



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

ACCIONES DE AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS DE USO CLÍNICO SOBRE EL MICROCIRCUITO ESTRIATAL
PARKINSONIANO

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ESTHER LARA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR:

DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEGARAY
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. FEBRERO 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto se realizó en el departamento de Neurociencia Cognitiva del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. José Bargas Díaz, a quien agradezco mi formación científica y humana. Por el apoyo académico y técnico al Físico Antonio Laville Conde.

Por el apoyo técnico: al Biólogo Dagoberto Tapia Ramírez, a la Dra. Yazmín Ramiro Cortés y a la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM. Así como a la M.C. Ana María Escalante Gonzalbo y al Ing. Francisco Pérez Eugenio de la unidad de cómputo del IFC, UNAM.

Por el apoyo en el cuidado y manejo de animales a la M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo, al M.V.Z. Héctor Malagón Rivero, a la M.C. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez y a la Dra. Ariadna Aparicio Juárez.

Por la asesoría en mantenimiento y operación de los equipos de investigación del laboratorio, a los Ingenieros del Taller de Mantenimiento del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Galván Lobato y el Ing. Manuel Ortíz Benavides.

Por su tiempo, apoyo y correcciones a los miembros de mi comité tutor: Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray y Dr. Federico Bermúdez Rattoni. A los miembros del jurado: Dra. Martha Lilia Escobar, Dr. José Fernando Peña Ortega, al Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza y Dra. Mónica López Hidalgo.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM. Beca 218676 otorgada por CONACyT.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
Abstract	2
I. INTRODUCCIÓN	3
Enfermedad de Parkinson.....	5
Ensamblajes neuronales	11
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS	17
V. MÉTODOS	20
Modelo 6-OHDA en ratón	21
El ensayo funcional <i>in vitro</i>	23
Análisis de los datos	25
VI. RESULTADOS.....	29
VII. DISCUSIÓN	50
VIII. ANEXO.....	57
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	60

I. RESUMEN

La enfermedad de Parkinson, patología neurodegenerativa provocada por la pérdida de las terminales dopaminérgicas en los ganglios basales, de forma importante en el estriado. La L-DOPA, fármaco de elección para el tratamiento de esta enfermedad, alivia muchos signos motores. El uso prolongado de esta molécula precursora de dopamina causa discapacidades motoras además no actúa sobre condiciones comórbidas como la depresión. Esas deficiencias han llevado a la búsqueda de otros fármacos agonistas de los receptores dopaminérgicos, que puedan sustituir o disminuir la dosis de L-DOPA.

Previamente, usando la técnica de imagenología de calcio hemos podido seguir simultáneamente docenas de neuronas estriatales en rebanadas de cerebro, caracterizando la actividad neuronal espontánea y la activada por una entrada excitatoria en un microcircuito estriatal control y en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson. En condición control, sin estímulos o en reposo, el estriado muestra escasa actividad. Sin embargo, después de una estimulación cortical adecuada, la actividad neuronal del estriado estimulado o activo, revela secuencias de grupos neuronales con actividad correlacionada que se alternan dicha actividad formando en ocasiones ciclos cerrados o reverberaciones. En contraste, el microcircuito estriatal privado de dopamina, o modelo parkinsoniano, exhibe un alto grado de actividad espontánea pero la alternancia entre los ensambles neuronales está disminuida debido a la formación de un ensamble altamente recurrente que se apropia del circuito. De manera interesante, en el tejido privado de dopamina, un estímulo cortical alivia de manera temporal los signos parkinsonianos disolviendo el ensamble recurrente y restableciendo la secuencia normal. Este efecto terapéutico se mantiene si al estímulo cortical se le agrega L-DOPA. Con estos antecedentes comparamos la acción de algunos agonistas dopaminérgicos usados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, y los comparamos con el efecto terapéutico de la L-DOPA. Usamos como bioensayo la dinámica del microcircuito estriatal parkinsoniano sin estimular o después de ser estimulado desde la corteza.

Los agonistas de la clase D2 reducen mejor la actividad espontánea excesiva del microcircuito parkinsoniano, mejor que como lo hacen los agonistas que activan ambas clases de receptores dopaminérgicos, clase D1 y clase D2. Cuando activamos el microcircuito estriatal parkinsoniano con

un estímulo cortical en presencia de algún fármaco, todos los agonistas dopaminérgicos tienden a mantener la secuencia temporal de los ensambles neuronales observada en los controles activados. Sin embargo, el análisis cuantitativo sugiere diferencias en sus acciones. La acción de los diferentes fármacos no fue equivalente al efecto de L-DOPA que parece la droga con mejor desempeño. El completo restablecimiento de la dinámica del microcircuito estriatal parkinsoniano a las condiciones control no fue lograda por ningún tratamiento, incluyendo la L-DOPA.

El orden de eficacia de los diferentes agonistas fue: L-DOPA > agonistas D2 > agonistas D1,2.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative illness presenting motor and non-motor symptoms due to the loss of dopaminergic terminals in basal ganglia, most importantly, the striatum. L-DOPA relieves many motor signs. Unfortunately, in the long term, L-DOPA use causes motor disabilities by itself and does not act in comorbid conditions such as depression. These deficiencies have led to search for drugs such as dopamine (DA) receptor agonists (DA-agonists) that allow the reduction of L-DOPA dose. Previously, we have identified the attributes of non-stimulated (resting) and cortical stimulated (active) striatal microcircuits following the activity of dozens of neurons simultaneously using calcium imaging in brain slices. We also have characterized the changes that take place in DA-depleted microcircuits *in vitro*. In control conditions, there is *low* spontaneous activity. After cortical stimulation (CtxS) sequences and alternation of neuronal ensembles activity occur, including reverberations. In contrast, DA-deprived circuits exhibit *high* spontaneous activity at rest, and a highly recurrent ensemble curtails alternation. Interestingly, CtxS briefly relieves these Parkinsonian signs in DA-depleted tissue. Here we compare the actions of some DA-agonists used in PD therapeutics on the pathological dynamics of DA-depleted microcircuits at rest and with CtxS; taking L-DOPA as reference. D₂-class agonists better reduce the excessive spontaneous activity of DA-depleted microcircuits. All DA-agonists tend to maintain ensemble alternation seen in control circuits after CtxS. However, quantitative analyses suggest differences in their actions: in general, DA-agonists only approximate L-DOPA actions. Nonetheless no treatment, including L-DOPA, completely restores microcircuit dynamics to control conditions.

I. INTRODUCCIÓN

Un desafío en las neurociencias es integrar el funcionamiento del nivel celular con el nivel sistémico: no sabemos cómo unas pocas docenas de neuronas se organizan en un microcircuito o módulo a escala histológica y cómo esta organización nos permitiría avizorar cambios que permitan correlacionar signos patológicos a nivel sistémico. Este es el problema que nos hemos planteado. El funcionamiento de un tejido no es la suma de las acciones de sus células sino de las interacciones entre ellas. En un microcircuito cerebral las interacciones son sinápticas, directas o indirectas. Para estudiarlas debemos de ser capaces de observar muchas neuronas al mismo tiempo sin perder la resolución de célula única. La tecnología para hacer esto está en pleno desarrollo. En el laboratorio, hemos logrado registrar la actividad de muchas neuronas con resolución de célula única, en una preparación cerebral *in vitro*.

En este manuscrito nos referiremos al neostriado, el mayor núcleo de los ganglios basales, que se encarga del control motor y modula varias funciones cognitivas. La imagenología de calcio nos permite estudiar la dinámica del microcircuito estriatal en condición control y patológica (Pérez-Ortega et al., 2016). De hecho, hemos logrado describir la “huella fisiopatológica de la enfermedad de Parkinson”, la cual resultó ser muy descriptiva, casi metafórica, de los signos que presentan los sujetos enfermos (Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016). También hemos mostrado como el fármaco anti-Parkinsoniano estándar, la L-DOPA, restablece el comportamiento patológico del microcircuito estriatal al control (Plata et al., 2013a). En condición control el microcircuito estriatal tiene poca actividad espontánea. Ante un estímulo excitador adecuado o la presencia de bajas concentraciones de NMDA u otras drogas, el microcircuito se activa dejándonos observar su funcionamiento (Carrillo-Reid et al., 2008; Aparicio-Juárez et al., 2019). Este consiste en la activación de ensambles neuronales: grupos de neuronas que disparan juntas o de manera correlacionada. Estos ensambles alternan su actividad produciendo secuencias temporales y circuitos reverberantes (Carrillo-Reid et al., 2009) tal como predice la Teoría de los Ensambls Neuronales (Hebb, 1949; Buzsáki, 2010). Utilizando el modelo

murino de la enfermedad de Parkinson (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970), observamos un exceso de actividad aun sin estimular al tejido y una interrupción de la secuencia temporal de ensambles neuronales debido a la generación de un ensamble neuronal altamente recurrente que captura la mayor parte de las neuronas. Esto es, el microcircuito reverbera en un mismo ensamble interrumpiendo las secuencias temporales, por lo tanto, ya no hay alternancia entre ellos como sucedería en un microcircuito control, resultando en un paralelo de lo que sucede en los pacientes, que tienen dificultad para iniciar, cambiar o finalizar una actividad (Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016). Observando esto, decidimos probar las drogas anti-Parkinsonianas usadas en la terapéutica clínica en el mismo tejido. El resultado fue que el ensamble patológico se disolvió, regresando la alternancia entre los grupos de neuronas similar a las condiciones control. Todo lo cual permitirá en un futuro probar nuevas drogas con potencial terapéutico o diferentes combinaciones de las mismas.

Nuestro bio-ensayo cuantifica con gran precisión qué moléculas restauran el microcircuito estriatal “parkinsoniano” acercándolo a las condiciones control. Los resultados no son intuitivos porque los microcircuitos cerebrales están conformados por diferentes tipos de neuronas que expresan diferentes receptores dopaminérgicos. En el estriado, la mitad de las neuronas expresan el receptor D1 y la otra mitad el receptor D2. Además, existen interneuronas que pueden expresar receptores D1, D2 o ambos. Predecir qué ligando producirán el mejor efecto es difícil. Por lo que la ventaja de nuestro bioensayo funcional es que permite seguir la actividad neuronal de las distintas poblaciones neuronales y si utilizáramos animales genéticamente modificados que marcan neuronas específicas podríamos descifrar el mecanismo de acción de fármacos en una escala histológica.

Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden multisistémico neurodegenerativo que afecta a las personas principalmente en los últimos años de su vida, descrita por James Parkinson en 1817. Es el primer desorden motor y la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en el mundo, con incidencia y prevalencia en aumento según los cambios demográficos de la población (Pringsheim et al., 2014). La prevalencia incrementa cuando avanza la edad tanto en hombres como en mujeres (Sveinbjornsdottir, 2016). Los síntomas cardinales de la EP son el temblor, inestabilidad postural, rigidez y bradicinesia, pero pueden aparecer otros síntomas motores y no motores (Lees et al., 2009; Obeso et al., 2017). La pérdida de las neuronas de la sustancia *nigra pars compacta* y la acumulación de α -sinucleína mal plegadas llamadas cuerpos de Lewy son el sello característico de la EP (Balestrino & Schapira, 2020). Los síntomas motores correlacionan con la pérdida del 50-70% de las terminales dopaminérgicas en el estriado (Burke and O'Malley, 2013). Esta pérdida de dopamina causa alteraciones tanto en la vía indirecta como la directa de los ganglios basales (Kravitz et al., 2010; Gerfen and Surmeier, 2011; Calabresi et al., 2014; Parker et al., 2018; Jáidar et al., 2019).

