disparo, pero a menores frecuencias (10-20 Hz). Con nuestro método de registro obtuvimos 597 células en la SNr, las cuales

mostraron tener diferentes patrones y frecuencias de disparo (Figura 10), cuando graficamos el histograma de distribución de la frecuencia de disparo (Figura 10 B), observamos frecuencias que llegan hasta 80 Hz. Sin embargo, la frecuencia media de la población es de 20 Hz, similar a los ya reportados en la literatura (Zhou, 2016). Además de la actividad tónica que tienen las neuronas de la SNr, se sabe que este núcleo tiene una participación fundamental en el control de las oscilaciones tálamo-corticales (G. Buzsáki et al., 1990). Por lo tanto, analizamos la potencia de estas neuronas en diferentes bandas de frecuencia (Figura 10 C) y observamos que en la banda de frecuencia entre 4 y 10 Hz se obtuvieron los mayores valores de potencia.

Posteriormente analizamos la actividad poblacional evocada en la SNr por las estimulaciones somestésicas, para ello alineamos la frecuencia de disparo normalizada a valores Z, entre 1s antes y 2s después del momento en que se aplicó el primer estímulo de cada ensayo. Después, graficamos cada una de las células en una matriz de colores (Figura 10 E), donde los colores claros y oscuros representan mayores y menores tasas de disparo respectivamente. La actividad normalizada de las células se separó en dos poblaciones, una en la que las células disminuyeron (azules) y otra en la que incrementaron (amarillas) su tasa de disparo posterior a la primera estimulación somestésica, y fueron ordenadas de acuerdo con el momento en que tuvieron su menor o mayor tasa de disparo respectivamente. Además, se obtuvo la media de los valores Z de todas las células registradas en la SNr (trazo gris), de aquellas que incrementaron su frecuencia de disparo (trazo amarillo) y de aquellas que disminuyeron (trazo azul). En conjunto, estas respuestas podrían reflejar la activación de las vías directa e indirecta de los GB, aquellas células que disminuyeron su tasa de disparo estarían respondiendo a la activación de las proyecciones GABAérgicas de la vía directa mientras que las células que incrementaron su actividad, sería efecto de la estimulación de la vía indirecta por la activación de sus proyecciones glutamatérgicas. Por otro lado, analizamos la distribución de las latencias de respuesta (Figura 10 D) de aquellas células que incrementaron su tasa de disparo posterior al primer estímulo. Para ello consideramos únicamente a las células que incrementaron significativamente su actividad (4 SD) entre 3 y 290 ms después de que se dio el primer estímulo del tren. Se observa que la población tiene una amplia distribución de latencias y que se evocan respuestas dentro de todo el intervalo de análisis, sin embargo, la mayoría de la población (40%) responde con latencias cortas (mediana=35ms), correspondiente a la entrada de la información sensorial.

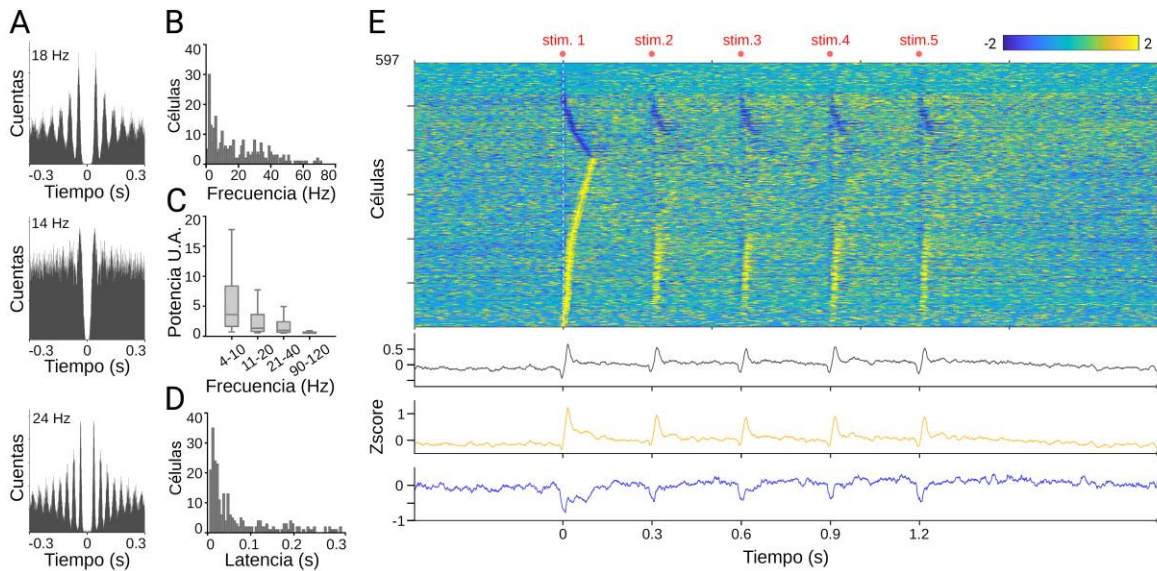


Figura 10. Caracterización de la actividad neuronal en la SNr y de las respuestas evocadas por la estimulación somestésica. **A)** Autocorrelogramas representativos de tres diferentes neuronas en condiciones basales. **B)** Distribución de la frecuencia de disparo de 597 células registradas en la SNr, en condiciones basales. **C)** Distribución de la potencia en cuatro diferentes bandas de frecuencia. **D)** Distribución de latencias de las respuestas evocadas ante el primer estímulo somestésico. **E)** Respuesta poblacional de la SNr. Arriba: se muestra una matriz de la frecuencia de disparo normalizada a valores Z de cada célula registrada en la SNr, las cuáles fueron separadas en dos diferentes poblaciones, en la parte superior se encuentran aquellas células que disminuyeron (azules) y en la parte inferior aquellas que incrementaron (amarillas) su actividad neuronal ante la estimulación somatosensorial. Fueron alineadas al primer estímulo somestésico y ordenadas al momento en que tuvieron su menor o mayor tasa de disparo, respectivamente. Abajo: 1. Trazo gris, se gráfica la media de los valores Z del total de células registradas. 2. Trazo amarillo, la media de los valores Z de las células que incrementaron su frecuencia de disparo. 3. Trazo azul, la media de los valores Z de las células que disminuyeron su frecuencia de disparo.

Efectos de la activación del receptor CB1 sobre la actividad de la SNr

Como resultado de la estimulación de la pata delantera contralateral al sitio de registro, logramos observar que la SNr integra información somatosensorial que potencialmente estaría producida por la activación de ambas vías ante un mismo estímulo. Sin embargo, ¿qué efecto se produce en la actividad de la SNr posterior a la activación del RCB1? Para ello, primero analizamos los promedios de la frecuencia de disparo (Figura 11 A) de manera espontánea durante la actividad basal de la SNr y posterior a cada una de las dosis diferenciales de CP55940. No encontramos ninguna diferencia significativa con la activación del RCB1 (Kruskal-Wallis, $X^2=5.66$, $p=0.12$).

Estudios realizados en hipocampo, otra estructura cerebral en la cual se expresa abundantemente el RCB1, han demostrado que los cannabinoides afectan la memoria tanto

en humanos como en modelos animales. Este efecto lo han relacionado con una disminución en la potencia de diferentes oscilaciones en la actividad del hipocampo en rata. De manera interesante, al igual que nuestros resultados, en el trabajo realizado por Robbe et al., (2006) tampoco encontraron diferencias en el promedio de las frecuencias de disparo. Después, cuando observamos los autocorrelogramas de células individuales, encontramos que posterior a la activación sistémica del RCB1, en algunas células modificaron claramente su patrón de disparo, con una mayor oscilación (Figura 11 B). Por tal motivo, decidimos evaluar la potencia de la SNr en diferentes bandas de frecuencia (Figura 11 C). Encontramos que la activación del RCB1 incrementó de manera significativa la potencia en las bandas de 4-10 Hz (Kruskal-Wallis y post hoc Bonferroni, $X^2=12.9$, $p<0.05$) y de 11-20 Hz (Kruskal-Wallis y post hoc Bonferroni, $X^2=8.49$, $p<0.05$), pero no afectó las bandas más rápidas (21 a 120 Hz). Este resultado es también consistente con lo reportado por Robbe et al., (2006) para el hipocampo y Kucewicz, Tricklebank, Bogacz, & Jones (2011) para la corteza cerebral. El hecho de que las oscilaciones de alta frecuencia no se hayan modificado es consistente con la ausencia de cambio en la frecuencia general de disparo, ya que estas frecuencias reflejan la actividad multiunitaria en el potencial local de campo (György Buzsáki, Anastassiou, & Koch, 2012).

