



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
Biología Experimental

**“Disección de los circuitos neurales involucrados en la
estimulación cerebral profunda mediante técnicas de
optogenética”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
Anil Kumar Verma Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dr. José Bargas Díaz
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Víctor Magdaleno-Madrigal
Instituto Nacional de Psiquiatría

CD. MX.

OCTUBRE, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

OFICIO CPCB /1186/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de octubre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **VERMA RODRÍGUEZ ANIL KUMAR** con número de cuenta **411070821** con la tesis titulada "**Diseción de los circuitos neuronales involucrados en la estimulación cerebral profunda mediante técnicas de optogenética**", realizada bajo la dirección del **DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
Vocal: DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO
Secretario: DR. JOSÉ BARGAS DIAZ
Suplente: DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO
Suplente: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 05 de noviembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

Agradecimientos institucionales

Agradezco al posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad de estudiar en su programa, fomentando así mi crecimiento científico.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Ciencia Básica

El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo gracias a los siguientes apoyos financieros:

- Beca Nacional CONACyT para estudios de posgrado 638839.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Ciencia Básica 22412
- Fronteras de la Ciencia 2022
- Beca Nacional CONACyT para estudios de posgrado.

Agradezco también al Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar por la confianza de pertenecer a su equipo de trabajo. Gracias por contribuir en mi desarrollo académico. Al Dr. Josué Ramírez Jarquin por su ayuda en mis experimentos.

Al comité tutor, el Dr. José Bargas Díaz y el Dr. Víctor Magdaleno Madrigal, quienes con sus discusiones ayudaron a enriquecer el trabajo.

Agradecimientos personales

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio por ser parte de mi formación como académico y como persona.

A todos mis maestros quienes contribuyeron a mi crecimiento a lo largo de mi vida.

Índice

Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Objetivos	9
Antecedentes.....	10
La enfermedad de Parkinson: Fisiopatología.....	10
La enfermedad de Parkinson y la Deficiencia de Dopamina	11
Modelo experimental de depleción dopaminérgica con 6-hidroxidopamina	12
La actividad neural de los ganglios basales se encuentra alterada en la enfermedad de Parkinson	14
Tratamientos para la enfermedad de Parkinson.....	15
Generalidades de la estimulación cerebral profunda.....	16
Teorías sobre el mecanismo de acción de la estimulación cerebral profunda	17
La función del núcleo Globo Pálido interno / núcleo Entopenduncular	20
Pregunta Experimental	23
Hipótesis.....	23
Metodología	25
Lesión con 6-hidroxidopamina.....	25
Implementación de sistema de lectura de conducta	25
Estandarización del vector viral AAV2-hsyn-Arch3.0.....	25
Activación de fibras aferentes al GPi.....	25
Inhibición del GPi.....	26
Prueba de protocolos óptimos de estimulación en el GPi.....	26
Microestimulación cortical para el mapeo funcional de la corteza motora	27
Electrofisiología <i>in vivo</i>	27
Análisis de señal electrofisiológica de campo.....	28
Tarea conductual de giros dirigidos a un objetivo	28
Cirugía de implante de electrodo en animales entrenados y registro electrofisiológico.....	29
Análisis de datos electrofisiológicos	30
Resultados	32

Objetivos 1 y 2. Implementación del modelo de ratón hemiparkinsoniano y de un sistema de seguimiento por video.....	32
Objetivo 3a: Activación de fibras aferentes al GPi mediante ChR2 ET/TC.....	33
Objetivo 3b: Inhibición directa del GPi con Arch3.0	37
Objetivo 4: Evaluación de la repercusión de las estimulaciones optogenéticas sobre marcadores electrofisiológicos de la enfermedad	44
Objetivo 5: Evaluación actividad normal del núcleo entopeduncular durante la conducta de giro.....	49
Paradigma conductual	50
Mediciones de conducta en el paradigma	51
Análisis de la actividad electrofisiológica de unidades registradas en el núcleo entopeduncular ante la conducta de giro.....	53
Análisis poblacional de la actividad de unidades registradas en el núcleo entopeduncular ante la conducta de giro.....	55
Discusión.....	58
Generar una inhibición moderada del núcleo entopeduncular mejora la función motora del animal parkinsoniano	58
La mejora de la actividad motora del animal parkinsoniano concuerda con la fisiopatología propuesta de la enfermedad de Parkinson	59
La inhibición del núcleo entopeduncular mediante la activación de fibras gabaérgicas aferentes tiene efectos de red	60
La contribución que el núcleo entopeduncular tiene sobre la conducta de giro no se ha estudiado.....	62
Conclusiones	65
Anexos.....	66
Literatura citada	67

Resumen

Debido a que la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson no es comprendida del todo, son también incompletamente entendidos los mecanismos de acción de los tratamientos actuales. Un tratamiento utilizado en pacientes con enfermedad avanzada consiste en la administración de pulsos de voltaje a altas frecuencias tras el implante de un electrodo en zonas profundas del cerebro, como el núcleo subtalámico o el globo pálido interno. Este protocolo logra disminuir algunos de los síntomas de la enfermedad, como la bradicinesia, el temblor y la distonía (generalmente consecuencia del tratamiento con agonistas dopaminérgicos). En este estudio se explora un posible mecanismo de la estimulación cerebral profunda en un modelo roedor de la enfermedad de Parkinson, el ratón hemidepletado de dopamina. Entre los mecanismos propuestos está la inhibición de la actividad en el sitio blanco del implante de los electrodos. Mediante técnicas de manipulación optogenética, en donde se induce la expresión de proteínas sensibles a la luz en neuronas específicas, se puede manipular la actividad de manera dirigida y temporalmente determinada, pudiendo así evaluar la repercusión de éstas sobre la conducta motora del animal.

En este estudio se realizaron inhibiciones del núcleo entopeduncular (NEP) en el modelo de ratón hemiparkinsoniano mediante dos estrategias de manipulación optogenética. Se evaluó la repercusión de estas manipulaciones sobre la conducta motora del modelo experimental, así como sobre marcadores electrofisiológicos de la enfermedad. Se encontró que un protocolo de inhibición logra mejorar los parámetros motores de lesión de bradicinesia y giro ipsilateral a la lesión. Este mismo parámetro de inhibición logró disminuir el marcador electrofisiológico de depleción dopaminérgica, el poder de la banda beta.

Por otra parte, se indagó en la actividad de este núcleo en animales no lesionados durante una tarea de giro, con el objetivo de entender qué función cumple el mismo. La hipótesis planteada a partir de los experimentos de manipulación es que el NEP es importante para la conducta de giro del animal y refleja parámetros motores del movimiento. Los resultados preliminares indican que las unidades registradas no parecen codificar esta conducta de la manera planteada en la hipótesis. La actividad refleja otras variables, aparentemente más motivacionales, pero no de manera fiel la codificación del giro.

Así, mediante el estudio del núcleo en condiciones controles y en un modelo de la enfermedad, se busca entender cuál es su función, cómo la enfermedad podría afectarlo, y un mecanismo mediante el que la estimulación cerebral profunda podría estar contrarrestando esta desregulación.

Abstract

The pathophysiology of Parkinson's disease is not well understood. Moreover, the mechanism of action of current treatment options have not been completely elucidated. For example, one of the currently used methods to treat this disease consists in implanting an electrode in deep areas of the brain, such as the subthalamic nucleus or the Globus Pallidus internus of patients with a severe disease. High frequency voltage pulses are then delivered through these electrodes, and this correlates with a decrease of motor symptoms such as bradykinesia, tremor, and dystonia (generally an adverse effect of treatment with dopaminergic agonists). In this study a possible mechanism of action of deep brain stimulation is explored with the use of a rodent model, a dopamine hemidepleted mouse. Amongst the proposed mechanisms of action of deep brain stimulation is the inhibition of the target site of the implanted electrode. Using optogenetic techniques to manipulate the activity of select neurons of the rodent brain, we explore the effect inhibition of the entopeduncular nucleus has upon motor behaviors of this rodent model of the disease.

In this study the inhibition of the entopeduncular nucleus of a hemiparkinsonian mouse are performed using two different optogenetic approaches. Then, an evaluation is conducted to ascertain the repercussion that these manipulations have on the motor behavior of the experimental model, and on electrophysiological markers of the disease. The findings include an inhibition protocol that improves the bradykinesia and ipsilateral turn of the mouse. This same protocol can reduce the beta band power that is signature of parkinsonism.

Furthermore, the activity of the entopeduncular nucleus during a turning behavior is explored in non-lesioned animals with the objective of achieving a better understanding of the function of this nucleus. The hypothesis presented based on the inhibition experiments was that the activity of this nucleus would be correlated with the angular velocity of the turning behavior of the animals. However, preliminary results show that the recorded units do not seem to have a correlated activity with the turning behavior of the animals.

Thus, through the study of this nucleus in a control situation and in a model of the disease, we seek to understand what its function is, how it may be affected by the disease, and how the deep brain stimulation might counteract this deregulation.

Introducción

La fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP) no se comprende enteramente. Empero, es posible tratarla principalmente mediante el uso de agonistas dopaminérgicos y, en casos más avanzados, mediante la estimulación cerebral profunda. La respuesta ante agonistas dopaminérgicos, así como estudios post-mortem de pacientes humanos han ligado estrechamente esta enfermedad con la desaparición de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Por lo mismo, se han generado modelos animales con lesión de estas neuronas para emular la fisiopatología y estudiar la enfermedad y sus tratamientos. En el caso de los roedores, un modelo ampliamente empleado es el de lesión unilateral con 6-hidroxidopamina. Ante la desaparición de las neuronas dopaminérgicas, los roedores presentan bradicinesia, presente también en humanos. Sin embargo, aparece una conducta de giro ipsilateral a la lesión, que no es característico de la enfermedad. Además, no presentan temblores que se pudieran equiparar al temblor de intención observado en los pacientes. No obstante, se han encontrado marcadores electrofisiológicos que sugieren que existen paralelismos entre el modelo y la enfermedad, como el aumento del poder de las oscilaciones en la banda beta en diversos sitios anatómicos, entre ellos la sustancia nigra y la corteza motora.

Por otra parte, el entendimiento que se tiene sobre el mecanismo de acción de los tratamientos es incompleto. En particular, el mecanismo de acción de la estimulación cerebral profunda, en el que se administran pulsos de voltaje a altas frecuencias en núcleos profundos como el núcleo subtalámico o el globo pálido interno a través de electrodos implantados, sigue siendo un misterio. Se han propuesto diversas hipótesis a partir de datos experimentales. Sin embargo, los resultados experimentales son contradictorios.

Con estos antecedentes, en este proyecto se propuso estudiar la inhibición del núcleo entopeduncular como posible mecanismo de acción de la estimulación cerebral profunda en el sitio análogo humano, el globo pálido interno. A través de técnicas de optogenética se manipularon circuitos específicos con precisión temporal. Se generaron dos aproximaciones experimentales para inhibir este núcleo, y se evaluó la conducta motora espontánea del animal y algunos marcadores electrofisiológicos como indicadores del impacto de estas intervenciones. Por último, se realizaron registros electrofisiológicos del núcleo entopeduncular durante una conducta de giro en animales no lesionados con el objetivo de entender cuál es la función de este núcleo en condiciones normales. Esto permitió formular una hipótesis de cómo se desregula la actividad en el núcleo en la depleción dopaminérgica y cómo se generan las conductas motoras características de la lesión.

Objetivos

Objetivo general

Explorar un posible mecanismo de acción de la estimulación cerebral profunda en el globo pálido interno para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson mediante técnicas de optogenética en un modelo de ratón hemiparkinsoniano.

Objetivos particulares

1. Implementar un modelo de ratón hemiparkinsoniano.
2. Generar un análisis de conducta que permita constatar el modelo de lesión para discriminar si las manipulaciones son efectivas.
3. Generar manipulaciones optogenéticas dirigidas al globo pálido interno, efectivas para disminuir los signos de parkinsonismo en el modelo de ratón, mediante técnicas de optogenética.
 - a. Activar vías aferentes
 - b. Inhibir el sitio blanco
4. Corroborar la efectividad de las manipulaciones optogenéticas sobre la disminución de marcadores conductuales y electrofisiológicos de depleción dopaminérgica
5. Estudiar la actividad del núcleo entopeduncular durante la conducta de giro en animales no lesionados.

Antecedentes

La estimulación cerebral profunda (DBS, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una opción terapéutica para un número creciente de enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas. Esencialmente consiste en introducir un electrodo a un sitio específico en el cerebro y generar pulsos cuadrados de voltaje a diversas frecuencias. Su uso se describió originalmente para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP) implantando el electrodo en la región talámica (J. A. Obeso et al., 2017). Sin embargo, se han encontrado otros sitios de estimulación que también son benéficos para esta enfermedad (Follett et al., 2010). Asimismo, la investigación básica y clínica ha dado lugar a la extensión de las indicaciones para la DBS. Prueba de ello es que la Food and Drug Agency (FDA), agencia regulatoria estadounidense, ha concedido aprobación para el uso o investigación de la DBS para diversas condiciones, como la distonía, el síndrome obsesivo-compulsivo, la depresión, la epilepsia, entre otras (Hariz, Blomstedt, & Zrinzo, 2010).

No obstante, a pesar de la extensión de indicaciones para su uso en vista de evidencia clínica a favor de su utilidad, no existe un consenso general sobre el mecanismo de acción de la DBS. Desde la implementación para el tratamiento de la EP ha habido un auge de la investigación tanto clínica como básica con el fin de elucidar los efectos de ésta sobre el tejido nervioso. En el presente estudio se abordó la pregunta de qué mecanismo podría estar ejerciendo la estimulación cerebral profunda en un modelo de roedor hemiparkinsoniano. Específicamente, se evalúa la posibilidad de que esta modalidad terapéutica genere inhibición sobre su sitio blanco.

La enfermedad de Parkinson: Fisiopatología

La EP recibe su nombre por el médico que la describió por primera vez como entidad nosológica en 1817 (Parkinson, 2002). Inicialmente se describió como parálisis agitante o con temblor. Fue otro médico, Charcot, quien estableció que a pesar de haber sido descrita como parálisis, la enfermedad no se caracterizaba por la debilidad de los pacientes, y la nombró ‘enfermedad de Parkinson’ (J. A. Obeso et al., 2017). Aun hoy, más de 200 años de la descripción inicial, la mayoría de los elementos inicialmente identificados como definitorios de la entidad nosológica se utilizan para caracterizar a la misma.

Hoy en día se identifica clínicamente a la enfermedad principalmente por el temblor de reposo, rigidez y bradicinesia (lentitud de movimientos). A pesar de ser muy comunes en etapas avanzadas, las dificultades en la marcha y la inestabilidad postural no son definitorios de la enfermedad (Gelb, Oliver, & Gilman, 1999). La EP suele aparecer de manera unilateral y primero en extremidades superiores. El inicio es lento y progresivo e incluso en la descripción original de la enfermedad, Parkinson describió que los pacientes no pueden precisar el comienzo de su

enfermedad (Parkinson, 2002). Progresa afectando a todas las extremidades produciendo la llamada marcha festinante (las piernas no se elevan ante cada paso, zancada reducida, festinación o marcha cada vez más rápida) y postura de tronco en flexión (camptocormia). Por otra parte, ahora se reconoce que la enfermedad produce manifestaciones no motoras que muchas veces anteceden a la aparición de los síntomas arriba mencionados por 2 a 10 años, como anosmia (baja en el sentido del olfato), ageusia (disminución del sentido del gusto), hiperhidrosis (sudoración), fatiga y dolor (Pont-Sunyer et al., 2015).

Desde un punto de vista histopatológico, se ha ligado a la enfermedad con la aparición de agregados inmunopositivos para alfa-sinucleína en el cerebro de los pacientes (Braak et al., 2006). Interesantemente, la aparición de estos agregados en la EP se da con cierto orden a lo largo del tiempo, desde la médula espinal hacia regiones más corticales. Se sugiere que cuando estos agregados (cuerpos y neuritas de Lewis) surgen en la sustancia nigra, generan la muerte neuronal dopaminérgica lo que es causa de las afecciones motoras características de la EP (Poewe et al., 2017).

El mecanismo que da origen a la enfermedad todavía no es entendido por completo. Se cree que la EP es la manifestación sindrómica de varias posibles etiologías (intoxicación, trauma, alteraciones vasculares, sinucleinopatías), que tienen como común denominador la muerte de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Desde el punto de vista fisiopatológico destacan los siguientes procesos (Michel, Hirsch, & Hunot, 2016; Poewe et al., 2017):

- Proteostasis alterada de la alfa-sinucleína: en histopatología de pacientes con EP se han encontrado agregados proteínicos que son inmunopositivos para alfa-sinucleína.
- Disminución de la degradación intracelular por daño de vías (como el sistema de autofagia lisosomal).
- Propagación tipo prión: Este modelo apoya la idea de que la agregación anómala de proteínas (en especial la alfa-sinucleína) genera una reacción en cascada que facilita la agregación proteínica adicional.
- Disfunción mitocondrial: A partir de estudios genéticos se ha encontrado que en algunos casos de EP existen mutaciones de genes relacionados con la función mitocondrial.
- Estrés oxidativo: A pesar de que existen marcadores de estrés oxidativo en modelos y pacientes con EP, no queda claro si éste es causa o consecuencia misma de la muerte neural.

La enfermedad de Parkinson y la Deficiencia de Dopamina

A mediados del siglo XX comenzó a surgir evidencia que ligaba a la EP con la deficiencia de dopamina cerebral, desde modelos animales hasta mediciones en cerebros de pacientes (Ehringer & Hornykiewicz, 1998; Lees, Tolosa, & Olanow, 2015). Puesto que se ha descrito que existen varias causas fisiopatológicas para el síndrome parkinsoniano, se cree que convergen en la desaparición de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. La evidencia se basa en que la disminución de

neuronas dopaminérgicas tiene buena correlación con la aparición y gravedad de los síntomas motores mencionados previamente. En la **Figura 1A** se presentan datos de un estudio anátomo-patológico en los que se correlacionó la gravedad de los síntomas de los pacientes con el conteo de neuronas en la sustancia nigra pars compacta al momento de su muerte (Greffard et al., 2006). Por otro lado, en un estudio funcional, se correlacionó la gravedad de la bradicinesia evaluada clínicamente con la captación de un precursor dopaminérgico en el estriado: a menor captación, menor cantidad de axones dopaminérgicos (Eidelberg et al., 1990) (**Figura 1B**).

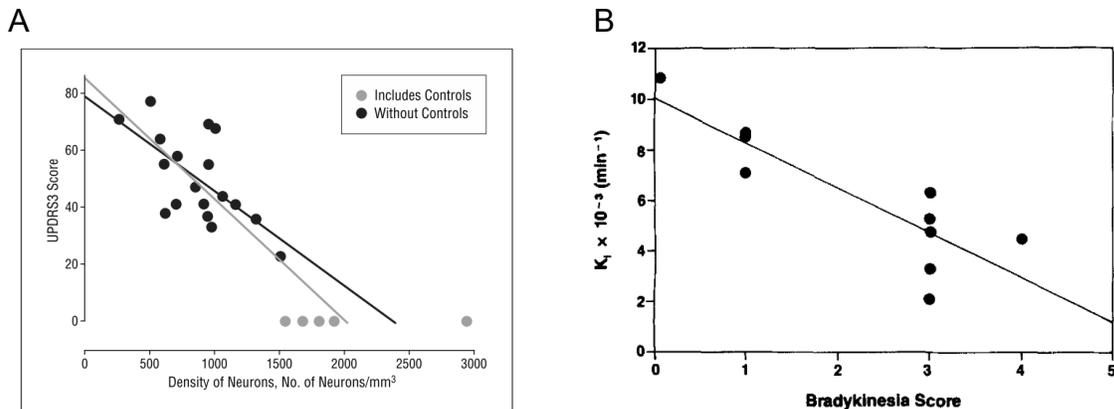


Figura 1. La gravedad de los síntomas motores correlaciona con la cantidad de neuronas dopaminérgicas y con la captación de dopamina en pacientes con EP. A. En esta figura adaptada de (Greffard et al., 2006) se estudiaron histológicamente cerebros de pacientes con EP. Se correlacionó con significancia estadística la densidad de neuronas en la sustancia nigra pars compacta con la gravedad de sus síntomas medida clínicamente mediante la Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS3) en un periodo reciente a su fallecimiento. **B.** Correlación estadísticamente significativa entre la captación de [18F]fluorodopa (K_i) y la medición clínica de bradicinesia de pacientes [adaptada de (Eidelberg et al., 1990)].

Por último, una de las evidencias más fuertes que apuntan a que la fisiopatología de la enfermedad está estrechamente correlacionada con la deficiencia de dopamina se estableció cuando se administró levodopa (un precursor de dopamina) a pacientes y tuvieron una mejoría notable, en particular en los síntomas motores de rigidez, bradicinesia y temblor (Lees et al., 2015). Puesto que se ha ligado estrechamente la sintomatología motora con la deficiencia de dopamina, se han creado varios modelos animales en los que se genera una depleción de esta sustancia en el cerebro. Uno de ellos, el usado en este estudio, es el roedor lesionado con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Boix, Padel, & Paul, 2015).

Modelo experimental de depleción dopaminérgica con 6-hidroxidopamina

Hace ya varias décadas se encontró que la inyección de 6-OHDA en el sistema nervioso central de roedores produce una depleción de fibras monoaminérgicas, que además genera signos de bradicinesia y rotación ipsilateral a la lesión (Ungerstedt, 1968). Si bien en los roedores, el modelo de depleción dopaminérgica no genera el característico temblor de reposo, sí reproduce la

bradicinesia y otros eventos celulares como el estrés oxidativo y la neurodegeneración (Hernandez-Baltazar, Zavala-Flores, & Villanueva-Olivo, 2017).

Además, el modelo de 6-OHDA reproduce patrones electrofisiológicos que se cree son marcadores electrofisiológicos de la EP (Mugge et al., 2019). Diversos estudios han corroborado que en pacientes con EP existe un aumento en la amplitud de las oscilaciones beta (10-40Hz) en diversas áreas del cerebro, y se cree que se originan en el núcleo subtalámico (Wingeier et al., 2006). Este ritmo aberrante, se cree proviene de una actividad sincrónica que parece estar asociada a la fisiopatología de la enfermedad.

La **Figura 2A** muestra el análisis espectral de la señal de potencial local de campo registrada en el núcleo subtalámico de un paciente con EP con y sin tratamiento (levodopa). Es aparente que existe un mayor poder del 'pico' beta en el paciente sin tratamiento. Por otro lado, el modelo de roedor lesionado con 6-OHDA también muestra este aumento del poder de la banda beta, especialmente cuando el animal se encuentra en locomoción.

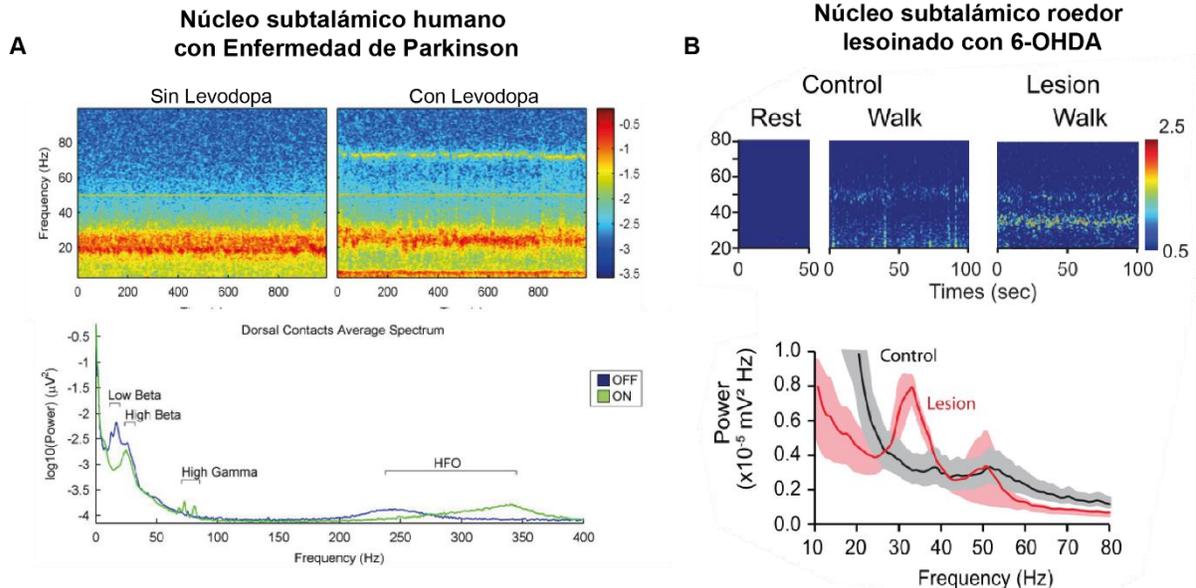


Figura 2. Los pacientes con enfermedad de Parkinson presentan un aumento en el poder beta en el potencial local de campo del núcleo subtalámico y esto es replicado en el modelo de roedor lesionado con 6-OHDA. A. Se muestra el análisis espectral de registros de potencial local de campo obtenidos del núcleo subtalámico de un paciente con enfermedad de Parkinson sin y con levodopa (tratamiento para la enfermedad). Es visible en el panel superior cómo existe una banda en el rango de frecuencias 15-30Hz que tiene un poder alto. Cuando al paciente se le administra levodopa, el poder de esta banda disminuye. Esto es visible de manera cuantitativa en el panel inferior, en donde se observa un 'pico' en el rango beta y este disminuye ante la administración de levodopa [adaptado de (López-Azcárate et al., 2010)]. **B.** Se muestra en el panel superior el análisis espectral del potencial local de campo en un roedor control y en un roedor lesionado durante locomoción. En el panel inferior es visible este 'pico' en el rango beta que está ausente en animales controles [adaptado de (C. Delaville, McCoy, Gerber, Cruz, & Walters, 2015)].

Debido a que existe evidencia que correlaciona la magnitud del poder de la banda beta con la gravedad de los síntomas del paciente, es posible que este ritmo anómalo sea parte de la fisiopatología de la enfermedad (Neumann et al., 2016). Así, el modelo de roedor lesionado con 6-OHDA presenta ciertas características similares a la EP que permiten evaluar algunos tratamientos y estudiar la fisiopatología.

La actividad neural de los ganglios basales se encuentra alterada en la enfermedad de Parkinson

Existen diversas teorías sobre cómo la depleción dopaminérgica podría estar alterando la función de los ganglios basales. Tras el descubrimiento de que las neuronas de proyección consistían en dos poblaciones genéticamente y anatómicamente distintas, se sugirió que esto podría ser parte de la explicación de la fisiopatología de la enfermedad. La vía estriato-nigral expresa el receptor excitatorio de dopamina, D1R. Mientras que la otra, estriato-palidal, expresa el receptor inhibitorio de dopamina, D2R (CR Gerfen et al., 1990). En diversos estudios se corroboró que la dopamina aumenta la excitabilidad de las neuronas de la vía estriato-nigral, o vía directa, mientras que disminuía la excitabilidad de las neuronas de la vía estriato-palidal, o indirecta (Ericsson et al., 2013; Hernández-López et al., 2000; Hernández-López, Vargas, Surmeier, Reyes, & Galarraga, 1997). Así, surge la hipótesis de que ante la ausencia de dopamina la actividad de la vía directa debe estar disminuida, la actividad de la vía indirecta aumentada, y, gracias a las interconexiones descritas en la **Figura 3A y B**, la actividad de los núcleos subtalámico y globo pálido interno debería estar aumentada. Experimentos posteriores han concluido que la actividad del núcleo subtalámico está en efecto aumentada, pero la actividad del globo pálido interno no siempre se ha encontrado elevada (Deffains et al., 2016; McCairn & Turner, 2009).