La etiología de la enfermedad es probablemente multifactorial, solo del 5-10% tiene un origen genético y no existe tratamiento que detenga la progresión de la neurodegeneración. El tratamiento actual de la EP está basado en el remplazo de la dopamina con el objetivo de corregir las alteraciones motoras (Sveinbjornsdottir, 2016; Balestrino & Schapira, 2019). La levodopa (L-DOPA), un precursor de la dopamina es el estándar para el tratamiento de la EP (Carlsson et al., 1957; Foley, 2000; Mercuri and Bernardi, 2005; Lees et al., 2015; De Deurwaerdère et al., 2017). Al inicio del tratamiento la respuesta suele ser idónea, pero con la progresión de la enfermedad y la menor capacidad del sistema para liberar dopamina, la mayoría de los pacientes experimentan una menor duración de la respuesta a la misma dosis (*wearing-off*). Además de presentarse fluctuaciones de la actividad motora (*on-off*) y movimientos involuntarios de la cabeza, tronco o de las extremidades: las discinesias producidas por L-DOPA (Ahlskog & Muenter, 2001; Aquino & Fox, 2015; Sharma et al., 2015; Picconi et al., 2017). Varios medicamentos dopaminérgicos se usan para manejar estas fluctuaciones, como: inhibidores de

monoamino oxidasas, inhibidores de la catecol-amino-transferasa, antagonistas del receptor a glutamato tipo NMDA, así como anticolinérgicos y agonistas de los receptores dopaminérgicos. (Jankovic & Stacy 2007; Millan., 2010). Cuando la terapia farmacológica falla en controlar los síntomas motores se recurre a la estimulación cerebral profunda (Sironi, 2011).

Por lo tanto, ha habido una búsqueda de terapias adyuvantes, incluidos los agonistas de los receptores dopaminérgicos (agonistas DA) asociados con el uso de una menor dosis de L-DOPA y una menor incidencia de complicaciones motoras (Sprenger & Poewe, 2013; Jiménez-Shahed, 2016). Hay dos principales clases de agonistas dopaminérgicos: los agonistas menos selectivos porque activan ambas clases de receptores dopaminérgicos (D1, D2), como la rotigotina (Jenner & Katzenschlager, 2016; Chen et al., 2017); y los agonistas del receptor de la clase D2 como el pramipexole (Mizuno et al., 2014; Shen et al., 2017).

Un extenso conocimiento de la etiología, patogénesis y fisiopatología ha sido obtenido gracias a los modelos de la EP. Los modelos animales más comúnmente usados en estudios preclínicos pueden ser categorizados como neurotóxicos y genéticos.

Los modelos basados en neurotóxicos imitan la mayoría de las características patológicas y conductuales de la EP en humanos, por esta razón han resultado muy útiles para el desarrollo de nuevas terapias. Las neurotoxinas sintéticas más utilizadas para modelar la EP en animales son: 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), estas inducen la degeneración selectiva de las neuronas nigroestriales en roedores y primates (Morissette & Di Paolo, 2018). El modelo hemi-parkinsoniano en roedores generado por lesión unilateral con 6-OHDA en la SNc logra degenerar las fibras de la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) que inervan al estriado. Aunque este modelo no reproduce todos los signos y síntomas de la EP porque solo consiste en la privación de dopamina en los ganglios basales, es el modelo más utilizado debido a que la inyección de la toxina es más segura que otras, además los síntomas motores correlacionan con la EP y estos

pueden ser evaluados fácilmente de diversas maneras, como la conducta de giro por inyección de apomorfina o anfetamina (Ungerstedt, 1968; Jagmag et al., 2016; Dunnet and Lejos, 2010).

A pesar de la frecuencia y la facilidad para obtener el modelo hemi-parkinsoniano con 6-OHDA en rata existen algunas complicaciones del modelo en ratón. Los ratones son más vulnerables después de la cirugía estereotáxica para lesionar la SNc o el *medial forebrain bundle* o MFB. Pero un régimen postoperatorio intensivo mantiene altas tasas de supervivencia. Además, la conducta de giro y otras conductas motoras ya han sido estandarizadas para el modelo de lesión de 6-OHDA en ratón (Heuer et al., 2012). Tener un modelo de la enfermedad de Parkinson en esta especie, ha permitido estudiar poblaciones neuronales específicas a través del uso de ratones transgénicos. Con esta estrategia se ha investigado la función de las dos vías de los ganglios basales, identificando la actividad de las neuronas espinosas de proyección D1 o D2 (Parker et al., 2018; Jáidar et al., 2019). Por estas razones el modelo de lesión unilateral con 6-OHDA en roedor ha sido utilizado durante muchos años para estudiar la fisiopatología de los ganglios basales en la EP y para el desarrollo de nuevas terapias.

Microcircuito estriatal

Los ganglios basales son estructuras subcorticales interconectadas. Modelos de la fisiología de este conjunto de núcleos se basa tradicionalmente en las funciones sensoriomotoras, sin embargo, el funcionamiento de los ganglios basales se ha extendido a dominios no motores en las últimas décadas. Tienen un papel crítico en las funciones cognitivas como el lenguaje, atención y memoria (Gatev et al., 2006; Arsalidou et al., 2013). El estriado es el núcleo de entrada más prominente de los ganglios basales que recibe proyecciones topográficas glutamatérgicas de prácticamente todas las áreas corticales y del tálamo (Hintiryan et al., 2016). El microcircuito estriatal se había considerado solo una simple estructura de entrada convergente a núcleos profundos, pero ahora se ve como una compleja red eferente que procesa la información recibida utilizando una vasta colección de interneuronas de

varios tipos, para posteriormente enviar la información de salida a través de sus neuronas espinosas de proyección (Andres & Darbie, 2018).

El estriado está compuesto en su mayoría por neuronas GABAérgicas de proyección (95% en roedor), forman las únicas salidas de esta estructura a través de dos vías: la vía indirecta que inicia con las espinosas de proyección que expresan el receptor a dopamina tipo D2, y la vía directa cuyas neuronas expresan el receptor de la clase D1, ambas vías comandan la información de salida hacia el siguiente núcleo (Smith et al., 1998; Gerfen & Surmeier, 2011). Las neuronas restantes consisten en varias poblaciones de interneuronas que se han clasificado según sus propiedades electrofisiológicas, sus perfiles de expresión neuroquímicos y / o moleculares, así como su conectividad sináptica.

Existe una población de interneuronas colinérgicas, así como diversos grupos heterogéneos de interneuronas GABAérgicas que se han caracterizado gracias al desarrollo de modelos transgénicos de ratón. Los grupos de interneuronas GABAérgicas que se han encontrado son: las de disparo rápido que expresan parvalbúmina, las interneuronas que expresan calretinina, las que expresan neuropéptido Y/somatostatina/óxido nítrico, de bajo umbral de disparo (Kawaguchi et al., 1993; Tepper & Bolam, 2004), interneuronas que expresan tirosina hidroxilasa no dopaminérgicas (Ibañez-Sandoval et al., 2010; Xenias et al., 2015), las interneuronas neurogliformes que expresan neuropéptido Y con características morfológicas y electrofisiológicas distintas (Ibañez-Sandoval et al., 2011; English et al., 2011), y por último las interneuronas de adaptación rápida que expresan 5-HT3 (Faust et al., 2015; Muñoz-Manchado et al., 2016). La heterogénea población de neuronas del estriado tiene conexiones recíprocas que se han estado investigando para poder entender como el microcircuito intrínseco estriatal procesa la información que recibe de la corteza u otros núcleos (Figura A). Esto es esencial para comprender como la información que entra, afecta a las neuronas de proyección y a las estructuras río abajo en los ganglios basales (Assous y Tepper, 2019).

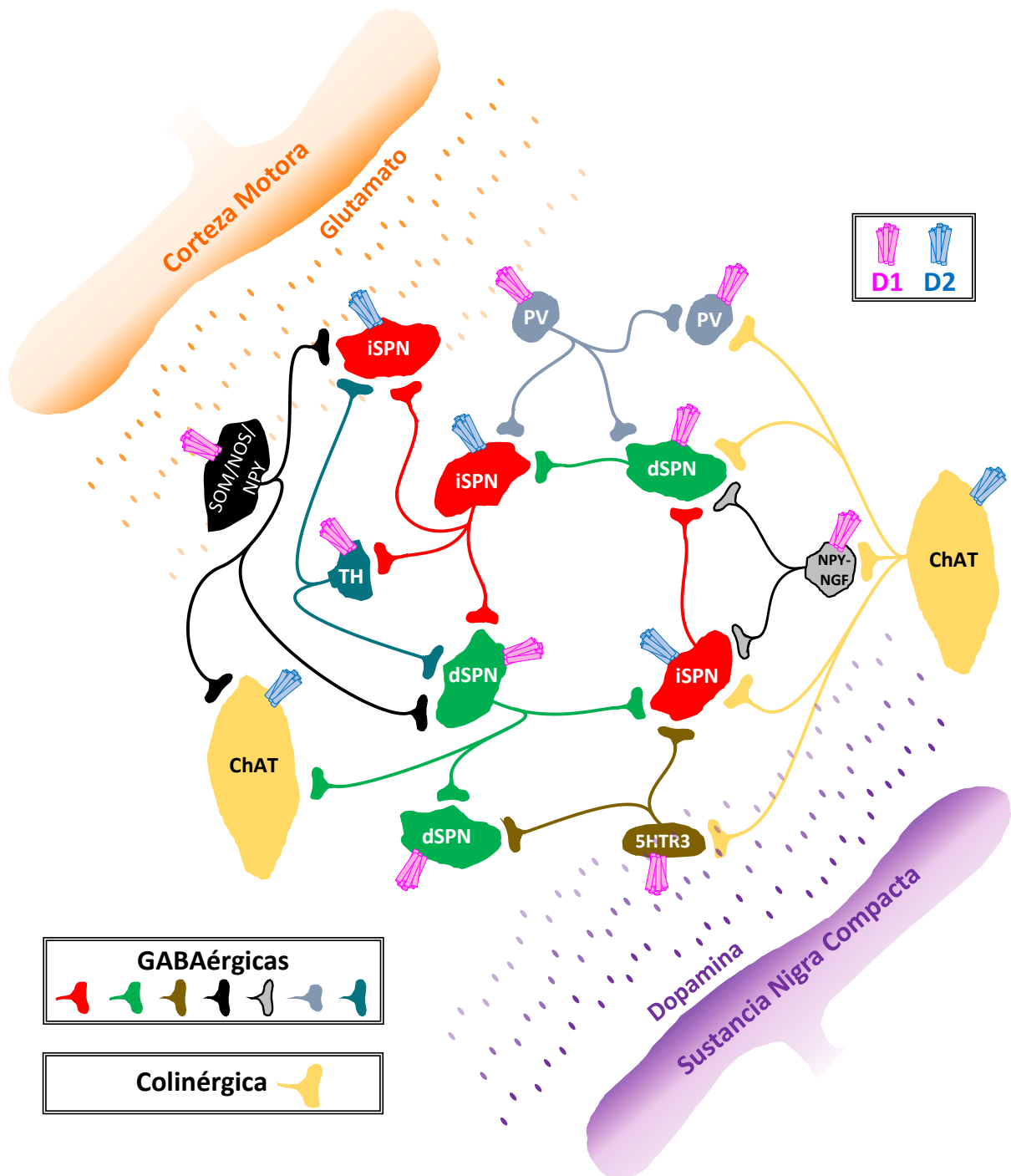


Figura A. Microcircuito estriatal, modificado de Burke et al., 2017. Distintas poblaciones neuronales que forman el circuito local del estriado. Neuronas espinosas de proyección de la vía directa (dSPN, por sus siglas en inglés) o las de la vía indirecta (iSPN), las interneuronas GABAérgicas (PV, 5HT3, NPY-NGF, SOM/NOS-NPY y TH) y las interneuronas colinérgicas (ChAT). Se indica familia de receptores dopaminérgicos que expresa cada tipo de neurona (D1-rosa, D2-azul). La dopamina proveniente principalmente de la SNC. El estriado es el principal núcleo de entrada a los ganglios basales, recibe aferentes excitatorias de la corteza cerebral.