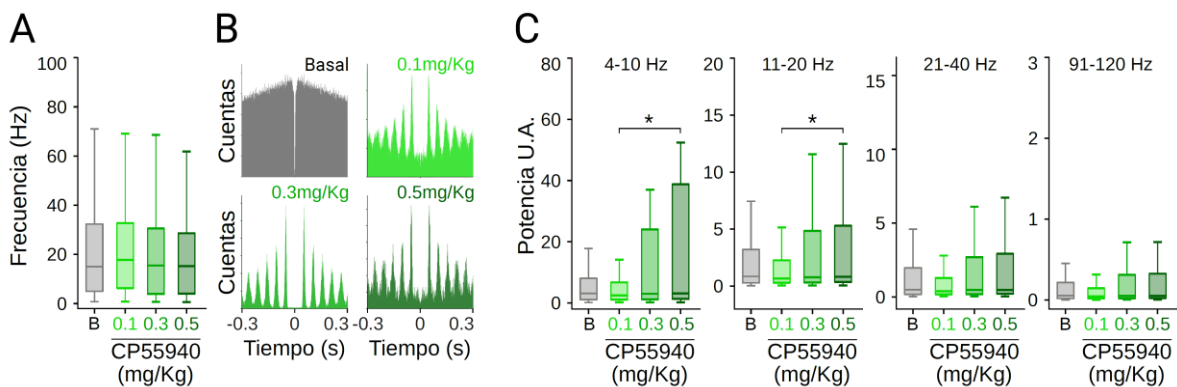


Figura 11. La activación del RCB1 incrementa la potencia en la actividad de la SNr. A) Frecuencia de disparo promedio en la SNr (B=basal). **B)** Autocorrelogramas de una célula registrada en la SNr en actividad basal y posterior a 0.1, 0.3 y 0.5 mg/Kg de CP55940. **C)** Potencia de las células registradas en la SNr a diferentes bandas de frecuencia (* $p<0.05$ vs Basal, Kruskal-Wallis y post hoc Bonferroni)

El RCB1 modula diferencialmente la información somatosensorial en la SNr

Los cannabinoides modulan de manera importante la actividad de la SNr, debido a la alta expresión del RCB1 en las terminales de las vías directa e indirecta, en ambas disminuye la

liberación de neurotransmisor (Szabo et al., 2000; Wallmichrath & Szabo, 2002). Podríamos esperar que la activación de este receptor en las terminales GABAérgicas de la vía directa disminuya la liberación de este y produzca un incremento en la actividad de la postsinápsis. Por otro lado, la activación en las terminales de la vía indirecta disminuirá la liberación de glutamato y producirá el efecto contrario. Estas diferencias nos permitirían inferir si el efecto es producido por las terminales de la vía directa o indirecta. En cada experimento se administraron tres diferentes dosis de un agonista del RCB1, CP55940 (0.1, 0.3 y 0.5 mg/Kg). Las administraciones se realizaron de manera consecutiva con intervalos de ~30 min entre cada administración, por lo que los efectos reportados son acumulados.

Los resultados sugieren que la estimulación somestésica estaría activando ambas vías, directa e indirecta de los GB, al observar dos poblaciones neuronales, las que disminuyen y las que incrementan su frecuencia de disparo respectivamente (Figura 12 A, Basal). Con la activación del RCB1 observamos que en la población de neuronas que incrementan su frecuencia de disparo, esas respuestas evocadas se mantuvieron en neuronas individuales (matriz) y también en el promedio de los valores Z de la población (trazo amarillo) que se observa con un incremento en la tasa de disparo evocada para cada uno de los estímulos. Sin embargo, en la población de neuronas que disminuyeron su frecuencia de disparo, encontramos que las respuestas inhibitorias disminuyeron de forma dosis dependiente. Cuando graficamos (Figura 12 A) el promedio de los valores Z (trazo azul) encontramos que los picos negativos disminuyen conforme incrementamos la dosis de la droga, e inclusive a partir de la dosis de 0.3mg/Kg la frecuencia de disparo de aquellas células que disminuían su actividad en las respuestas evocadas ahora incrementó con la estimulación somestésica.

Como se observa en la matriz de la actividad poblacional de la SNr, el patrón de disparo se modificó posterior a la activación del RCB1, sin embargo, al analizar las latencias de las células que incrementaron su tasa de disparo (Figura 12 B), no encontramos ninguna diferencia estadística entre la condición basal y posterior a las diferentes dosis del agonista, debido a que esta población neuronal mantuvo las respuestas evocadas (Kruskal-Wallis, $X^2=1.08$, $p=0.78$). Posiblemente estas respuestas se deban a la activación de las terminales de la vía indirecta, en el cual su sistema de neurotransmisión es el glutamato, por lo que estos datos sugieren que la activación del RCB1 no afecta el procesamiento de la información sensorial en esta vía.

Para evaluar cuantitativamente éste fenómeno, para cada una de las condiciones calculamos la media de los valores Z de la frecuencia de disparo entre el momento en que se dio el primer estímulo del tren y los siguientes 50ms. Observamos que la distribución de estos valores en condiciones basales es muy equilibrada entre los valores positivos (>0) y negativos (<0). Sin embargo, posterior a las administraciones sistémicas del cannabinoide, los valores negativos disminuyeron y con la mayor dosis del agonista, la población se desplazó hacia los valores positivos (Figura 12 C). Cuando graficamos los valores Z de aquellas células que incrementaron (amarillo) o disminuyeron (azul) su actividad neuronal en condiciones basales, notamos claramente que posterior a la activación del RCB1, la distribución de las respuestas evocadas se modificó significativamente en ambas poblaciones (Figura 12 D; Kruskal-Wallis y post hoc Bonferroni, Positivos: $X^2=65.35$, $p<0.001$, Negativos: $X^2=119$, $p<0.001$). Es importante resaltar que, el mayor efecto se observó en la población que evocó respuestas inhibitorias, en donde la inhibición provocada por el estímulo sensorial disminuyó significativamente e inclusive en algunas neuronas se invirtió (Figura 12 D).

En la literatura previa se había demostrado que en la SNr existen representaciones somatosensoriales (Nagy et al., 2005), además, que la activación del RCB1 en experimentos *in vitro*, disminuía la liberación de neurotransmisor en las terminales de ambas vías de los ganglios basales (Szabo et al., 2000; Wallmichrath & Szabo, 2002). Sin embargo, con nuestro diseño experimental logramos, además de registrar la actividad poblacional de la SNr, analizar cómo este núcleo responde neurofisiológicamente ante la entrada de la información somatosensorial en un modelo *in vivo*. Encontramos que, si bien la activación del RCB1 modula la actividad neuronal de la SNr a través de su expresión en las terminales tanto excitatorias como inhibitorias de ambas vías, observamos un efecto diferencial que favoreció las respuestas excitatorias ante la estimulación somatosensorial. Estos resultados nos permiten inferir que existe una representación sensorial en la SNr proveniente de ambas vías de los GB, y que la activación del RCB1 repercute principalmente en una disminución de las respuestas inhibitorias (vía directa). También sugieren que, bajo la influencia de cannabinoides, el incremento en la actividad de la SNr provocado por estímulos sensoriales ejercería una mayor inhibición en los núcleos motores del tálamo y podría explicar el efecto de hipolocomoción producido por la administración de cannabinoides.