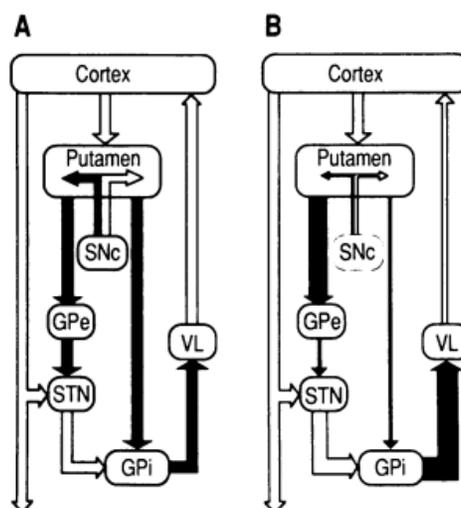


Figura 3. Teoría de la frecuencia de disparo alterada en la enfermedad de Parkinson. Esta figura [adaptada de (Bergman, Wichmann, & DeLong, 1990)] es un modelo

hipotético de la interconexión entre los núcleos de los ganglios basales y cómo la dopamina puede alterar su actividad. Las flechas blancas indican conexiones glutamatérgicas mientras que las negras indican conexiones gabaérgicas. El grosor de las flechas indica actividad promedio (tono). **A.** Se ilustra el modelo de los ganglios basales en un animal normal. **B.** Se ilustran los cambios que acontecerían en la actividad de los núcleos tras la depleción dopaminérgica.

Esta hipótesis de la frecuencia de disparo promedio se encuentra alterada en los núcleos de salida hace sentido cuando se considera que los primeros tratamientos quirúrgicos lesionaban estos mismos núcleos, artificialmente 'disminuyendo su actividad'. Sin embargo, existe evidencia que apunta a que posiblemente no sólo la actividad de estos núcleos esté alterada en frecuencia de disparo, pero también que los perfiles espacio-temporales de actividad se encuentran alterados (Parker et al., 2018). Sin embargo, a pesar de la comprensión incompleta de la fisiopatología de la enfermedad, se han descrito tratamientos paliativos que son efectivos para controlar algunos síntomas de ésta.

Tratamientos para la enfermedad de Parkinson

Hoy en día los tratamientos para esta enfermedad son paliativos y se centran en disminuir los síntomas para mejorar la calidad de vida del paciente. No existen tratamientos que detengan o reviertan la progresión de la enfermedad. La primera línea de tratamiento se basa en aumentar el tono dopaminérgico dentro del cerebro del paciente enfermo. Esto se hace principalmente mediante la administración de agonistas dopaminérgicos, generalmente el precursor de dopamina, levodopa (Miyasaki, Martin, Suchowersky, Weiner, & Lang, 2002).

Un gran problema del tratamiento con agonistas dopaminérgicos/levodopa es que la efectividad del tratamiento es máxima sólo en los primeros 5 años de la administración. Para los 10 años de tratamiento, la mayoría de los pacientes experimenta complicaciones derivadas del tratamiento farmacológico (Frucht & Greene, 2002; J. A. Obeso et al., 2017; Poewe et al., 2017). Es en estos casos que se puede considerar el uso de la estimulación cerebral profunda. En la mayoría de los pacientes, la terapia con DBS permite reducir la dosis de levodopa diaria, disminuyendo así los efectos adversos como la distonía, y mejora síntomas motores como el temblor. Actualmente los sitios anatómicos más utilizados para tratar la EP con DBS son el núcleo subtalámico y el núcleo globo pálido interno. En ensayos clínicos aleatorizados no se ha encontrado la superioridad de uno sobre otro (Follett et al., 2010). Con todo, y a pesar de la existencia del tratamiento, no alivia todos los síntomas.

Generalidades de la estimulación cerebral profunda

El uso de la electricidad para explorar las funciones del cerebro humano tuvo su comienzo en el inicio del siglo XX. Uno de los mayores exponentes fue Penfield, quien adoptó el 'Procedimiento de Montreal' que consistía exponer el cerebro de pacientes con epilepsia usando únicamente anestesia local. Así, con el paciente despierto, Penfield realizaba la estimulación eléctrica en diferentes partes de la corteza cerebral recibiendo retroalimentación del paciente sobre los efectos que éste percibía mientras encontraba el sitio responsable de las crisis epilépticas y se lesionaba (Penfield, 1936). Además, con la invención del aparato estereotáxico se comenzaron a utilizar las técnicas de estimulación para hallar sitios de interés en blancos más profundos y para diversas enfermedades, pues no existía otro tipo de tratamiento (Gardner, 2013). Esto inauguró el uso de técnicas de estimulación para la localización de blancos en el cerebro y posteriormente para el tratamiento de enfermedades.

Empero, la estimulación cerebral profunda moderna no comenzó sino hasta la década de los 90s, cuando se comenzó a adaptar los estimuladores subcutáneos utilizados para marcapasos cardíacos a electrodos cerebrales (Hariz et al., 2010). Uno de los primeros ejemplos de DBS con parámetros de estimulación e indicaciones similares a los que se utilizan hoy fue para el tratamiento de temblor en la enfermedad de Parkinson. Se combinó la talamotomía unilateral del núcleo ventral intermedio del tálamo (el tratamiento quirúrgico estándar en la época) con el implante de un electrodo de estimulación en el núcleo talámico contralateral (Benabid et al, 1987). Esto logró buenos resultados en cuanto a la disminución del temblor y la capacidad de los pacientes para realizar movimientos voluntarios. Curiosamente, en este estudio se menciona que el protocolo de estimulación usado fue de 130Hz (considerado como alta frecuencia, high-frequency) porque era el límite superior que el estimulador podía alcanzar. Sin embargo, investigaciones subsecuentes corroboraron que en efecto estos parámetros de estimulación suelen ser los más efectivos (Limousin et al., 1995). Así, se auguró el inicio de la estimulación cerebral profunda como se aplica hoy en día.

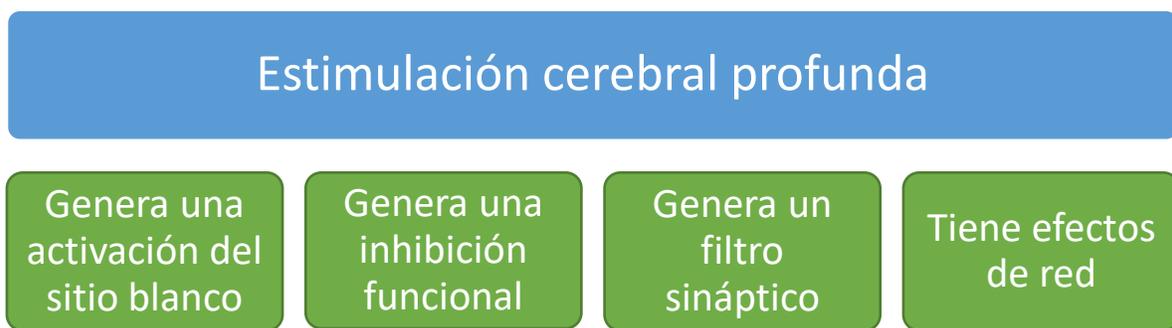
Si bien la estimulación cerebral profunda a alta frecuencia (HF, *high frequency*) se utilizó primeramente en trastornos motores, hoy en día las indicaciones para la misma han crecido y son variadas. Existen indicaciones para DBS en problemas tanto neurológicos como psiquiátricos. Entre los problemas neurológicos en los que se ha probado la DBS están la enfermedad de Parkinson, el temblor esencial, distonía, epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, entre otros. Por otra parte, trastornos neuropsiquiátricos como el trastorno obsesivo compulsivo, el trastorno depresivo resistente a tratamiento, la obesidad y la anorexia nerviosa, la adicción, dolor crónico, entre otros (Lee, Lozano, Dallapiazza, & Lozano, 2019; Lyons, 2011). Además, junto con la variedad de patologías para los que se ha implementado la DBS, se han estudiados varias regiones anatómicas para la implantación de electrodos. Por ejemplo, para la enfermedad de Parkinson se encuentran aprobados por la FDA actualmente los núcleos subtalámico y globo pálido interno; sin embargo,

existen ensayos clínicos en los que se han implantado los electrodos en el tálamo, el núcleo pedúnculo pontino y el núcleo basal de Meynert (Lyons, 2011).

No obstante, los mecanismos que subyacen a la eficacia de la DBS no son del todo claros.

Teorías sobre el mecanismo de acción de la estimulación cerebral profunda

Desde su implementación ha habido una gran cantidad de investigación para intentar dilucidar el mecanismo de la estimulación cerebral profunda. Existen algunas vertientes en las hipótesis de su funcionamiento, que se resumen en el esquema a continuación.



La idea de la estimulación cerebral profunda como un método para generar inhibición funcional en el sitio de implantación de los electrodos sigue un paso lógico a partir de los tratamientos previos que involucraban lesiones. Previo a la invención de la DBS el tratamiento quirúrgico para la EP avanzada consistía en realizar ablaciones de distintos blancos quirúrgicos (Walter & Vitek, 2004). En particular se realizaban lesiones generalmente en el tálamo (en el núcleo intermedio), en el subtálamo y en el globo pálido interno. De hecho, en la descripción original de la técnica moderna de estimulación cerebral profunda se utilizó una combinación de lesión en un hemisferio junto con la estimulación eléctrica a alta frecuencia en el otro hemisferio (Benabid et al., 1987). Así, fue una explicación lógica el que la DBS generara una inhibición funcional.

Esfuerzos para comprobar esta hipótesis de inhibición funcional han arrojado resultados variados, algunos de ellos compatibles con inhibición. Desde el punto de vista de la electrofisiología de la célula única, se ha comprobado que la estimulación a alta frecuencia puede bloquear ciertas corrientes dependientes de voltaje (Beurrier, Bioulac, Audin, & Hammond, 2001a; Do & Bean, 2003), en específico corrientes de sodio y de calcio. Este efecto es reversible con el paso de tiempo, y estas corrientes vuelven a ser funcionales (**Figura 4A**). Por otro parte, registros en el globo pálido interno de primates han revelado que aplicar estimulación a alta frecuencia en la vecindad de la unidad registrada puede inhibir la actividad de ésta (**Figura 4B**, (Chiken & Nambu, 2016)). Este efecto es reversible aplicando bloqueadores de canales de GABA. Así, se comprueban por lo menos dos

mecanismos para la inhibición del sitio de implantación del electrodo de estimulación cerebral profunda cuando se aplican pulsos a alta frecuencia. Esto es relevante y concuerda con la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson, pues existen estudios que revelan que la actividad del núcleo GPi en primates con depleción dopaminérgica es más elevada que en controles, y disminuye tras la aplicación de estimulación a alta frecuencia (Boraud, Bezard, Bioulac, & Gross, 1996; Moran, Stein, Tischler, Belevsky, & Bar-Gad, 2011).

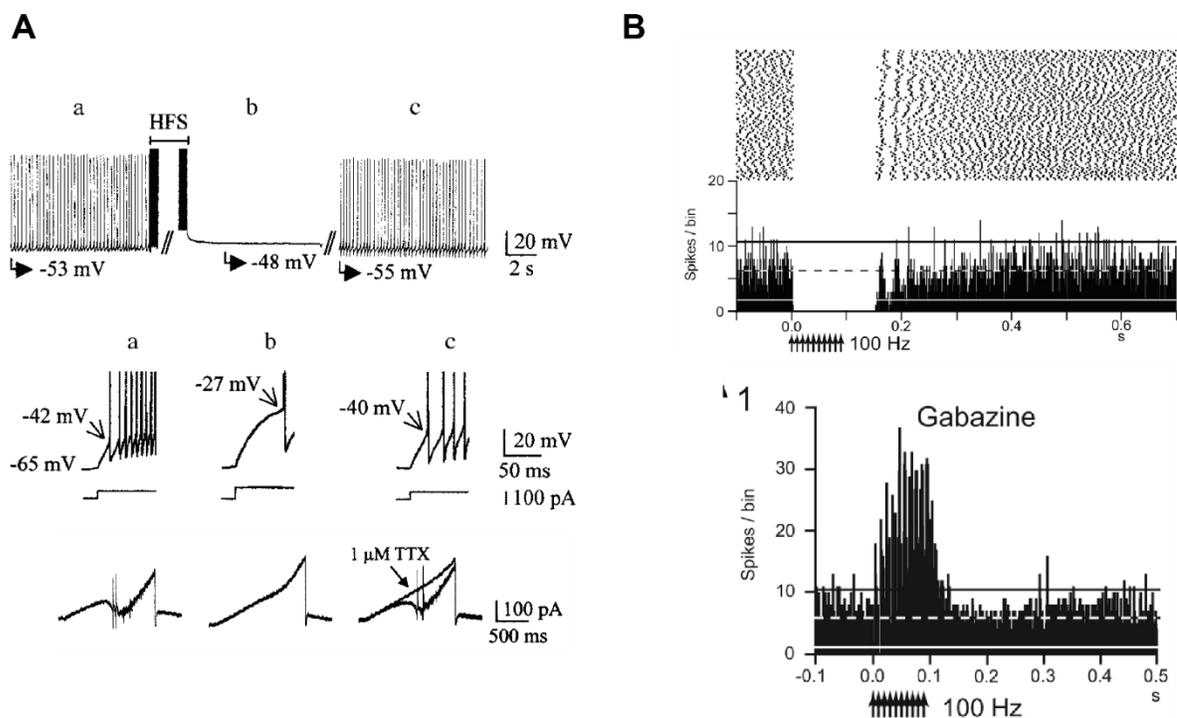


Figura 4. La estimulación cerebral profunda genera una inhibición funcional del sitio blanco. **A.** Registros electrofisiológicos *patch clamp* en la modalidad de célula completa de neuronas del núcleo subtalámico antes, durante y después de aplicar estimulación a alta frecuencia (HFS, 250Hz) cerca del a célula registrada. En la segunda fila se muestran registros en fijación de corriente en donde la inyección de un pulso de corriente de 80pA en cada uno de los tres periodos de tiempo. Es visible que ante esta inyección de corriente en el periodo pre estimulación, se generan potenciales de acción con un umbral de -42mV. Inmediatamente después de la HFS, la inyección de corriente debe ser mayor (100pA) para generar un potencial de acción, y el umbral al que este ocurre es mayor (-27mV). Tras dejar pasar tiempo, la excitabilidad de la membrana retorna a ser más parecida a la basal y el umbral de disparo baja a -40mV. En la tercera fila se muestran registros en fijación de voltaje. Se genera una rampa de despolarización de 5mV/s y en el periodo pre estimulación se inducen dos tipos de corrientes: la de canales de sodio rápidos, vistas como espigas, y una corriente de sodio lenta, vista como una deflexión negativa sobre la rampa. Tras dar la HFS ambas corrientes desaparecen. Cuando se deja pasar tiempo, ambas corrientes reaparecen y pueden ser bloqueadas con TTX (bloqueador de canales de sodio). Adaptada de (Beurrier, Bioulac, Audin, & Hammond, 2001b)]. **B.** En esta figura se presenta un raster del registro de una neurona del globo pálido interno en un primate. Este ráster está alineado al inicio de un tren de estimulación a alta frecuencia (100Hz) mediante un electrodo de estimulación en la cercanía del electrodo de registro. Se muestra el histograma perievento. En la parte inferior se muestra el mismo protocolo, pero habiendo infundido gabazina (antagonista competitivo de los receptores de GABA). El resultado

es un aumento en la frecuencia de disparo. Esto sugiere que los efectos inhibitorios vistos en el panel superior son dependientes de liberación sináptica de GABA [Adaptado de (Chiken & Nambu, 2014)].

Asimismo, existen datos que sugieren que también es posible generar una activación del sitio blanco (Chiken & Nambu, 2016). También se han descrito mecanismos que dependen de la sinapsis: tras la estimulación a alta frecuencia parece haber una depresión de las sinapsis aferentes al sitio de estimulación, generando así un 'filtro sináptico' (Rosenbaum et al., 2014). También se le ha atribuido una falla de conducción a los axones, pues evidencia experimental y computacional apunta a que los axones no pueden conducir a altas frecuencias (Bucher & Goillard, 2011). Así, la estimulación a alta frecuencia generaría una pérdida de fidelidad en la conducción axónica y una depleción de neurotransmisores en la terminal que en conjunto funcionarían como un filtro de información. Estas hipótesis, en donde la acción de la estimulación cerebral profunda a alta frecuencia genera un filtro sináptico, son útiles para explicar cómo los ritmos anómalos característicos de la enfermedad desaparecen (Dejean, Hyland, & Arbutnott, 2009). Se predice que los patrones de ráfaga que suelen estar presentes en los ganglios basales lesionados sean filtrados y no puedan generar la propagación de las oscilaciones anómalas (Ammari, Bioulac, Garcia, & Hammond, 2011).

Por otra parte, no es posible ignorar que axones aferentes al sitio de estimulación a alta frecuencia también pueden generar potenciales de acción antidrómicos. Esto generaría una modulación 'de red' a nivel de las regiones que proyecten hacia el sitio de estimulación y posteriormente a nivel del cerebro completo (Alhourani et al., 2015). En la **Figura 5** se detallan los hallazgos de un estudio que buscaba evaluar la repercusión de la HFS DBS en el núcleo subtalámico sobre la corteza motora. Se encontró que esta estimulación puede generar potenciales de acción antidrómicos (a través de la vía hiperdirecta, **Figura 5A**). La frecuencia de estos potenciales antidrómicos correlaciona con la disminución de la bradicinesia del animal (**Figura 5C**), por lo que parece tener participación en el mecanismo de acción de la estimulación cerebral profunda. Asimismo, la actividad oscilatoria y correlacionada entre sí de las neuronas de la corteza motora parece disminuir y adoptar un patrón menos oscilatorio (**Figura 5D y E**, (Li et al., 2012)). A pesar de que se muestra una correlación entre la frecuencia de los potenciales antidrómicos y la movilidad del animal, no queda claro si la relación es causal. En este mismo set de datos, puede caber la posibilidad de que la disminución del patrón de disparo en ráfaga (que disminuye con el aumento de los antidrómicos) tenga mayor correlación con la disminución de bradicinesia.

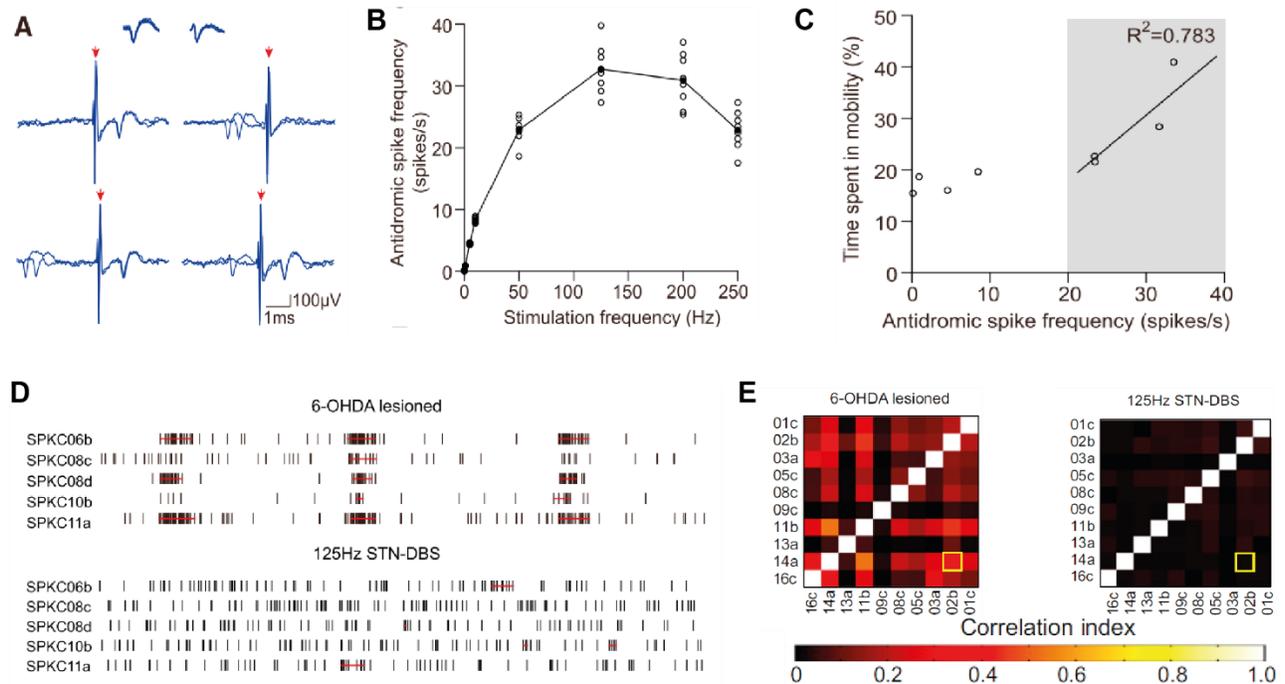


Figura 5. La estimulación cerebral profunda a alta frecuencia en el núcleo subtalámico modula la corteza motora. **A.** Se muestran registros de unidades en la corteza motora en donde se evocan potenciales de acción antidrómicos o colisiones tras la estimulación (flecha roja). **B.** Estos potenciales de acción antidrómicos tienen una frecuencia máxima alrededor de 125Hz de estimulación. **C.** La frecuencia de disparo de los potenciales antidrómicos tiene una correlación lineal con el tiempo que el animal pasa en movilidad en el rango de 20 a 40Hz. **D.** Los patrones de disparo oscilatorios (en burst) y correlacionados entre sí que han sido descritos como parte de la fisiopatología de la EP, disminuyen ante la aplicación de HFS en el núcleo subtalámico. **E.** La correlación que existe entre la actividad de las neuronas de la corteza motora en un animal lesionado disminuye ante la aplicación de la estimulación cerebral profunda. [Adaptada de (Li et al., 2012)]

La función del núcleo Globo Pálido interno / núcleo Entopenduncular

A pesar de la eficacia clínica de lesiones o estimulación cerebral profunda sobre el núcleo Globo Pálido interno, resulta paradójico que la destrucción o inhibición de este no genere conductas hiperkinéticas. Es decir, si el núcleo se encuentra sobre activado durante la enfermedad, y esto genera bradicinesia y conductas de rigidez, se sugeriría un efecto opuesto ante la destrucción o inhibición de éste (Nambu, Tachibana, & Chiken, 2015). No obstante, la evidencia clínica no demuestra este efecto adverso (Follett et al., 2010).

Si bien el Globo Pálido interno se ha estudiado en el contexto de la enfermedad, es importante conocer cuál es su función en un organismo sano. Para esto, se han realizado estudios en donde se ha encontrado que existe una correlación entre la frecuencia de disparo de algunas neuronas de este núcleo con parámetros motores de un movimiento (Anderson & Turner, 1991). Sin embargo, este mismo grupo encontró que esta correlación desaparece cuando el contexto de

la tarea cambia, a pesar de estar realizando el mismo movimiento (ver **Figura 6A**). Se generó la hipótesis de que los movimientos memorizados son los que requieren a este núcleo.

Se ha encontrado que cierto grupo de neuronas del núcleo GPi realiza diversas funciones de recompensa. En particular, se ha encontrado que neuronas del globo pálido interno que proyectan a la habénula lateral en primates pueden codificar la expectativa de la recompensa (ver **Figura 6B**). Interesantemente, esta función de codificar expectativa no es dependiente del movimiento, pues la respuesta neural se modifica cuando la contingencia cambia. Es decir, es una respuesta que es dependiente de la evaluación de la acción. Esto se corroboró en roedores, encontrándose también una relación entre la frecuencia de disparo incrementada ante estímulos no recompensados y un decremento en la actividad neural ante estímulos recompensados. Más aún, este tipo de respuestas neurales se encontraron en unidades que fueron fotoidentificadas como VGlut2+. Es decir, la respuesta neural de evaluación parece estar restringida a una población genéticamente específica (**Figura 6C**, (Stephenson-Jones et al., 2016)).

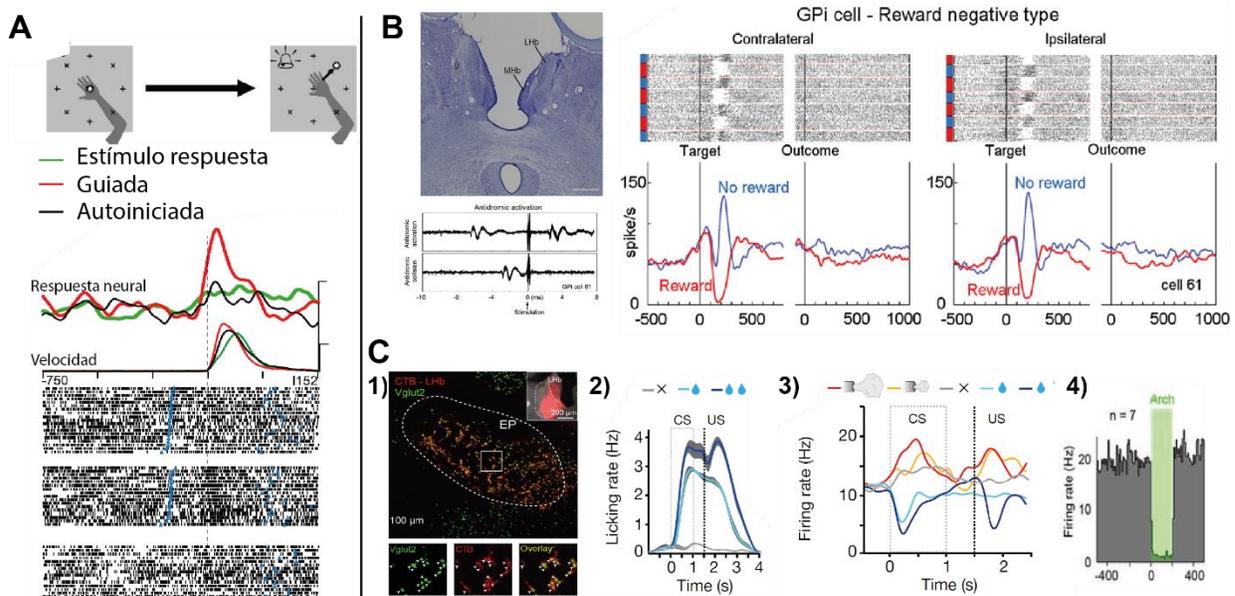


Figura 6. El núcleo Globo Pálido interno / Entopeduncular tiene funciones motoras y de evaluación/predicción de recompensa.

A. Se analizaron las respuestas neurales del GPi en primates en una tarea en la que debía desplazar la mano desde un punto central a un punto periférico que se encendía junto con un tono (estímulo respuesta), cuando el punto periférico se encontraba ya encendido y se le daba un tono (guiado), y sin señal de tono (autoiniciado) [Adaptado de (Turner & Anderson, 2005)]. **B.** En primates, se realizó un experimento para registrar neuronas del GPi que proyectaran hacia la habénula mediante estimulación antidrómica. El primate debía realizar una sacada (movimiento ocular) hacia uno de dos sitios tras un tono. Se dividió a los ensayos en recompensa derecha (azul en ráster) y recompensa izquierda (rojo). Las respuestas neurales indican que la neurona responde con un aumento de la frecuencia de disparo ante una respuesta no recompensada y una disminución de su frecuencia de disparo ante un evento recompensado. Es importante mencionar que la respuesta neural no depende del sitio al que el

primate deba hacer la sacada, y se modifica de acuerdo al cambio en contingencia [adaptado de (Hong & Hikosaka, 2008)]. **C. 1)** Se estableció que entre las neuronas que proyectan a la habénula (marcador rojo retrógrado inyectado en la habénula), están aquellas que son Vglut2+ (marcadas mediante un animal transgénico, verde). **2)** En una tarea en roedor en cabeza fija, se le presentaban estímulos condicionados (tonos) y se evocaban respuestas mediante estímulos no condicionados (gotas o pufs de aire en la cara). Así, los roedores aumentaban su tasa de lengüeteo cuando el tono implicaba una recompensa. **3)** Las respuestas neurales se graduaban de acuerdo al valor del estímulo no condicionado, decrementando su frecuencia de disparo ante estímulos recompensantes. **4)** Se verificó que aquellas neuronas que tenían las respuestas ya mencionadas eran Vglut2+ (mediante fotoidentificación) [adaptado de (Stephenson-Jones et al., 2016)].