Además, los ganglios basales reciben proyecciones catecolaminérgicas, serotoninérgicas y colinérgicas de regiones extra basales, que contribuyen a la modulación de las neuronas e interneuronas de estos núcleos (Andres & Darbie, 2018). En particular la dopamina está involucrada en la motivación, la toma de decisiones, el aprendizaje y la ejecución de acciones (Schultz, 2016). La liberación dinámica de este neuromodulador en escala de milisegundos es localmente regulada en la terminal dopaminérgica (Berke, 2018). En el estriado existe una expresión diferencial de los receptores dopaminérgicos: las neuronas de proyección de la vía directa de los ganglios basales expresan preferentemente el receptor de la clase D1, mientras que las neuronas de la vía indirecta expresan los receptores de la clase D2, aunque existe un porcentaje pequeño de colocalización (Surmeier et al., 1996; Gerfen & Surmeier, 2011). Las interneuronas colinérgicas expresan receptores D2, D5 y las interneuronas GABAérgicas expresan preferentemente receptores de la clase D1 (Yan et al., 1997; Centonze et al., 2003; Rendón-Ochoa et al., 2018).

La falta de dopamina en el estriado genera un desbalance en la fisiología del microcircuito, se ha reportado un aumento de la acetilcolina estriatal debido a la hiperactividad de las interneuronas colinérgicas (Raz et al., 1996; Tanimura et al., 2018), pérdida de espinas dendríticas en las neuronas espinosas de proyección (Calabresi y Di Filippo, 2015), disfunción de la plasticidad sináptica de largo (Picconi et al., 2012) y corto plazo (Barroso-Flores et al., 2015). Aunado a cambios severos de sensibilización de los receptores dopaminérgicos, aumentando la cantidad de receptores y de heterodímeros que se pueden formar con el receptor a adenosina A_{2A} (Criswell et al 1988; Gerfen et al., 2002; Gerfen, 2003) y otros. Estos cambios patológicos a nivel celular provocan un aumento en la actividad sináptica de las neuronas estriatales, caracterizada por periodos de sincronización anormal espontánea (Zold et al., 2009). Todas estas disfunciones revelan la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson en el estriado, y apoyan la importancia de investigar estos cambios producidos por la patología no sólo a nivel celular si no en mesoescala, los microcircuitos neuronales.

Ensamblajes neuronales

En 1933 Lorente de Nó, basándose en datos anatómicos, postuló a través de dos leyes de la conectividad neuronal que las redes neuronales son no lineales. La ley de la pluralidad que dice que cada núcleo en sucesión lineal recibe axones suplementarios de la célula previa, de una tercera neurona o de un grupo de neuronas. Y la ley de reciprocidad: la neurona que recibe un axón manda axones recurrentes a su afluente axonal directamente o mediado por una neurona adicional o un conjunto de neuronas. Estas son las bases necesarias para comprender las propiedades emergentes de los circuitos neuronales. Pero ¿Cómo se seleccionan las neuronas que están conectadas? A finales de los 70 se comprueba que existe la plasticidad sináptica de largo plazo postulada por D.O. Hebb a finales de los años 40 (*"The Organization of Behavior"*), que enuncia que las sinapsis que disparan juntas se refuerzan, las que no, se deprimen, y al final las conexiones que quedan son entre las neuronas que fueron seleccionadas por el proceso potenciación/depresión. A la potenciación se le llama "potenciación de largo plazo" (*LTP: long term potentiation*), y a la depresión: "depresión de largo plazo" (*LTD: long term depression*). Los cambios en los pesos sinápticos de la red neuronal hacen que ciertas trayectorias queden facilitadas y otras deprimidas, seleccionando rutas preferentes para el flujo de la actividad. Por lo tanto, Hebb propone que las sinapsis entre las neuronas que disparan sincrónicamente se potencian, formando ensamblajes neuronales y secuencias de fase o actividad (*phase sequenses*).

Un ensamble neuronal es definido como un grupo de neuronas con actividad cuasi-sincrónica o correlacionada que se accionan de manera transitoria, con activación secuencial alternante y recurrente, como si fuese un sistema de procesamiento cerrado capaz de representar percepciones y conductas (Hebb, 1949). Los circuitos que se forman mediante este proceso dejan "el trazo de memoria" en el tejido nervioso, que se activará siguiendo un ciclo cerrado de actividad cuando se presente el estímulo adecuado (Dehaene & Changeux, 2005; Costa et al., 2006).

Técnicas recientes han permitido el registro y manipulación de conjuntos neuronales específicos con alta precisión espacial (Packer et al., 2015). De esta manera, la activación recurrente de un determinado grupo de neuronas permitió la formación de nuevas redes en el cerebro, las cuales pudieron ser recuperadas por la estimulación de una sola célula que ya formaba parte del nuevo ensamble, esto demostró lo postulado por Hebb sobre los ensamblajes neuronales como unidades funcionales del cerebro para explicar los eventos sinápticos involucrados en la plasticidad neuronal, el aprendizaje y la memoria (Carrillo-Reid et al., 2016).

Es el disparo correlacionado de estos grupos de neuronas lo que viaja por la red, los ensamblajes son transitorios ya que alternan su actividad formando secuencias temporales: A-B-C...n. Las secuencias de los ensamblajes evolucionan tanto en el tiempo como en el espacio (Buzsáki, 2010). Durante las últimas décadas, las limitaciones fueron técnicas por la falta de métodos apropiados para registrar simultáneamente un número suficientemente grande de neuronas (Abeles, 1991; Strangman, 1996). Sin embargo, el progreso rápido en el registro a gran escala de neuronas individuales en múltiples regiones cerebrales y los intentos iniciales de rastrear y definir experimentalmente ensamblajes celulares putativos condujo a dificultades de una naturaleza conceptual. ¿Qué tan grande es un ensamble neuronal, cuál es su duración y qué representa exactamente en el dominio cognitivo? ¿Un ensamble neuronal representa una característica, una figura o fondo, un objeto o concepto, un proceso de pensamiento, un plan de acción inmediato o procesos aún más complejos? (Nicollelis, 1999; Buzsáki, 2004; Plenz & Thiagarajan, 2007; Buzsáki, 2010).

El término de ensamble neuronal carece de una definición estricta y universalmente aceptada, se ha utilizado para denotar desde la sincronización precisa (*zero-phase-lag*) de espigas en un subconjunto definido de neuronas hasta cambios temporales coherentes del promedio de las tasas de disparo en largas escalas de tiempo (Harris et al., 2003; Durstewitz et al., 2010). A menudo, el término implica una precisa coordinación de espigas dadas por una descarga de actividad neuronal en

milisegundos, que se repiten en intervalos regulares o irregulares, relacionados a perceptos específicos o eventos motores (Poo et al 2016; Klaus et al., 2017). En el hipocampo se han encontrado patrones de secuencias de disparos en intervalos específicos que corresponden a secuencias de lugares (Buzsáki & Draguhn, 2004). En la corteza visual posiblemente se generan secuencias de picos de sincronía a través de estructuras del tipo *synfire-chain-like* (Abeles, 1991; Köing et al., 1995; Diesmann et al., 1999), las neuronas pueden contribuir en varios picos de sincronía en cualquier orden del patrón espaciotemporal *in vitro* e *in vivo* (Ikegaya et al., 2004; Yuste et al., 2005). A una escala temporal más gruesa, las neuronas podrían activarse con un patrón temporal específico al que cada neurona puede contribuir con "ráfagas" de duración variable. Tales transiciones ordenadas entre los patrones de tasa de disparo coherentes a través del registro simultáneo de muchas neuronas han sido descritas en diferentes tareas cognitivas (p. ej. Beggs and Plenz, 2003; Jones et al., 2007; Shen et al., 2019). Por esta razón se han desarrollado diferentes enfoques estadísticos para analizar patrones de actividad coherentes obtenidos de espigas en trenes (Russo & Durstewitz, 2017) o registros de imagenología de calcio (Carrillo-Reid et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2016; Mölter et al., 2018).

No obstante, un principio central de la neurociencia es la conectividad neuronal, base estructural que subyace a la función neuronal. El mapa de conectividad sistemática o conectoma de todo el cerebro podría representar la firma de la red neuronal de los individuos, pero la cuestión sigue siendo si la conectividad refleja la función (Sporns, 2012). Los conectomas funcionales y anatómicos tienen múltiples niveles, macro, meso y micro escala. A macroescala, áreas definidas del cerebro pueden ser relacionadas en sus contrapartes conductuales, mientras que a microescala las conexiones sinápticas pueden estar relacionadas con la potenciación (LTP) o depresión de largo plazo (LTD), plasticidad sináptica dependiente de la sincronización de espigas (STDP, spike timing dependent plasticity), facilitación o depresión sináptica de corto plazo (Carrillo-Reid & Larriva-Sahd, 2019). Sin embargo, poco se sabe acerca de la conectividad funcional de los grupos neuronales a mesoescala.

Tendrían que registrarse docenas de neuronas simultáneamente a escala histológica para observar si estos fenómenos, largo tiempo hipotetizados, se generan. En el laboratorio comenzamos a utilizar imagenología funcional de calcio con resolución de célula única, para tratar de observar la dinámica de los circuitos neuronales *in vitro* o *ex vivo*. Actualmente, podemos seguir la actividad de cada neurona pues cada vez que sucede un potencial de acción entra calcio a través de la membrana, y en el interior celular se han absorbido o transfectado moléculas que emiten una señal fluorescente en presencia de calcio. Con esta estrategia hemos logrado observar la existencia de estructuras neuronales dinámicas que cumplen con los requisitos teóricos antedichos: grupos de neuronas que se activan juntas, que se alternan en secuencia y reverberan mostrando ciclos cerrados de actividad.

El microcircuito estriatal en reposo muestra poca actividad espontánea. Sin embargo, ante un estímulo adecuado en la corteza o una baja concentración de un agonista excitador como el NMDA, el circuito puede activarse formando ensambles neuronales que se ven como picos de coactividad o actividad correlacionada en una ventana de tiempo. Utilizando diferentes algoritmos de agrupamiento, así como herramientas tomadas de la Teoría de Redes Complejas se pueden revelar las secuencias temporales de los ensambles neuronales (Carrillo-Reid et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2016; Aparicio-Juárez et al., 2019). Los agonistas colinérgicos y dopaminérgicos afectan estas secuencias exhibiendo una organización modular y jerárquica (Carrillo-Reid et al, 2009; 2011; Vautrelle et al., 2009; Pérez-Ortega et al., 2016). La activación del receptor D1 favorece la selección de secuencias de ensambles específicas, mientras que la activación del receptor D2 genera un mayor número de trayectorias en un ciclo de cerrado de actividad, el resultado final de la acción de los agonistas dopaminérgicos se pudo inferir registrando muchas neuronas simultáneamente, lo que difícilmente puede predecirse con registros de células o pares de células aisladas (Carrillo-Reid et al, 2011). No es intuitivo, dado que los receptores son tanto pre- como post-sinápticos en todas las clases de neuronas del estriado. Las neuronas de proyección pueden expresar el receptor a dopamina tipo D1 o D2. La activación del receptor D1 incrementa el número de potenciales de acción y la liberación de neurotransmisor. En cambio, el receptor D2 disminuye la excitabilidad y por lo tanto la liberación