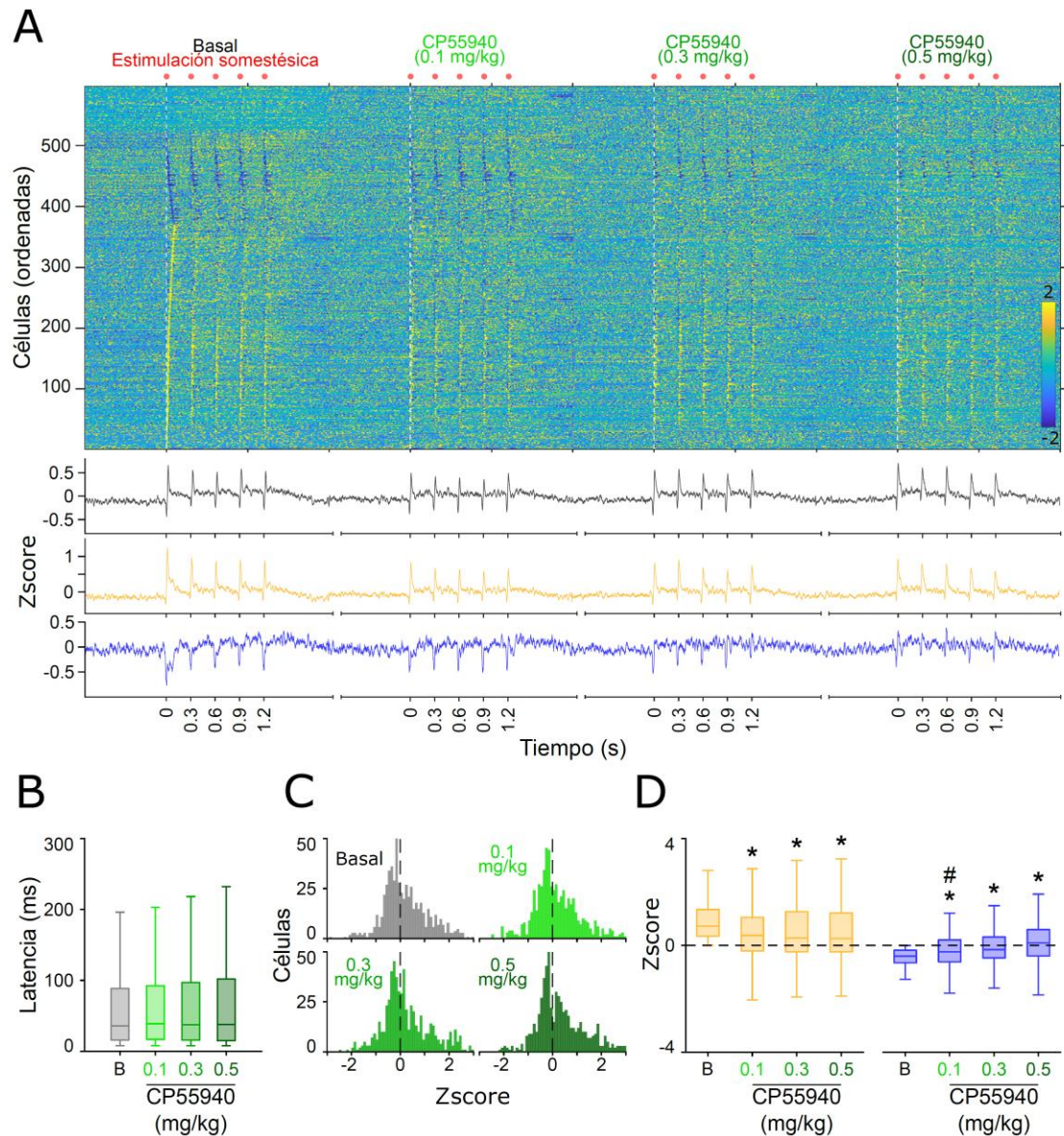


Figura 12. Efectos de la activación del RCB1 sobre las respuestas evocadas a la estimulación somestésica. **A)** Arriba: Matriz de la actividad neuronal poblacional normalizada a valores Z de las respuestas evocadas en la SNr, registrada en condiciones basales y posterior a tres administraciones diferenciales y acumuladas del agonista CB1 (CP55940). La actividad neuronal de cada célula fue alineada al primer estímulo somestésico y las células fueron ordenadas de acuerdo al momento en que disminuyeron (azules) o incrementaron (amarillas) su actividad neuronal respectivamente. Abajo: Gráficos de la media de los valores Z del total de células registradas (gris), de las células que incrementaron (amarillo) su frecuencia de disparo y de las células que disminuyeron su frecuencia de disparo (azul). **B)** Gráficos de caja de las latencias al incremento de la actividad neuronal ante la estimulación somestésica en condiciones basales y posterior a las tres diferentes dosis de CP55940. **C)** Histogramas de distribución del promedio de los valores Z a partir del momento en que se aplicó el primer estímulo somático y 60 ms después. La línea negra punteada está alineada al valor 0 de Zscore. **D)** Diagramas de caja para el promedio de los valores Z en **C**, separados en dos poblaciones, para aquellas células que incrementaron (amarillo) o que disminuyeron (azul) su actividad neuronal posterior a la estimulación somática en condiciones basales y después de las administraciones de CP55940. (* $p < 0.001$ vs Basal, # $p < 0.001$ vs 0.5mg/Kg CP55940, prueba Kruskal-Wallis y post hoc Bonferroni)

Manipulación optogenética de la vía directa de los GB

En el apartado anterior observamos que tan solo la estimulación somatosensorial en la extremidad delantera del animal produce diversas respuestas sobre la actividad neuronal en la SNr y que esta diversidad posiblemente refleje la activación de la vía directa e indirecta de los GB. Para determinar si las diferencias en las respuestas evocadas en la SNr se deben a la activación específica de cada vía, implementamos un modelo de manipulación optogenética. Para estimular la vía directa, indujimos la expresión de una canalrodopsina (ChR2) específicamente en las NEM que expresan al receptor de dopamina tipo 1 (D1), en el estriado dorsolateral de ratas transgénicas Cre-D1, mediante una transfección con el virus AAV/EF1-DIO-hChR2(H134R)-EYFP (Figura 13 A). Seleccionamos esa porción del estriado ya que se sabe que funcionalmente es ahí donde converge la entrada de la información sensoriomotora, en este mismo sitio implantamos la fibra óptica (Figura 13 B). Los registros de las respuestas provocadas por la estimulación óptica se realizaron en la SNr (Figura 13 C).

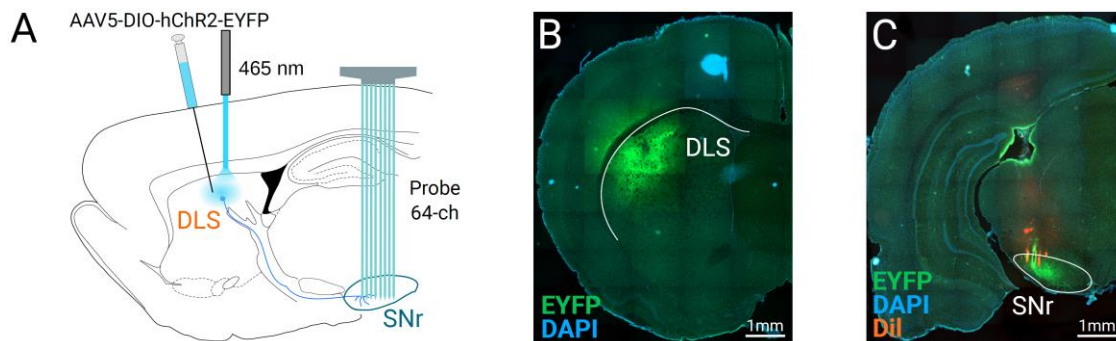


Figura 13. Manipulación optogenética de la vía directa. **A)** Esquema de la manipulación optogenética de la vía directa, infección viral y estimulación óptica en el DLS, y registro electrofisiológico en la SNr. **B)** Fotografía de fluorescencia de un corte coronal de rata, se observa la transfección en verde (EYFP) en el sitio de infección y los núcleos celulares marcados con DAPI, en el DLS. **C)** Fotografía de fluorescencia de un corte coronal de rata, se observa el sitio de registro en la SNr (Dil) y en verde (EYFP) las terminales de las células que fueron transfectadas en el DLS.