En resumen, la fisiología de la enfermedad de Parkinson no ha sido completamente dilucidada. Se sabe que está ligada a los niveles de dopamina cerebrales, pues existe evidencia anatómo-patológica que liga la gravedad del cuadro clínico con la cantidad de neuronas dopaminérgicas que el paciente tiene. Por otra parte, el tratamiento con agonistas dopaminérgicos mejora los síntomas de la misma. Existen modelos animales como el roedor lesionado con 6-OHDA que replican algunos de los hallazgos presentes en pacientes y puede ser utilizado para explorar la fisiopatología de la enfermedad, así como la efectividad de algunos tratamientos.

Entre los tratamientos de esta enfermedad se encuentra la estimulación cerebral profunda, que mejora los síntomas motores y en algunos casos los no motores. Para este tratamiento hay un gran y variado número de hipótesis sobre su mecanismo de acción, sin que haya prueba contundente sobre un mecanismo como el más probable. Más aún, en vista de la efectividad clínica para la EP, el tratamiento con estimulación cerebral profunda se ha extendido hacia otras enfermedades. Esto resalta la necesidad de generar conocimiento sobre el mecanismo de acción, no sólo para explicar los eventos clínicos, si no para poder extrapolar estas funciones y generar terapias más específicas para cada enfermedad.

Pregunta Experimental

¿Cuál es el mecanismo de acción de la estimulación cerebral profunda a alta frecuencia en el globo pálido interno en un modelo de ratón hemiparkinsoniano?

¿La estimulación cerebral profunda genera su efecto mediante una inhibición funcional del sitio blanco?

¿La inhibición del Globo pálido interno genera una mejora en la actividad motora de un modelo de ratón hemiparkinsoniano?

Hipótesis

La depleción dopaminérgica causa la disminución de la excitabilidad en las neuronas de la vía directa mientras que aumenta la excitabilidad en neuronas de la vía indirecta (**Figura 7A-C**), incrementando la actividad del núcleo entopeduncular (**Figura 7E**). Esta última correlaciona con la conducta de giro ipsilateral a la lesión en el modelo animal de enfermedad de Parkinson. La inhibición del núcleo entopeduncular correlacionaría con una mejora de la conducta motora del modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.

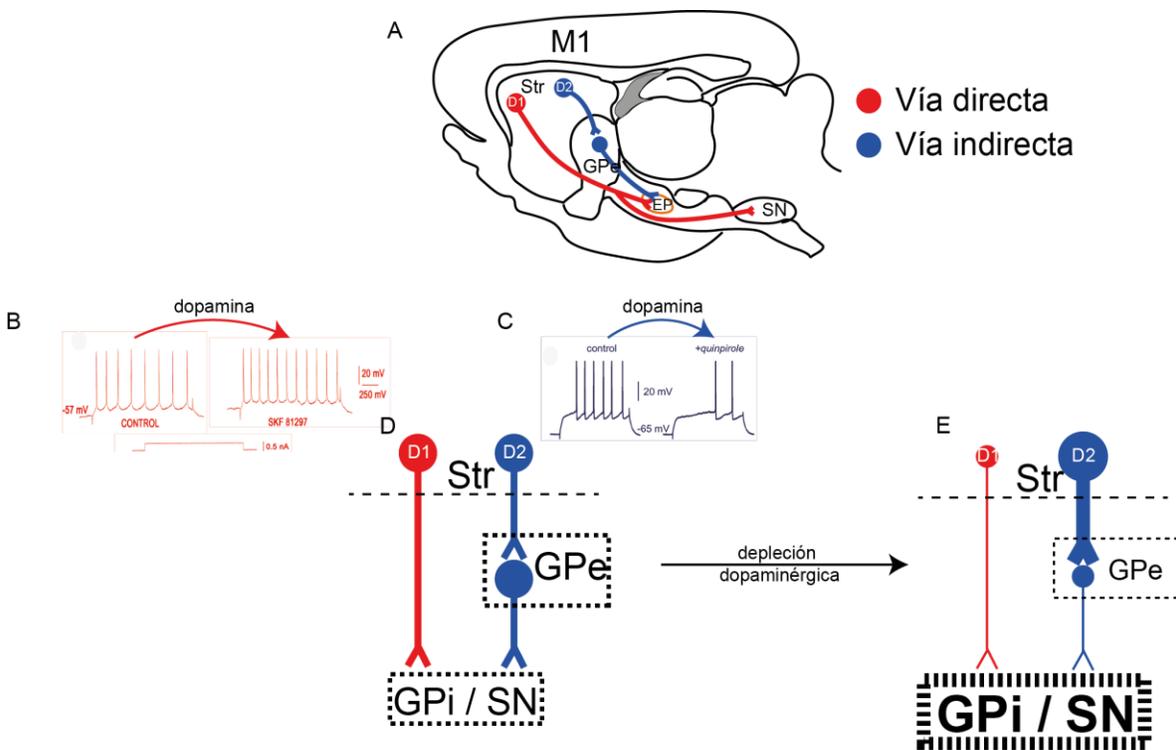


Figura 7. Hipótesis del funcionamiento del núcleo entopeduncular en un roedor control y uno con depleción dopaminérgica. A. Esquema representativo de las

vías de proyección del estriado (directa en rojo, indirecta en azul). **B.** Las neuronas de la vía directa aumentan su excitabilidad de la membrana ante la aplicación de agonistas dopaminérgicos D1 [adaptado de (Hernández-López et al., 1997)]. **C.** Las neuronas de la vía indirecta disminuyen la excitabilidad de su membrana ante agonistas dopaminérgicos D2 [adaptado de (Hernández-López et al., 2000)]. **D.** Interconectividad de la vía directa y la vía indirecta hacia los núcleos de salida (GPi/SN). **E.** Hipótesis de qué ocurre tras la depleción dopaminérgica: las neuronas de la vía directa (D1) disminuyen de tono, disminuyendo así su actividad inhibitoria sobre los núcleos de salida. Las neuronas de la vía indirecta aumentan su tono, pues no reciben la modulación negativa por parte de la dopamina. Esto aumenta la inhibición sobre las neuronas del núcleo GPe, que a su vez disminuyen su inhibición sobre los núcleos de salida. Estos efectos culminan en un aumento de la actividad de los núcleos de salida, el globo pálido interno y la sustancia nigra.

Metodología

Los experimentos que se presentan a continuación se realizaron bajo el protocolo aprobado por la comisión de manejo de animales experimentales del Instituto de Fisiología Celular (CICUAL: FTA2018).

Lesión con 6-hidroxidopamina

Para el presente estudio se utilizaron ratones adultos (20-30g), silvestres de la cepa C57BL6 y transgénicos D1-Cre (Gerfen, Paletzki, & Heintz, 2013). Con el animal bajo anestesia (isoflurano 1-2%) y colocado en el aparato estereotáxico se procedió a realizar una incisión en la línea media de la piel sobre el cráneo. Se realizó un trépano y una inyección de 1 microL (3.6mg de 6-OHDA/mL en solución 0.9% NaCl, 0.2% ác. ascórbico) en las coordenadas -1.1 AP, 0.9 lateral, 4.75 DV. La inyección se realizó con micropipetas de vidrio y un NanoJect a 9.2nL/5seg (Drummond Scientific). Los animales se suturaron y se monitorizaron durante su recuperación.

Debido a la excesiva pérdida de peso de algunos animales, se implementó una sustitución calórica e hídrica mediante dieta líquida hipercalórica (a base de aceite vegetal y sacarosa), intra-esofágica e inyección subcutánea de NaCl al 0.9%.

Implementación de sistema de lectura de conducta

Se realizó un programa mediante Bonsai (Lopes et al., 2015) y Matlab para detectar al ratón en un video de campo abierto. Mediante este programa se obtienen las mediciones de trayectoria de desplazamiento, velocidad, distancia y rotación.

Estandarización del vector viral AAV2-hsyn-Arch3.0

En un ratón silvestre se realizó una inyección unilateral de 500 nl de AAV2-hSyn-Arch3.0 (UNC Vector Core, título 1×10^{12} copias de genoma viral/ mL) en la región anatómica del núcleo entopeduncular (coordenadas AP -1.1, ML 0.9, DV -4mm). Se realizó el implante de un optrodo (electrodo fabricado por Innovative Neurophysiology, 16 alambres de tungsteno de 32 micras, fibra óptica acoplada a un electrodo de registro de 16 canales) en la misma región anatómica. Se colocó al ratón en el campo abierto y se administraron pulsos de luz de 5 segundos de duración. A través del software BLACKROCK (Cereplex Direct, Blackrock Microsystems, UT) se registró la actividad multi-unitaria.

Por otra parte, en un ratón silvestre se realizó la infección con el mismo virus en la región del tálamo para realizar experimentos de electrofisiología *in vitro* con técnica de célula completa convencional.

Activación de fibras aferentes al GPi

Animales transgénicos D1-Cre fueron infectados unilateralmente con AAV2-DIO-ChR2-ET/TC (UNC Vector Core, título 1×10^{12} copias de genoma viral/ mL) en el estriado dorsal (coordenadas AP 0.5, ML 1.5, DV -2.2mm). Así, se logró la expresión de la opsina en la vía directa estriatal de manera unilateral. Además, se les realizó la lesión con 6-OHDA en el mismo hemisferio. Finalmente, se implantó una fibra óptica (200 micras) en el núcleo entopeduncular.

Inhibición del GPi

En ratones silvestres lesionados se realizó además una infección con 250 nL del vector viral AAV2-hsyn-Arch3.0 TC (UNC Vector Core, título 1×10^{12} copias de genoma viral/mL) en el sitio del núcleo GPi. Se colocó una fibra óptica de 300 micras de diámetro sobre el núcleo.

Prueba de protocolos óptimos de estimulación en el GPi

Los ratones lesionados, infectados con alguno de los dos vectores virales e implantados con una fibra óptica en el núcleo entopeduncular fueron sometidos a diferentes protocolos de estimulación para evaluar la eficacia en disminuir la bradicinesia y giro ipsilateral a la lesión. Las fibras ópticas implantadas de los ratones se conectaron a un LED de longitud de onda de 488 nm o a un láser con longitud de onda de 558 nm dependiendo de la opsina expresada. Se permitía a los animales 5 minutos de aclimatación en la arena para después realizar la estimulación con el protocolo seleccionado durante treinta segundos. Posteriormente, se repetía el protocolo después de 90 segundos. Se realizó este ciclo cinco veces, como se ilustra en la **Figura 8**.

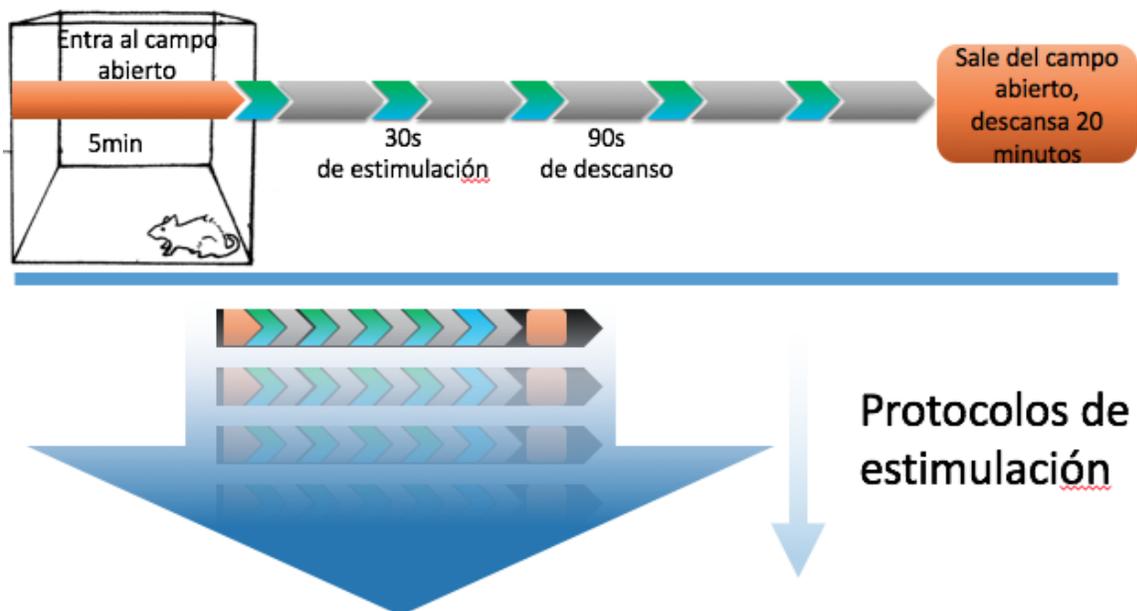


Figura 8. Protocolo experimental para probar la efectividad de las manipulaciones optogenéticas sobre la conducta motora espontánea del animal lesionado. Los animales lesionados e implantados con una fibra óptica en el núcleo entopeduncular eran colocados en un campo abierto. Tras 5 minutos de periodo basal, se hacía llegar un protocolo de iluminación hacia la fibra óptica durante treinta segundos. Se esperaban 90 segundos entre cada periodo de estimulación, para llegar a un total de 5 periodos. Tras esto, el animal era retirado del campo abierto y descansaba por un mínimo de 20 minutos antes de probar otro protocolo de estimulación. El orden de los protocolos se hizo al azar.

Microestimulación cortical para el mapeo funcional de la corteza motora

Para poder identificar las coordenadas de la corteza motora correspondientes a la región del brazo contralateral, se realizaron tres experimentos de microestimulación. Se colocó al animal en el aparato estereotáxico bajo anestesia (ketamina 0.15 mg/g de ratón + xilazina 0.01 mg/g de ratón). Se realiza el acceso a la corteza motora mediante incisión en la piel y trepanación de una ventana de al menos 2 mm de diámetro alrededor del punto (AP +1, ML 1). Utilizando un electrodo bipolar concéntrico de 300 micras se realizó estimulación en la superficie de la duramadre con 15 pulsos cuadrados de 200 microsegundos a una frecuencia de 200Hz mediante un aparato estimulador (DS2, Digitimer). Con la administración de pulsos de voltaje 30-100V se corroboraba el movimiento contralateral mediante una cámara. Esta estimulación se realizó una cuadrícula cada 100 micras en dirección AP y ML. Se tomó nota del punto en donde se lograba la estimulación del bíceps braquial contralateral. Con el promedio de los resultados obtenidos en estos animales (**Tabla 1**), se implantó el electrodo en animales lesionados.

Tabla 1. Coordenadas estereotáxicas de microestimulación cortical que evocaron mayor movimiento en el bíceps braquial.

ANIMAL	COORDENADA ANTERO-POSTERIOR (MM)	COORDENADA MEDIO-LATERAL (MM)
1	0.5	1.5
2	0	1.5
3	0.5	1.5
PROMEDIO	0.3	1.5

Electrofisiología *in vivo*

En dos animales transgénicos D1-Cre se realizó la infección estriatal derecha de ChR2-ET/TC así como lesión con 6-OHDA en el mismo hemisferio. Posteriormente, se implantó una fibra óptica en el núcleo entopeduncular. Asimismo, se implantó un electrodo de registro (un arreglo de 16 alambres de 32 micrometros, móvil en el eje dorsoventral) en las coordenadas previamente establecidas para M1, región de la

extremidad superior (AP +0.3, ML 1.5, DV 0.2). Estos animales fueron registrados en campo abierto utilizando los mismos protocolos de estimulación previamente descritos (**Figura 9**). Se obtuvo video de los animales mientras fueron registrados.

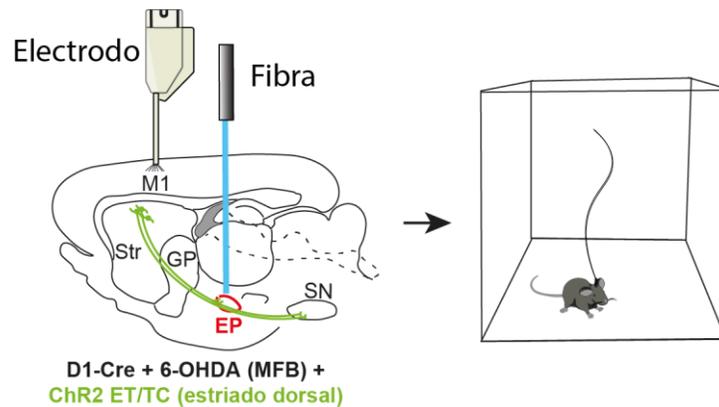


Figura 9. Esquema del experimento para registrar el potencial local de campo de la corteza motora primaria. Esquema representativo de la posición del electrodo y la fibra.

Análisis de señal electrofisiológica de campo

Las espigas se detectaron en línea mediante el software de adquisición (Cerebrus, Blackrock Microsystems). Para esto, la señal se filtró con un filtro pasa altas de 600Hz y se clasificaron espigas mediante el uso de un umbral y *hoops*. De manera *offline* se procedió a mejorar esta clasificación con el uso del software Offline Sorter (Plexon).

Los análisis de potencial local de campo se realizaron sobre la señal adquirida a 1,000Hz con *scripts* escritos en Matlab. Se aplicó un filtro pasa bajas de 150Hz (Butterworth, orden 4). Se correlacionó la señal electrofisiológica con la trayectoria detectada del video grabado simultáneamente. Se identificaron segmentos de movilidad e inmovilidad. Estos segmentos se analizaron visualmente (tanto el video como la señal electrofisiológica) para no incluir señales con artefactos. En seguida, se realizó un *detrending* para disminuir las fluctuaciones lentas. Con el uso de la paquetería Chronux (Bokil, Andrews, Kulkarni, Mehta, & Mitra, 2010) se realizó la descomposición en tiempo y frecuencia de la señal. Se analizaron las frecuencias 1-50Hz con una resolución de 100 puntos, *multitapers* dinámicos (1 a 5, Slepian) en bins de 1s con solapamiento de 0.5s. Los gráficos de densidad espectral de potencia (PSD, por sus siglas en inglés, power spectral density), se realizaron con la función de *pwelch* de Matlab. Éstos se segmentaron en las frecuencias correspondientes a alfa (8-12Hz), beta (12-40Hz), gamma bajo (40-55Hz), gamma alto (55-100Hz), delta (1-4Hz) y teta (4-8Hz). Para determinar diferencias estadísticas se utilizó un *t-test* pidiendo una $p < 0.05$.

Tarea conductual de giros dirigidos a un objetivo

Se estandarizó una tarea conductual con el objetivo de generar conducta de giro estereotipado y repetitivo en los animales. Para esto, se utilizaron ratones C57BL6 machos de 2-4 meses de edad, deshidratados a 80-85% de su peso corporal.

Se creó un prisma triangular (40cm de lado, 60cm de alto) con paneles de plástico PVC. En la mitad de dos aristas (lados) se colocó un puerto dispensador de gotas de agua con sensores infrarrojos. La tarea se programó en Bonsai (<https://bonsai-rx.org/introduction/>), Arduino UNO y Python. Se utilizaron diferentes fases para que el animal adquiriera la conducta final (**Figura 10**). El animal debía aproximarse a la esquina con la zona activa y esperar 1 s en inmovilidad (medida como una diferencia baja en cambio de píxeles de cuadro a cuadro). Posteriormente, sonaba un tono de 200 ms (a través de un twitter). El tono indica la liberación de agua en el puerto izquierdo o derecho ($p= 0.5$ para cada tono). Si el animal genera un lengüetazo en el puerto correcto, se libera una gota de agua (5-10 microL). Si el animal se dirige al puerto incorrecto, las luces de la caja conductual se apagan por 10 s (**Figura 10**).

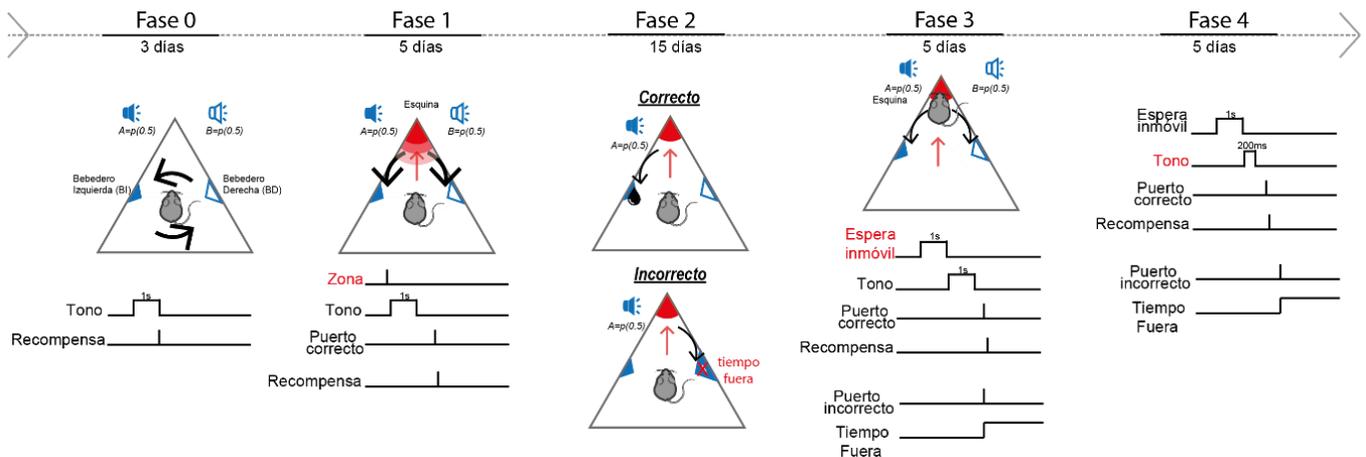


Figura 10. Entrenamiento por fases para generar una conducta de giro estereotipado. Durante la Fase 0, se liberan gotas de agua en cada bebedero de manera alternada. Cuando el animal consume la gota, suena un tono. En la Fase 1, se le pide al animal que active la zona activa para recibir el tono. El tono indica si la gota se liberará en el puerto izquierdo o el derecho. Esta zona activa se controla a través de la cámara de video y se procede a hacerla más chica conforme pasan los días. En la Fase 2 se añade la condición de que los ensayos en los que el animal responde de manera incorrecta, las luces de la caja de conducta se apagan durante 10s. En la Fase 3, el animal debe permanecer cada vez más tiempo en la zona/esquina para que suene el tono, hasta llegar a 1 segundo. Finalmente, en la Fase 4 el tono que el animal recibe se reduce a 200ms.

Cirugía de implante de electrodo en animales entrenados y registro electrofisiológico

Tras un entrenamiento de alrededor de un mes, se operó a 5 animales entrenados en la tarea conductual de manera similar a la ya mencionada (ver arriba). sin embargo, se eligieron las coordenadas para alcanzar al núcleo entopeduncular.

Tras 3 días de recuperación, se procedió a reentrenar a los animales de manera que alcanzaran un desempeño adecuado para el registro. Por último, se registró durante 7-15 días a cada animal, avanzando 50-100 micrometros el electrodo tras cada sesión de registro.

Análisis de datos electrofisiológicos

Se realizaron registros del núcleo entopeduncular de los ratones, entrenados en la tarea de giro, durante la conducta. Las unidades se clasificaron mediante métodos en línea (hoops, Blackrock Microsystems) y por algoritmos de PCA manuales fuera de línea (Offline Sorter, Plexon). Los tiempos de disparo de las unidades se exportaron a Matlab y se analizaron mediante programas ad hoc.

Para el análisis de la codificación izquierda-derecha? se recurrió a transformar las espigas a una señal continua mediante una convolución de las espigas con una función gaussiana ($\sigma = 25$ ms). Se obtuvo el promedio de los intervalos inter-evento de la tarea conductual (tono-pico vuelta y pico-vuelta-recompensa). La señal continua de cada unidad durante cada ensayo se re-escaló hacia el promedio de estos intervalos inter-evento mediante interpolación lineal (**Figura 11**). A continuación, se analizó mediante curvas de Receiver Operating Characteristic (ROC) para comparar entre la frecuencia de disparo de las unidades durante los ensayos a la izquierda y a la derecha.

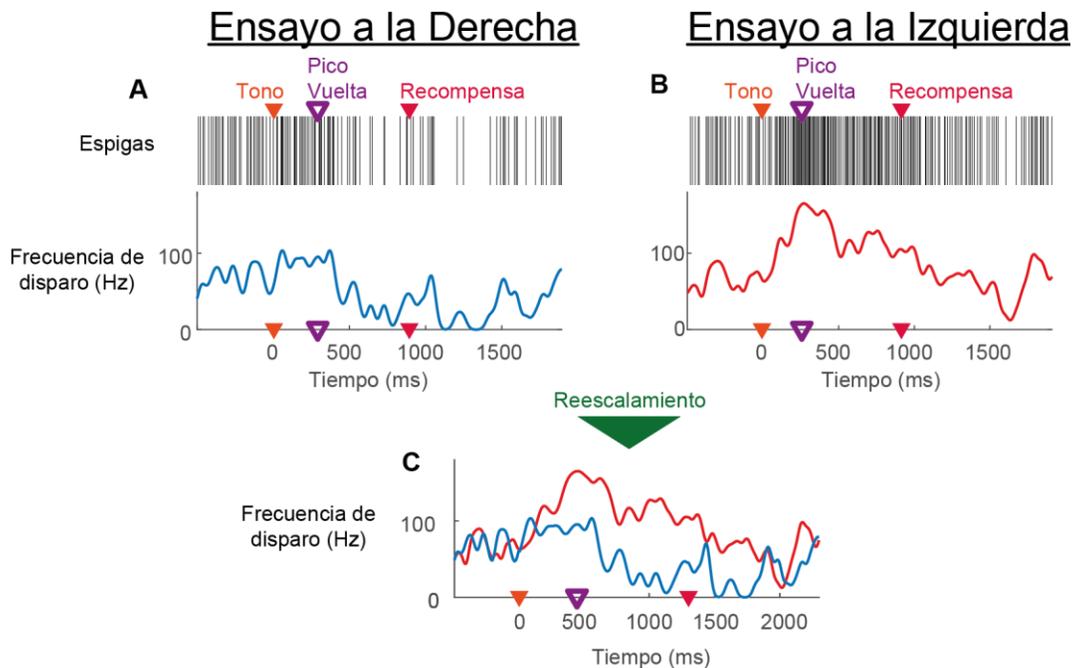


Figura 11. Procedimiento de convolución y posterior reescalamiento de las espigas de las unidades registradas. A y B. Arriba, se muestran las espigas durante un ensayo a la derecha y un ensayo a la izquierda de una unidad. Abajo, se realiza la convolución de estas espigas con una función gaussiana ($\sigma = 25$ ms). C. Se reescalán las señales a el promedio de los intervalos inter-evento. De esta manera las dos señales son directamente comparables. Note que la información de la frecuencia alrededor de cada evento se preserva.