del neurotransmisor (Hernández-López et al., 1997; 2000; Tecuapetla et al., 2007). También forman parte del microcircuito estriatal interneuronas GABAérgicas y colinérgicas que expresan receptores a dopamina D1, D2 o ambos. Además, los receptores a dopamina se encuentran en las terminales presinápticas corticoestriatales y estriatonigrales, que regulan la liberación de glutamato y GABA así como la misma liberación de DA (Surmeier et al., 2011). Sería muy complicado de averiguar el resultado final en el microcircuito registrando célula por célula. En el otro extremo, con los pacientes y los modelos conductuales pre-clínicos de las enfermedades en animales, sólo se tiene el resultado final pero no se tiene idea de cuáles son los mecanismos de acción, por qué y para qué. La ventaja de nuestra preparación in vitro es tener un nivel intermedio: la acción final de una molécula sobre la actividad de un microcircuito o módulo, utilizando las conexiones funcionales de la red neuronal. Hemos determinado que el microcircuito actúa como una red de escala libre, mundo pequeño y jerárquico, propiedades que se pierden en un microcircuito patológico (Pérez-Ortega et al., 2016).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El análisis de las señales obtenidas con imagenología de calcio nos ha revelado la dinámica del microcircuito estriatal control, el cambio de la dinámica en presencia de neuromoduladores y en condiciones patológicas (Carrillo-Reid et al., 2011; Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016). En particular, la pérdida del tono dopaminérgico en el estriado debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta*, causa principal de la Enfermedad de Parkinson, cambia las funciones de las sinapsis estriatales, promoviendo consecuencias anómalas como la bradicinesia, acinesia, temblor y rigidez muscular, atribuidos a una sincronización neuronal anormal (Galarraga et al., 1987; Hammond et al., 2007; Burke and O'Malley, 2013; Obeso et al., 2017). Los modelos animales de la Enfermedad de Parkinson basados en moléculas neurotóxicas han sido utilizados durante muchos años porque mimetizan muchas de las características patológicas y de comportamiento de la enfermedad en humanos, lo que los hace convenientes para desarrollar nuevas

terapias (Dunnet and Lelos, 2010; Morissette and Di Paolo, 2018). Por esas razones, realizamos registros de imagenología de calcio en tejido cerebral proveniente de roedores lesionados en la sustancia nigra pars compacta con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Esto permitió evidenciar los cambios ocurridos en la dinámica del microcircuito estriatal privado de dopamina al que nos referiremos como “Parkinsoniano”. El microcircuito estriatal parkinsoniano muestra un aumento en la actividad espontánea de las neuronas, exhibiendo picos de actividad sincrónica enganchados en un ensamble altamente recurrente o dominante, es decir, la alternancia en la secuencia de los ensambles neuronales se reduce drásticamente manteniendo al circuito en un estado virtualmente invariante, haciendo recordar a los pacientes inmobilizados y rígidos (Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016).

La restitución de la dopamina o la activación de sus receptores es la terapia principal utilizada para la Enfermedad de Parkinson. L-DOPA, una molécula precursora de la dopamina, y diversos agonistas dopaminérgicos. Previamente observamos que: la presencia de L-DOPA bastó para que la actividad espontánea exacerbada disminuyera (Plata et al., 2013a). Un agonista selectivo para el receptor a dopamina D1, SKF81297 no disminuyó el exceso de actividad espontánea, aunque sí se disolvió el ensamble altamente recurrente (Jáidar et al., 2010). También la nicotina disminuyó la actividad patológica (Plata et al., 2013b). Además, un estímulo cortical alivia la condición parkinsoniana del microcircuito estriatal disminuyendo la recurrencia del estado dominante característico de la patología, aunque este efecto es transitorio si no va acompañado de L-DOPA (Aparicio-Juárez et al., 2019). Por eso fue de nuestro interés saber si otros agonistas dopaminérgicos serían capaces regresar la actividad de las neuronas del microcircuito estriatal parkinsoniano a un estado control espontáneo, y sí después del estímulo cortical, mantienen la alternancia y recurrencia entre los ensambles neuronales formando ciclos cerrados de actividad. De ser así tendríamos un ensayo farmacológico a mesoescala.

III. HIPÓTESIS

El bioensayo funcional del microcircuito estriatal parkinsoniano es capaz de mostrar diferencias en la eficacia de fármacos anti-Parkinsonianos para restablecer la dinámica a una similar a la del microcircuito control en reposo, es decir la capacidad de regresar a la actividad neuronal casi silente. En caso de activación del microcircuito estriatal en presencia de los fármacos, con un estímulo cortical, este mostrará la secuencia de ensambles neuronales parecidos al control activado de la misma manera.

IV. OBJETIVOS

El primer objetivo general fue cuantificar la capacidad de los fármacos anti-Parkinsonianos actualmente en uso clínico, como paso preliminar para probar fármacos novedosos con potencial terapéutico. Estos fueron: L-DOPA, apomorfina, rotigotina, pramipexole, ropinirole y quinelorane. Primero se trató de regresar el microcircuito estriatal Parkinsoniano a la actividad espontánea del control en reposo o no estimulado. Para ello nos trazamos los siguientes objetivos particulares:

- Registrar con imagenología de calcio la actividad neuronal espontánea del estriado (control en reposo) proveniente de una rebanada de cerebro de ratón utilizando el fluoróforo calcium Orange.
- Lesionar la sustancia nigra pars compacta (SNc) de ratón con la neurotoxina 6-OHDA para generar un modelo animal Parkinsoniano, validado por la conducta de giro e inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa en el estriado y la SNc, con el propósito de obtener rebanadas de cerebro de ratón que contengan al estriado.
- Registrar con imagenología de calcio, utilizando el fluoróforo calcium Orange, la actividad neuronal espontánea del microcircuito estriatal Parkinsoniano proveniente del modelo de 6-OHDA en ratón. Antes y durante la aplicación de agonistas dopaminérgicos: apomorfina, rotigotina, pramipexole, ropinirole y quinelorane.

- Cuantificar la actividad de las neuronas del microcircuito estriatal en las siguientes condiciones: control espontáneo, Parkinsoniano espontáneo y Parkinsoniano espontáneo en presencia de agonistas dopaminérgicos. Para cuantificarla: calculamos la actividad acumulada de todas las neuronas en cada condición, y con la resolución de célula única del registro de imagenología de calcio, calculamos la actividad neuronal individual para obtener la distribución de probabilidad acumulada, en cada condición.
- Comparar con las pruebas estadísticas adecuadas la actividad acumulada y la distribución de probabilidad acumulada del microcircuito Parkinsoniano espontáneo y en presencia de cada uno de los fármacos, con la actividad del microcircuito estriatal control para evidenciar el efecto terapéutico de cada fármaco.

El segundo objetivo general fue cuantificar la capacidad de los fármacos anti-Parkinsoniano: L-DOPA, rotigotina, pramipexole y ropinirole, para restablecer el microcircuito Parkinsoniano activo, después de una estimulación adecuada que lo ponga en marcha. Los objetivos particulares fueron:

- Registrar con imagenología de calcio en una rebanada de cerebro de ratón con el fluoróforo calcium Orange, la actividad de las neuronas del microcircuito estriatal activado con estímulo proveniente de la capa V de la corteza motora con el propósito de evidenciar la dinámica de los ensambles neuronales en este estado (control activo).
- Registrar con imagenología de calcio, utilizando el fluoróforo calcium Orange, la actividad neuronal del estriado parkinsoniano de rebanadas de cerebro de ratón lesionado con 6-OHDA, antes y después de ser activado por un estímulo cortical en la capa V.
- Estimular la capa V de la corteza motora de una rebanada de cerebro de ratón lesionado con 6-OHDA (Aparicio-Juárez et al., 2019), mientras se registra con imagenología de calcio el microcircuito estriatal Parkinsoniano en presencia de cada uno de los fármacos antiparkinsonianos: L-DOPA, rotigotina, pramipexole, ropinirole y quinolorane.

- Caracterizar la dinámica de los ensambles neuronales del estriado en las siguientes condiciones: microcircuito estriatal activado con un estímulo cortical, microcircuito estriatal parkinsoniano antes y después de un estímulo cortical, microcircuito estriatal parkinsoniano antes y después de un estímulo cortical en presencia de cada uno de los fármacos antiparkinsonianos, para determinar la secuencia de actividad de los ensambles neuronales.
- Cuantificar la recurrencia, alternancia y los ciclos cerrados de las secuencias de ensambles neuronales en cada condición, calculando la probabilidad de transición, un índice de recurrencia y la distribución del número de transiciones para formar un ciclo cerrado.
- Determinar la capacidad de los fármacos antiparkinsonianos para que el microcircuito muestre una secuencia de ensambles neuronales parecida al control comparando, con las pruebas estadísticas adecuadas, el índice de recurrencia y la distribución del número de transiciones para formar ciclos cerrados que observamos en el microcircuito parkinsoniano que ha recibido un estímulo en presencia de cada uno de los fármacos.

Con los objetivos anteriores queremos lograr que: El bioensayo funcional fundamentado en la dinámica de los ensambles neuronales pueda ser incluido en los ensayos farmacológicos preclínicos para probar fármacos novedosos con potencial terapéutico. Esta es la meta final, y para alcanzarla hemos logrado:

- i. Observar decenas de neuronas simultáneamente en una rebanada de cerebro utilizando la técnica de imagenología de calcio, y registrar sus señales de actividad neuronal por más de 1 hora.
- ii. Caracterizar la dinámica de los ensambles neuronales del estriado a partir de las señales fluorescentes registradas en el estriado de un ratón control con lo que tenemos su “huella fisiológica”
- iii. Tener la “huella fisiopatológica” del microcircuito estriatal parkinsoniano
- iv. Diferencias cuantificables y reproducibles entre la dinámica de los ensambles neuronales del estriado control y parkinsoniano para tener los límites de sensibilidad de nuestro ensayo.

- v. Poner a prueba diferentes fármacos antiparkinsonianos.

Por ahora solo se probaron fármacos que ya se usan en la clínica como tratamiento para la enfermedad de Parkinson. Con esto la preparación in vitro ha sido validada como bioensayo preclínico, porque se cuantificó y comparó el rendimiento de fármacos antiparkinsonianos. Esto permite saber que molécula tiene un mejor rendimiento terapéutico. De modo que este bioensayo in vitro, basado en la caracterización de la dinámica de grupos de neuronas, puede servir para probar nuevas moléculas con efecto antiparkinsoniano o hacer combinaciones de las que ya se usan para encontrar posibles sinergias. Aunque este trabajo se ha dedicado a caracterizar la dinámica de los ensambles neuronales del estriado en condiciones control y parkinsoniano a través de observar docenas de neuronas al mismo tiempo. El bioensayo farmacológico in vitro, también puede ser utilizado en otras áreas cerebrales que se afectan en las diferentes neuropatologías como son: epilepsia, Alzheimer y enfermedad de Huntington por mencionar algunas. Más aún esta preparación podría ser validada en otros órganos como corazón, hígado, páncreas. Y probar moléculas blanco para cada una de las patologías que se desarrolla en los diferentes órganos corporales.

V. MÉTODOS

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas de bioética establecidas por el comité de bioética del Instituto de Fisiología Celular (IFC). En todos los experimentos se emplearon ratones machos y hembras C57BL/6 del bioterio del IFC. Se mantuvieron en una habitación libre de patógenos con temperatura controlada, bajo un ciclo luz/oscuridad de 24 horas (12/12) con agua y comida estándar *ad libitum*

Se mantuvieron dos grupos experimentales como se muestra en la figura B, de los cuales se obtuvieron rebanadas de cerebro de ratón para realizar registros de imagenología de calcio en el núcleo estriado:

- A. Grupo control, ratones C57BL/6.
- B. Grupo parkinsoniano, ratones C57BL/6 lesionados con la neurotoxina 6-OHDA en la sustancia nigra pars compacta (SNc) para privar de dopamina a los ganglios basales, y así generar un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

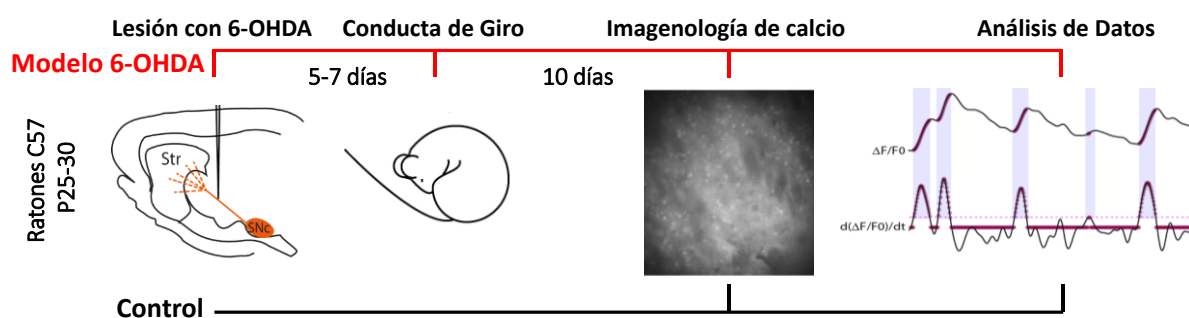


Figura B. Esquema general del procedimiento experimental

Modelo 6-OHDA en ratón

El ratón hemi-parkinsoniano generado mediante la inyección unilateral de 6-OHDA es el modelo de roedor Parkinsoniano más empleado en la investigación (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970). Para este propósito, 125 ratones de 25-30 días de edad, fueron anestesiados intraperitonealmente con ketamina (85 mg/kg)-xilacina (15 mg/kg). Usando cirugía estereotáxica se les inyectó 0.8 μ L de 6-OHDA (0.1 mg/mL) intracranealmente a una velocidad de 0.2 μ L/min en el borde de la SNc y el haz prosencefálico medial, con las siguientes coordenadas desde bregma: -2.6 mm AP, -1.5 mm LM y -4.7 mm DV. Durante el periodo de recuperación de 15-30 días (día postnatal 45-60) los ratones recibieron pellets de chocolate *ad libitum* y, en caso de ser detectada una pérdida de peso mayor al 20%, inyecciones subcutáneas de 100 μ L de glucosa al 2% en solución salina diariamente.