Para evaluar si las respuestas eran similares a las que se generaban con la estimulación somestésica, también aplicamos trenes de estimulación óptica con una duración de 10ms en cada estímulo. Analizamos 286 células registradas en 10 animales y evaluamos las mismas variables que con los datos de la estimulación somestésica. Observamos que la estimulación óptica en el DLS evocó respuestas en la actividad de la SNr, en la matriz de la actividad poblacional encontramos células que incrementaron o disminuyeron su frecuencia de

disparo, sin embargo, consistente con la activación de las proyecciones GABAérgicas de la vía directa, las respuestas inhibitorias que fueron más robustas (Figura 14 A). Dicho efecto fue más evidente cuando graficamos el promedio de los valores Z de la población que mostró respuestas inhibitorias (trazo azul) ante la estimulación óptica, y se observó con picos negativos en la actividad neuronal con cada uno de los estímulos del tren (Figura 14 A).

Como hemos mencionado anteriormente, la SNr es la región del cerebro con la mayor expresión del RCB1, donde se expresa en terminales GABAérgicas y glutamatérgicas. Esto representa una ventaja técnica, ya que nos permitiría diferenciar sobre que vía está ejerciendo su efecto, por ejemplo, si actúa preferencialmente sobre las terminales GABAérgicas de la vía directa produciría un incremento en la actividad de la SNr, por el contrario, si se activa el RCB1 de las terminales glutamatérgicas de la vía indirecta generaría una disminución en su actividad neuronal. De acuerdo con lo que observamos, con la activación del RCB1 sobre las respuestas evocadas de la estimulación somática en donde hubo una disminución significativa de las respuestas inhibitorias, esperaríamos que con la estimulación óptica de la vía directa ocurriera lo mismo. Así como lo supusimos, la administración del agonista CB1 también disminuyó eficientemente las respuestas producidas por la estimulación óptica de la vía directa en el DLS.

De igual forma analizamos la distribución del promedio de los valores Z, entre el momento en que se dio el primer estímulo óptico del tren y 50 ms posteriores. Encontramos que de manera basal existían valores Z tanto positivos como negativos, y con la activación del RCB1 se produjo una disminución en ambos componentes (Figura 14 A). Sin embargo, cuando analizamos las latencias de las células que mostraron incrementos en su tasa de disparo (Figura 14 B) no encontramos ninguna diferencia estadística entre la condición basal y posterior a las diferentes dosis del agonista (Kruskal-Wallis, $X^2=1.68$, $p=0.64$). Por otro lado, cuando graficamos el promedio de los valores Z positivos y negativos, observamos que ambos tipos de respuestas evocadas disminuyeron (Figura 14 D; Kruskal-Wallis y post hoc Bonferroni, Positivos: $X^2=42.06$, $p<0.001$, Negativos: $X^2=51.4$, $p<0.001$). Esto significa que 1) las respuestas provocadas por la manipulación optogenética mimetizaron el efecto observado con la estimulación somática, por lo que las respuestas inhibitorias son efecto de la estimulación de la vía directa, y 2) la activación del RCB1 bloquea la transmisión de la vía directa, al disminuir las respuestas inhibitorias evocadas de la estimulación óptica y somática.

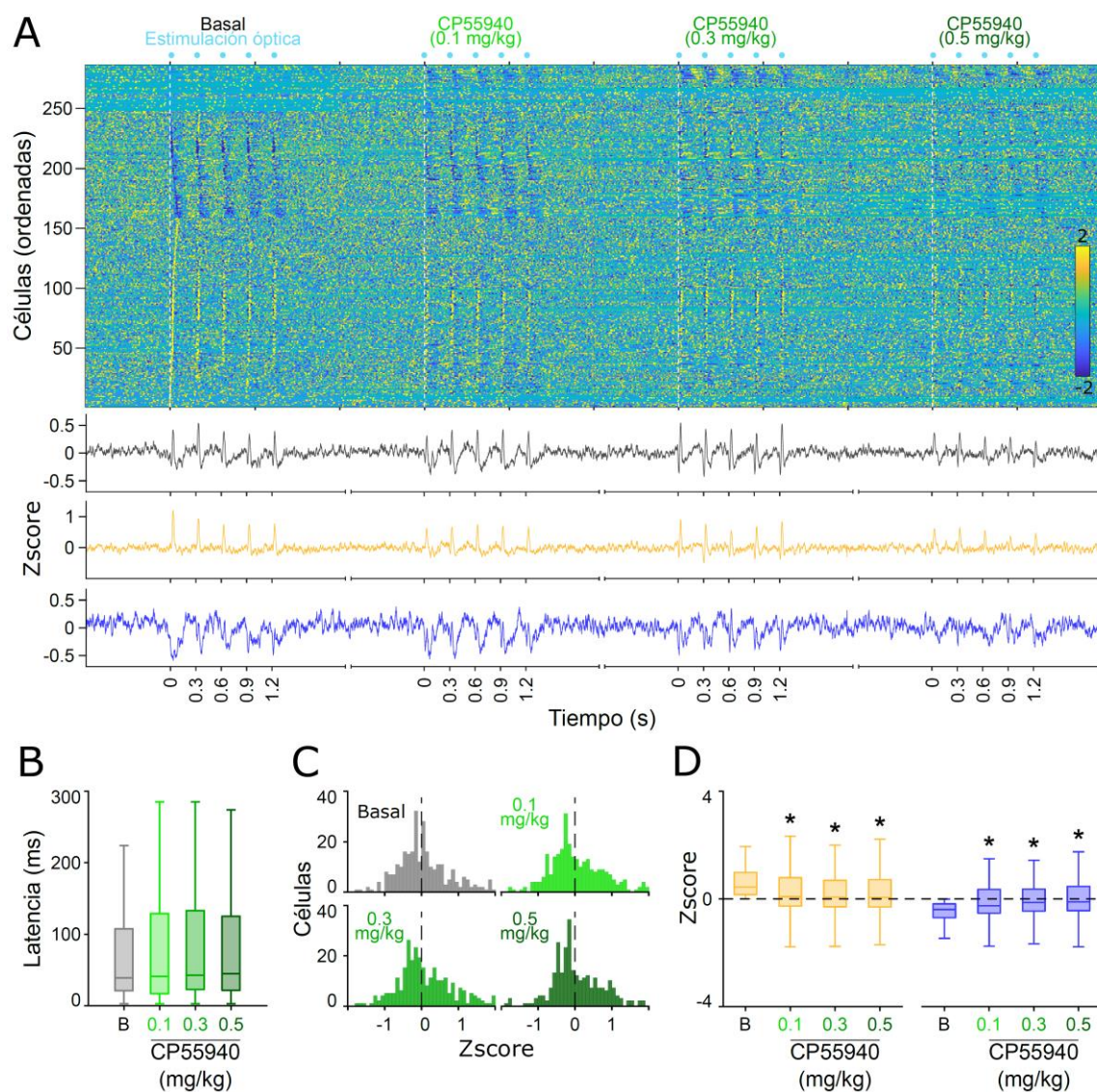


Figura 14. Manipulación optogenética de la vía directa. A) Arriba: Matriz de la actividad neuronal poblacional normalizada a valores Z de las respuestas evocadas a la estimulación óptica en la SNr, registrada en condiciones basales y posterior a tres administraciones diferenciales y acumuladas del agonista CB1 (CP55940). La actividad neuronal de cada célula fue alineada al primer estímulo óptico y las células fueron ordenadas de acuerdo al momento en que disminuyeron (azules) o incrementaron (amarillos) su actividad neuronal respectivamente. Abajo: Se representa la media de los valores Z del total de células registradas (gris), de las células que incrementaron (amarillo) su frecuencia de disparo y de las células que disminuyeron su frecuencia de disparo (azul). **B)** Se representan en barras de caja las latencias al incremento de la actividad neuronal ante la estimulación óptica en condiciones basales y posterior a las tres diferentes dosis de CP55940. **C)** Histogramas de distribución del promedio de los valores Z a partir del momento en que se aplicó el primer estímulo y 60 ms después. La línea negra punteada está alineada al valor 0 de Zscore. **D)** Las barras de caja representan el promedio de los valores Z en **C**, separados en dos poblaciones, para aquellas células que incrementaron (amarillo) o que disminuyeron (azul) su actividad neuronal posterior a la estimulación óptica en condiciones basales y después de las administraciones de CP55940. (* $p < 0.001$ vs Basal, prueba Kruskal-Wallis y post hoc Bonferroni)