Resultados

Objetivos 1 y 2. Implementación del modelo de ratón hemiparkinsoniano y de un sistema de seguimiento por video

Para implementar el modelo de ratón hemiparkinsoniano se realizaron inyecciones de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial de manera unilateral, con el objetivo eliminar las neuronas dopaminérgicas de un solo hemisferio. Posteriormente, se realizaron programas en Bonsai (Lopes et al., 2015) y Matlab para poder seguir a un ratón mediante un sistema de video. Esto permitió colocar a los ratones en un campo abierto y registrar su trayectoria, haciendo mediciones de la velocidad de desplazamiento y la velocidad angular.

En los ratones lesionados con 6-OHDA disminuyen las fibras dopaminérgicas del estriado del hemisferio lesionado. La **Figura 12A** presenta un ejemplo de un animal lesionado y teñido mediante técnicas de inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa, que es?. El hemisferio derecho muestra que esta marca está ausente por completo del estriado, lo que significa que las fibras dopaminérgicas fueron eliminadas exitosamente mediante la administración de 6-OHDA.

Los ratones hemiparkinsonianos presentan una conducta de bradicinesia y giro espontáneo ipsilateral a la lesión. Con el uso de seguimiento por video de los ratones en campo abierto, se logró registrar la trayectoria y hacer cálculos de velocidad y giro. En la **Figura 12B** se presentan las trayectorias realizadas por un animal control y un hemiparkinsoniano durante 5 minutos, siendo evidente el menor desplazamiento del animal lesionado, así como la presencia de una trayectoria en giros.

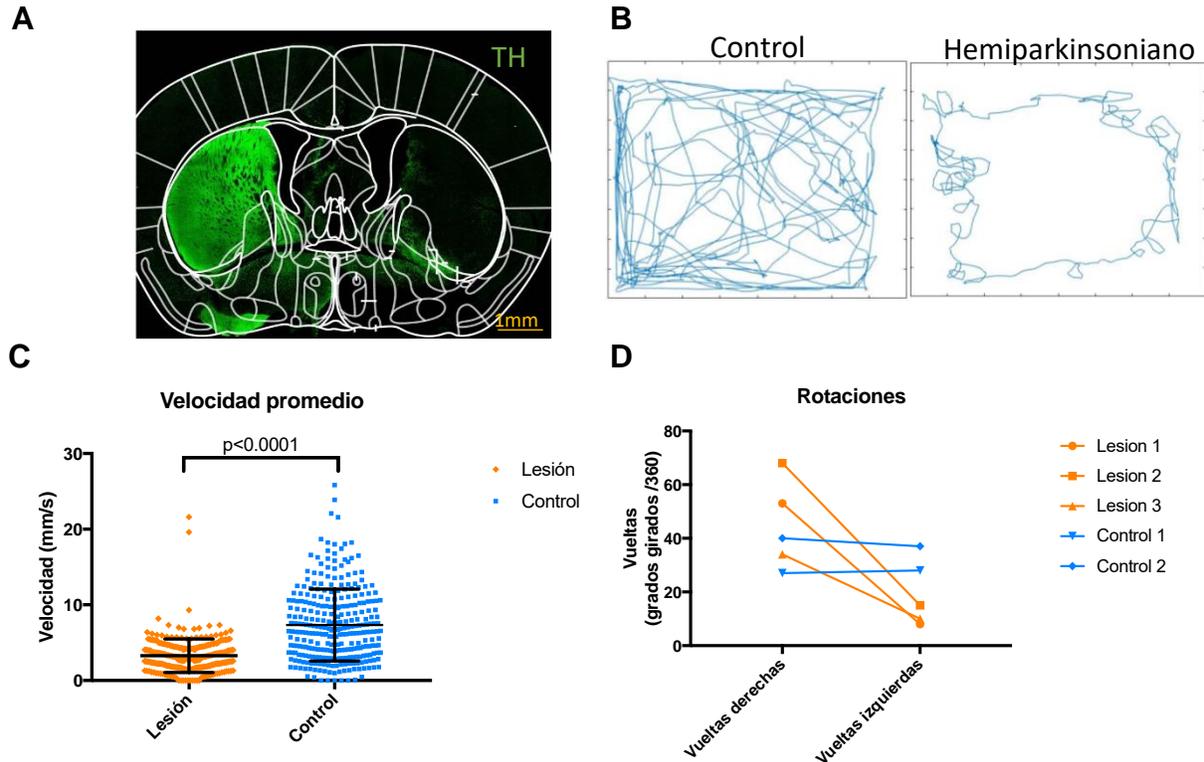


Figura 12. Implementación del modelo de ratón hemiparkinsoniano y un sistema de seguimiento por video. **A.** Fotomicrografía por microscopio confocal de una rebanada de cerebro de ratón hemilesionado tras realizar la inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH). Note que el hemisferio derecho, el lesionado, no muestra marca. **B.** Se presentan los datos de seguimiento por video durante 5 minutos de un animal control y un hemiparkinsoniano. Note que el animal hemiparkinsoniano realiza una trayectoria de vueltas. **C.** Se grafican los datos de velocidad promedio durante ventanas de 1 segundo de animales controles y animales lesionados ($p < 0.0001$, prueba t de Student). **D.** Se muestran los datos de rotaciones seguidas por video durante 15 minutos. Es visible que los animales lesionados realizan mayor cantidad de vueltas a la derecha, ipsilaterales a la lesión.

De esta manera, se concluye que el inyectar 6-OHDA en un hemisferio de los ratones genera una depleción dopaminérgica que se asocia a una conducta de bradicinesia y giro ipsilateral a la lesión.

Objetivo 3a: Activación de fibras aferentes al GPi mediante ChR2 ET/TC

Con la hipótesis de que la estimulación cerebral profunda genera una inhibición en el sitio blanco de estimulación, se planteó generar inhibición en el núcleo entopeduncular (análogo al globo pálido interno humano) ipsilateral a la lesión. Una estrategia experimental posible es la activación de las fibras gabaérgicas aferentes al núcleo. Con este objetivo, se planteó expresar la opsina excitatoria ChR2 ET/TC en las fibras gabaérgicas de la vía directa. Estas fibras son aferentes al núcleo

entopeduncular y su activación generaría una inhibición sobre el mismo. La opsina modificada ChR2 ET/TC se eligió sobre la channelrhodopsin silvestre, debido a que sus cinéticas de activación, inactivación y recuperación son más rápidas. Esto permite llegar a frecuencias de estimulación más altas (Berndt et al., 2011).

En la **Figura 13A** se muestra la estrategia experimental: en animales D1-Cre, transfectados en el estriado dorsal para expresar la opsina ChR2 ET/TC y lesionados ipsilateralmente con 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (MFB), se implantó una fibra óptica sobre el núcleo entopeduncular. Tras 3-4 semanas de recuperación y permitiendo así la óptima expresión de la opsina se procedió a colocar a los animales en un campo abierto para probar el efecto de diferentes frecuencias de estimulación sobre la conducta motora del animal. En la **Figura 13B** se muestran desglosados los dos parámetros medidos de uno de los protocolos de estimulación del animal: giro (como grados de giro acumulados) en el panel superior, y velocidad de desplazamiento en el panel inferior). Se muestra en sombreado azul los segmentos de tiempo estimulación (50Hz con pulsos de 5 ms durante 30 segundos en este caso). Los datos de esta figura muestran que en el segmento inicial (de 0-350 s) el ratón genera movimientos de desplazamiento que se asocian exclusivamente al giro ipsilateral a la lesión. En este tiempo, el animal no presenta movimientos de desplazamiento con giro contralateral a la lesión. Esto es característico del modelo de ratón con hemidepleción dopaminérgica (Konieczny, Czarnecka, Lenda, Kamińska, & Antkiewicz-Michaluk, 2017).

Mediante el análisis de video se pueden medir variables de velocidad angular y velocidad de desplazamiento del animal, y así cuantificar el efecto que las estimulaciones tienen sobre la conducta motora del animal. Por cada protocolo probado, se tomaron medidas de la velocidad angular y el desplazamiento (**Figura 14B**), durante un periodo basal y durante los segmentos de estimulación. Se identificó que existe una relación entre la frecuencia de estimulación y la velocidad angular (**Figura 13C**). Las gráficas de la **Figura 13D y E** se muestran los promedios de velocidad angular y velocidad de desplazamiento durante el segmento inicial, durante los segmentos de estimulación y 30 segundos después del segmento de estimulación, para todos los protocolos de estimulación que se probaron. La estimulación en los protocolos en el rango de 1-50Hz parecen ejercer un efecto sobre la velocidad angular promedio que es proporcional a la frecuencia de estimulación. Por otra parte, en los segmentos de post-estimulación parece haber una exacerbación del giro ipsilateral. En los protocolos de 100 y 125Hz no se continúa esta tendencia y no parece haber gran diferencia con respecto a la basal. En los segmentos de post-estimulación, la velocidad promedio se encuentra incrementada con respecto a la basal, pero es menor a aquella alcanzada durante la estimulación para la mayoría de los protocolos en este rango. Los protocolos de 100 y 125Hz muestran que no existe tampoco un gran cambio con respecto a la basal.

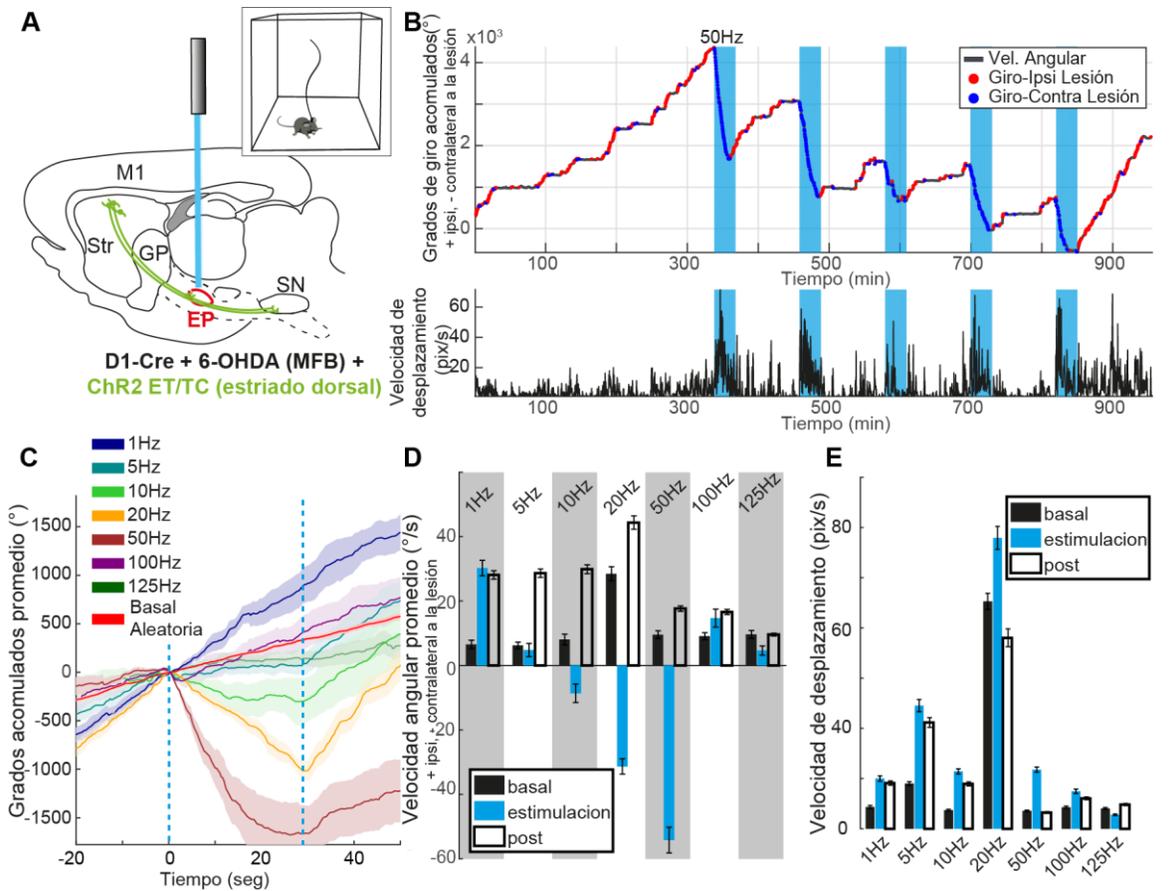


Figura 13. Estrategia experimental y ejemplo del análisis empleado sobre los datos de un animal ante diferentes protocolos de estimulación con ChR2. **A.** Se muestra la estrategia experimental empleada: en animales D1-Cre se expresa la opsina ChR2 ET/TC en el estriado dorsal unilateral en las fibras de la vía directa, aferentes al núcleo entopeduncular; se realiza la lesión con 6-OHDA y el implante de una fibra óptica sobre el núcleo entopeduncular ipsilateral a la infección. Posterior a la recuperación y adecuada expresión de la opsina, se coloca al animal en el campo abierto con una fibra óptica y se prueban diferentes protocolos de estimulación mientras se realiza seguimiento por computadora del animal. **B.** Panel superior, se muestran los datos de grados de giro acumulados (+ ipsilateral a la lesión, - contralateral a la lesión) de un animal durante un protocolo de estimulación. Los sombreados azules indican los segmentos de estimulación (50Hz, pulso de 5 ms, durante 30 s). Sobre el trazo de velocidad angular se muestran en rojo los segmentos de giro ipsilateral a la lesión y en azul los giros contralaterales a la lesión. Panel inferior, se muestran los datos de velocidad de desplazamiento sobre el tiempo. **C.** Se muestra el promedio de grados acumulados girados antes, durante y después del segmento de estimulación (rayas punteadas) para todos los protocolos de estimulación que se probaron. **D.** Se expresan los datos del panel C en promedio. **E.** Se presentan los datos de velocidad de desplazamiento promedio para cada protocolo de estimulación en el segmento basal, durante y después de la estimulación.

Las estimulaciones de la vía directa sobre el núcleo entopeduncular ipsilateral al hemisferio de lesión en animales hemiparkinsonianos, generan cambios en su velocidad angular promedio y su velocidad de desplazamiento promedio. En la **Figura 14** se presentan los efectos poblacionales ($n=5$) de los protocolos de estimulación de fibras aferentes de la vía directa sobre el núcleo entopeduncular. La **Figura 14A** muestra la velocidad angular promedio durante los

protocolos de estimulación. Es aparente que la población de animales presenta un promedio de velocidad angular positiva (ipsilateral a la lesión), que es consecuencia de la depleción dopaminérgica unilateral. Para los protocolos de estimulación en el intervalo de 1-50Hz existe una tendencia: a mayor frecuencia de estimulación, una velocidad angular promedio más negativa (mayor giro contralateral a la lesión). Para los protocolos de 100 y 125Hz no existe un cambio entre el periodo de estimulación y la basal, y, lo que es más, no continúan con la tendencia ya mencionada. Los periodos de post-estimulación no se diferencian de la basal para ningún protocolo (prueba de rango con signo Wilcoxon, $p > 0.05$).

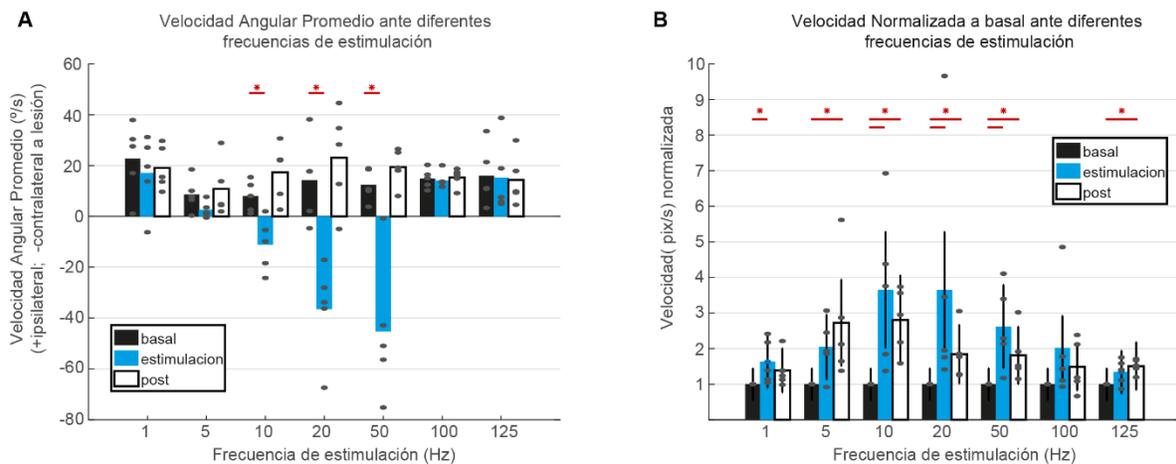


Figura 14. Efectos poblacionales de la estimulación de fibras de la vía directa, aferentes al núcleo entopeduncular en animales con hemidepleción dopaminérgica ante diferentes protocolos de estimulación. **A.** Velocidad angular promedio durante el segmento basal, estimulación y después de estimulación para cada uno de los protocolos de estimulación. En barras se muestran los promedios poblacionales y en círculos grises los promedios por animal. **B.** Velocidad de desplazamiento promedio normalizada a su basal para los segmentos basal, estimulación y post-estimulación para cada protocolo. Se muestran las barras que dieron significancia estadística cuando son comparadas contra el valor basal, prueba de rango con signo Wilcoxon, $p < 0.05$; $n = 5$.

Objetivo 3b: Inhibición directa del GPi con Arch3.0

La anatomía de las neuronas de la vía directa, estudiada a través de marcaje de célula única, revela que la subpoblación de las neuronas de la vía directa que hacen sinapsis en el núcleo entopeduncular tienen colaterales adicionales hacia el globo pálido externo y la sustancia nigra (Wu, Richard, & Parent, 2000). Por otro lado, existe otra subpoblación de la vía directa que genera sinapsis en el globo pálido externo, pasa por el núcleo entopeduncular sin dejar sinapsis y al llegar a la sustancia nigra genera sinapsis adicionales. Esto supone que al iluminar las neuronas de la vía directa transfectadas con ChR2 ET/TC con los protocolos de luz a diferentes frecuencias en el núcleo entopeduncular se generarían al menos tres efectos (**Figura 15**):

- 1) La activación de las sinapsis inhibitorias procedentes del estriado sobre neuronas entopedunculares.
- 2) La conducción antidrómica a través de estos mismos axones y la generación de la inhibición en el estriado o en el Globo Pálido (externo) a través de colaterales (Tecuapetla, F. et al, 2007).
- 3) La conducción ortodrómica del efecto hacia la sustancia nigra.

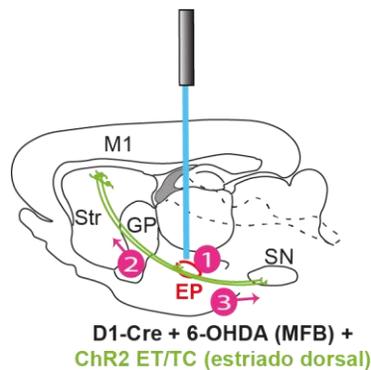


Figura 15. Efectos teóricos de la estimulación optogenética sobre axones de la vía directa en el núcleo entopeduncular. Al menos tres efectos teóricos ocurrirían: 1) efecto de inhibición local, 2) conducción antidrómica y posterior inhibición estriatal (colaterales locales) o en el globo pálido externo (colaterales), y 3) conducción ortodrómica e inhibición de la sustancia nigra.

Así, con el objetivo de aislar los efectos debidos a la inhibición exclusiva del núcleo entopeduncular, se procedió a realizar la inhibición optogenética directa de neuronas entopedunculares a través de la opsina hSyn-Arch3.0.

Estandarización de la expresión del vector viral AAV2-hsyn-Arch3.0-eYFP

Inicialmente, se hizo una validación *in vitro* de la opsina en neuronas talámicas. Se eligieron neuronas talámicas debido a que el registro *in vitro* de neuronas del núcleo entopeduncular es técnicamente muy difícil, pues la abundante matriz extracelular dificulta la visualización de neuronas del núcleo entopeduncular bajo el microscopio. Se presentan registros de neuronas talámicas en célula completa tras 3 semanas de transfección (**Figura 16**).

La opsina Arch3.0 es una bomba de protones que se activa óptimamente con luz con una longitud de onda de 595 nm y bombea protones del espacio intracelular al extracelular, generando así una corriente saliente (**Figura 16A**) y consecuentemente una hiperpolarización del voltaje de membrana intracelular (**Figura 16C**). Tras 3 semanas de expresión del vector viral ya mencionado, se corroboró que en promedio las neuronas presentaban una corriente saliente de 60 pA (**Figura 16B**) que logró generar un decremento en la frecuencia de disparo de las neuronas (**Figura 16D**).

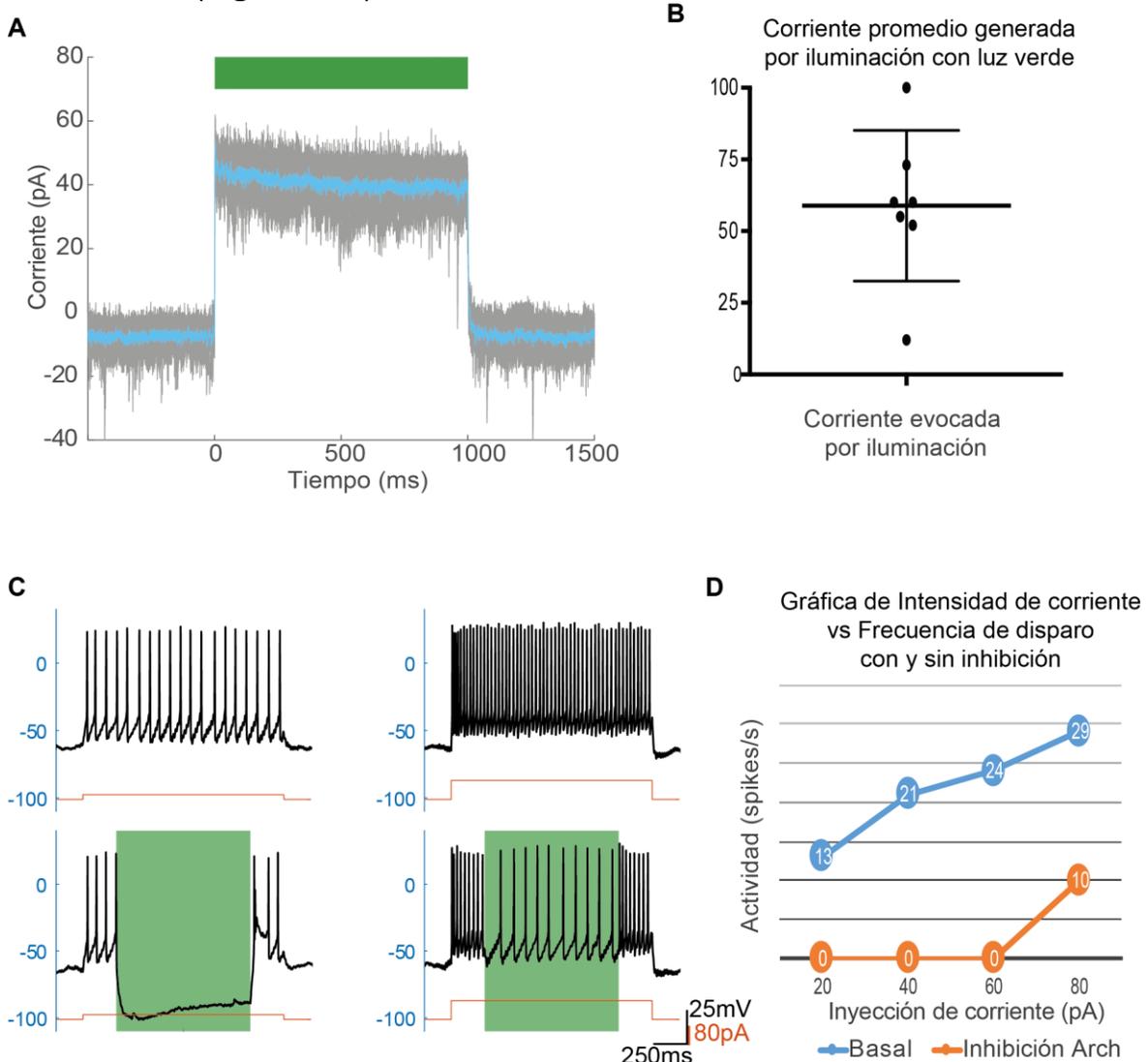


Figura 16. Verificación del constructo viral AAV2-hsyn-Arch3.0-eYFP mediante patch-clamp de célula completa. **A.** Ejemplo de una célula que expresa Arch3.0 (fluorescente en verde) iluminada con luz verde (595 nm) durante 1 segundo (barra verde, intensidad alrededor de 20mW). En gris se muestran trazos individuales, mientras que en azul se muestra el trazo promedio. **B.** Cuantificación de la amplitud de la corriente en las neuronas registradas. **C.** Arriba, registros en fijación de corriente de la misma neurona presentada en A ante la inyección de 20 pA durante 1500 ms, izquierda, y 80 pA, derecha. Abajo, mismos protocolos de inyección de corriente, pero ahora con la aplicación de un pulso de 1 segundo de luz (sombreado verde). **D.** Cuantificación de la frecuencia de disparo antes y durante la aplicación de la luz verde.

Debido a que los registros obtenidos en rebanada no eran de la región que se pretendía manipular (el núcleo entopeduncular), se procedió a realizar registros *in vivo* en libre movimiento tras una transfección del constructo viral en el núcleo de interés. Se implantó un optrodo (un electrodo de alambres finos móviles, acoplado a una fibra óptica, con la finalidad de que ambos apunten al mismo sitio) para registrar el sitio (**Figura 17A**). Los registros que se presentan en la **Figura 17** fueron obtenidos tras 5 semanas de infección en un campo abierto. Es de notar que no se pudieron obtener registros de unidades individuales, por lo que se presentan los gráficos tipo ráster de la actividad multiunitaria obtenida a diferentes niveles de profundidad (**Figura 17C**).

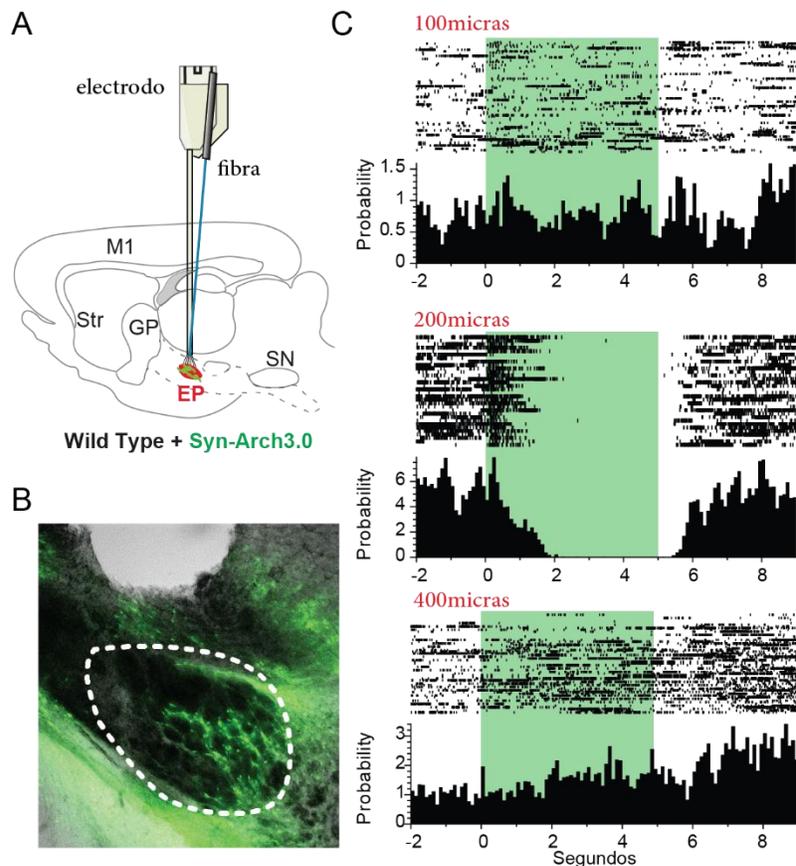


Figura 17. Corroboración electrofisiológica de la inhibición *in vivo* a través de Arch3.0. **A.** Esquema del experimento: en un animal silvestre se transfectó el núcleo entopeduncular con el constructo AAV2-hsyn-Arch3.0-eYFP, se implantó un optrodo (electrodo acoplado a fibra óptica) y se procedió a realizar el registro tras 5 semanas de expresión de la opsina. **B.** Microfotografía del trayecto del optrodo. **C.** Rásters e histogramas perievento de actividad multiunitaria a diferentes profundidades de registro. Sombreado verde es el periodo de iluminación, con intensidad alrededor de 35mW en la fibra implantada.