Validación del modelo de 6-OHDA en ratón

- Conducta de giro.

La pérdida de dopamina se evaluó con una prueba de conducta de giro, para la que se inyectó apomorfina subcutáneamente (0.5 mg/kg en un vehículo salino con 0.02% de ascorbato). Los giros ipsilaterales y contralaterales al sitio de la lesión se contaron con el programa RotaCount 2.0 (OmniTech, Sioux Falls SD) por al menos 50 minutos. Se utilizó la tasa de giros contralaterales vs ipsilaterales para identificar a los ratones con la deficiencia unilateral de DA. Cuando los ratones presentaron más giros contralaterales que ipsilaterales (tasa ≥ 2) y al menos 50 giros contralaterales totales en un minuto, se consideraron como modelos hemi-parkinsonianos exitosos (Figura 1E). Este criterio correlaciona con al menos el 80% de disminución de dopamina estriatal (Heuer et al., 2012).

- Inmunohistoquímica

Para confirmar la pérdida dopaminérgica en la SNc y el estriado, en algunos ratones lesionados con 6-OHDA, se efectuó la tinción inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH), la enzima productora de dopamina (Fig. 1A-D). A los 8 días de la evaluación de la conducta de giro, los ratones lesionados se anestesiaron y se perfundieron con una solución buffer de fosfato 0.1 M (PBS). Después de la extracción del cerebro, se obtuvieron rebanadas coronales de 50 μm en un vibrátomo (PELCO easiSlicer Ted Pella, Redding, CA) que se mantuvieron en PBS. Las rebanadas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) en PBS al 1% y Tritón 0.1 M al 3% durante 40 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron tres veces en PBS 0.1 M y se incubaron con el anticuerpo primario (de conejo, anti-tirosina hidroxilasa, Chemicon International, 1:500 en PBS 0.1 M-Tritón 3%) por 12 horas. Después las rebanadas se incubaron con el anticuerpo secundario (de asno, anti-conejo conjugado con Cy3 Affini Pure, Jackson Immuno Research, Inc. 711-165-152 1:250 en PBS 0.1 M-Tritón 3%) a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, las rebanadas se cubrieron con DAPI (Vecta Shield, Vector Laboratories, Inc. H-1200): Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal (Zeiss LSM-710, objetivo: C-Apochromat 10X N.A. 0.45, láser 543 nm). El grado de inervación

dopaminérgica se cuantificó como intensidad de fluorescencia y se comparó con la del lado intacto a través de ImageJ®, mientras que los somas de las neuronas dopaminérgicas se contaron manualmente a partir de micrografías confocales. En ambos casos, se confirmó que la pérdida dopaminérgica fue de al menos 80%, como se ilustra en la Fig. 1C-D, en 17 rebanadas tomadas de distintos animales. Las imágenes estereoscópicas se obtuvieron con una cámara Nikon SMZ1500 (objetivo HR, Apo 1x WD 54).

El ensayo funcional *in vitro*

- Obtención del tejido cerebral vivo

Tanto los ratones control como los modelos hemi-parkinsonianos se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina-xilacina (85 mg/kg-15 mg/kg) y fueron perfundidos intracardialmente con solución de sacarosa fría para posteriormente realizar una craneotomización, una vez extraídos los cerebros, se obtuvieron rebanadas para-horizontales con un ángulo de 30 grados (Figura 1F), 300 μ m de grueso en un vibrátomo (PELCO easiSlicer Ted Pella, Redding, CA), las rebanadas con el núcleo estriado fueron conservadas en líquido cefalorraquídeo artificial (NaCl 126 mM, dextrosa 15 mM, NaHCO₃ 26 mM, tiourea 0.2 mM, ácido ascórbico 0.2 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1.3 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM y CaCl₂ 2.0 mM; pH = 7.4; 300 \pm 5 mOsm/L) perfundidas con 95% de O₂ y 5% de CO₂.

- Registros de imagenología de calcio

Se eligió a la molécula fluorescente Calcium Orange, un fluoróforo con bajo grado de fotoblanqueo (Thomas et al., 2000) que permitió hacer registros hasta de 90 minutos. Los cortes se incubaron en una solución de Calcium Orange (Calcium Orange 8.2 μ M, DMSO al 0.1%, ácido plurónico al 0.67% en ACSF) a 36 °C durante 40 minutos y luego se depositaron en una cámara de perfusión con flujo constante de líquido cefalorraquídeo artificial, bajo un objetivo de inmersión de 20X (Olympus XLUMPLFN, 1.00 NA, 2.0 mm WD). El campo de observación fue de 750 \times 750 μ m. La estimulación del fluoróforo se llevó a cabo con un iluminador Lambda LS (Sutter Instruments, Petaluma, CA, USA) acoplado a un filtro de luz de 570/30 nm. El software, Im-Patch©, diseñado en el entorno de LabView

(National Instruments, ciudad de México, México; disponible en <http://Impatch.ifc.unam.mx>) se utilizó para el control de una cámara CoolSnap K4 (Photometrics, Tucson), AZ, USA) con la que se efectuaron los registros de imagenología. Los videos se componen de 720–2160 cuadros y la tasa de adquisición fue de 6 cuadros/s. Para cubrir largos períodos, se tomaron de 7 a 10 videos por experimento, lo que representa hasta 90 minutos de registro por cada experimento.

- Validación de los registros de imagenología de calcio

Con el fin de constatar la fiabilidad de la fluorescencia del calcio como indicador de actividad neuronal, se efectuaron registros de fluorescencia y electrofisiología de manera simultánea, utilizando la configuración *current-clamp* de célula completa. Las pipetas empleadas en el protocolo experimental de *current-clamp* (3–6 M Ω) se llenaron con una solución que contiene en mM: 115 KH₂PO₄, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 10 NaCl, 0.2 ATP, 0.2 GTP y 0.03 sal de Calcium Orange, a un pH de 7.24. Como se muestra en la Figura 1G, la derivada positiva $d(\Delta F/F) / dt$ de los transitorios de fluorescencia coinciden en el tiempo con el inicio y duración de la actividad celular.

- Adquisición de datos

Los registros de imagenología de calcio se realizaron en el estriado dorsolateral, con la siguiente estrategia experimental:

1. Las rebanadas provenientes del grupo control, que aquí llamaremos condición control, en las que se apreció el núcleo estriado se compararon bajo dos condiciones principales: actividad espontánea y actividad provocada por estimulación cortical (CtxS), el estímulo consistió en 10 pulsos, a 40 Hz, de 1.1–1.3 mA, a través de un electrodo concéntrico bipolar de 50 μ m de diámetro (FHC, # CBCFE75, Bowdoin, ME, USA) que se insertó en la capa V de la corteza motora primaria (M1), como se muestra en la Fig. 1F.

2. Las rebanadas de estriado de ratones lesionados con 6-OHDA, que aquí referiremos como condición parkinsoniana, también se compararon en dos condiciones: actividad espontánea a la que se le aplicó

alguno de los agonistas dopaminérgicos (L-DOPA 10 μ M, apomorfinina 20 μ M, rotigotina 10 μ M, pramipexol 10 μ M, ropinirole 10 μ M, quinelorane 10 μ M), y actividad inducida por estimulación cortical (CtxS) en presencia de un agonista dopaminérgico. La actividad espontánea del tejido privado de dopamina se registró siempre antes de la adición de cualquier fármaco al sistema de perfusión.

Análisis de los datos

Los vídeos fueron procesados con Im-Patch®, tal procesamiento consiste en la extracción de la actividad celular y su transformación en matrices de actividad (véase Anexo). Todas las neuronas activas en un campo son seleccionadas para medir su fluorescencia en función del tiempo, los transitorios de calcio. El fotoblaqueo, el fenómeno de discos de Airy y el ruido fueron corregidos al restar la señal cruda de la neurona a su fondo local, imagen por imagen. Las señales de calcio provocadas por los potenciales de acción serán detectadas basándose en el valor del umbral obtenido por su primera derivada en el tiempo, específicamente la parte positiva de la derivada de la señal de calcio tiene la misma duración que los trenes de potenciales de acción registrados electrofisiológicamente (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009; Perez-Ortega et al., 2016; Carrillo-Reid et al., 2016; Duhne et al., 2020). Para el análisis solo son considerados los eventos fluorescentes de amplitudes mayores a 2.5 veces la desviación estándar del ruido, a este umbral se asegura que el 98% de la señal de ruido está por debajo (Figura 1G). El procedimiento anterior es hecho para cada neurona, del que se obtiene una matriz binaria $N \times F$, N es el número de neuronas activas y F es el número de imágenes (cuadros adquiridos). En esta matriz para cada neurona, 1 indica actividad y 0 inactividad durante los cuadros adquiridos. Estas matrices pueden expresarse como gráficos tipo ráster, donde cada punto representa actividad neuronal en ese cuadro y cada fila representa la actividad de una célula a lo largo del tiempo (Figura 2).

A partir de las matrices de actividad se obtuvo:

1. La actividad neuronal del microcircuito estriatal en condiciones control, parkinsoniana y cuando se adiciono algún agonista dopaminérgico, esto es necesario porque en condiciones control la

actividad espontánea es escasa y son muy pocos o ningún pico de coactividad neuronal los que se registran, por lo tanto, no podemos observar la secuencia de ensamblajes neuronales. Además, el efecto esperado de los agonistas dopaminérgicos es regresar la actividad estriatal a condiciones parecidas al control silente. De modo que para caracterizar la actividad neuronal en condiciones espontáneas los cálculos son los siguientes:

- **Actividad acumulada:** La cantidad de actividad neuronal por experimento se cuantificó mediante gráficos de actividad acumulada, que se construyeron sumando la actividad de todas las neuronas a lo largo del tiempo. Para considerar muestras de experimentos en la misma condición, se hizo un ajuste lineal a los gráficos de actividad acumulada, las pendientes de los ajustes se representaron como diagramas de caja de Tukey.
 - **Función de distribución acumulada (CDF, por sus siglas en inglés):** se construyó a partir de los valores de la actividad de cada célula, que se definió como el número total de cuadros activos sobre el número total de cuadros, para comparar la actividad de las células individuales a través de diferentes secciones de un solo experimento. Las CDFs se realizaron para cada condición utilizando todas las neuronas de una muestra determinada.
2. Las matrices provenientes de microcircuitos estriatales control o parkinsonianos activados por un estímulo cortical que exhiben eventos neuronales sincrónicos, se cuantificaron con:
- **Histogramas de coactividad:** es la suma de la actividad de todas las células por cada cuadro a lo largo del experimento, muestra cuántas neuronas se activaron juntas por cuadro, a esto le llamamos picos de coactividad que cuando son estadísticamente significativos constituyen los ensamblajes neuronales.
 - **Picos de coactividad significativos:** un pico coactivo son las neuronas que tuvieron actividad sincrónica o correlacionada en una ventana de tiempo, la significancia estadística se

determinó utilizando simulaciones de Montecarlo de las matrices de actividad, con 10,000 iteraciones cada una, sólo aquellos picos que superaron el umbral del azar se consideraron significativos, son los que se toman en cuenta para los siguientes análisis. Al dividir la cantidad de picos coactivos entre el tiempo total (minutos de duración) del experimento obtenemos el número de picos de coactividad/min.