Manipulación optogenética de la vía indirecta de los ganglios basales

Para caracterizar de manera específica la actividad de la vía indirecta infectamos a 5 animales en el Sth (Figura 15 A), último núcleo de relevo de la vía indirecta, mismo sitio donde colocamos la fibra óptica (Figura 15 B) para la estimulación de la vía indirecta durante los registros en la SNr (Figura 15 C). Las proyecciones del Sth a la SNr son glutamatérgicas y al estimularlas ópticamente observamos que del total de células registradas ($n=57$), la mayoría de las células incrementaron su frecuencia de disparo (Figura 16 A). Nuevamente estos datos coincidieron con el modelo clásico de los GB, que predice que la estimulación de la vía indirecta incrementa la actividad de la SNr, tal como se observa en el promedio de los valores Z de la población (Figura 16 A, trazo gris), donde claramente se observan incrementos súbitos en la frecuencia de disparo con cada estimulación óptica.

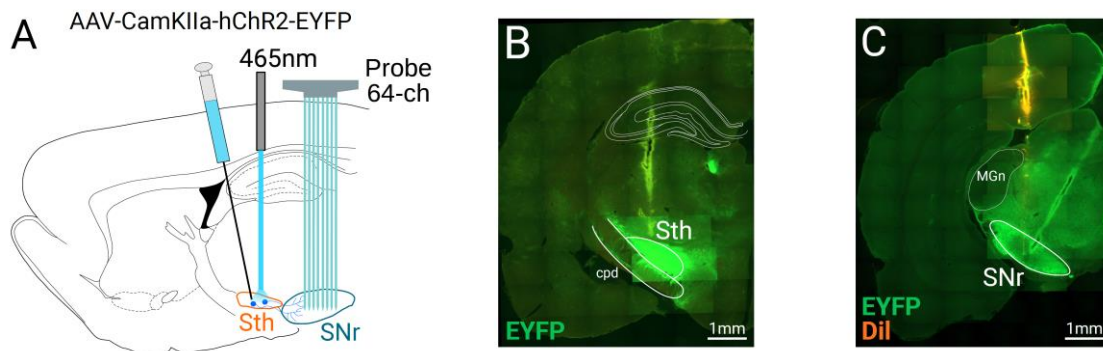


Figura 15. Manipulación optogenética de la vía indirecta. **A)** Esquema de la manipulación optogenética de la vía indirecta, infección viral y estimulación óptica en el Sth, y registro electrofisiológico en la SNr. **B)** Fotografía de fluorescencia de un corte coronal de rata, se observa la transfección en verde (EYFP) en el Sth. **C)** Fotografía de fluorescencia de un corte coronal de rata, se observa el sitio de registro en la SNr (Dil) y en verde (EYFP) las terminales de las células que fueron transfectadas en el Sth.

Finalmente, evaluamos las respuestas ópticas evocadas por la estimulación del Sth bajo los efectos del agonista CB1. Contrario a lo que observamos con la manipulación de la vía directa, los incrementos en la tasa de disparo se mantuvieron estables a pesar de las administraciones de CP55940 (Figura 16 A). Tampoco observamos cambios significativos en las latencias de respuesta (Figura 16 B, Kruskal-Wallis, $p=0.26$), la distribución o el promedio de la frecuencia de disparo (Figura 16 C y D; Kruskal-Wallis, Positivos: $X^2=5.83$, $p=0.12$, Negativos: $X^2=6.59$, $p=0.08$). Estos resultados confirman que ante la administración de cannabinoides, las respuestas provocadas por estímulos sensoriales en la SNr sufren un

desbalance que impacta principalmente en el componente de la vía directa, pero mantiene el componente de la vía indirecta prácticamente intacto.