Con esta evidencia (**Figura 17**), se procedió a realizar inhibiciones en el modelo de lesión hemiparkinsoniana a las 5 semanas de expresión del vector viral.

Inhibición del núcleo entopeduncular en el modelo de hemidepleción dopaminérgica de manera local con Arch3.0

Para evaluar los efectos de la inhibición directa del núcleo entopeduncular sobre parámetros motores en el modelo de depleción dopaminérgica se procedió a expresar la opsina Arch3.0 en el NEP a través de una infección viral de manera ipsilateral a la lesión con 6-OHDA (**Figura 18A**). La **Figura 18B** muestra la velocidad angular promedio (panel superior) y la velocidad de desplazamiento (panel inferior). En el segmento de tiempo basal (0-350s) es aparente que el animal realiza mayormente movimientos de desplazamiento que se asocian a un giro ipsilateral a la lesión (marcas rojas). Cuando se procede a realizar la inhibición con luz verde (cuadros sombreados verdes), el animal aumenta su desplazamiento y se asocia a un giro contralateral a la lesión (marcas azules). En la **Figura 18C-D** se muestra el promedio de grados acumulados girados referenciados al inicio de la estimulación (periodo entre líneas punteadas). Es aparente que ante un mayor poder del láser verde se genera un giro más pronunciado. De manera basal, este animal muestra una tendencia a tener una velocidad angular positiva, ipsilateral a la lesión. Cuando se realiza la inhibición el animal se modifica la velocidad angular promedio, y en el periodo inmediatamente después, regresa a su basal.

Se pudo observar una tendencia a la alta (representado como un incremento en la velocidad de desplazamiento) ante todos los tratamientos, que se mantiene tras el periodo de inhibición en los protocolos de menor intensidad (**Figura 18E**).

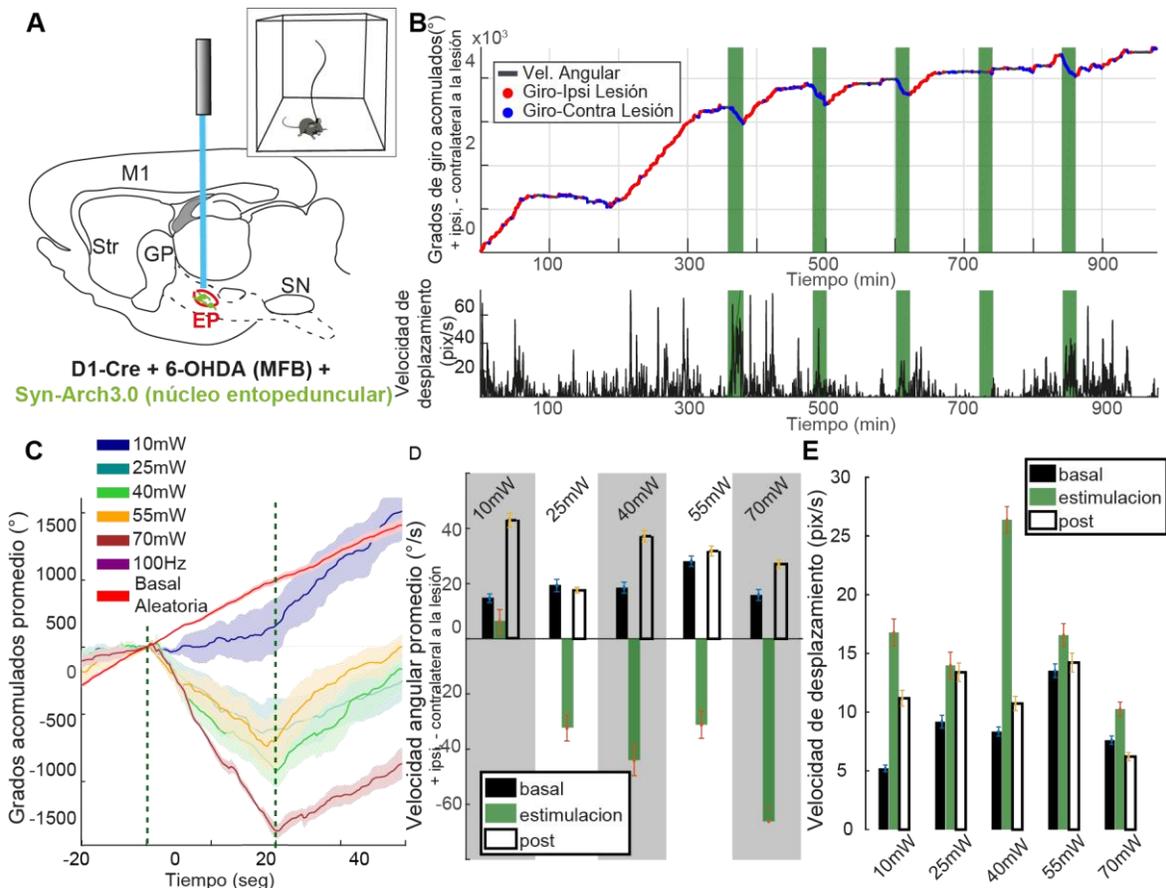


Figura 18. Estrategia experimental y ejemplo del análisis empleado sobre los datos de un animal ante diferentes protocolos de estimulación con Arch3.0. A.

Se muestra la estrategia experimental: en animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA se indujo la expresión de Arch3.0 en neuronas del núcleo entopeduncular ipsilateral. Posteriormente se implantó una fibra sobre el núcleo. Tras 5 semanas, se procedió a colocar a los animales en campo abierto para evaluar los parámetros motores. **B.** Panel superior, se muestran los datos de grados de giro acumulados (+ ipsilateral a la lesión, - contralateral a la lesión) de un animal durante un protocolo de estimulación. Los sombreados azules indican los segmentos de estimulación (láser de 552nm, 70mW, pulso de 20s). Sobre el trazo de velocidad angular se muestran en rojo los segmentos de giro ipsilateral a la lesión y en azul los giros contralaterales a la lesión. Panel inferior, se muestran los datos de velocidad de desplazamiento sobre tiempo. **C.** Promedio de grados acumulados girados antes, durante y después del segmento de estimulación (rayas puntadas) para todas las intensidades de inhibición que se probaron. **D.** Se expresan los datos del panel C en promedio. **E.** Se presentan los datos de velocidad de desplazamiento promedio para cada protocolo de estimulación en el segmento basal, durante y después de la estimulación.

La inhibición directa del NEP ipsilateral a la lesión de animales hemiparkinsonianos tiene efectos sobre la velocidad angular promedio (conducta de giro) y sobre la velocidad de desplazamiento (bradicinesia). En la **Figura 19A** se muestran los datos de velocidad angular promedio en la basal, durante los protocolos de estimulación, y en el seguimiento inmediatamente posterior (30s). De los promedios basales, es visible como todos los animales (n=4) presentan una tendencia a girar ipsilateral a la lesión. En los segmentos de inhibición se puede observar que ante inhibiciones

de intensidad baja (10-25mW) los animales tienen a una velocidad angular promedio de 0, mientras que en protocolos con mayor intensidad se genera un giro contralateral al hemisferio de inhibición. Los segmentos de post-inhibición sugieren que el efecto de modulación sobre la velocidad angular promedio es en línea. En el panel B de la **Figura 19** se expresa la velocidad promedio antes, durante y después del protocolo de inhibición, normalizado a su basal. Los protocolos de 25-55mW incrementan la velocidad de desplazamiento durante la inhibición. Por otra parte, todos los protocolos tienen un efecto significativo sobre el periodo inmediatamente posterior a la inhibición en cuanto a su velocidad de desplazamiento (barras blancas). Esto sugiere que existe un efecto que se mantiene después de la inhibición.

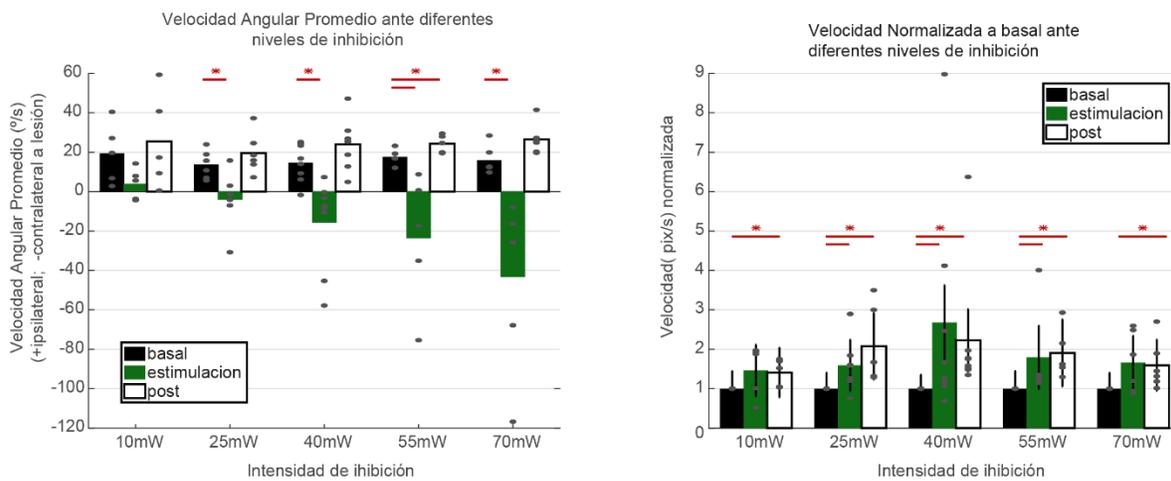


Figura 19. Efectos poblacionales de la inhibición directa del núcleo entopeduncular con Arch3.0 a diferentes intensidades, en animales con hemidepleción dopaminérgica.

A. Velocidad angular promedio durante el segmento basal, estimulación y después de estimulación para cada uno de las intensidades de inhibición. En barras, se muestran los promedios poblacionales y en círculos grises los promedios por animal. **B.** Velocidad de desplazamiento promedio normalizada a su basal para los segmentos basal, estimulación y post-estimulación para cada protocolo. Se muestran las barras que dieron significancia estadística cuando son comparadas contra la basal, prueba de rango con signo Wilcoxon, $p < 0.05$.

A través de dos aproximaciones experimentales se estudió la repercusión de la inhibición del núcleo entopeduncular sobre conductas motoras de velocidad angular promedio y velocidad de desplazamiento promedio. Con el objetivo de explorar la relación entre los diferentes protocolos de estimulación y estas dos variables se realizaron ajustes que describieran esta relación (**Figura 20**). Para los ajustes de velocidad angular se utilizaron ajustes lineales. En los ajustes para velocidad de desplazamiento se utilizó un polinomio de segundo orden, pues la suma de cuadrados de los residuos ($SCR = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2$) fue menor para los mismos (SCR ajuste lineal Vel. Desp. ChR2 = 108.3, SCR ajuste polinomial Vel. Desp. ChR2 = 96.2; SCR ajuste lineal Vel. Desp. Arch3.0 = 75.4, SCR ajuste polinomial Vel.

Desp. Arch3.0 = 70.4). En los ajustes de los experimentos de activación de fibras aferentes gabaérgicas se omitieron los datos para los protocolos 100Hz y 125Hz pues la opsina empleada (ChR2 ET/TC) no puede activarse a esas frecuencias de estimulación (Berndt et al., 2011).

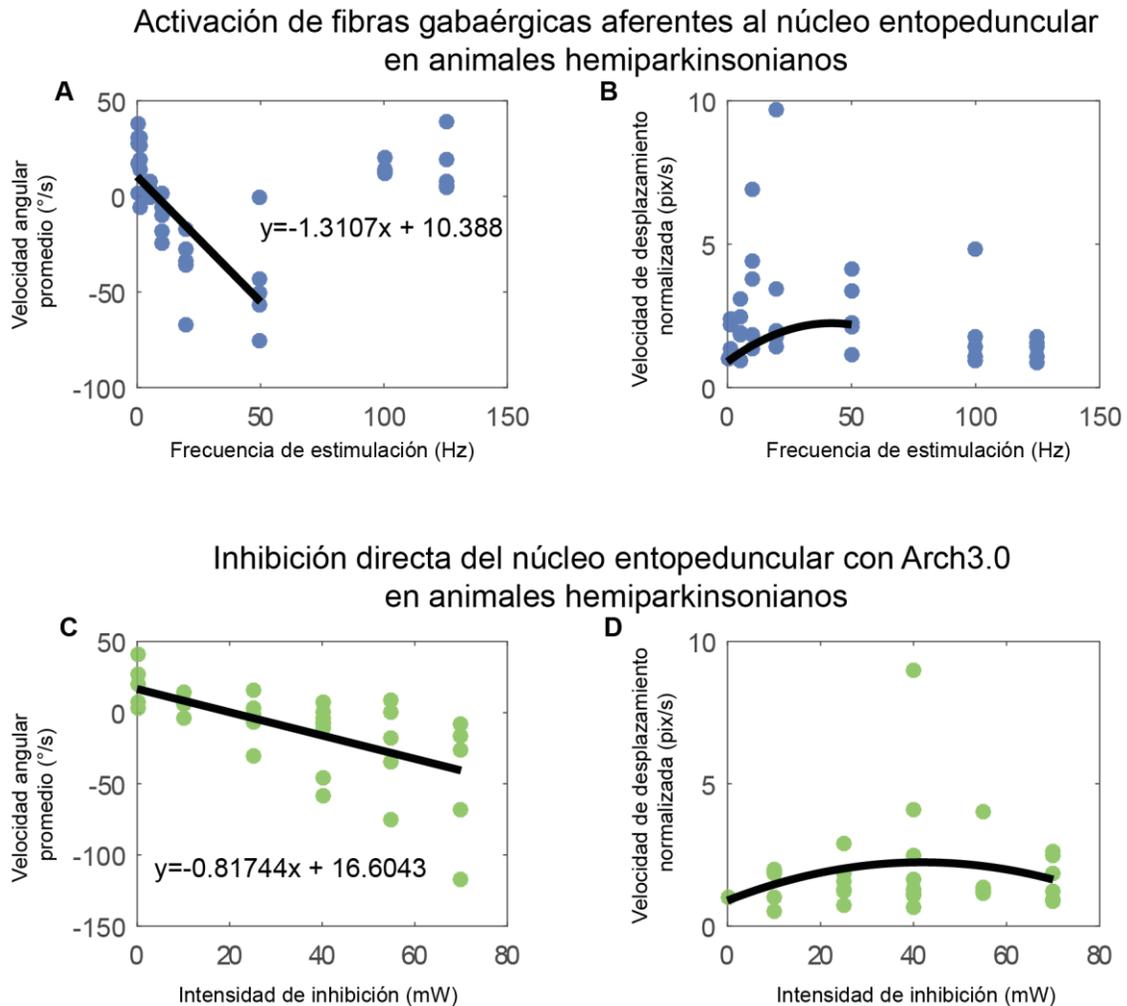


Figura 20. Efecto de las dos aproximaciones experimentales de inhibición del núcleo entopeduncular sobre la velocidad angular promedio y la velocidad de desplazamiento normalizada promedio. **A.** Se grafican los promedios individuales de velocidad angular por animal para cada protocolo, así como un ajuste lineal y su ecuación. **B.** Gráfica de los promedios de velocidad de desplazamiento por animal para cada protocolo, así como un ajuste polinomial de segundo grado. Para los ajustes se excluyen los datos de los protocolos 100Hz y 125Hz. **C y D,** mismo que A y B, pero para inhibición con Arch3.0.

Los ajustes lineales sobre la velocidad angular promedio ante diferentes protocolos de estimulación sugieren que existe un nivel de inhibición que genera una velocidad angular promedio igual a cero, lo que es normal en animales no lesionados. Si se resuelven las ecuaciones para $y=0$ (velocidad angular promedio=0), resulta que en cuanto a la frecuencia de estimulación de ChR2 ET/TC el protocolo que generaría este patrón sería alrededor de 8Hz. Esta frecuencia en el ajuste de desplazamiento se encuentra en la porción ascendente, es decir, sí genera un aumento en la

velocidad de desplazamiento. Por otro lado, si realizamos esto mismo para el ajuste de la inhibición con Arch3.0, resulta que 20mW generaría una velocidad angular promedio =0. Esto también se encuentra en la parte ascendente de la parábola en el ajuste de velocidad de desplazamiento promedio. Por otra parte, los datos de velocidad de desplazamiento se ajustan mejor a un polinomio de segundo grado. Esto sugiere que existe un vértice en donde la velocidad de desplazamiento sería máxima. Sin embargo, mayores niveles de inhibición disminuirían esta velocidad. Esto tiene sentido pues ante inhibiciones mayores, los animales generan un movimiento de giro con un ángulo cerrado, que no genera un gran desplazamiento.

Objetivo 4: Evaluación de la repercusión de las estimulaciones optogenéticas sobre marcadores electrofisiológicos de la enfermedad

En los antecedentes se estableció que una de las repercusiones de la EP sobre la electrofisiología cerebral es el aumento de la amplitud de las oscilaciones en el rango beta (11-40Hz) en diferentes partes del cerebro (Oswal, Brown, & Litvak, 2013). Existe evidencia que apunta a que esta sincronización excesiva en la banda beta está directamente relacionada con la fisiopatología de la enfermedad, pues la disminución de la misma (a través de estimulación cerebral profunda) correlaciona con la disminución de los síntomas (Meissner et al., 2005; Wingeier et al., 2006). Se ha propuesto que este aumento de poder en estas oscilaciones surge a partir del núcleo subtalámico y se propaga a través de otras estructuras (Deffains et al., 2016). Estas oscilaciones exageradas se han reproducido en diferentes modelos experimentales de parkinsonismo, como en primate y rata. En particular, la evidencia disponible sugiere que la locomoción en la rata induce este ritmo tanto en la sustancia nigra como en la corteza motora (Avila et al., 2010).

Así, en este estudio se propuso evaluar este incremento en la banda beta (pico beta) que se ha correlacionado en pacientes humanos con la fisiopatología de la enfermedad (López-Azcárate et al., 2010). Este pico beta se ha evidenciado en modelos de estudio de roedores parkinsonianos, en específico durante movimientos de desplazamiento (Brazhnik, McCoy, Novikov, Hatch, & Walters, 2016). Este aumento del poder de la banda beta se utilizaría como marcador del parkinsonismo y se estudiaría su relación con los protocolos de estimulación optogenética.

La hipótesis del estudio se ilustra en la **Figura 21**. Se propone que en animales lesionados se observaría un incremento en la banda beta ('pico beta'), específicamente cuando realizaran movimientos de desplazamiento (**Figura 21B**). Este 'pico beta' disminuiría con los protocolos de estimulación optogenética que mejoran la conducta motora espontánea del animal (**Figura 21C**).

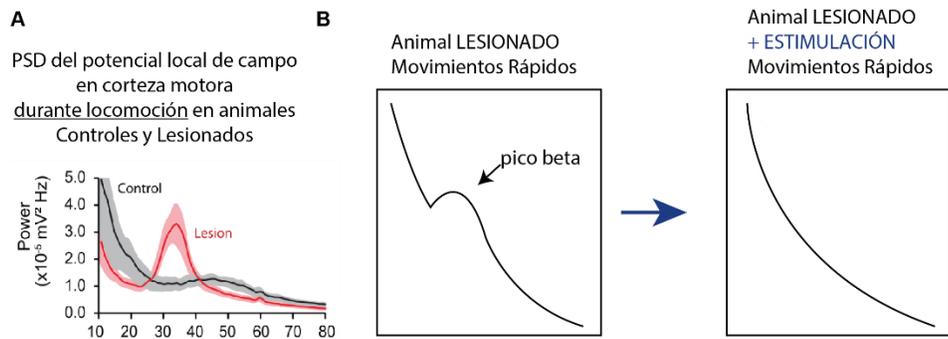


Figura 21. Hipótesis del experimento de registrar el potencial local de campo durante la estimulación optogenética. **A.** Densidad espectral de potencia del potencial local de campo registrado en corteza motora primaria durante la locomoción de animales lesionados y no lesionados (control). Modificado de (C. Delaville et al., 2015). **B.** Se sugiere que ante la estimulación optogenética sobre el núcleo entopeduncular, este marcador electrofisiológico de la enfermedad disminuiría hacia lo normal.

Análisis del potencial local de campo corteza motora en animales lesionados en épocas de alta y baja velocidad de desplazamiento

Con el objetivo de evidenciar el aumento de la banda beta durante de periodos de movilidad, se implantó a dos animales con electrodos en la corteza motora. Los animales implantados fueron transgénicos para D1-Cre, infectados en el estriado de manera unilateral para expresar ChR2 ET/TC en la vía directa, hemilesionados ipsilateralmente con 6-OHDA e implantados con una fibra óptica sobre el núcleo entopeduncular. Este procedimiento es idéntico al utilizado en los primeros experimentos. Adicionalmente, se les colocó un electrodo en la corteza motora primaria en la región somatotópica de la extremidad anterior contralateral (ver métodos). Tras 4 semanas de expresión de la opsina y de lesión, se realizaron registros en campo abierto bajo sistema de *tracking*. Posterior a periodos basales, se les aplicó los protocolos de estimulación ya descritos, activando fibras de la vía directa (gabaérgicas) aferentes a el núcleo entopeduncular (**Figura 13**).

Inicialmente, el análisis se versó en intentar identificar el aumento del poder de las frecuencias beta durante los periodos de movilidad, como ha sido descrito previamente (Mallet, N et al., 2008; Avila, I et al., 2010; Delaville, C et al., 2015; Brazhnik, E et al., 2014). Para esto, se segmentó el periodo de tiempo basal de los animales en ventanas de 1 segundo. Se cuantificó la velocidad de desplazamiento registrada en el video y se tomaron las ventanas con el percentil 89-99 de movimiento como periodos rápidos y el percentil 0-10 como periodos lentos (**Figura 22A**). Se evitó tomar el percentil 99-100 porque se querían descartar posibles artefactos por el sistema de *tracking*. Se tomó el trazo electrofisiológico registrado en esa ventana y se le calculó la PSD para las frecuencias de interés (**Figura 22B y C**). Se promediaron los espectros para las ventanas lentas y para las ventanas rápidas (**Figura 22D**) y se segmentaron las frecuencias en las bandas de interés (delta, teta, alfa, beta, gama bajo y gama alto) en **Figura 22E**. Es visible que las

frecuencias bajas (delta y teta) tienen menor poder ($p < 0.05$, t-test) durante periodos de movimiento comparado con aquellos de quietud. Por otra parte, las frecuencias más rápidas (alfa, beta y gama) se incrementan en los periodos de movimiento rápido.

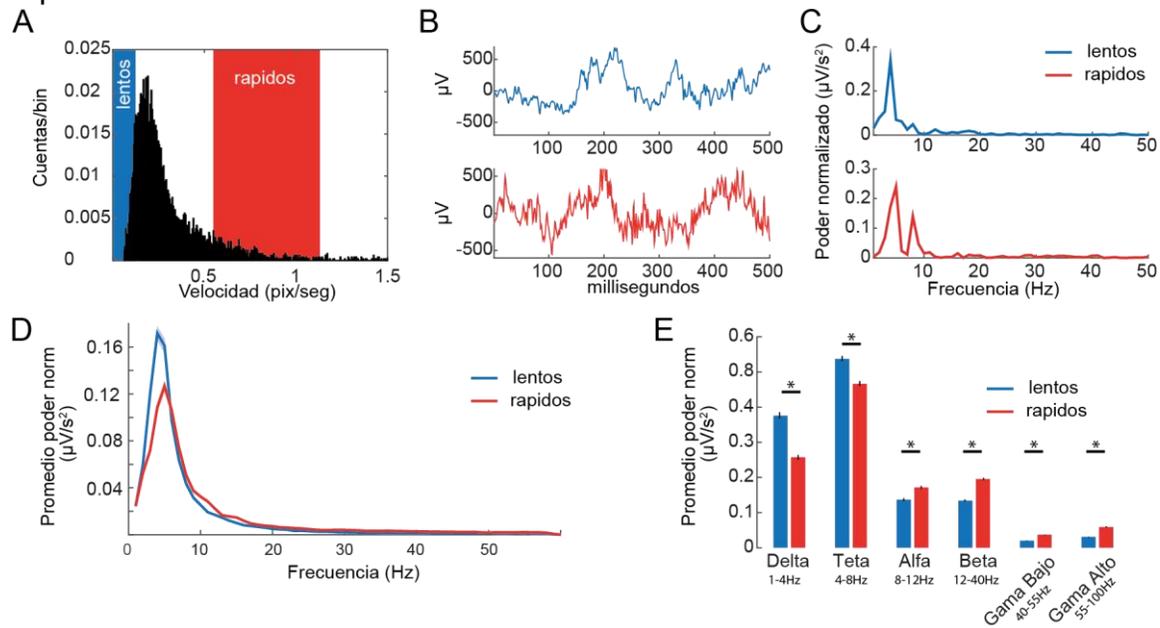


Figura 22. Análisis de densidad espectral de potencia del potencial local de campo registrado en corteza motora de animales lesionados en situación de movilidad y quietud. **A.** Se muestra el histograma de la velocidad promedio de cada ventana de tiempo durante el registro de la corteza motora. Se eligió el percentil 0-10 como lentos y el percentil 89-99 como rápidos. **B.** Ejemplo de señal electrofisiológica y análisis de densidad espectral en **C** durante un periodo lento (superior) y periodo rápido (inferior). **D.** Promedio de análisis de densidad espectral durante segmentos rápidos y lentos. **E.** Cuantificación de poder en las diferentes bandas de interés en movimientos rápidos y lentos (diferencias estadísticas presentadas con asterisco, $p < 0.05$, t-test).

El incremento observado del poder de la banda beta durante períodos de movimiento rápidos confirma la hipótesis planteada. Sin embargo, no es visible el ‘pico beta’ que se describe en la literatura (**Figura 21B**). A continuación, se procedió a evaluar la repercusión de los diferentes protocolos de estimulación optogenética sobre el potencial local de campo de la corteza motora. Para determinar la repercusión de las estimulaciones optogenéticas en el potencial local de campo en la corteza motora, se colocó a los animales en un campo abierto y se aplicaron los protocolos de activación de fibras aferentes gabaérgicas ya descritos.

Análisis del potencial local de campo corteza motora en animales lesionados durante estimulación optogenética

Los protocolos de estimulación que generaron un cambio evidente sobre el poder de ciertas frecuencias en el potencial de campo fueron los de 10Hz, 20Hz, y 50Hz, como es visible en el análisis tiempo-frecuencia (**Figura 23A**). Estos tres protocolos

demonstraron disminuir el poder de frecuencias bajas. Sin embargo, es visible en estos gráficos que ante la estimulación optogenética se genera un aumento de poder en la frecuencia estimulada. Es decir, se impone un ritmo al estimular optogenéticamente la vía directa a estas frecuencias (**Figura 23B**). Asimismo, se logra observar un aumento en los armónicos de las frecuencias de 10Hz (en 20 y 30Hz) y para 20Hz (40Hz), **Figura 23B**.