- **Ensamblajes neuronales:** los picos de coactividad se agruparon y compararon usando un índice de similitud: el coseno del ángulo tomado del producto punto de los vectores columna y se asociaron utilizando el análisis de agrupamiento jerárquico con ventanas de tiempo de 12 a 18 cuadros, definiendo así los ensamblajes neuronales como neuronas que disparan juntas o de manera correlacionada de forma transitoria y que pueden alternar su actividad formando secuencias.
- **Secuencia temporal de ensamblajes neuronales:** La actividad de las neuronas que forman ensamblajes se coloreó diferencialmente en los gráficos tipo ráster, y se simbolizaron como círculos de color en secuencias temporales de ensamblajes, permitiendo ver la actividad del circuito, así como las transiciones entre distintos ensamblajes de red y la recurrencia en el mismo ensamble.
- **Ciclos cerrados de ensamblajes:** Cuando cada ensamble apareció al menos una vez y el ensamble inicial es igual al último ensamble, esto es una reverberación, que tiene lugar cuando las transiciones entre los ensamblajes de la red generan un ciclo cerrado.
- **Índice de recurrencia:** La recurrencia es la repetición consecutiva de un ensamble de la red en lugar de alternar la actividad con otro ensamble; se calcula como la suma total de eventos recurrentes, cuyo valor mínimo es 1 que corresponde a la aparición de una vez. El índice de recurrencia es el número de veces seguidas que un solo ensamble se repite dividido por la suma de la recurrencia de todos los demás ensamblajes.

- **Distribución de las transiciones para formar un ciclo cerrado:** Cuantificamos el número de transiciones requeridas para lograr un ciclo cerrado entre los ensamblajes de la red; si no se observa un ciclo cerrado durante el experimento, se asigna el valor "infinito". La distribución del número de transiciones necesarias para cerrar un ciclo de actividad se presenta en gráficas de pastel. Con el fin de evaluar las transiciones necesarias para cerrar un ciclo de actividad, se excluyen las secuencias que nunca se cerraron.

Estadística

La actividad acumulada y la función de distribución acumulada se usaron para poder comparar condiciones experimentales que no presentaron picos de coactividad, como es el caso de la actividad espontánea del microcircuito estriatal control y del microcircuito estriatal Parkinsoniano en presencia de algún agonista dopaminérgico. Para comparar la pendiente del ajuste de la actividad acumulada de cada condición experimental se usó la prueba de Kruskal-Wallis. La prueba de Kolmogórov-Smirnov se usó para comparar las funciones de distribución acumulada, pruebas estadísticas que se realizaron con el software Graph Prism. Para las condiciones experimentales que mostraron picos de coactividad se usaron las siguientes pruebas estadísticas: La determinación de un umbral de significancia para los picos de coactividad emplearon la prueba de Montecarlo, utilizando programas personalizados en MATLAB. Así mismo, se realizaron pruebas estadísticas en Graph Prism, con los siguientes propósitos: prueba de Mann-Whitney para comparar dos diferentes condiciones, prueba T de Wilcoxon para comparar dos condiciones pareadas, de los picos coactivos/min. La prueba de Kruskal-Wallis fue usada para comparar el número de transiciones para formar ciclos cerrados de actividad y su distribución fue comparada con la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Y el índice de recurrencia entre las diferentes condiciones farmacológicas fue comparado mediante la prueba de homogeneidad de la varianza de O' Brian. Todas las comparaciones múltiples se corrigieron utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg con un FDR de 0.05.

VI. RESULTADOS

Los resultados se encuentran en el artículo anexo siguiente, Lara-González et al., 2019.

Comparison of Actions between L-DOPA and Different Dopamine Agonists in Striatal DA-Depleted Microcircuits In Vitro: Pre-Clinical Insights

Esther Lara-González,^{ab} Mariana Duhne,^a Fátima Ávila-Cascajares,^a Silvia Cruz^a and José Bargas^{a*}

^aDivisión Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, Mexico

^bFacultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla City 72000, Mexico

Abstract—Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative illness presenting motor and non-motor symptoms due to the loss of dopaminergic terminals in basal ganglia, most importantly, the striatum. L-DOPA relieves many motor signs. Unfortunately, in the long term, L-DOPA use causes motor disabilities by itself and does not act in comorbid conditions such as depression. These deficiencies have led to search for drugs such as dopamine (DA) receptor agonists (DA-agonists) that allow the reduction of L-DOPA dose. Previously, we have identified the attributes of non-stimulated (resting) and cortical stimulated (active) striatal microcircuits following the activity of dozens of neurons simultaneously using calcium imaging in brain slices. We also have characterized the changes that take place in DA-depleted microcircuits in vitro. In control conditions, there is *low* spontaneous activity. After cortical stimulation (CtxS) sequences and alternation of neuronal ensembles activity occur, including reverberations. In contrast, DA-depleted circuits exhibit *high* spontaneous activity at rest, and a highly recurrent ensemble curtails alternation. Interestingly, CtxS briefly relieves these Parkinsonian signs in DA-depleted tissue. Here we compare the actions of some DA-agonists used in PD therapeutics on the pathological dynamics of DA-depleted microcircuits at rest and with CtxS; taking L-DOPA as reference. D₂-class agonists better reduce the excessive spontaneous activity of DA-depleted microcircuits. All DA-agonists tend to maintain ensemble alternation seen in control circuits after CtxS. However, quantitative analyses suggest differences in their actions: in general, DA-agonists only approximate L-DOPA actions. Nonetheless no treatment, including L-DOPA, completely restores microcircuit dynamics to control conditions. © 2019 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Parkinson's Disease, Dopaminergic agonists, 6-OHDA, Calcium imaging, L-DOPA, Microcircuit analysis.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by motor deficits such as tremor, postural instability, rigidity and bradykinesia (Lees et al., 2009; Obeso et al., 2017). Motor signs correlate with the loss of 50–70% of the dopaminergic terminals in the striatum (Burke and O'Malley, 2013). Terminals loss causes alterations on both the direct and indirect pathways of the basal ganglia (Kravitz et al., 2010; Gerfen and Surmeier, 2011; Calabresi et al., 2014; Parker et al., 2018). Even though L-DOPA, as dopamine (DA) replacement therapy, has been the gold standard for PD treatment (Carlsson et al., 1957; Foley, 2000; Mercuri and Bernardi, 2005; Lees et al., 2015; De Deurwaerdère et al., 2017) in the long-term its usage generates motor secondary effects such as dyskinesia (L-DOPA induced dyskinesia), wearing-off

and on-off phenomena (Ahlskog and Muentner, 2001; Aquino and Fox, 2015; Sharma et al., 2015; Picconi et al., 2017). In addition, L-DOPA does not improve non-motor conditions of the disease such as depression and cognitive deficits (Millan, 2010). Therefore, there has been a search for adjuvant therapies, including dopaminergic receptor agonists (DA-agonists) whose use has been associated with lower L-DOPA dosage and a lower incidence of motor complications (Sprenger and Poewe, 2013; Jimenez-Shahed, 2016). There are two main classes of DA-agonists: the less selective D_{1,2} receptors agonists such as rotigotine (Jenner and Katzenschlager, 2016; Chen et al., 2017) and the more selective D₂-class receptor agonists such as pramipexole (Mizuno et al., 2014; Shen et al., 2017).

The neurotoxic-based animal models of Parkinsonism have been used for many years, since they mimic many of the pathological and behavioral features of PD in humans, which make them convenient for the development of new therapies (Dunnet and Lelos, 2010; Morissette and Di Paolo, 2018). Recently, calcium imaging in 6-OHDA injured rodents allowed us to compare network activity of dopamine

*Corresponding author.

E-mail address: jbargas@ifc.unam.mx (José Bargas).

Abbreviations: Ctr, control; CtxS, Cortical Stimulation; DA, dopamine; FDR, False Discovery Rate; CDF, Cumulative distribution function; PD, Parkinson's Disease; L-DOPA, levodopa.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.058>

0306-4522/© 2019 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

depleted (DA-depleted) and control microcircuits (Pérez-Ortega et al., 2016; Aparicio-Juárez et al., 2019) with single cell resolution, opening the possibility of in vitro drug testing in brain slice preparations of histological scale to observe changes in microcircuit dynamics. The present study is an initial attempt to do that, using reproducible circuitry properties, easy to observe.

In control non-stimulated resting microcircuits, there is little spontaneous neuronal activity. But after cortical stimulation (CtxS), control microcircuits activity is enhanced showing transient neuronal groups firing together. These neuronal assemblies can alternate with other groups forming sequences or closed cycles (Hebb, 1949; Edelman, 1993; Carillo-Reid et al., 2009; Buzsáki, 2010; Pérez-Ortega et al., 2016). In contrast, non-stimulated DA-depleted microcircuits exhibit enhanced spontaneous activity with respect to the controls and become particularly engaged into a highly recurrent network state with increased synchronization (Liang et al., 2008; Jáidar et al., 2010, 2019; Lemaire et al., 2012; Pérez-Ortega et al., 2016). This state may have a surplus activity of D₂-receptor expressing striatal projection neurons although D₁-receptor expressing striatal projection neurons activity remains important (Parker et al., 2018; Jáidar et al., 2019). The highly recurrent state is dissolved by the action of D₁-agonists, but the enhancement of spontaneous activity is not reversed (Jáidar et al., 2010), in contrast to L-DOPA, which restores spontaneous activity to resting-like conditions (Lemaire et al., 2012; Plata et al., 2013). Interestingly, CtxS in DA-depleted striatal microcircuits, though briefly, also relieves the network from the excessive pathological activity. Addition of L-DOPA to the stimulated microcircuit prolongs this restoration (Aparicio-Juárez et al., 2019).

D₂-class agonists have been used as mono-therapy in the initial stages of PD (Baker et al., 2009) and co-applied with L-DOPA in more advanced phases of the disease (Brooks, 2000; Linazasoro and Spanish Dopamine Agonists Study Group, 2004; Stocchi, 2009; Millan, 2010). D₂-agonists restore the balance between direct and indirect pathways (Ballion et al., 2009), decreasing pathological activity. Here we want to correlate these findings in vitro using the activity of neuronal networks of histological scale. We compare the actions of less selective D_{1,2}-agonists with those of more selective D₂-agonists (Hu and Wang, 1988; Wang and Zhou, 2017) under two different conditions pertaining the pathophysiological signatures of parkinsonism (Pérez-Ortega et al., 2016): First, how agonists decrease excessive spontaneous neuronal activity in non-stimulated DA-depleted striatum. Secondly, how they act during network dynamics restoration induced by CtxS (Aparicio-Juárez et al., 2019). The results of this work show that both classes of DA-agonists exhibit subtle differences in spontaneous and stimulated network activity when compared with different metrics during circuit dynamics, a finding that may have clinical relevance. In vitro preparations appear to be potential bioassays to test combinations of adjuvant therapies and new drugs, in addition to cellular, behavioral and clinical tests. Their cost is low and the actions of several drugs can be tested and correlated with other assays.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Research subjects

Protocols were designed and performed as approved by the Institutional Committee for Laboratory Animals Care and Use of the Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM (NOM-062-Z00–1999; laboratory protocols JBD-59-15) in accordance with the international norms for the ethical use of experimental animals established in the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals Eighth Edition (NIH, 2010). Male and female C57BL/6 mice bred in the animal facilities of the IFC were used in all experiments. Mice were housed in a temperature controlled, pathogen-free room, on a 12:12 light: dark cycle and allowed food and water ad libitum.