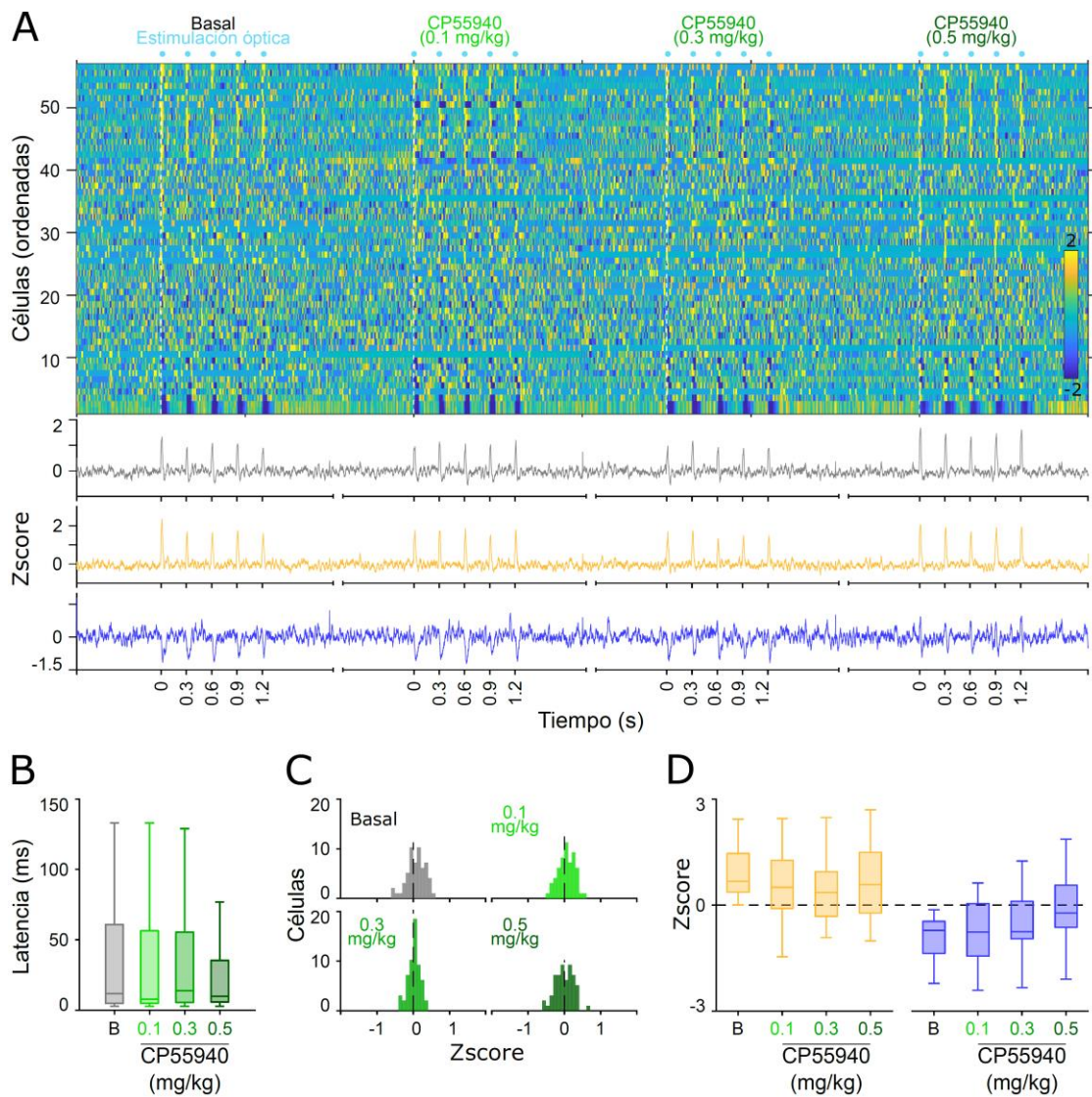


Figura 16. Manipulación optogenética de la vía indirecta. **A)** Arriba: Matriz de la actividad neuronal poblacional normalizada a valores Z de las respuestas evocadas a la estimulación óptica en la SNr, registrada en condiciones basales y posterior a tres administraciones diferenciales y acumuladas del agonista CB1 (CP55940). La actividad neuronal de cada célula fue alineada al primer estímulo óptico y las células fueron ordenadas de acuerdo al momento en que disminuyeron (azules) o incrementaron (amarillas) su actividad neuronal respectivamente. Abajo: Se representan la media de los valores Z del total de células registradas (gris), de las células que incrementaron (amarillo) su frecuencia de disparo y de las células que disminuyeron su frecuencia de disparo (azul). **B)** Barras de caja de las latencias al incremento de la actividad neuronal ante la estimulación óptica en condiciones basales y posterior a las tres diferentes dosis de CP55940. **C)** Histogramas de distribución del promedio de los valores Z a partir del momento en que se aplicó el primer estímulo y 280ms después. La línea negra punteada está alineada al valor 0 de Zscore. **D)** Barras de caja para el promedio de los valores Z en c, separados en dos poblaciones, para aquellas células que incrementaron (amarillo) o que disminuyeron (azul) su actividad neuronal posterior a la estimulación óptica en condiciones basales y después de las administraciones de CP55940.

DISCUSIÓN

Se han hipotetizado múltiples funciones sensoriales, motoras, cognitivas y de actualización adaptativa para los GB. Los GB conservan una organización topográfica, integran información proveniente de la corteza y el tálamo a través de dos sistemas de proyección, la vía directa e indirecta y finalmente, ambos sistemas de procesamiento convergen en el principal núcleo de salida de este circuito, la SNr. Por otro lado, se sabe que el estriado en ratas contiene alrededor de 2.7 millones de neuronas, las cuales envían su información a través de las vías directa e indirecta hacia la SNr, que únicamente contiene alrededor de 26, 000 neuronas (Oorschot, 1996), sugiriendo que la arquitectura de los GB debería concluir en un alto nivel de integración en la SNr. A pesar de la información que se tiene sobre cada vía, aún se desconoce cuál es la contribución exacta de la SNr sobre la integración convergente de ambos sistemas de proyección. En este trabajo investigamos la participación específica de la vía directa e indirecta en la integración somatosensorial de la SNr.

Para este objetivo, caracterizamos óptica y electrofisiológicamente la contribución de cada vía sobre la actividad neuronal de la SNr. Registrada en un modelo de rata anestesiada, el cual nos permitió evaluar las representaciones somestésicas sin la interferencia motora. Bajo estas condiciones la estimulación somatosensorial de las patas delanteras produjo respuestas robustas en la actividad neuronal de la SNr. Estas respuestas se caracterizaron por activaciones e inhibiciones transitorias que podrían reflejar la actividad de la vía indirecta como directa respectivamente. Este tipo de respuestas específicas para cada vía fueron confirmadas con las manipulaciones optogenéticas. Posteriormente, para apoyar estos hallazgos estudiamos la participación del sistema endocannabinoide, debido a la alta expresión del RCB1 en las aferencias GABAérgicas (vía directa) y glutamatérgicas (vía indirecta) de la SNr. Administramos de manera sistémica dosis diferenciales del agonista CP55940 y observamos, que la activación del RCB1 disminuye drásticamente el componente inhibitorio de las respuestas evocadas tanto por la estimulación somatosensorial como óptica. Estos resultados sugieren que la estimulación del RCB1 produce un desbalance entre la actividad de la vía directa e indirecta en la SNr, afectando principalmente la participación de la vía directa y ser el posible mecanismo por el cual los cannabinoides producen el efecto de hipolocomoción.

En los GB, uno de los principales sistemas de procesamiento está dedicado a la integración sensoriomotora, la cual se sabe tiene una organización somatotópica. Con base en investigaciones anatómicas y electrofisiológicas recientes, se plantea que los GB integran la información sensoriomotora constantemente, con el objetivo de mantener un monitoreo continuo del estado sensoriomotor del sujeto, crítico para la adquisición o actualización de cualquier acción (Robbe, 2018). Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han enfocado en estudiar el estriado, ya que es el primer punto de entrada al circuito de los GB y, además, es ahí donde se originan las vías directa e indirecta. En el DLS ya se ha reportado la existencia de representaciones somatosensoriales de diferentes partes del cuerpo (Carelli & West, 1991), recientemente y con el empleo de manipulaciones optogenéticas, se ha caracterizado que tanto neuronas de la vía directa (D1) como de la vía indirecta (D2) en el DLS incrementan su frecuencia de disparo ante estímulos somatosensoriales (Coffey et al., 2017). Por otra parte, Sippy et al., (2015) investigó la participación del DLS, en un modelo de ratón entrenado a lengüetear por un reforzador en respuesta a la deflexión de una vibrisa, mientras registraban por patch clamp a neuronas caracterizadas de la vía directa o indirecta. Ellos observaron que ambas poblaciones se despolarizaron ante la estimulación somestésica, sin embargo, en las neuronas de la vía directa la despolarización fue más rápida. Posteriormente estimularon optogenéticamente a estas neuronas lo que produjo que los ratones lengüetearan más veces en el sitio donde se les entregaba el reforzador, con lo cual demostraron que las neuronas de la vía directa contribuyen a la manifestación de una respuesta motora condicionada ante la integración de la señalización de un estímulo sensorial.

Si bien en el DLS se está dando la activación de ambas vías de los GB ante la entrada de la información somatosensorial ¿cómo es que está converge y es integrada en la salida de los GB? Para ello registramos la actividad de la SNr y evaluamos qué respuestas evocaban los trenes de estimulación somestésica en la pata delantera contralateral al sitio de registro. Observamos que las estimulaciones somatosensoriales evocaron respuestas robustas (Figura 9) en la actividad de la SNr y que las células registradas se separaron claramente en dos poblaciones, unas que disminuyeron su frecuencia de disparo y otras que la incrementaron (Figura 10). Estos resultados se relacionaron con lo encontrado en el DLS, ya que tanto la vía directa como indirecta incrementan su frecuencia de disparo y, por la convergencia de sus vías, la activación de la vía directa produciría los decrementos de la

frecuencia de disparo mientras que la activación de la vía indirecta los incrementos, de acuerdo con el modelo clásico de los GB.

De manera independiente, la función canónica de estas vías ya ha sido demostrada en relación con el control motor. Kravitz et al., (2010) al manipular optogenéticamente cada vía en el DLS, observaron que la estimulación de la vía directa disminuye la frecuencia de disparo de neuronas registradas en la SNr, mientras que la estimulación de la vía indirecta la incrementa. A su vez, la activación de estas vías ejerció un efecto antagónico en la movilidad de los ratones, debido a que el incremento de la actividad de la vía directa facilitó el movimiento, mientras que la vía indirecta lo inhibió. Sin embargo, con nuestro estudio hemos demostrado que, en un proceso fisiológico, como lo es la estimulación somatosensorial, la activación de ambas vías se da ante la misma modalidad sensorial y repercute de manera simultánea sobre la actividad de la SNr. Estos resultados, podrían relacionarse con los modelos actuales que explican como la vía directa e indirecta están involucradas en el inicio y la ejecución de los movimientos (Cui et al., 2013; Tecuapetla, Jin, Lima, & Costa, 2016), la integración de un estímulo sensorial y su transformación en una respuesta motora (Sippy et al., 2015), así como el monitoreo y actualización de la selección de acciones (Nonomura et al., 2018). Sin embargo, no debemos olvidar que en nuestras condiciones (i.e. anestesia por uretano), el componente motor está severamente disminuido. Por lo que nuestros resultados deben interpretarse únicamente en el contexto de la integración sensorial. Estudios posteriores deberán realizarse para comprender exactamente la interacción con el sistema motor y, por lo tanto, con las funciones propuestas para iniciar y terminar acciones.