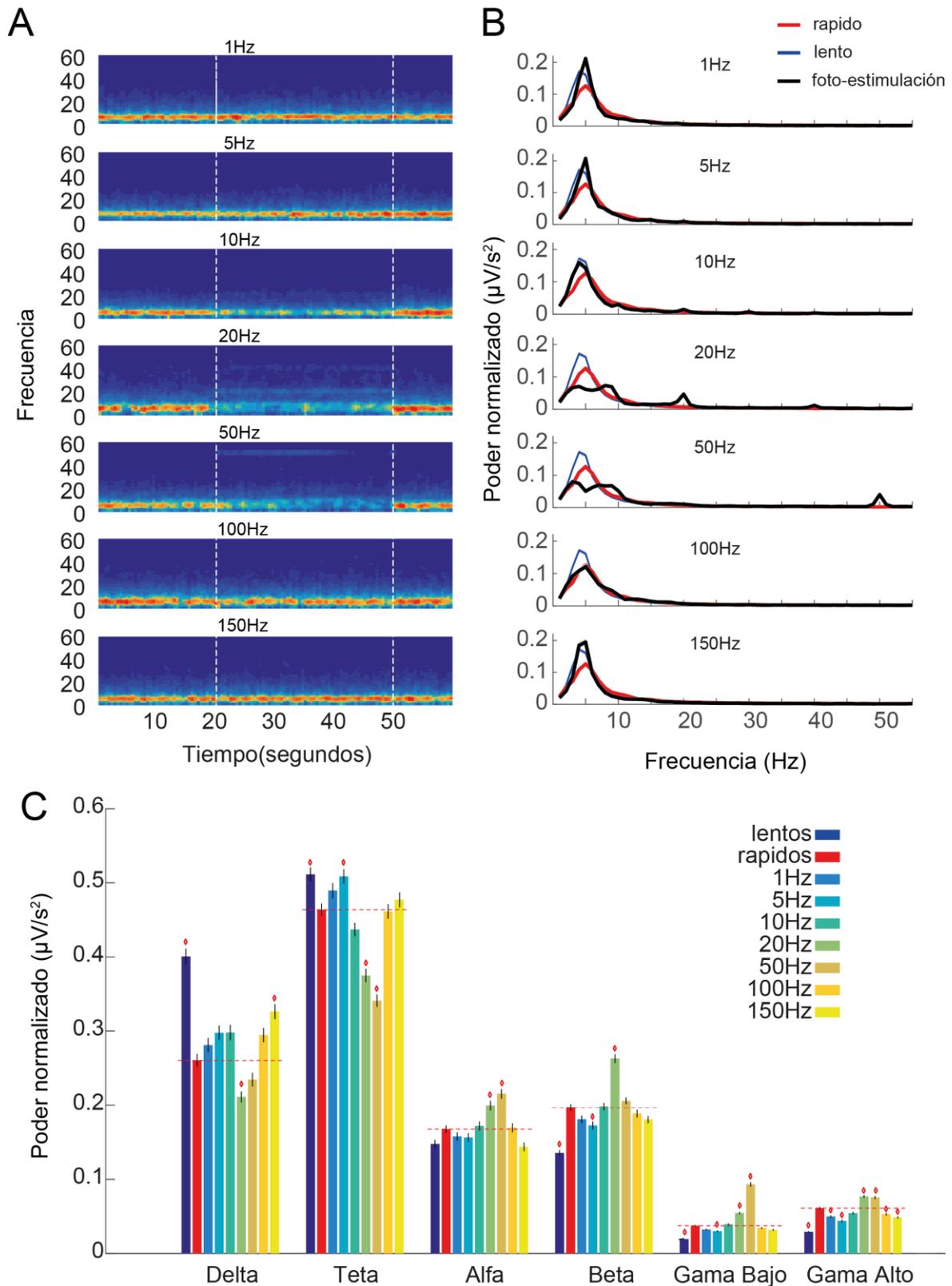


Figura 23. Efecto de los diferentes protocolos de estimulación de fibras de la vía directa aferentes al núcleo entopeduncular sobre el potencial local de campo de la corteza motora en animales hemiparkinsonianos. A. Se muestra la

descomposición en tiempo y frecuencia del poder de las oscilaciones antes, durante y después de aplicar el protocolo de estimulación optogenética. Cada gráfico es un promedio de 5 ensayos. **B.** Análisis de densidad espectral para cada uno de los protocolos de estimulación, comparado con aquellos de los segmentos lentos y rápidos. **C.** Comparación de poder normalizado para cada una de las bandas de interés en cada protocolo de estimulación contra el poder observado durante movimientos rápidos. Rombos rojos= diferencias estadísticamente significativas contra movimientos rápidos ($p < 0.05$, ANOVA 1 vía, post hoc Tukey).

Dentro de la banda de mayor interés, la banda beta, los efectos no fueron muy claros. La hipótesis formulada sugería que aquellos protocolos que mejoraban la conducta motora del animal, entre 5 y 10Hz, tendrían un efecto de disminuir el poder de la banda beta en el animal lesionado. En efecto, el único protocolo que disminuyó de manera estadísticamente significativa (ANOVA de una vía, $p < 0.05$, post hoc Tukey) el poder de la banda beta fue el de 5Hz.

No obstante, el hallazgo presentado en **Figura 22** sobre el incremento estadísticamente significativo de beta en segmentos de desplazamiento rápido no es muy claro. Esto es así, debido a que el pico beta que se ha descrito en pacientes y que se ha reproducido en modelos roedores no fue observado. Este pico se describe como un segmento de frecuencias pertenecientes a la banda beta que se encuentran elevadas hasta más de dos veces con respecto a frecuencias vecinas. Una razón que puede explicar por qué no se halló este fenómeno previamente descrito, se puede encontrar en el diseño experimental. Los estudios que reportaron este fenómeno (pico beta) en roedores no anestesiados (Avila, I et al., 2010; Delaville, C et al., 2015) utilizaron una caminadora (treadmill) para inducir movimientos de desplazamiento rápido. El uso de este aparato puede, además de producir un desplazamiento más rápido, activar otros sistemas como los de atención. Así, es posible que la causa de incremento en ritmo beta en la corteza motora previamente descrito, se deba mayormente a la exagerada atención que el animal tiene que poner para mantener la marcha en este aparato, y no al aumento de velocidad de desplazamiento.

Por otra parte, en el apartado anterior se había descrito que el protocolo teórico que produciría una velocidad angular promedio de cero (normal) sería la estimulación de entre 5 y 10hz (según regresiones de **Figura 20A**). Resulta interesante que el protocolo de 5Hz fuera el único que lograra disminuir, de manera estadísticamente significativa, el poder de la banda beta comparado con los movimientos rápidos.

Sin embargo, es importante destacar que los datos aquí presentados se obtuvieron de dos animales. Esta muestra es pequeña comparada con otros estudios similares. Así, para poder generar datos más concluyentes sería importante aumentar esta muestra.

Objetivo 5: Evaluación actividad normal del núcleo entopeduncular durante la conducta de giro

Justificación

Los datos previamente presentados no exploran la función del núcleo entopeduncular en el ratón en un contexto sano. Así, es difícil entender por qué en el modelo de lesión la manipulación de este núcleo tiene un impacto sobre la conducta de giro y la velocidad de desplazamiento. Por lo mismo, es importante generar un entendimiento más profundo sobre la función del núcleo de manera normal para poder formar conclusiones sobre la razón por la que la lesión dopaminérgica puede alterar ciertas conductas. Aún más cardinal, es importante conocer la función del núcleo para entender por qué la inhibición unilateral del mismo puede generar una conducta de giro contralateral.

La hipótesis con la que se diseñó el experimento de conducta es la siguiente: las unidades del núcleo entopeduncular codifican la dirección de giro (izquierda y derecha). Su frecuencia de disparo disminuirá ante la conducta motora de giro contralateral al hemisferio de registro. Su frecuencia de disparo aumentará ante la conducta motora de giro ipsilateral al hemisferio de registro.

Paradigma conductual

Con el objetivo de generar una conducta de giro con una trayectoria y parámetros motores lo más estereotipados posibles, se entrenó a ratones a discriminar entre dos tonos que señalizaban una liberación de recompensa en uno de dos bebederos, situados a su derecha o izquierda. En la **Figura 24A** se muestra un esquema de la distribución espacial de la tarea. Los ratones se encontraban en un prisma triangular, privados de agua (hasta un peso corporal de 80-85% del basal). Debían acercarse a una esquina y esperar de manera inmóvil durante un segundo. Tras ese segundo, sonaba uno de dos tonos, que señalizaban disponibilidad de recompensa en uno de los dos bebederos situados a su izquierda y derecha. Si el animal realizaba un lengüeteo en el bebedero correcto, se liberaba una gota de agua. Si realizaba un lengüeteo en el bebedero incorrecto, las luces de la caja de comportamiento se apagaban durante 10s (timeout).

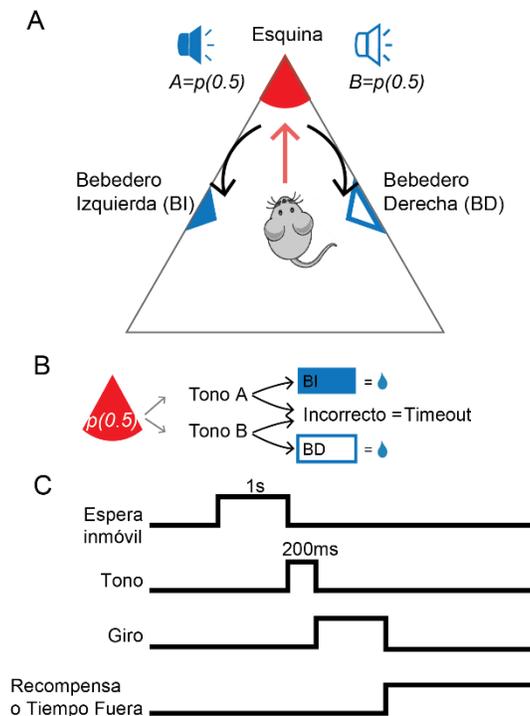


Figura 24. Esquema de tarea conductual para explorar conductas de giro en ratones. **A.** El animal se encuentra en un prisma triangular. Se debe aproximar a una esquina y esperar 1 segundo en inmovilidad. Tras la espera inmóvil correcta, se reproduce un tono de 200ms de duración que señala el puerto al que debe dirigirse el animal para recibir una gota de agua. **B.** La probabilidad de que suene un tono para cada puerto es de 0.5. En caso de realizar un lengüetazo en el bebedero correcto, se libera una gota de agua. Si realiza un lengüetazo en el bebedero incorrecto, las luces de la caja conductual se apagan por 10s. **C.** Se muestra un esquema con los eventos de la tarea ordenados de manera temporal.

Mediciones de conducta en el paradigma

Los animales fueron entrenados alrededor de un mes durante diferentes fases que los llevaron a realizar la tarea final descrita anteriormente (ver Métodos). Tras el entrenamiento, se realizó la cirugía de implante de electrodo en el núcleo entopeduncular derecho para poder registrar la actividad de las unidades. En la **Figura 25A**, se muestra el desempeño de los ratones que se usaron para el registro electrofisiológico de unidades. Se muestran las diferentes fases ya descritas. Tras la cirugía el desempeño de los animales disminuyó considerablemente, por lo que se tuvo que reentrenar a los mismos para mejorar su desempeño antes del registro electrofisiológico. Tras el entrenamiento, los ratones generaban una trayectoria desde la esquina hasta el bebedero bastante estereotipada, como se puede observar en **Figura 25B**. Se grafican en rojo las trayectorias desde el sonido del tono hasta el arribo al sitio de recompensa, mientras que en negro se encuentra el seguimiento del animal durante toda la sesión. En **Figura 25C** se muestra, para un animal, los trazos de aceleración corporal (suma cuadrada de la señal de acelerómetro de los tres ejes), durante los ensayos hacia la derecha y hacia la izquierda. El promedio muestra que el animal disminuyó su aceleración corporal durante el periodo de espera. Así, es posible decir que durante la espera presentó inmovilidad.

Por otra parte, para poder alinear la actividad electrofisiológica al giro del animal, variable a explorar, se muestran las señales disponibles en **Figura 25D**. Estas señales son las obtenidas durante un ensayo (a la derecha) para un animal y están alineadas al inicio del tono (sombreado azul). Se muestran capturas del animal dentro de la tarea a diferentes tiempos del ensayo. Tras el tono, la distancia del animal desde el bebedero al que debe llegar disminuye hasta llegar a cero. Esto coincide con el aumento de la velocidad de desplazamiento. Se puede calcular la velocidad angular del animal (cambio de ángulo en grados por segundo de la cabeza con respecto a su centroide). Asimismo, se pueden obtener señales de los sensores inerciales que están presentes en la headstage de registro electrofisiológico. La señal de giroscopio también muestra la velocidad angular de la cabeza. Se listan a continuación tres razones por las que se utilizó la señal del giroscopio para alinear la actividad electrofisiológica:

1. La proporción señal ruido es mucho mayor para el giroscopio que para la señal obtenida a través del video (ver histograma de señal en Figura C, donde el pico del giroscopio se posiciona 10 desviaciones estándar del promedio).
2. La señal del video depende de mucho procesamiento offline para registrar correctamente la cabeza de la cola. La señal de giroscopio se obtiene directamente del aparato de medición.
3. La señal de giroscopio se guarda directamente en conjunto con la señal electrofisiológica, por lo que no es necesario alinear la primera a la segunda. Por otra parte, el video se debe alinear a la señal electrofisiológica.

Así, en la **Figura 25E** se muestran las alineaciones de los giros de un animal durante una sesión para ambos lados, izquierda y derecha. Es visible, cualitativamente, que el giro es bastante estereotipado y que existe bastante simetría entre los giros hacia ambas direcciones.

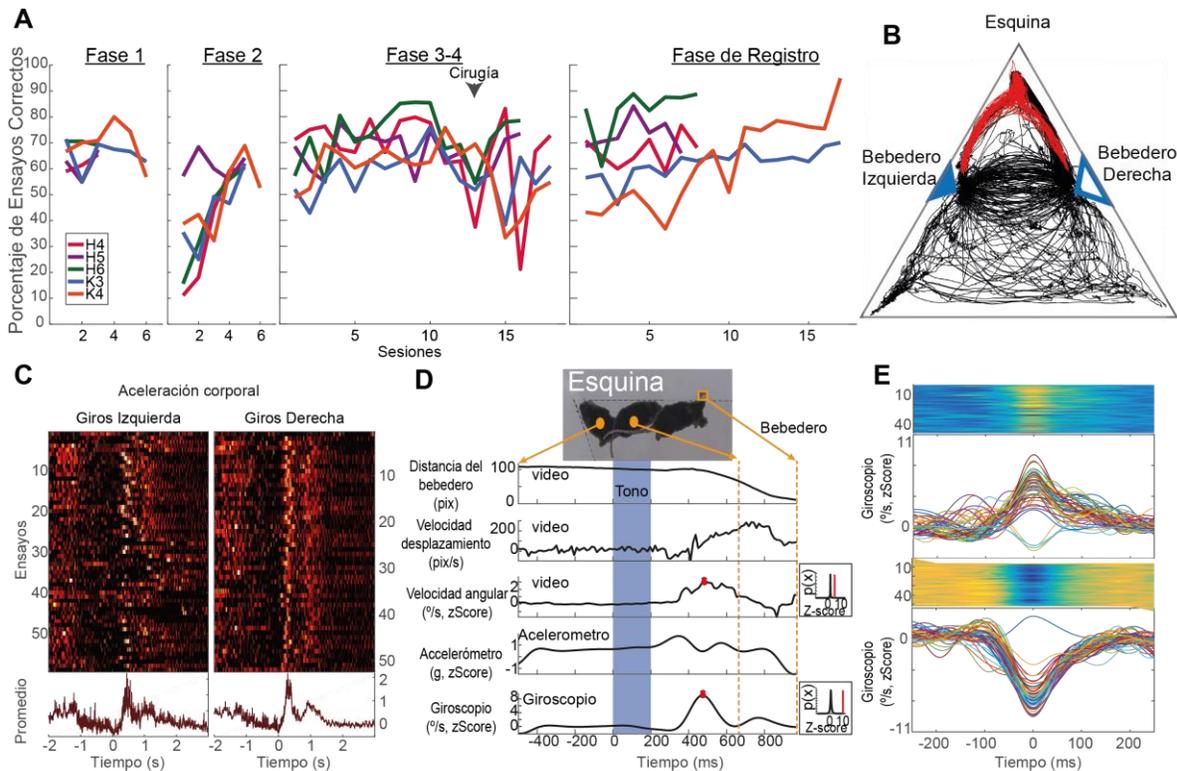


Figura 25. Mediciones de la tarea conductual. **A.** Desempeño de los animales de los que se obtuvo registros electrofisiológicos del núcleo entopeduncular a lo largo de las diferentes fases de entrenamiento (Ver figura en métodos). **B.** Se muestran el ejemplo del seguimiento por video para una sesión de un animal. En rojo se muestran las trayectorias desde tono hasta recompensa. **C.** Ejemplo de aceleración corporal total (suma cuadrada de señal de acelerómetro para los tres ejes) de un animal ante ensayos a la derecha y a la izquierda. Note que en promedio el animal disminuye su nivel de movimiento durante el tiempo de espera (-1 a 0s). **D.** Arriba, capturas del animal durante un ensayo de la tarea. Abajo, señales del sistema de tracking por video y sensores inerciales de la headstage para registro electrofisiológico. **E.** Alineación de giros a partir de giroscopio hacia la derecha (superior) y la izquierda (inferior), se muestran en heatmap, así como los trazos sobrepuestos.

Análisis de la actividad electrofisiológica de unidades registradas en el núcleo entopeduncular ante la conducta de giro

La manera clásica de analizar la actividad de una unidad requiere alinearla a algún evento conductual a través de varios ensayos. Así, la figura **Figura 26** ilustra la actividad promedio de una unidad registrada durante los eventos que se presentan en la conducta de giro hacia la izquierda, dentro de la tarea conductual. Según los gráficos de ráster y los histogramas perievento presentados en **Figura 26A**, esta unidad presenta actividad en rampa antes del pico de la vuelta, y la actividad decreta conforme se acerca al bebedero izquierdo. Tras recibir la recompensa, la actividad disminuye todavía más.

Debido a que en esta tarea en libre movimiento la realización de cada una de estos eventos conductuales depende del ratón, existe cierta variabilidad entre ensayos. Esto se puede deber a diferentes tiempos de reacción, lo cual es esperable. Por

esta razón y para poder presentar los datos de manera más sencilla, se realizó un reescalamiento de la actividad de cada ensayo, izquierdo y derecho, al promedio del intervalo que se obtuvo de todas las sesiones de todos los animales (**Figura 26B**).

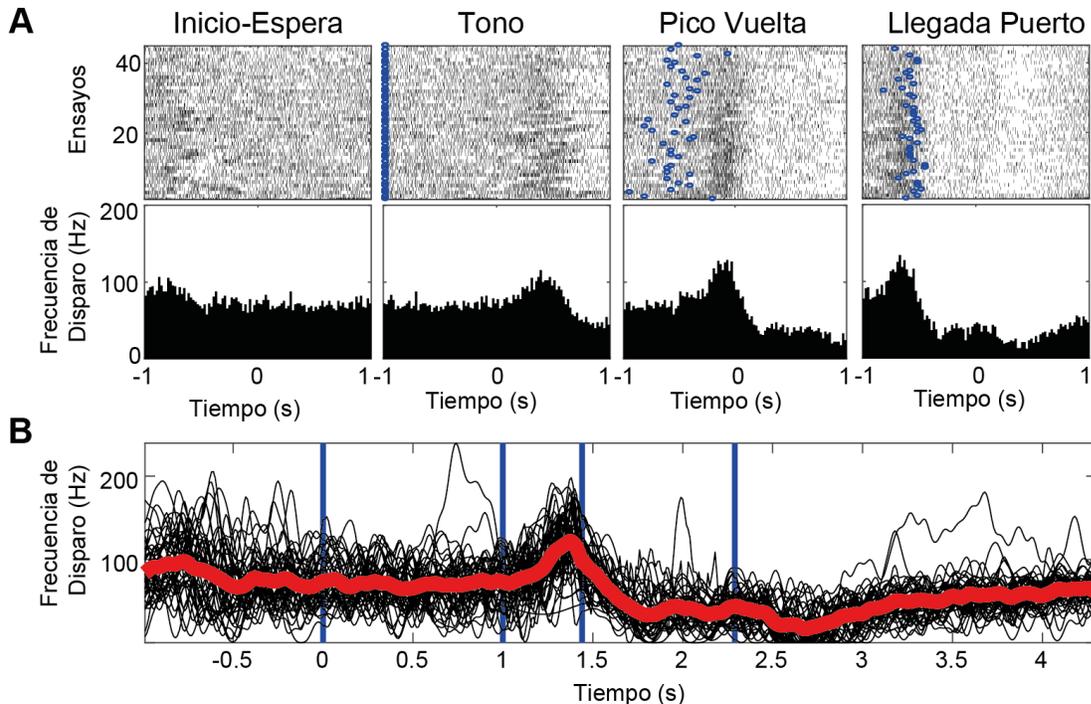


Figura 26. Alineaciones y reescalamiento para una unidad durante un ensayo a la izquierda. A. Arriba. Se muestran los rásters en donde se alinean las espigas de la unidad a los distintos eventos de la tarea conductual en cero. En marcas azules se muestra el evento previo alineado al evento actual. Abajo. Se muestran los histogramas perievento (bin=20ms). **B.** Se muestran en trazos negros los ensayos individuales reescalados (ver Métodos), al promedio del intervalo entre eventos de todas las sesiones, de todos los animales. Cada línea vertical azul es uno de los cuatro eventos de la parte superior. En trazo rojo se muestra el promedio.

Posteriormente, se realizó un análisis de ROC (Receiver Operating Characteristic, según sus siglas en inglés; ver Métodos) entre Ensayos Izquierda vs Ensayos Derecha para todos los tiempos de cada ensayo, como se muestra en **Figura 26B**. Esto permite establecer en qué eventos conductuales las distribuciones de las frecuencias de disparo de la unidad son diferentes, codificando algún parámetro izquierda-derecha de la tarea conductual. A partir de las observaciones anteriores, es posible concluir que esta unidad, previo al pico del giro, no distingue de la acción de girar a la izquierda o derecha (valor ROC dentro del límite de permutaciones). Es decir, según esta métrica, no contiene información del tono, de la selección de la acción de girar a alguno de los lados y del inicio del movimiento. No es hasta que ya inició el movimiento (antes del pico de vuelta) y se encuentra en un movimiento de desaceleración angular que la unidad puede distinguir entre las dos acciones ejecutadas. Es visible un aumento de la frecuencia de disparo conforme se acerca al bebedero derecho y una disminución casi simétrica cuando se acerca al bebedero

izquierdo. Por último, la unidad no regresa a su basal y continúa diferenciando cuando el animal se encuentra consumiendo la recompensa.

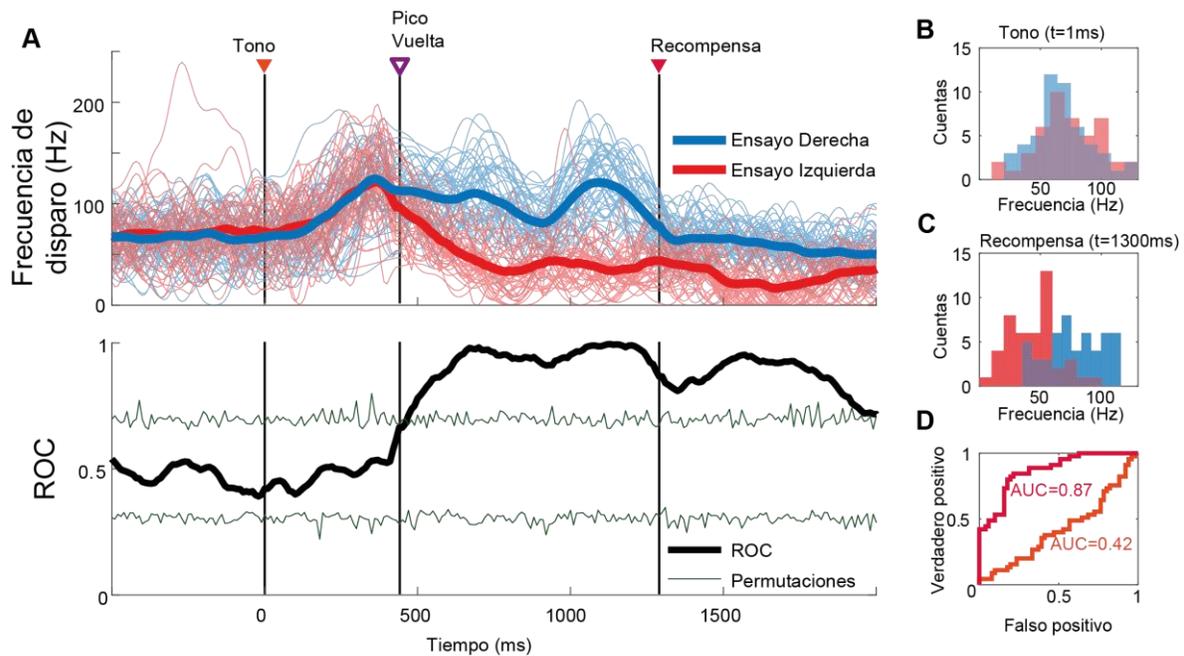


Figura 26. Ejemplo de análisis de codificación izquierda-derecha para una unidad. **A.** Arriba, se muestran en trazos delgados y semitransparentes las respuestas reescaladas de una neurona ante los diferentes eventos de la tarea conductual, para ensayos derechos e izquierdos. Se muestran en triángulos de color los eventos relevantes. Abajo, se grafica el análisis estadístico de ROC para la comparación EnsayosDerecha – EnsayosIzquierda a lo largo del tiempo. Un valor positivo significa que la frecuencia promedio de la unidad fue mayor durante los ensayos hacia la derecha, y viceversa. Se permutaron ($n=1000$) los datos para cada tiempo y se muestra el mínimo y máximo; valores por arriba o por debajo del intervalo de permutaciones denotan significancia estadística. **B.** Histograma de las frecuencias de disparo ante ensayos a la derecha (rojo) e izquierda (azul) para el tiempo de inicio de tono. **C.** Lo mismo que B pero para el tiempo de entrega de recompensa. **D.** Curva ROC para los datos en B y C. En naranja se muestra el tiempo de tono, mientras que en rosa se muestra el tiempo de recompensa. AUC, área bajo la curva por sus siglas en inglés.

Análisis poblacional de la actividad de unidades registradas en el núcleo entopeduncular ante la conducta de giro

El análisis que se describió en el apartado anterior se realizó para cada una de las unidades registradas de los 5 animales. De esta manera es posible cuantificar la cantidad de unidades registradas cuya frecuencia de disparo distingue entre la acción de dirigirse al bebedero izquierdo del derecho a cada momento de la acción (desde el tiempo de espera → tono → vuelta → aproximarse al bebedero → recompensa, **Figura 27**). En el mapa de color de la **Figura 27** se muestra la codificación ROC para todas las unidades registradas en los diferentes eventos conductuales. Los segmentos en azul indican que la unidad tuvo una mayor

frecuencia de disparo durante los ensayos ipsilaterales en ese segmento de tiempo. La hipótesis que se ideó a partir de los experimentos de manipulación optogenética sugería que las neuronas del núcleo entopeduncular se inhibirían (o disminuirían su frecuencia de disparo) ante un giro contralateral, mientras que aumentarían su frecuencia durante un giro ipsilateral. Esto se vería reflejado como unidades que tuvieran una $ROC > 0.5$ durante el giro, en azul.