Drugs

6-OHDA (6-Hydroxydopamine hydrochloride, Sigma-Aldrich H4381-100MG) was dissolved in saline solution and injected intracranially (0.1 mg/ml) to obtain hemiparkinsonian mice. Apomorphine (R(-)-apomorphine hydrochloride hemihydrate Sigma-Aldrich A4393-250MG) was diluted in saline vehicle and administered via subcutaneous injection to measure rotational behavior in 6-OHDA injected animals. Calcium Orange 8.2 μM (Molecular Probes®, Life technologies, Mexico City, MX) was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) solution, 0.1% DMSO, 0.67% Pluronic Acid (Pluronic TM F-127, Life Technologies Corporation, Oregon USA, P3000MP) and dissolved in artificial cerebral spinal fluid (ACSF) to be applied to brain slices at 36 °C for 40 min for calcium imaging. NMDA (N-Methyl-D-aspartic acid, Sigma-Aldrich M3262), L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine, Sigma-Aldrich D9628), apomorphine (R(-)-apomorphine hydrochloride hemihydrate, Sigma-Aldrich A4393), quinolorane (quinolorane hydrochloride, Tocris Bioscience. CAS97548–97-5), pramipexole (pramipexole dihydrochloride, Sigma-Aldrich A1237), ropinirole (ropinirole dihydrochloride, Sigma-Aldrich R2530) and rotigotine (rotigotine hydrochloride, Sigma-Aldrich R9281) were dissolved in ACSF and applied to the bath saline during calcium imaging. Saturating concentrations were employed in all cases reported.

6-OHDA model

The hemiparkinsonian mouse obtained by 6-OHDA unilateral injections is the most common Parkinsonian rodent model used in research (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). For that purpose 125 mice 25–30 days old were anesthetized intraperitoneally with ketamine (85 mg/kg)-xylazine (15 mg/kg) for stereotaxic surgery. 0.8 μL of 6-OHDA (0.1 mg/ml) were injected intracranially at a 0.2 μL/min rate in –2.6 mm AP, –1.5 mm LM y –4.7 mm DV from Bregma, targeting the edge of SNc and MFB. Immediately after surgery animals were placed on a heating pad until fully awoken. After 15–30 days recovery period (Postnatal day 45–60), DA-depletion was measured by rotational behavior test, during this period mice received chocolate pellets ad libitum and subcutaneous 100 μL glucose 2% in

saline solution daily injections were administered if more than 20% weight loss was detected. 80% of the injected mice survived (100 mice) until rotational evaluation. For turning behavior evaluation, apomorphine was injected subcutaneously (0.5 mg/kg in saline vehicle with 0.02% ascorbate). Ipsilateral and contralateral rotations to the lesion site were counted with the program RotaCount 2.0 (Omni-Tech, Sioux Falls SD) for at least 50 min. The ratio of contralateral vs ipsilateral rotations was used to identify unilateral DA-depleted mice. Whenever mice presented more contralateral rotations than ipsilateral rotations (ratio ≥ 2) and total contralateral rotations were at least 50 (1 per minute) mice were considered as successfully DA-depleted. Lesion efficacy was 65% as measured by this test (for rotation data see Fig. 1E). This test has previously been reported as effective in detecting about 80% dopamine depletion (Heuer et al., 2012). The lesioned hemisphere used for in vitro experiments is referred to as dopamine depleted (DA-depleted) in the present paper. Not every DA-depleted mouse resulted in experiments reported here since slices with less than 80% cell survival were discarded; this was quantified based on videos with 20 mM KCl application at the end of each experiment. In total, slices from 50 mice were used for calcium imaging experiments.

Immunohistochemistry

Tyrosine Hydroxylase (TH) immunohistochemistry staining was performed as previously reported (Aparicio-Juárez et al., 2019) to confirm DA depletion in some 6-OHDA lesioned mice (Fig. 1A-D). Briefly, 8 days after behavioral evaluation, lesioned mice were anesthetized and perfused with phosphate buffer solution 0.1 M (PBS) (NaH_2PO_4 15 mM, Na_2HPO_4 80 mM, NaCl 50 mM, pH 7.4) and 4% paraformaldehyde fixative (PFA) in PBS 0.1 M, pH 8). After brain extraction, 50 μm coronal slices were obtained in a vibratome (PELCO easiSlicer Ted Pella, Redding, CA) and stored in PBS. Slices were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS and 0.1 M Triton 3% for 40 min at room temperature and washed three times in PBS 0.1 M. Primary antibody (Rabbit, anti-Tyrosine Hydroxylase, Chemicon International, 1:500 in PBS 0.1 M Triton 3%) was incubated at room temperature for 12 h and washed three times with PBS 0.1 M. Slices were incubated with secondary antibody (Cy3-conjugated Affini Pure Donkey anti-Rabbit, Jackson Immuno Research, Inc. 711–165-152 1:250 in PBS 0.1 M Triton 3%) at room temperature for 2 h and washed three times with PBS 0.1 M. Finally, slices were cover slipped with DAPI (Vecta Shield, Vector Laboratories, Inc. H-1200) and images were obtained by confocal microscopy (Zeiss LSM-710, objective: C-Apochromat 10X N.A. 0.45, laser 543 nm). DA fibers in the striatum were quantified as fluorescence intensity compared to the intact side using ImageJ®, while DA somata were manually counted from confocal micrographies. In both cases DA depletion was confirmed to be at least 80%, as illustrated in Fig. 1C-D, across 17 slices taken from different animals. Stereoscopic images were obtained on a Nikon SMZ1500 (HR objective, Apo 1x WD 54).

Calcium imaging

Both controls and DA-depleted mice were anesthetized intraperitoneally with ketamine-xylazine (85 mg/kg-15 mg/kg) and perfused intracardially with chilled sucrose solution (234 mM sucrose, 28 mM NaHCO_3 , 7 mM dextrose, 4.54 mM pyruvate, 0.28 mM ascorbic acid, 2.5 mM KCl, 7 mM MgCl_2 , 1.44 mM NaH_2PO_4 , 0.4 mM CaCl_2 , 4 °C). For DA-depleted mice, there was a 14 days delay between rotational behavioral tests and calcium imaging experiments. Once brains were extracted, 300 μm thick para-horizontal slices with a 30° angle were taken (Fig. 1F) in a vibratome (PELCO easiSlicer Ted Pella, Redding, CA) and kept in ACSF (126 mM NaCl, 15 mM dextrose, 26 mM NaHCO_3 , 0.2 mM thiourea, 0.2 mM ascorbic acid, 2.5 mM KCl, 1.3 mM MgCl_2 , 1.2 mM NaH_2PO_4 and 2.0 mM CaCl_2 ; pH = 7.4; 300 ± 5 mOsm/L) continually perfused with 95% O_2 and 5% CO_2 . Slices from control (Ctr) and lesioned (DA-depleted) animals were used. Since long-term data acquisition was required, a low photobleaching fluorophore (Thomas et al., 2000), Calcium Orange, was chosen. Slices were incubated in a Calcium Orange solution (Calcium Orange 8.2 μM , 0.1% DMSO, 0.67% Pluronic Acid in ACSF) at 36 °C for 40 min and later located in a perfusion chamber with constant ACSF flow under a 20X immersion objective (Olympus XLUMPLFN Objective, 1.00 NA, 2.0 mm WD). Observation field was 750 \times 750 μm . Fluorophore stimulation was carried out with a Lambda LS Illuminator (Sutter Instruments, Petaluma, CA, USA) and a 570/30 nm light filter. Im-Patch© an open source software designed in the LabView environment (National Instruments, Mexico City, Mexico; available at <http://Impatch.ifc.unam.mx>) was used for fluorescence recordings controlling a CoolSnap K4 camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA). Videos were 720–2160 frames long and acquisition rate was 6 frames/ s. To cover long periods, 7–10 videos were taken per experiment, making up to 90 min per experiment.

In order to confirm calcium fluorescence reliability as activity reporter simultaneous calcium and electrophysiological recordings were obtained using whole cell current-clamp configuration. Patch pipettes (3–6 M Ω) were filled with a solution that contains in mM: 115 KH_2PO_4 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 0.5 EGTA, 10 NaCl, 0.2 ATP, 0.2 GTP and 0.03 Calcium Orange salt, the pH was 7.24. As shown in Fig. 1G, the positive derivative $d(\Delta F/F)/dt$ of fluorescence transients coincide in time and duration with cell activity.

Data acquisition

Control striatum slices were compared in two main conditions: spontaneous activity and stimulation-evoked activity. Two stimuli were compared, the previously used pharmacological stimulation consisting in the application of 2 μM NMDA (Carrillo-Reid et al., 2008) and CtxS (Aparicio-Juárez et al., 2019) consisting in 10 pulses, at 40 Hz, 1.1–1.3 mA through a bipolar concentric electrode 50 μm at the tip (FHC, #CBCFE75, Bowdoin, ME, USA) inserted in primary motor cortex (M1) layer V as shown in Fig. 1F. Recordings were obtained in the adjacent dorsal, mostly dorsolateral, striatum in every case. DA-depleted striatum slices were also compared in two conditions: activity altered solely by dopaminergic agonists application (10 μM L-