Además de recibir las terminales de la vía directa e indirecta, es importante mencionar que la SNr es el núcleo con la mayor expresión del RCB1 (Herkenham et al., 1991) y que la localización de esta proteína se encuentra tanto en las terminales GABAérgicas de la vía directa como glutamatérgicas de la vía indirecta. Estudios electrofisiológicos *in vitro* demostraron que la activación del RCB1 en ambas terminales disminuye la liberación de GABA y glutamato (Szabo et al., 2000; Wallmichrath & Szabo, 2002), por lo que, al modular diferentes sistemas de neurotransmisión, la activación farmacológica de este receptor nos permitiría observar efectos opuestos sobre la actividad neuronal de la SNr. Es decir, al activar al RCB1 presináptico en la terminal de la vía directa, disminuiría la liberación de GABA e incrementaría la actividad de la SNr. Mientras que la activación del RCB1 en la terminal de la

vía indirecta, inhibiría la liberación de glutamato y en consecuencia disminuiría la actividad de la SNr. Con base en esto, al evaluar las respuestas evocadas ante la estimulación somatosensorial bajo el efecto de los cannabinoides esperaríamos que las respuestas se invirtieran.

Para estudiar la modulación del sistema endocannabinoide sobre la actividad de la SNr, analizamos si la activación sistémica del RCB1 modificaba la frecuencia de disparo en la actividad espontánea de las células en la SNr (Figura 11), y observamos que el promedio de la frecuencia de disparo no cambió con la administración del agonista CB1, sin embargo, cuando analizamos la potencia de éstas células en diferentes bandas de frecuencia, encontramos que la potencia de las células incrementó de manera dosis dependiente con la activación del RCB1. Datos previos han demostrado que la activación del RCB1 es capaz de producir una hiper sincronía tálamo-cortical (Sales-Carbonell et al., 2013) la cual es mediada por la expresión del RCB1 en las terminales de la vía directa, y proponen que estas oscilaciones patológicas podrían ser el mecanismo involucrado en estados cognitivos alterados o epilépticos, inclusive, que la hipersensibilidad que presentan los consumidores de marihuana podría ser debido a una sincronía tálamo-cortical aberrante mediada por la activación del RCB1 en la SNr. Sin embargo, en relación con la frecuencia de disparo, registros realizados en hipocampo y corteza bajo la influencia de cannabinoides tampoco observaron cambios en el promedio de la tasa de disparo (Kucewicz et al., 2011; Robbe et al., 2006).

Posteriormente evaluamos las respuestas evocadas a la estimulación somatosensorial bajo el efecto de los cannabinoides, y contrario a nuestra hipótesis, encontramos que la activación del RCB1 ejerce una modulación diferencial al eliminar únicamente las respuestas inhibitorias sin abolir las respuestas excitatorias de las respuestas evocadas. Esto sugiere que el RCB1 modula principalmente la actividad de la vía directa, y su activación produce un desbalance que repercute en un incremento neto en la actividad neuronal de la SNr (Figura 12). Este resultado puede explicarse debido al nivel de inervación de las terminales de las vías directa e indirecta en la SNr, como se mencionó anteriormente, sabemos que el estriado en ratas tiene alrededor de 2.7 millones de neuronas (Oorschot, 1996), de las cuales, podríamos esperar que un poco menos de la mitad serían de la vía directa (~1.3 millones). Estos números contrastan dramáticamente con las proyecciones que se esperarían

provenientes de las 13,000 neuronas del Sth (Oorschot, 1996). En consecuencia, podría esperarse que la mayor densidad de RCB1 en la SNr provenga de la vía directa. Esto es consistente con estudios en donde se ha mostrado que la lesión del estriado dorsal produce un muy importante decremento del RCB1 en la SNr (Herkenham et al., 1991).

De acuerdo con el circuito clásico de los GB, los efectos producidos por la estimulación somática y bajo el efecto del cannabinoide, coinciden con la función descrita para la vía directa e indirecta. Sin embargo, para comprobar que con la activación del RCB1 lo que se pierde es la actividad de la vía directa, manipulamos optogenéticamente la vía directa (DLS-CreD1-SNr) e indirecta (Sth-SNr). Al activar la vía directa predominaron las respuestas inhibitorias (Figura 14) y con la estimulación de la vía indirecta las respuestas excitatorias (Figura 16). Con la administración del agonista CB1, también observamos que las respuestas inhibitorias evocadas por la estimulación de la vía directa fueron abolidas, pero las respuestas evocadas por la vía indirecta se mantuvieron.

En conjunto nuestros resultados indican que la estimulación somatosensorial produce respuestas complejas caracterizadas por incrementos y decrementos en la actividad neuronal de la SNr, que reflejan la recurrencia de ambas vías. La activación del RCB1 produce un desbalance entre la actividad de la vía directa e indirecta, eliminando preferentemente la participación de la vía directa, y esto genera una hiperactividad de la SNr ante la estimulación somatosensorial. Las respuestas evocadas por la estimulación somatosensorial encontradas en la SNr fueron muy similares a lo que encontró recientemente Antonazzo, Gutierrez-Ceballos, Bustinza, Ugedo, & Morera-Herreras (2019), también con registros electrofisiológicos de la SNr, realizados en ratas anestesiadas pero con la estimulación eléctrica de las cortezas premotora y motora. Al igual que nuestros resultados, ellos encontraron respuestas excitatorias e inhibitorias ante las estimulaciones corticales, y con la administración de agonistas cannabinoides se perdió principalmente el componente inhibitorio.

Nuestros datos podrían responder la hipótesis planteada por Sales-Carbonell et al., (2013), en la que relacionan que la activación del RCB1 en las terminales de la vía directa está asociada a una hiper sincronía de la actividad tálamo-cortical, la cual sugieren sea la responsable de generar una alta sensibilidad sensorial durante el consumo recreativo de marihuana, puesto que con nuestro método experimental encontramos que bajo el efecto de

los cannabinoides, un estímulo somatosensorial produce un incremento en la actividad neuronal de la SNr. Por otro lado, debido al papel fundamental que tienen los ganglios basales en la integración de la información sensoriomotora para la manifestación de una acción (Sippy et al., 2015), y al encontrar que los cannabinoides producen un incremento de la actividad neuronal de la SNr ante la estimulación somatosensorial, que en consecuencia incrementaría el tono inhibitorio a sus núcleos objetivo, principalmente el tálamo motor, hipotetizamos que la administración de cannabinoides en animales en libre movimiento produciría una inhibición de la locomoción o de los parámetros cinemáticos del movimiento.

CONCLUSIONES

La estimulación somatosensorial evoca activaciones e inhibiciones transitorias en la actividad neuronal de la SNr, los incrementos en la tasa de disparo se relacionarían con la activación de la vía indirecta y los decrementos con la vía directa.

La administración sistémica del agonista CB1 produce un desbalance entre la actividad de la vía directa e indirecta en la SNr, lo que produce un incremento en la actividad de la SNr.