A partir de los datos encontrados, destaca que existe un gran número de unidades que no distinguen la acción de un ensayo derecho de un ensayo izquierdo (blanco en mapa de color, **Figura 27A**). Sumando el número de unidades con ROC significativa en **Figura 27B-C** es evidente que, en cualquier segmento temporal de la tarea, el número máximo de unidades que distinguen entre los ensayos izquierda y ensayos derecha no rebasa un 40%. Por otro lado, según los datos encontrados, existe un grupo de unidades que cumplieron con la hipótesis, su frecuencia de disparo fue mayor durante un giro ipsilateral comparado con el giro contralateral (**Figura 27C**, alrededor del pico de la vuelta). Sin embargo, también existió un grupo de unidades que tuvieron una actividad opuesta a la hipótesis prevista: su frecuencia de disparo fue mayor durante el giro contralateral comparado con la actividad durante el giro ipsilateral (**Figura 27B**, alrededor del pico de la vuelta). Aún más interesante, este segundo grupo, que va en contra de la hipótesis planteada, tuvo una mayor proporción (alrededor de 14%) que las del primer grupo (alrededor de 8%). Por otra parte, existieron unidades que distinguieron el segmento de tiempo en el que el animal se desplazaba hacia cada uno de los bebederos (segmento desde pico de vuelta hasta recompensa en **Figura 27**). También, existieron unidades que distinguieron entre recibir la misma recompensa de un lado al otro.

Sin embargo, los datos presentados no cumplen con la hipótesis de que la mayoría de las unidades se modularían a la alta durante los giros ipsilaterales y a la baja durante los giros contralaterales.

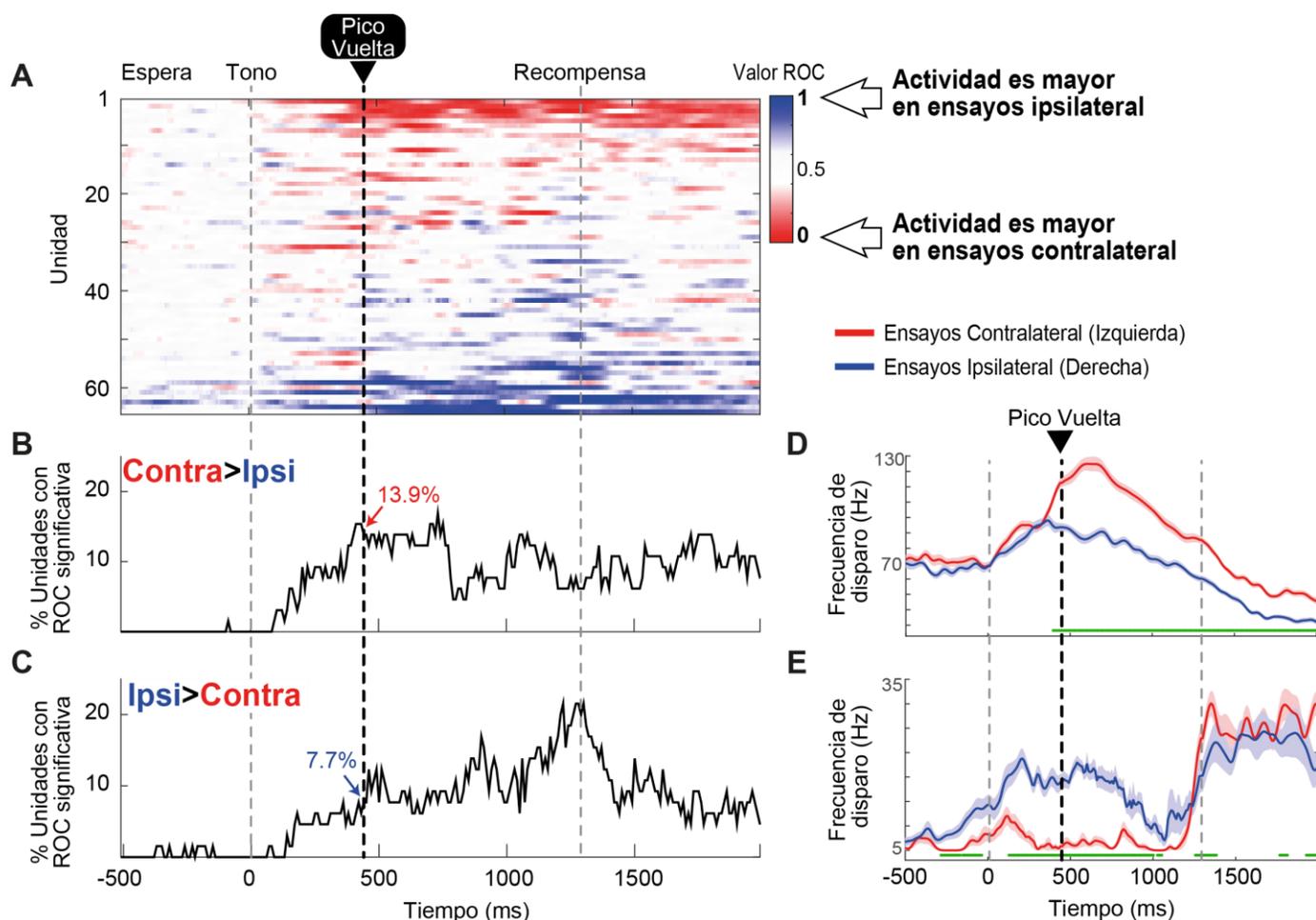


Figura 27. Análisis ROC para Ensayos Derecha vs Ensayos Izquierda para todas las unidades registradas. **A.** Se muestra en heatmap el valor ROC para cada unidad, comparando Ensayos Derecha vs Ensayos Izquierda a lo largo del tiempo. Se muestran los eventos conductuales relevantes. **B.** Porcentaje de unidades que presentaron un valor ROC menor a 0.5 estadísticamente significativo a lo largo del tiempo. Estas unidades codificaron la trayectoria a la izquierda con una mayor frecuencia de disparo que la trayectoria a la derecha. **C.** Porcentaje de unidades que presentaron un valor ROC mayor a 0.5 estadísticamente significativo a lo largo del tiempo. Estas unidades, por el contrario, codificaron la trayectoria a la derecha con una mayor frecuencia de disparo que la trayectoria a la izquierda. **D.** Ejemplo representativo de una neurona cuya frecuencia de disparo es significativamente mayor durante ensayos contralaterales. **E.** Ejemplo representativo de una neurona cuya frecuencia de disparo es significativamente mayor durante ensayos ipsilaterales.

Discusión

Mientras que el efecto de la estimulación cerebral profunda a alta frecuencia en el cerebro sigue estando en debate, existe evidencia que apunta a que por lo menos parte del mecanismo se debe a una inhibición funcional del núcleo blanco (Beurrier et al., 2001b; Chiken & Nambu, 2014; J. A. Obeso et al., 2017). En este estudio se puso a prueba la hipótesis de que la estimulación cerebral profunda podría ejercer sus efectos benéficos mediante la inhibición funcional del sitio blanco. Esto se intentó probar mediante la implementación de un modelo de parkinsonismo y la inhibición del núcleo entopeduncular (análogo al globo pálido interno en humanos y un sitio donde se suele implantar el electrodo para la estimulación cerebral profunda) a través de dos aproximaciones experimentales. Se realizó la evaluación de las manipulaciones en la conducta motora espontánea de los animales y mediante el efecto que éstas tenían sobre un marcador electrofisiológico de la enfermedad. Por último, se exploró cómo la actividad del núcleo entopeduncular podría participar durante la conducta de giro de los animales no lesionados.

Generar una inhibición moderada del núcleo entopeduncular mejora la función motora del animal parkinsoniano

Para cumplir con los objetivos propuestos, se implementó un modelo de ratón hemiparkinsoniano cuyas características conductuales de giro ipsilateral a la lesión y bradicinesia corresponden a lo ya reportado (Boix et al., 2015). Para evaluar al modelo y la repercusión conductual de las manipulaciones, se generó un sistema de seguimiento por video que permite evaluar la velocidad de desplazamiento y la velocidad angular del animal.

La inhibición del núcleo entopeduncular se logró a partir de dos aproximaciones experimentales con técnicas de optogenética. La primera se refería a la activación de fibras gabaérgicas aferentes al núcleo, de manera que se generara una inhibición del mismo. Mientras que esta manipulación tiene la ventaja de usar conexiones sinápticas que están presentes en el humano, por su anatomía también puede causar efectos en sitios distantes y no solamente de manera local (**Figura 15**). Se ha discutido que los efectos de la estimulación cerebral profunda pueden deberse no sólo al efecto local, sino a la propagación del efecto hacia otros sitios cerebrales (Lee et al., 2019; Li et al., 2012; J. A. Obeso et al., 2017). Esta manipulación, por ende, podría imitar este efecto de propagación puesto que la vía directa que fue manipulada, también tiene colaterales en el globo pálido externo y la sustancia nigra, además de colaterales locales dentro del estriado (Wu et al., 2000). Cabe mencionar que, a pesar de generar efectos más distribuidos, no son del todo similares a los que se podrían generar en el humano, porque con la estimulación eléctrica no se pueden seleccionar aferentes de la vía directa exclusivamente. El globo pálido interno también recibe aferencias importantes desde el globo pálido externo, la sustancia nigra, el núcleo subtalámico, entre otros (Jose A. Obeso, Rodriguez-Oroz, Stamelou, Bhatia, & Burn, 2014; Stephenson-Jones et al., 2016).

Para aislar los efectos debidos a la inhibición exclusiva del núcleo entopeduncular, se planteó la aproximación de usar una opsina inhibitoria (Arch3.0) localmente para poder generar una inhibición somática del núcleo de manera específica. Se realizaron corroboraciones electrofisiológicas de las manipulaciones y se comprobó que los protocolos de iluminación con la opsina inhibitoria, en efecto lograban disminuir la frecuencia de disparo de las unidades (**Figura 17**).

Con las dos aproximaciones experimentales de inhibición del núcleo entopeduncular se demostró que esta manipulación tiene efectos directos y graduales sobre los parámetros de velocidad angular y velocidad de desplazamiento de los ratones. Mediante los dos tipos de inhibición se logró incidir en la conducta de giro de los animales (**Figuras 13, 14, 18, 19**). Los animales hemilesionados presentan bradicinesia y cuando realizan movimientos, éstos tienden a ser giros ipsilaterales a la lesión. Con protocolos que generan una inhibición moderada (la activación de fibras gabaérgicas aferentes a 5-10Hz o la inhibición directa mediante Arch3.0 con una intensidad luminosa de 10-25mW) es posible incrementar la velocidad de desplazamiento y revertir esta conducta de giro llevándola a un promedio de 0. Por otra parte, ante protocolos que generan mayor inhibición del núcleo entopeduncular, los animales generan un giro pronunciado contralateral al hemisferio de manipulación. Los protocolos de inhibición pueden generar un aumento en la velocidad de desplazamiento, disminuyendo así la bradicinesia. Con estos datos, es posible generar una idea de que una inhibición leve del núcleo entopeduncular puede mejorar los parámetros motores ya descritos en roedores. Por último, cabe recalcar que a partir de las mediciones conductuales que se realizaron, no existió una gran diferencia entre la inhibición somática del núcleo o a través de fibras gabaérgicas aferentes (que además tienen colaterales en otros núcleos, **Figura 15**). Es posible que mediciones más finas de la conducta del ratón puedan revelar estas diferencias.

La mejora de la actividad motora del animal parkinsoniano concuerda con la fisiopatología propuesta de la enfermedad de Parkinson

Puesto que entre las hipótesis sobre la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson se postula un incremento anómalo de la actividad del globo pálido interno (**Figura 7**), tiene cabida la idea de generar una mejora en la conducta motora mediante la inhibición del mismo.

Para describir cómo el decremento de dopamina estriatal podría influir sobre la actividad del núcleo GPi, es necesario entender los efectos de dopamina en el estriado. Evidencia *in vitro* propone que ante la ausencia de dopamina las neuronas de la vía directa (con receptor D1, acoplado a proteína Gs por ende excitatorio) disminuirían su actividad (Hernández-López et al., 1997). Por otra parte, las neuronas de la vía indirecta (con receptor D2, acoplado a proteína Gi por ende inhibitorio) tendrían un aumento en la excitabilidad de su membrana ante la disminución de dopamina (Gerfen CR et al., 1990; Hernández-López et al., 2000). Cuando se ha analizado esta hipótesis *in vivo*, se encuentra que tras la lesión con 6-OHDA la actividad de las neuronas de la vía directa e indirecta (medida como

eventos de calcio por segundo) sí siguen la hipótesis postulada para el animal en reposo: la vía directa se encuentra deprimida mientras que la vía indirecta se encuentra hiperactiva (Parker et al., 2018). Debido a la anatomía estriatal, estas alteraciones en la actividad de las vías sugerirían un aumento en la actividad del núcleo GPi.

Registros de la actividad del núcleo Globo Pálido interno en pacientes con enfermedad de Parkinson y modelos animales de parkinsonismo han encontrado alteraciones en la frecuencia y el patrón de disparo de las neuronas del mismo. El uso de modelos animales es importante puesto que se pueden registrar regiones de cerebro en condiciones control y posteriormente lesionar al animal para evaluar los efectos de la misma. De esta manera, se ha encontrado que la destrucción de las neuronas dopaminérgicas induce un aumento de la frecuencia de disparo en el GPi comparado con control, en primates (Filion & Tremblay, 1991) y en roedores (Ruskin, Bergstrom, & Walters, 2002). Por otro lado, cuando se registra el núcleo GPi en pacientes con enfermedad de Parkinson, se encuentra que la tasa de disparo de estas neuronas es similar a la hallada en primates lesionados (Hutchison et al., 1994). También se corroboró que la administración de apomorfina (agonista dopaminérgico) a pacientes con enfermedad de Parkinson la tasa de disparo promedio de las neuronas del GPi disminuye (Merello, Lees, Balej, Cammarota, & Leiguarda, 1999). Sin embargo, se ha corroborado que la tasa de disparo no es la única característica alterada en la electrofisiología *in vivo* de pacientes o animales con disminución de dopamina cerebral. Se han descrito alteraciones como el incremento de los disparos en ráfaga y el incremento de la coherencia entre el disparo y el potencial local de campo, generando así patrones de disparo oscilatorios (Chan, Starr, & Turner, 2011). Estos patrones anómalos de característica oscilatoria parecen estar correlacionados con la fisiopatología de la enfermedad.

La inhibición del núcleo entopeduncular mediante la activación de fibras gabaérgicas aferentes tiene efectos de red

Como parte de las características electrofisiológicas descritas para la enfermedad de Parkinson se encuentran patrones oscilatorios y excesiva sincronía a través del sistema motor. Se ha señalado que existe un aumento del poder de beta en diferentes estructuras del sistema motor (Brown & Williams, 2005; López-Azcárate et al., 2010; Toledo et al., 2014). Por otro lado, esta oscilación muestra una sincronía excesiva entre núcleos de salida de los ganglios basales y la corteza motora. En registros simultáneos del núcleo subtalámico y la corteza motora, de pacientes con enfermedad de Parkinson, se encuentra aumentada la coherencia en fase y amplitud, sobre todo en el rango beta, en comparación con otros pacientes con enfermedad de distonía (De Hemptinne et al., 2013). Esto los llevó a postular la hipótesis de que los ganglios basales sanos funcionan como un filtro pasa bajas de la entrada cortical. Al encontrarse lesionados, esta función se ve afectada y se crea una reverberación de la entrada cortical y la salida de los ganglios basales, generando así un aumento entre la sincronía de estas estructuras.

Uno de los mecanismos propuestos de la estimulación cerebral profunda a alta frecuencia es un efecto de red que resulta en la atenuación de la sincronía excesiva presente en la enfermedad de Parkinson. Esto surge a partir de registros obtenidos en pacientes en donde el poder de beta disminuye tras la aplicación de la DBS (Wingeier et al., 2006). Por otra parte, en registros simultáneos de corteza motora y núcleo subtalámico, se ha corroborado que la DBS disminuye la coherencia entre estos dos núcleos (De Hemptinne et al., 2015). Por esto, en el presente estudio se decidió evaluar los efectos de red de las manipulaciones optogenéticas.

En el modelo de roedor hemiparkinsoniano se ha descrito un aumento parecido de la sincronía del sistema motor. Se ha evidenciado el aumento del poder de beta en estructuras como la sustancia nigra, el núcleo subtalámico y la corteza motora (Avila et al., 2010; Mallet et al., 2008). Además, la coherencia entre la corteza motora y la salida de los ganglios basales también se ha descrito (Claire Delaville et al., 2014; Sharott et al., 2005). Según estos estudios, se proponía que el aumento de velocidad en animales lesionados incrementa el poder de la banda beta, no así en animales control (Brazhnik et al., 2012). En este estudio, tras análisis exhaustivos con el fin de hallar el 'pico beta' descrito en literatura de registros humanos y replicado en roedores (ratas), no se pudo encontrar este marcador que se atribuye a la fisiopatología de esta lesión. Esto se pudo deber a que los estudios que reportaron este fenómeno en el roedor utilizaron una caminadora (treadmill) para registrar a los animales en época de movimiento. En este estudio simplemente se separaron los momentos de alta velocidad de los animales de los momentos de quietud mediante seguimiento por video. Es muy probable que los procesos involucrados en un treadmill sean diferentes, puesto que el animal debe mantenerse alerta, manteniendo el equilibrio y siguiendo la velocidad impuesta para no caer.

A pesar de no haber evidenciado el aumento de beta con características de pico, sí se evidenció un aumento del poder de beta (**Figura 22**). Curiosamente, uno de los protocolos que tuvo una mejoría más evidente sobre la velocidad angular promedio del animal (estimulación de la vía directa sobre el núcleo entopeduncular a 5Hz) fue el único que logró disminuir significativamente el poder de esta banda en los animales lesionados registrados (**Figura 23**). Por lo tanto, es interesante correlacionar que uno de los protocolos de estimulación que mayor mejoría tuvo sobre los parámetros motores medidos, fue el único que logró atenuar este patrón oscilatorio característico de la enfermedad de Parkinson.

Con todo, es claro que existen diversas correlaciones entre elementos encontrados en la enfermedad de Parkinson y su fisiopatología. Sin embargo, se vuelve evidente la necesidad de generar mayor conocimiento sobre cómo la deficiencia de dopamina podría causar los efectos ya descritos. Aún más, resulta curioso reconocer que, si bien no conocemos a la enfermedad del todo, tampoco existe una idea clara de cuál es la función del núcleo del sitio de acción (GPi) sobre la conducta. A pesar de que la bradicinesia y el giro ipsilateral a la lesión se han utilizado para estudiar el efecto terapéutico de muchas intervenciones, no se comprende cómo la deficiencia unilateral de dopamina podría generar este giro. Surgen dudas sobre si el animal no puede generar los movimientos que lleven a el giro contralateral a la lesión, o si el animal no tiene la voluntad de hacerlo. Por último,

también cabe la posibilidad de que el animal no pueda convertir en acción la voluntad de girar de manera contralateral a la lesión. Por lo mismo, en el presente estudio se diseñó una tarea conductual que generaba giros ipsi- y contralaterales al sitio de registro en el animal para entender de mejor manera la contribución del mismo a esta conducta.

La contribución que el núcleo entopeduncular tiene sobre la conducta de giro no se ha estudiado

Para generar mayor comprensión de qué actividad en el núcleo entopeduncular subyace a la conducta de giro, se generó una tarea conductual que permitió registrar a las neuronas de este núcleo durante giros ipsi y contralaterales. A partir de los experimentos de manipulación optogenética se puede generar una hipótesis de que el núcleo entopeduncular tiene relevancia en la conducta de giro del roedor. Un ratón con depleción dopaminérgica unilateral genera una conducta de giro ipsilateral a la lesión que puede ser consecuencia de la sobreactividad del núcleo, discutida previamente. Por otro lado, tras efectuar inhibición del mismo, el animal generó una conducta de giro contralateral al sitio de inhibición que fue gradual con respecto a la intensidad de la inhibición (**Figura 20**). Esto sugiere que la actividad del núcleo entopeduncular está ligada a la dirección y velocidad angular de la conducta de giro: a mayor actividad, mayor giro ipsilateral, mientras que a menor actividad mayor giro contralateral.

Tras entrenar a los ratones, éstos generaban una conducta de giro en espera de recibir agua. Los datos que se obtuvieron del experimento revelaron que no existe una relación tan estrecha de la actividad del núcleo con la dirección del giro que los animales realizaban. Interesantemente, sólo un 8% (**Figura 27C**) de las unidades registradas presentaron una actividad acorde a la hipótesis planteada; es decir, tuvieron una actividad más baja durante giros contralaterales en comparación con los giros ipsilaterales. Todavía más peculiar, una mayor proporción (14%, **Figura 27B**) presentan una actividad significativamente mayor en giros contralaterales, contrario a la hipótesis propuesta.

Si se considera ‘codificación motora’ como una buena correlación entre la actividad neural y algún parámetro del movimiento medido externamente, es posible afirmar que la mayoría de unidades registradas no responden al parámetro de ‘dirección izquierda-derecha de giro.’ Es decir, sólo un 8% de la población entopeduncular registrada refleja un decremento de actividad durante el giro contralateral esperado a partir de las inhibiciones optogenéticas. Resulta entonces contradictorio afirmar que el giro pronunciado contralateral que resulta tras inhibir al núcleo entopeduncular del roedor (**Figura 18C**) se debe a un cambio meramente motor.

Estudios previos de la conducta de giro también reportan una paradoja entre los experimentos de lectura y los de manipulación ((Tecuapetla, Matias, Dugue, Mainen, & Costa, 2014), **Figura 28**). Se han encontrado efectos intuitivos, opuestos y simétricos, en la manipulación de la vía directa unilateral: la sobreactivación por medio de optogenética genera giros contralaterales al hemisferio estimulado

mientras que una inhibición de la actividad de las mismas genera giros ipsilaterales. Esto concuerda muy bien con los experimentos de lectura: la vía directa incrementa su actividad ante giros ipsilaterales y la disminuye ante giros contralaterales. No obstante, lo hallado en la vía indirecta no es tan simple: la actividad poblacional incrementa ante el giro ipsilateral, que concuerda con la inducción de giros ipsilaterales tras su activación optogenética; sin embargo, la inhibición de la misma también provoca giros ipsilaterales. Estos efectos dispares podrían deberse a la sincronía que imponen las manipulaciones optogenéticas.

Sería esperable encontrar reflejado en la actividad del núcleo entopeduncular los hallazgos mencionados arriba, pues tienen una conexión sináptica directa. Así, resultaría lógico que un giro ipsilateral, asociado a un incremento de la actividad poblacional de la vía directa generara una inhibición generalizada del núcleo (post-sináptico) entopeduncular. Esto no se halló. Una posibilidad que podría explicar esta paradoja es que los experimentos mencionados en la **Figura 28** fueron hechos en un campo abierto, midiendo la conducta espontánea del animal. Los registros del núcleo entopeduncular presentados en este escrito se hicieron en una tarea dirigida a objetivos. El cambio de contexto podría cambiar la manera en la que la estructura funciona. Esto se ha reportado previamente, cuando ante el cambio de estrategia que el animal emplea para hacer un mismo movimiento, la correlación entre parámetros cinemáticos y la actividad neural desaparece (**Figura 6A**, (Turner & Anderson, 2005)).

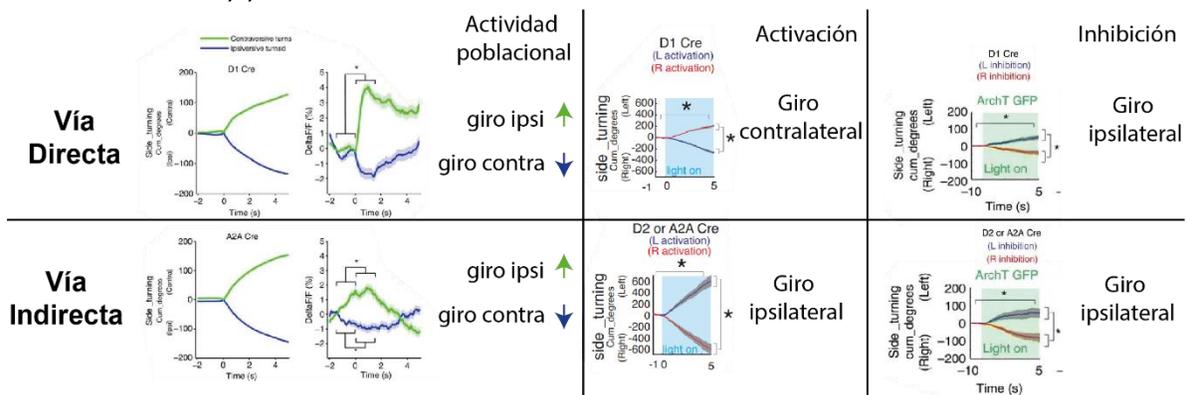


Figura 28. La actividad de las poblaciones de la vía directa e indirecta del estriado parecen estar relacionadas con la conducta de giro del animal. Existe una discordancia entre los datos generados a partir de experimentos de lectura y aquellos de manipulación. La actividad poblacional (medida con reporteros de calcio y fometría) tanto de la vía directa como de la vía indirecta, aumenta ante los giros ipsilaterales del animal y disminuye ante los giros contralaterales. Si se genera activación unilateral artificial mediante optogenética, los animales generan un giro ipsilateral ante la activación de la vía directa y contralateral ante la activación de la vía indirecta. Estos efectos son opuestos cuando se genera la inhibición unilateral mediante optogenética de las vías. [Adaptado de (Tecuapetla et al., 2014)]

Por otro lado, se han propuesto otras funciones al núcleo entopeduncular, más allá de la mirada clásica de 'núcleo motor.' Se le ha atribuido la función de evaluación de acciones, pues la actividad de las neuronas entopeduncular-habénula reflejan la evaluación de eventos recompensantes (**Figura 6B y C**, (Hong & Hikosaka, 2008; Stephenson-Jones et al., 2016)). Los datos de ambos estudios mencionados concluyen que las neuronas de esta vía codifican eventos

recompensados con un decremento de la actividad y los aversivos/no recompensados con un aumento de la misma. Estos datos fueron obtenidos en tareas de condicionamiento clásico en cabeza fija. Si bien este tipo de tareas son muy efectivas para aislar variables, no reflejan de manera fácilmente extrapolable la contribución que éstas podrían tener en la conducta natural del animal. Por ejemplo, es posible que estas señales relacionadas a la recompensa puedan tener un componente espacial en la tarea que se presenta en este escrito. Es decir, podrían codificar diferencialmente la recompensa que se obtendría de una acción a la izquierda o a la derecha. Si bien en este estudio no se encontraron unidades que respondieran con un decremento de la actividad ante el tono que predecía recompensa, como se describe en la literatura mencionada, sí hubo unidades que tuvieron respuesta de aumento de actividad ante el tono (**Figura Suplementaria 1, panel I**). Esta unidad a la que se hace referencia tiene un aumento de la actividad poco tiempo después del sonido del tono que indica recompensa en el puerto derecho o izquierdo. Además, esta respuesta es significativamente diferente (asteriscos verdes) entre los dos tonos (y solamente en la respuesta al tono). Esto sugiere que, si esta señal es de predicción de recompensa, no es lo mismo recibir la recompensa de un lado que del otro. Así, el incremento generalizado de la actividad del núcleo GPi en pacientes y en modelos de la enfermedad de Parkinson (descrito arriba) también podría desregular esta actividad asimétrica de recompensa.

Otra manera para conciliar la discordancia entre los datos de giro ante inhibición optogenética es imaginar que la función del núcleo entopeduncular es codificar una variable más compleja y/o abstracta. Por ejemplo, se ha propuesto que el estriado puede codificar el rendimiento esperado de la ejecución de una acción y el vigor con el que se realiza la misma (Wang, Miura, & Uchida, 2013). Así, se podría explicar que una salida del estriado, el núcleo entopeduncular, codifique (inversamente, debido a la conexión gabaérgica) algo similar. Por lo mismo, se podría especular que la inhibición del mismo aumenta la velocidad de desplazamiento porque asemeja un incremento en el 'vigor. Otro grupo de investigación postula que la función del estriado está relacionada con una variable que nombran *speed-accuracy trade-off* (el compromiso entre velocidad y exactitud) (Thura & Cisek, 2017). Esta idea implica al núcleo GPi no con la decisión de la acción tomada, sino con la urgencia con la que el animal realiza la acción. Aún más, este estudio señala que existe cierta direccionalidad en la respuesta de 'urgencia' de la unidad.

Si bien se han explorado variadas ideas que se han usado para explicar la función del núcleo GPi/entopeduncular, en este estudio no se ha logrado discernir entre las mismas. Se ha corroborado que la mayor proporción de las unidades registradas no presentan una actividad que esté acorde con las manipulaciones optogenéticas en cuanto a la codificación de la dirección de giro. Las respuestas neurales de las unidades registradas en el núcleo entopeduncular es variada y compleja (**Figura Suplementaria 1**). Así, los experimentos de manipulación optogenética no pueden usarse para explicar por completo la función de este núcleo, pues durante las conductas de giro las unidades no responden según la hipótesis derivada de las manipulaciones.

Es necesario estudiar con mayor detenimiento la actividad de este núcleo en animales lesionados y compararla con los animales controles. Por otro lado, es posible que la lesión afecte de manera dispar a las diferentes poblaciones del núcleo entopeduncular (Wallace et al., 2017). También podría ser cierto que algunas de estas poblaciones (aquellas que proyectan al tálamo motor) tengan más relevancia para la conducta de giro. Por ende, sería interesante disgregar qué contribución tiene esta subpoblación (núcleo entopeduncular- tálamo) durante el giro, y si ésta población fue la que cumplió la hipótesis planteada. Estudiar qué función realiza este núcleo durante la conducta de giro en animales controles y lesionados podría dar lugar a un mejor entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.

Conclusiones

La inhibición moderada del núcleo entopeduncular de manera unilateral ipsilateral al hemisferio de lesión en un modelo roedor hemiparkinsoniano mejora los parámetros motores de giro ipsilateral a la lesión y bradicinesia, lo que favorece el modelo de inhibición del sitio blanco como mecanismo de acción del DBS.

A diferencia de estudios anteriores, el incremento en la banda beta solo se observó en ensayos de movimiento rápido. Dicho incremento disminuyó con la estimulación optogenética de las fibras vía directa sobre el núcleo entopeduncular (5Hz).

La actividad del núcleo entopeduncular en animales no lesionados durante la conducta de giro no refleja del todo los datos extraídos de las manipulaciones optogenéticas. Un estudio detallado de la actividad de este núcleo es necesario para entender la contribución de este a los fenómenos motores observados en animales lesionados.

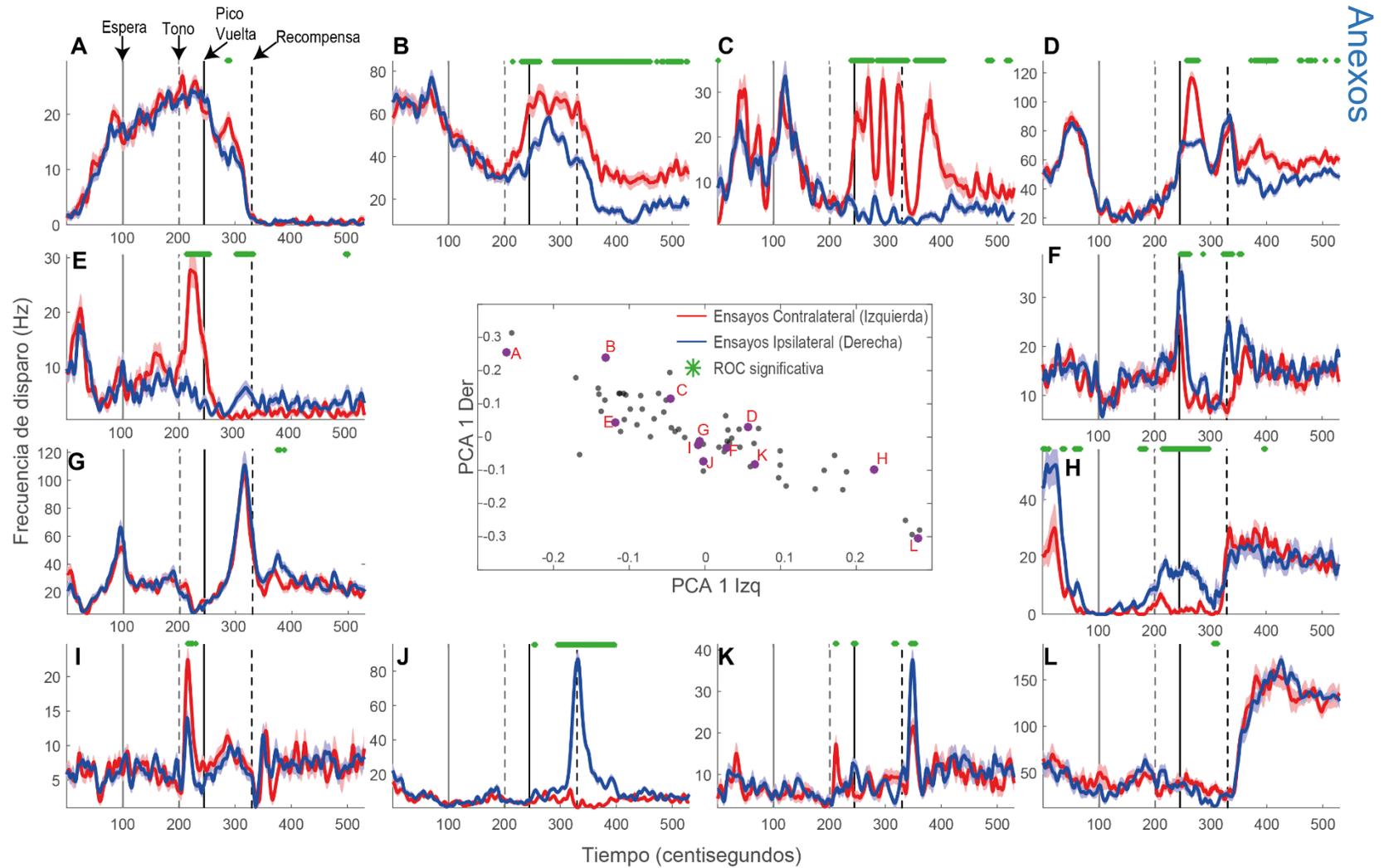


Figura Suplementaria 1. Las respuestas neurales ante la conducta son muy diversas. Centro. Se muestra el primer componente principal de las respuestas neurales a la derecha y a la izquierda. Los puntos A-L son ejemplos de las respuestas neurales, que se presentan en la periferia. Se muestran con diferentes estilos de raya los eventos de la tarea conductual: continua gris, espera; punteada gris, tono; continua negra, pico vuelta; punteada negra, recompensa.

Literatura citada

- Alhourani, A., McDowell, M. M., Randazzo, M. J., Wozny, T. A., Kondylis, E. D., Lipski, W. J., ... Richardson, R. M. (2015). Network effects of deep brain stimulation. *Journal of Neurophysiology*, *114*(4), 2105–2117. <https://doi.org/10.1152/jn.00275.2015>
- Ammari, R., Bioulac, B., Garcia, L., & Hammond, C. (2011). The subthalamic nucleus becomes a generator of bursts in the dopamine-depleted state. Its high frequency stimulation dramatically weakens transmission to the globus pallidus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *5*(JUNE 2011), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00043>
- Anderson, M. E., & Turner, R. S. (1991). Activity of neurons in cerebellar-receiving and pallidal-receiving areas of the thalamus of the behaving monkey. *Journal of Neurophysiology*, *66*(3), 879–893. <https://doi.org/10.1152/jn.1991.66.3.879>
- Avila, I., Parr-Brownlie, L. C., Brazhnik, E., Castañeda, E., Bergstrom, D. A., & Walters, J. R. (2010). Beta frequency synchronization in basal ganglia output during rest and walk in a hemiparkinsonian rat. *Experimental Neurology*, *221*(2), 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.11.016>
- Benabid, A., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S., & de Rougemont, J. (1987). Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol.*, *50*(1–6), 344–346. Retrieved from https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007125000097142/type/journal_article
- Bergman, H., Wichmann, T., & DeLong, M. R. (1990). Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*, *249*(4975), 1436–1438. <https://doi.org/10.1126/science.2402638>
- Berndt, A., Schoenenberger, P., Mattis, J., Tye, K. M., Deisseroth, K., Hegemann, P., & Oertner, T. G. (2011). High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(18), 7595–7600. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017210108>
- Beurrier, C., Bioulac, B., Audin, J., & Hammond, C. (2001a). High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *Journal of Neurophysiology*, *85*(4), 1351–1356.
- Beurrier, C., Bioulac, B., Audin, J., & Hammond, C. (2001b). High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *Journal of Neurophysiology*, *85*(4), 1351–1356.
- Boix, J., Padel, T., & Paul, G. (2015). A partial lesion model of Parkinson's disease in mice - Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behavioural Brain Research*, *284*, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.053>
- Bokil, H., Andrews, P., Kulkarni, J. E., Mehta, S., & Mitra, P. P. (2010). Chronux: A platform for analyzing neural signals. *Journal of Neuroscience Methods*, *192*(1), 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.06.020>
- Boraud, T., Bezard, E., Bioulac, B., & Gross, C. (1996). High frequency stimulation of the internal Globus Pallidus (GPi) simultaneously improves parkinsonian symptoms and reduces the firing frequency of GPi neurons in the MPTP-treated monkey. *Neuroscience Letters*, *215*(1), 17–20. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)12943-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)12943-8)
- Braak, H., Bohl, J. R., Müller, C. M., Rüb, U., de Vos, R. A. I., & Del Tredici, K. (2006). Stanley Fahn lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Movement Disorders*, *21*(12), 2042–2051. <https://doi.org/10.1002/mds.21065>
- Brazhnik, E., Cruz, A. V., Avila, I., Wahba, M. I., Novikov, N., Ilieva, N. M., ... Walters, J. R. (2012). State-Dependent Spike and Local Field Synchronization between Motor Cortex and Substantia Nigra in Hemiparkinsonian Rats. *Journal of Neuroscience*, *32*(23), 7869–7880. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0943-12.2012>
- Brazhnik, E., McCoy, A. J., Novikov, N., Hatch, C. E., & Walters, J. R. (2016). Ventral Medial Thalamic Nucleus Promotes Synchronization of Increased High Beta Oscillatory Activity in the Basal Ganglia-Thalamocortical Network of the Hemiparkinsonian Rat. *Journal of Neuroscience*, *36*(15), 4196–4208. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3582-15.2016>

- Brown, P., & Williams, D. (2005). Basal ganglia local field potential activity: Character and functional significance in the human. *Clinical Neurophysiology*, 116(11), 2510–2519. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2005.05.009>
- Bucher, D., & Goillard, J. M. (2011). Beyond faithful conduction: Short-term dynamics, neuromodulation, and long-term regulation of spike propagation in the axon. *Progress in Neurobiology*, 94(4), 307–346. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.06.001>
- Chan, V., Starr, P. A., & Turner, R. S. (2011). Bursts and oscillations as independent properties of neural activity in the parkinsonian globus pallidus internus. *Neurobiology of Disease*, 41(1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.08.012>
- Chiken, S., & Nambu, A. (2014). Disrupting neuronal transmission: Mechanism of DBS? *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00033>
- Chiken, S., & Nambu, A. (2016). Mechanism of Deep Brain Stimulation: Inhibition, Excitation, or Disruption? *Neuroscientist*, 22(3), 313–322. <https://doi.org/10.1177/1073858415581986>
- CR, G., TM, E., LC, M., Susel, Z., TN, C., & Jr., M. F. J. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250(1986), 1429–1432. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1126/science.2147780>
- De Hemptinne, C., Ryapolova-Webb, E. S., Air, E. L., Garcia, P. A., Miller, K. J., Ojemann, J. G., ... Starr, P. A. (2013). Exaggerated phase-amplitude coupling in the primary motor cortex in Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4780–4785. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214546110>
- De Hemptinne, C., Swann, N. C., Ostrem, J. L., Ryapolova-Webb, E. S., San Luciano, M., Galifianakis, N. B., & Starr, P. A. (2015). Therapeutic deep brain stimulation reduces cortical phase-amplitude coupling in Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 18(5), 779–786. <https://doi.org/10.1038/nn.3997>
- Deffains, M., Iskhakova, L., Katabi, S., Haber, S. N., Israel, Z., & Bergman, H. (2016). Subthalamic, not striatal, activity correlates with basal ganglia downstream activity in normal and parkinsonian monkeys. *eLife*, 5(AUGUST), 1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.16443>
- Dejean, C., Hyland, B., & Arbuthnott, G. (2009). Cortical effects of subthalamic stimulation correlate with behavioral recovery from dopamine antagonist induced akinesia. *Cerebral Cortex*, 19(5), 1055–1063. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn149>
- Delaville, C., McCoy, A. J., Gerber, C. M., Cruz, A. V., & Walters, J. R. (2015). Subthalamic Nucleus Activity in the Awake Hemiparkinsonian Rat: Relationships with Motor and Cognitive Networks. *Journal of Neuroscience*, 35(17), 6918–6930. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0587-15.2015>
- Delaville, Claire, Cruz, A. V., McCoy, A. J., Brazhnik, E., Avila, I., Novikov, N., & Walters, J. R. (2014). Oscillatory activity in basal ganglia and motor cortex in an awake behaving rodent model of Parkinson's disease. *Basal Ganglia*, 3(4), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.baga.2013.12.001>
- Do, M. T. H., & Bean, B. P. (2003). Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: Modulation by slow inactivation. *Neuron*, 39(1), 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00360-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00360-X)
- Ehringer, H., & Hornykiewicz, O. (1998). Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Parkinsonism and Related Disorders*, 4(2), 53–57. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(98\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(98)00012-1)
- Eidelberg, D., Moeller, J. R., Dhawan, V., Sidtis, J. J., Ginos, J. Z., Strother, S. C., ... Rottenberg, D. A. (1990). The metabolic anatomy of Parkinson's disease: Complementary [18F]fluorodeoxyglucose and [18F]fluorodopa positron emission tomographic studies. *Movement Disorders*, 5(3), 203–213. <https://doi.org/10.1002/mds.870050304>
- Ericsson, J., Stephenson-Jones, M., Pérez-Fernández, J., Robertson, B., Silberberg, G., & Grillner, S. (2013). Dopamine differentially modulates the excitability of striatal neurons of the direct and indirect pathways in lamprey. *Journal of Neuroscience*, 33(18), 8045–8054. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5881-12.2013>
- Filion, M., & Tremblay, L. (1991). Abnormal spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain Research*, 547(1), 140–144. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90585-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90585-J)

- Follett, K. A., Weaver, F. M., Stern, M., Hur, K., Harris, C. L., Luo, P., ... Reda, D. J. (2010). Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, *362*(22), 2077–2091. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907083>
- Frucht, S., & Greene, P. E. (2002). An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): Treatment guidelines (multiple letters) [1]. In *Neurology* (Vol. 58). <https://doi.org/10.1212/WNL.58.1.156>
- Gardner, J. (2013). A history of deep brain stimulation: Technological innovation and the role of clinical assessment tools. *Social Studies of Science*, *43*(5), 707–728. <https://doi.org/10.1177/0306312713483678>
- Gelb, D. J., Oliver, E., & Gilman, S. (1999). Diagnostic Criteria for Parkinson Disease. *Archives of Neurology*, *56*(1), 33. <https://doi.org/10.1001/archneur.56.1.33>
- Gerfen, C. R., Paletzki, R., & Heintz, N. (2013). GENSAT BAC cre-recombinase driver lines to study the functional organization of cerebral cortical and basal ganglia circuits. *Neuron*, *80*(6), 1368–1383. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.016>
- Greffard, S., Verny, M., Bonnet, A. M., Beinis, J. Y., Gallinari, C., Meaume, S., ... Duyckaerts, C. (2006). Motor score of the unified Parkinson disease rating scale as a good predictor of lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. *Archives of Neurology*, *63*(4), 584–588. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.4.584>
- Hariz, M. I., Blomstedt, P., & Zrinzo, L. (2010). Deep brain stimulation between 1947 and 1987: The untold story. *Neurosurgical Focus*, *29*(2), 1–10. <https://doi.org/10.3171/2010.4.FOCUS10106>
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., & Surmeier, D. J. (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLCβ1-IP3-Calcineurin-signaling cascade. *Journal of Neuroscience*, *20*(24), 8987–8995.
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología (English Edition)*, *32*(8), 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.06.019>
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., & Galarraga, E. (1997). Receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *Journal of Neuroscience*, *17*(9), 3334–3342.
- Hong, S., & Hikosaka, O. (2008). The Globus Pallidus Sends Reward-Related Signals to the Lateral Habenula. *Neuron*, *60*(4), 720–729. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.035>
- Hutchison, W. D., Lozano, A. M., Davis, K. D., Saint-Cyr, J. A., Lang, A. E., & Dostrovsky, J. O. (1994). Differential neuronal activity in segments of globus pallidus in parkinson's disease patients. *NeuroReport*, Vol. 5, pp. 1533–1537. <https://doi.org/10.1097/00001756-199407000-00031>
- Konieczny, J., Czarnecka, A., Lenda, T., Kamińska, K., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2017). The significance of rotational behavior and sensitivity of striatal dopamine receptors in hemiparkinsonian rats: A comparative study of lactacystin and 6-OHDA. *Neuroscience*, *340*, 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.070>
- Lee, D. J., Lozano, C. S., Dallapiazza, R. F., & Lozano, A. M. (2019). Current and future directions of deep brain stimulation for neurological and psychiatric disorders. *Journal of Neurosurgery*, *131*(2), 333–342. <https://doi.org/10.3171/2019.4.jns181761>
- Lees, A. J., Tolosa, E., & Olanow, C. W. (2015). Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr. *Movement Disorders*, *30*(1), 19–36. <https://doi.org/10.1002/mds.26120>
- Li, Q., Ke, Y., Chan, D. C. W., Qian, Z. M., Yung, K. K. L., Ko, H., ... Yung, W. H. (2012). Therapeutic Deep Brain Stimulation in Parkinsonian Rats Directly Influences Motor Cortex. *Neuron*, *76*(5), 1030–1041. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.032>
- Limousin, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Hoffmann, D., Le Bas, J.-F., Perret, J., ... Broussolle, E. (1995). Effect on parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *The Lancet*, *345*(8942), 91–95. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90062-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90062-4)
- Lopes, G., Bonacchi, N., Frazão, J., Neto, J. P., Atallah, B. V., Soares, S., ... Kampff, A. R. (2015). Bonsai: An event-based framework for processing and controlling data streams. *Frontiers in Neuroinformatics*, *9*(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fninf.2015.00007>
- López-Azcárate, J., Tainta, M., Rodríguez-Oroz, M. C., Valencia, M., González, R., Guridi, J., ...

- Alegre, M. (2010). Coupling between beta and high-frequency activity in the human subthalamic nucleus may be a pathophysiological mechanism in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, *30*(19), 6667–6677. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5459-09.2010>
- Lyons, M. K. (2011). Deep brain stimulation: Current and future clinical applications. *Mayo Clinic Proceedings*, *86*(7), 662–672. <https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0045>
- Mallet, N., Pogosyan, A., Sharott, A., Csicsvari, J., Bolam, J. P., Brown, P., & Magill, P. J. (2008). Disrupted Dopamine Transmission and the Emergence of Exaggerated Beta Oscillations in Subthalamic Nucleus and Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, *28*(18), 4795–4806. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0123-08.2008>
- McCairn, K. W., & Turner, R. S. (2009). Deep brain stimulation of the globus pallidus internus in the parkinsonian primate: Local entrainment and suppression of low-frequency oscillations. *Journal of Neurophysiology*, *101*(4), 1941–1960. <https://doi.org/10.1152/jn.91092.2008>
- Meissner, W., Leblois, A., Hansel, D., Bioulac, B., Gross, C. E., Benazzouz, A., & Boraud, T. (2005). Subthalamic high frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations. *Brain*, *128*(10), 2372–2382. <https://doi.org/10.1093/brain/awh616>
- Merello, M., Lees, A. J., Balej, J., Cammarota, A., & Leiguarda, R. (1999). GPi firing rate modification during beginning-of-dose motor deterioration following acute administration of apomorphine. *Movement Disorders*, *14*(3), 481–483. [https://doi.org/10.1002/1531-8257\(199905\)14:3<481::AID-MDS1015>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1531-8257(199905)14:3<481::AID-MDS1015>3.0.CO;2-H)
- Michel, P. P., Hirsch, E. C., & Hunot, S. (2016). Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*, *90*(4), 675–691. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.038>
- Miyasaki, J. M., Martin, W., Suchowersky, O., Weiner, W. J., & Lang, A. E. (2002). Practice parameter: Initiation of treatment for Parkinson's disease: An evidence-based review: Report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, *58*(1), 11–17. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.1.11>
- Moran, A., Stein, E., Tischler, H., Belevsky, K., & Bar-Gad, I. (2011). Dynamic stereotypic responses of basal ganglia neurons to subthalamic nucleus high-frequency stimulation in the parkinsonian primate. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *5*(APRIL 2011), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00021>
- Mugge, L., Krafcik, B., Pontasch, G., Alnemari, A., Neimat, J., & Gaudin, D. (2019). A Review of Biomarkers Use in Parkinson with Deep Brain Stimulation: A Successful Past Promising a Bright Future. *World Neurosurgery*, *123*, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.11.247>
- Nambu, A., Tachibana, Y., & Chiken, S. (2015). Cause of parkinsonian symptoms: Firing rate, firing pattern or dynamic activity changes? *Basal Ganglia*, *5*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.baga.2014.11.001>
- Neumann, W. J., Degen, K., Schneider, G. H., Brücke, C., Huebl, J., Brown, P., & Kühn, A. A. (2016). Subthalamic synchronized oscillatory activity correlates with motor impairment in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *31*(11), 1748–1751. <https://doi.org/10.1002/mds.26759>
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., ... Stoessel, A. J. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*, *32*(9), 1264–1310. <https://doi.org/10.1002/mds.27115>
- Obeso, Jose A., Rodriguez-Oroz, M. C., Stamelou, M., Bhatia, K. P., & Burn, D. J. (2014). The expanding universe of disorders of the basal ganglia. *The Lancet*, *384*(9942), 523–531. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62418-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62418-6)
- Oswal, A., Brown, P., & Litvak, V. (2013). Synchronized neural oscillations and the pathophysiology of Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, *26*(6), 662–670. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000034>
- Parker, J. G., Marshall, J. D., Ahanonu, B., Wu, Y. W., Kim, T. H., Grewe, B. F., ... Schnitzer, M. J. (2018). Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. In *Nature* (Vol. 557). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0090-6>
- Parkinson, J. (2002). An Essay on the Shaking Palsy (Originally published in 1817). *Journal of Neuropsychiatry*, *14*(2), 223–236. <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.14.2.223>
- Penfield, W. (1936). EPILEPSY AND SURGICAL THERAPY. *Archives of Neurology And Psychiatry*, *36*(3), 449. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1936.02260090002001>

- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., ... Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Pont-Sunyer, C., Hotter, A., Gaig, C., Seppi, K., Compta, Y., Katzenschlager, R., ... Tolosa, E. (2015). The onset of nonmotor symptoms in parkinson's disease (the onset pd study). *Movement Disorders*, 30(2), 229–237. <https://doi.org/10.1002/mds.26077>
- Rosenbaum, R., Zimnik, A., Zheng, F., Turner, R. S., Alzheimer, C., Doiron, B., & Rubin, J. E. (2014). Axonal and synaptic failure suppress the transfer of firing rate oscillations, synchrony and information during high frequency deep brain stimulation. *Neurobiology of Disease*, 62, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.09.006>
- Ruskin, D. N., Bergstrom, D. A., & Walters, J. R. (2002). Nigrostriatal lesion and dopamine agonists affect firing patterns of rodent entopeduncular nucleus neurons. *Journal of Neurophysiology*, 88(1), 487–496. <https://doi.org/10.1152/jn.00844.2001>
- Sharott, A., Magill, P. J., Harnack, D., Kupsch, A., Meissner, W., & Brown, P. (2005). Dopamine depletion increases the power and coherence of β -oscillations in the cerebral cortex and subthalamic nucleus of the awake rat. *European Journal of Neuroscience*, 21(5), 1413–1422. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03973.x>
- Stephenson-Jones, M., Yu, K., Ahrens, S., Tucciarone, J. M., Van Huijstee, A. N., Mejia, L. A., ... Li, B. (2016). A basal ganglia circuit for evaluating action outcomes. *Nature*, 539(7628), 289–293. <https://doi.org/10.1038/nature19845>
- Tecuapetla, F., Matias, S., Dugue, G. P., Mainen, Z. F., & Costa, R. M. (2014). Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nature Communications*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms5315>
- Thura, D., & Cisek, P. (2017). The Basal Ganglia Do Not Select Reach Targets but Control the Urgency of Commitment. *Neuron*, 95(5), 1160–1170.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.039>
- Toledo, J. B., López-Azcárate, J., Garcia-Garcia, D., Guridi, J., Valencia, M., Artieda, J., ... Rodriguez-Oroz, M. (2014). High beta activity in the subthalamic nucleus and freezing of gait in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 64, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.12.005>
- Turner, R. S., & Anderson, M. E. (2005). Context-dependent modulation of movement-related discharge in the primate globus pallidus. *Journal of Neuroscience*, 25(11), 2965–2976. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4036-04.2005>
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration of Central Monoamine Neurons. *European Journal of Pharmacology*, 5(1), 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7)
- Wallace, M. L., Saunders, A., Huang, K. W., Philson, A. C., Goldman, M., Macosko, E. Z., ... Sabatini, B. L. (2017). Genetically Distinct Parallel Pathways in the Entopeduncular Nucleus for Limbic and Sensorimotor Output of the Basal Ganglia. *Neuron*, 94(1), 138–152.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.017>
- Walter, B. L., & Vitek, J. L. (2004). *Review Surgical treatment for Parkinson 's disease*. 3(December), 719–728.
- Wang, A. Y., Miura, K., & Uchida, N. (2013). The dorsomedial striatum encodes net expected return, critical for energizing performance vigor. *Nature Neuroscience*, 16(5), 639–647. <https://doi.org/10.1038/nn.3377>
- Wingeier, B., Tcheng, T., Koop, M. M., Hill, B. C., Heit, G., & Bronte-Stewart, H. M. (2006). Intra-operative STN DBS attenuates the prominent beta rhythm in the STN in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 197(1), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.09.016>
- Wu, Y., Richard, S., & Parent, A. (2000). The organization of the striatal output system: A single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neuroscience Research*, 38(1), 49–62. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00140-1](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00140-1)