BIBLIOGRAFÍA

- Aceves, J. J., Rueda-Orozco, P. E., Hernandez-Martinez, R., Galarraga, E., & Bargas, J. (2011). Bidirectional plasticity in striatonigral synapses: A switch to balance direct and indirect basal ganglia pathways. *Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1101/lm.023432.111>
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Antal, M., Beneduce, B. M., & Regehr, W. G. (2014). The substantia nigra conveys target-dependent excitatory and inhibitory outputs from the basal ganglia to the thalamus. *Journal of Neuroscience*, *34*(23), 8032–8042. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0236-14.2014>
- Antonazzo, M., Gutierrez-Ceballos, A., Bustinza, I., Ugedo, L., & Morera-Herreras, T. (2019). Cannabinoids differentially modulate cortical information transmission through the sensorimotor or medial prefrontal basal ganglia circuits. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.14613>
- BermudezContreras, E. J., Schjetnan, A. G. P., Muhammad, A., Bartho, P., McNaughton, B. L., Kolb, B., ... Luczak, A. (2013). Formation and reverberation of sequential neural activity patterns evoked by sensory stimulation are enhanced during cortical desynchronization. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.013>
- Bolam, J. P., Wainer, B. H., & Smith, A. D. (1984). Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience*, *12*(3), 711–718. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90165-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90165-9)
- Brown, J., Pan, W. X., & Dudman, J. T. (2014). The inhibitory microcircuit of the substantia nigra provides feedback gain control of the basal ganglia output. *ELife*, *2014*(3), 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.02397>
- Buzsáki, G., Smith, A., Berger, S., Fisher, L. J., Gage, F. H., Aston-Jones, G., & Bloom, F. E. (1990). Petit mal epilepsy and parkinsonian tremor: Hypothesis of a common pacemaker. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90345-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90345-5)
- Buzsáki, György, Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(6), 407–420. <https://doi.org/10.1038/nrn3241>
- Carelli, R. M., & West, M. O. (1991). Representation of the body by single neurons in the dorsolateral striatum of the awake, unrestrained rat. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.903090205>
- Coffey, K. R., Nader, M., Bawa, J., & West, M. O. (2017). Homogeneous processing in the striatal direct and indirect pathways: single body part sensitive type IIb neurons may express either dopamine receptor D1 or D2. *European Journal of Neuroscience*, *46*(8), 2380–2391. <https://doi.org/10.1111/ejn.13690>
- Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., & Costa, R. M. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11846>

- de Fonseca, F. R., del Arco, I., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A., & Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: Physiology and pharmacology. *Alcohol and Alcoholism*, *40*(1), 2–14. <https://doi.org/10.1093/alcac/agh110>
- Deniau, J. M., Mailly, P., Maurice, N., & Charpier, S. (2007). The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Progress in Brain Research*, *160*, 151–172. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60009-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60009-5)
- Freeze, B. S., Kravitz, A. V., Hammack, N., Berke, J. D., & Kreitzer, A. C. (2013). Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *Journal of Neuroscience*, *33*(47), 18531–18539. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1278-13.2013>
- Gerfen, C. R., & Bolam, J. P. (2016). The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, *24*, 3–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00001-5>
- Giuffrida, A., & Seillier, A. (2012). New insights on endocannabinoid transmission in psychomotor disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *38*(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.04.002>
- Groenewegen, H. J. (2003). The basal ganglia and motor control. *Neural Plasticity*, *10*(1–2), 107–120. <https://doi.org/10.1155/NP.2003.107>
- Gulcebi, M. I., Ketenci, S., Linke, R., Hacıoğlu, H., Yanali, H., Veliskova, J., ... Çavdar, S. (2012). Topographical connections of the substantia nigra pars reticulata to higher-order thalamic nuclei in the rat. *Brain Research Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.005>
- Hazan, L., Zugaro, M., & Buzsáki, G. (2006). Klusters, NeuroScope, NDManager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *Journal of Neuroscience Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.01.017>
- Herkenham, M., Lynn, A. B., de Costa, B. R., & Richfield, E. K. (1991). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Research*, *547*(2), 267–274. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90970-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90970-7)
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., De Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(5), 1932–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1932>
- Hidalgo-Balbuena, A. E., Luma, A. Y., Pimentel-Farfan, A. K., Peña-Rangel, T., & Rueda-Orozco, P. E. (2019). Sensory representations in the striatum provide a temporal reference for learning and executing motor habits. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12075-y>
- Hikosaka, O. (2007). GABAergic output of the basal ganglia. *Progress in Brain Research*, *160*(1), 209–226. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60012-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60012-5)
- Howlett, A. C. (1998). The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1998.0215>
- Katsidoni, V., Kastellakis, A., & Panagis, G. (2013). Biphasic effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on brain stimulation reward and motor activity. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(10), 2273–2284.

<https://doi.org/10.1017/S1461145713000709>

- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, *466*(7306), 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>
- Kucewicz, M. T., Tricklebank, M. D., Bogacz, R., & Jones, M. W. (2011). Dysfunctional prefrontal cortical network activity and interactions following cannabinoid receptor activation. *Journal of Neuroscience*, *31*(43), 15560–15568. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2970-11.2011>
- Mailleux, P., & Vanderhaeghen, J. J. (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: A comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, *48*(3), 655–668. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90409-U](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90409-U)
- Mochol, G., Hermoso-Mendizabal, A., Sakata, S., Harris, K. D., & De La Rocha, J. (2015). Stochastic transitions into silence cause noise correlations in cortical circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(11), 3529–3534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410509112>
- Murray Sherman, S., & Guillery, R. W. (2011). Distinct functions for direct and transthalamic corticocortical connections. *Journal of Neurophysiology*. <https://doi.org/10.1152/jn.00429.2011>
- Nagy, A., Paróczy, Z., Norita, M., & Benedek, G. (2005). Multisensory responses and receptive field properties of neurons in the substantia nigra and in the caudate nucleus. *European Journal of Neuroscience*, *22*(2), 419–424. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04211.x>
- Nonomura, S., Nishizawa, K., Sakai, Y., Kawaguchi, Y., Kato, S., Uchigashima, M., ... Kimura, M. (2018). Monitoring and Updating of Action Selection for Goal-Directed Behavior through the Striatal Direct and Indirect Pathways. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.002>
- Obeso, J. A., & Lanciego, J. L. (2011). Past, present, and future of the pathophysiological model of the basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, *5*(JULY), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00039>
- Oorschot, D. E. (1996). Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: A stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *Journal of Comparative Neurology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960318\)366:4<580::AID-CNE3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960318)366:4<580::AID-CNE3>3.0.CO;2-0)
- Parent, A., & Hazrati, L. N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews*. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00007-C](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00007-C)
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition*. Elsevier Academic Press.
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., ... Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: Implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2915>

- Robbe, D. (2018). To move or to sense? Incorporating somatosensory representation into striatal functions. *Current Opinion in Neurobiology*, 52, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.009>
- Robbe, D., Montgomery, S. M., Thome, A., Rueda-Orozco, P. E., McNaughton, B. L., & Buzsáki, G. (2006). Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1526–1533. <https://doi.org/10.1038/nn1801>
- Sales-Carbonell, C., Rueda-Orozco, P. E., Soria-Gómez, E., Buzsáki, G., Marsicano, G., & Robbe, D. (2013). Striatal GABAergic and cortical glutamatergic neurons mediate contrasting effects of cannabinoids on cortical network synchrony. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), 719–724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217144110>
- Schultz, W. (1986). Activity of pars reticulata neurons of monkey substantia nigra in relation to motor, sensory, and complex events. *Journal of Neurophysiology*, 55(4), 660–677. <https://doi.org/10.1152/jn.1986.55.4.660>
- Schwarz, M., Sontag, K. H., & Wand, P. (1984). Sensory-motor processing in substantia nigra pars reticulata in conscious cats. *The Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015057>
- Sippy, T., Lapray, D., Crochet, S., & Petersen, C. C. H. (2015). Cell-Type-Specific Sensorimotor Processing in Striatal Projection Neurons during Goal-Directed Behavior. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.039>
- Szabo, B., Wallmichrath, I., Mathonia, P., & Pfreundtner, C. (2000). Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*, 97(1), 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00036-1)
- Takakusaki, K., Habaguchi, T., Ohtinata-Sugimoto, J., Saitoh, K., & Sakamoto, T. (2003). 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(1), 293–308. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00095-2)
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S. Q., & Costa, R. M. (2016). Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.032>
- Turner, R. S., & Desmurget, M. (2010). Basal ganglia contributions to motor control: A vigorous tutor. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(6), 704–716. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.022>
- Wallmichrath, I., & Szabo, B. (2002). Analysis of the effect of cannabinoids on GABAergic neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 365(4), 326–334. <https://doi.org/10.1007/s00210-001-0520-z>
- Zador, A. M. (2019). A critique of pure learning and what artificial neural networks can learn from animal brains. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11786-6>
- Zhou, F. M. (2016). The Substantia Nigra Pars Reticulata. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 24, 293–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00015-5>