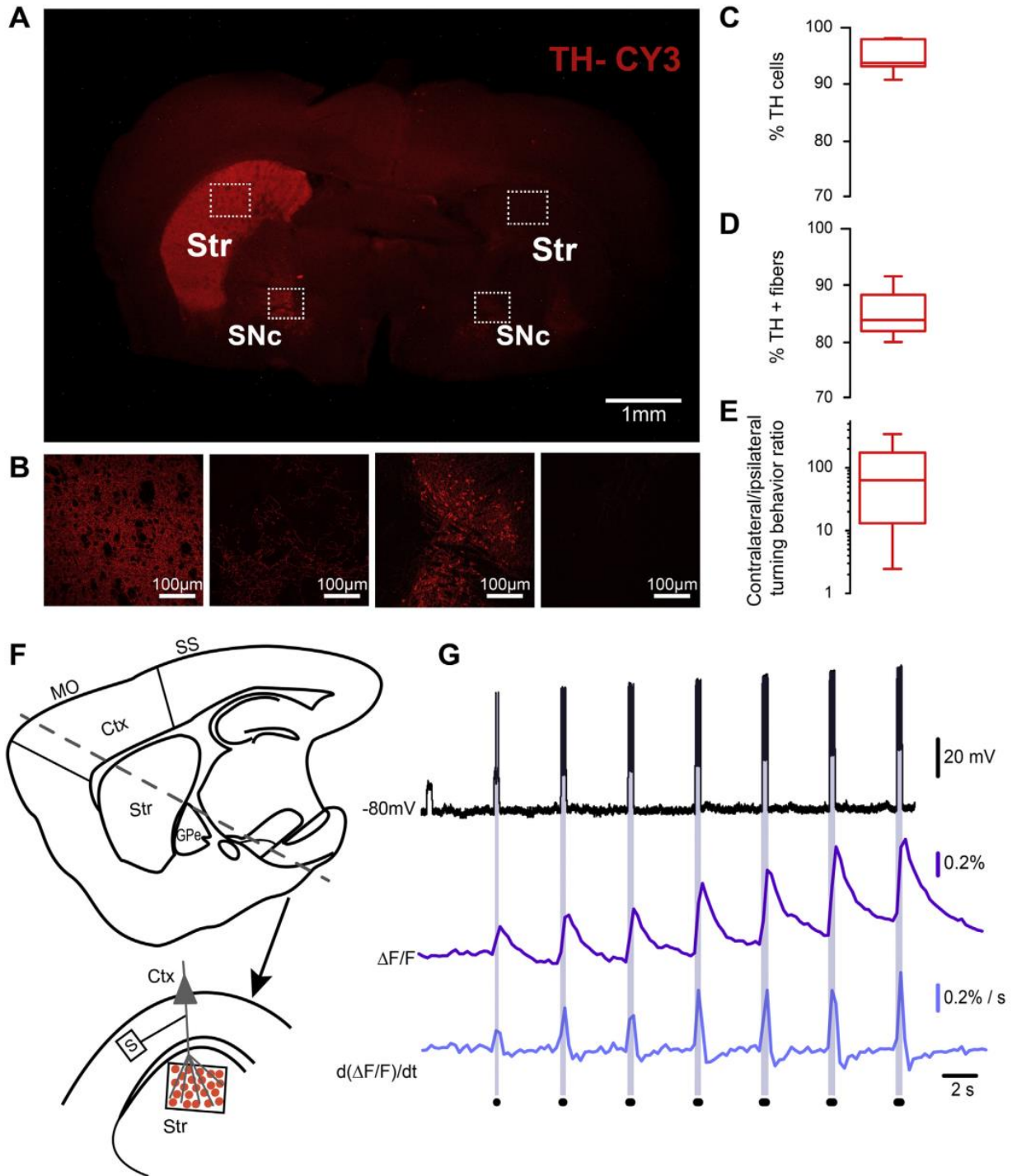


Fig. 1. (A) Stereoscopic fluorescence microscopy showing decreased TH-CY3 on the lesioned hemisphere (right) compared to the intact hemisphere (left) both on striatum (Str) and Substantia nigra compacta (SNc). (B) Confocal microscopy of chosen areas of the Str and SNc from both hemispheres. (C) Percentage reduction of TH+ cells somata in the SNc as compared to the non-lesioned side ($n = 17$ mice). (D) Percentage reduction of TH-immunoreactive (TH+) fibers ($n = 17$ mice; fluorescence intensity compared to the non-lesioned side). (E) Box plot showing unbalance in turning behavior evaluated in a sample of experimental animals ($n = 65$ mice; apomorphine 0.5 mg/Kg). Note variability. (F) Diagram of a sagittal mouse brain slice showing (dotted line) the orientation of a para-horizontal (30°) brain slice (top). Diagram of stimulation and recording sites: mostly motor cortex and dorso-lateral striatum, respectively (bottom). (G) Simultaneous electrophysiological (top signal) and calcium imaging recordings (middle) are shown. An intracellular current step of increasing strength was applied to evoke increasing numbers of action potentials and corresponding increases in calcium entry seen as changes in the fluorescence signal ($\Delta F/F$). The positive phase of the time derivative of the calcium transient, $d(\Delta F/F)/dt$, reports the duration of electrophysiological activity (bottom). These durations are denoted with dots in raster plots (bottom).

Benjamini-Hochberg procedure with a 0.05 FDR and recurrence index among different pharmacological conditions were compared using O'Brian Homogeneity of variance test.

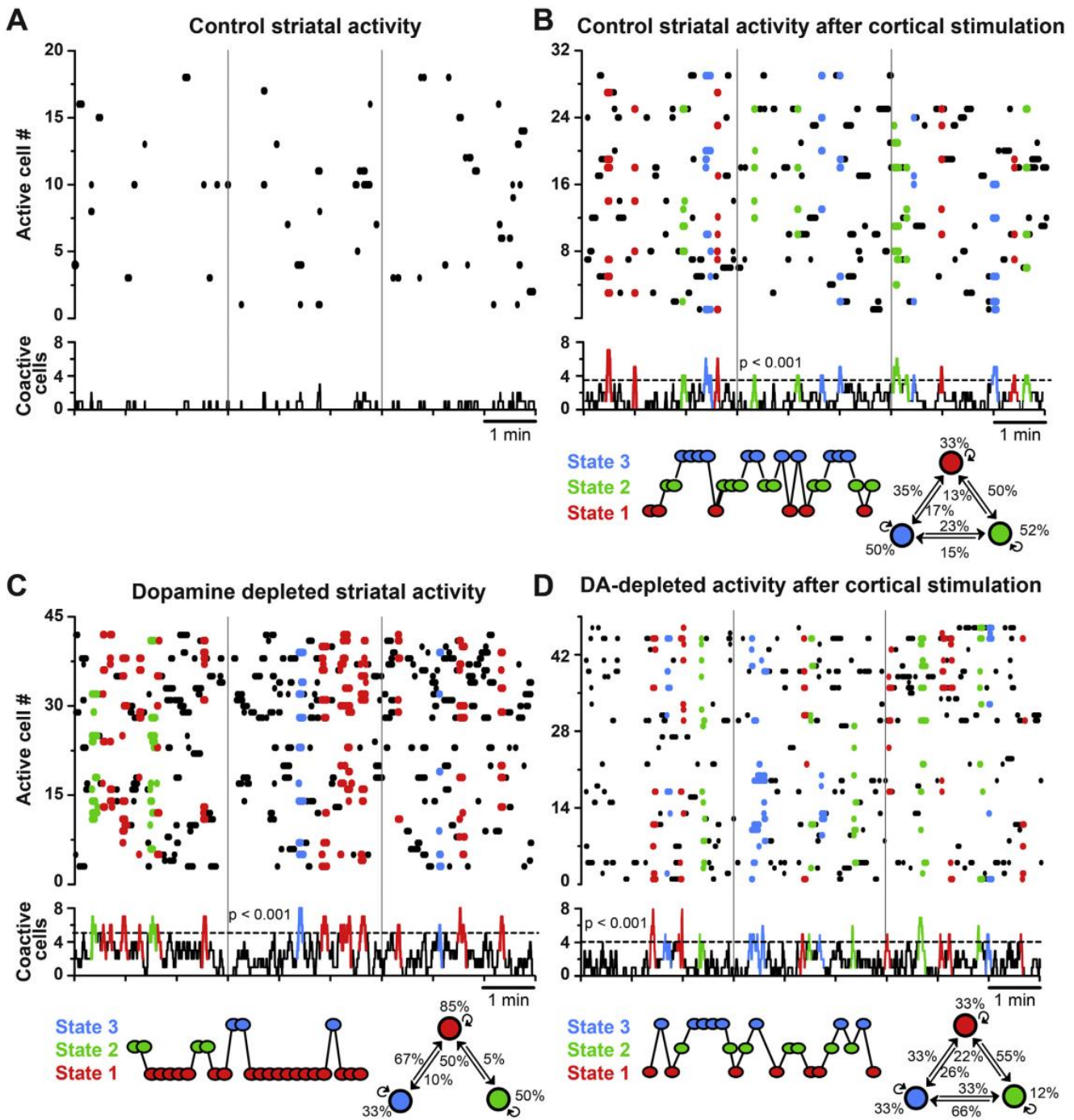
RESULTS

DA-depleted microcircuits differ from control striatal microcircuits

Microcircuit activity can be accurately recorded by calcium entry during neuronal firing (see Experimental Procedures and Pérez-Ortega et al., 2016), the positive time derivative

of a calcium transient corresponds in time and magnitude with action potentials firing (Fig. 1G). Microcircuit activity can be illustrated in the form of raster plots where rows in the y-axis represent the activity of each neuron in the microcircuit along time, and each dot the activity of a cell in one frame (Fig. 1G). Every raster plot in this work corresponds to a single brain slice taken from a single animal, there are no different experiments coming from the same slice or animal (Videos using calcium orange can be seen in Aparicio-Juárez et al., 2019 and in Video A of the present work).

As previously reported (Carrillo-Reid et al., 2008; Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016), the non-stimulated



control (Ctr) striatal microcircuit has little spontaneous activity (Fig. 2A), similar to that recorded in a resting subject in vivo (Mink, 2003; Parker et al., 2018). In contrast, after cortical stimulation (CtxS; 10 pulses at 40 Hz in cortex layer V see Experimental Procedures), the striatal microcircuit exhibits enhanced activity that may be recorded for a long time after the stimulus (Fig. 2B; see also Aparicio-Juárez et al., 2019), resembling that recorded during motor activity in vivo (Mink, 2003; Cacace et al., 2017; Parker et al., 2018). A similar increase in network activity and motor behavior may be recorded during the administration of NMDA (2 μ M), a glutamatergic receptor agonist, into the striatum (data not shown); see also Ossowska and Wolfarth, 1995; Carrillo-Reid et al., 2008). Both cortical stimulation and NMDA generate network dynamics characterized by the alternation or transitions between network states activity.

Histograms of cellular coactivity at the bottom of raster plots show the sum of neuronal activity per frame in each panel (Fig. 2A–D). The threshold to consider a significant peak of coactivity is represented by a dotted line ($P < 0.001$). In control conditions there are no significant peaks of coactivity (Fig. 2A; $n = 12$ experiments) due to low spontaneous activity; frames with no activity can be recorded. In contrast, after delivering a cortical stimulus (CtxS; Fig. 2B; $n = 5$; see Aparicio-Juárez et al., 2019), network activity is enhanced and displays significant peaks of neuronal coactivity (Fig. 2B) as compared to non-stimulated controls (cf., Fig. 2A). Similarly, the non-stimulated DA-depleted striatal microcircuit (Fig. 2C; $n = 33$) exhibits significant spontaneous activity as compared to the non-stimulated controls (cf., Fig. 2A) accompanied by several significant coactivity peaks (histogram below raster plot in Fig. 2C) without any electrical or chemical stimulus. Significant coactivity peaks in a stimulated control (Fig. 2B), non-stimulated DA-depleted microcircuit (Fig. 2C) and stimulated DA-depleted microcircuits (Fig. 2D) are illustrated as colored circles below the histograms (network states). Note that in stimulated control and DA-depleted microcircuits (Fig. 2B and D) network states form chain-like sequences with alternation of activity between network states (Buzsáki, 2010; Pérez-Ortega et al., 2016) including closed

ring-like cycles, or reverberations. In contrast, the non-stimulated DA-depleted microcircuit exhibits a sequence of network states in which a highly recurrent state greatly curtails the alternation with other states (Fig. 2C bottom, dominant state colored in red; $n = 33$), as previously described in rats and mice (Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016; Aparicio-Juárez et al., 2019; Jáidar et al., 2019).

We then compared network activity in these microcircuits. The cumulative activity of every neuron, that is, the area obtained under the histograms of summed activity, was calculated for each experiment, and representative examples are shown in Fig. 3A. Straight lines were fitted to these data and the slope values for each neuron representing activity of each cell along time (active / non-active frames) were graphed as box plots (Fig. 3B). The non-stimulated Ctr microcircuit had significantly less activity than all the other conditions ($P < 0.001$; Kruskal-Wallis ANOVA, FDR correction: Ctr + CtxS, $*P = 0.008$; Ctr + NMDA, $**P = 0.002$; non-stimulated DA-depleted striatum, $***P < 0.0001$; DA-depleted + CtxS striatum, $**P = 0.0015$). Activity levels between stimulated controls ($P = 0.74$) and DA-depleted stimulated microcircuits (Ctr + CtxS, $P = 0.96$; Ctr + NMDA, $P = 0.74$) and non-stimulated DA-depleted microcircuits to stimulated conditions (Ctr + CtxS, $P = 0.5$; Ctr + NMDA, $P = 0.8$; DA + depleted + CtxS, $P = 0.43$) showed no significant differences using this test. We conclude that differences between stimulated and non-stimulated DA-depleted microcircuits are not based on the number of active neurons but the dynamics represented by the sequences of network states (Fig. 2, see also Aparicio-Juárez et al., 2019).

We next calculated cumulative distribution functions (CDFs) for cell activity by adding up the cells from all experiments in each condition (Fig. 3C). Extremes of the CDFs are non-stimulated Ctr ($n = 449$ cells, black trace) and non-stimulated DA-depleted ($n = 1258$ cells, gray trace). Stimulated controls and stimulated DA-depleted cases stand between both extreme conditions (Ctr + CtxS, $n = 173$ cells and DA-depleted + CtxS, $n = 287$ cells). Ctr + CtxS vs. DA-depleted + CtxS were not significantly different, suggesting that stimulation relieves the pathologic state found in the DA-depleted microcircuit (Pérez-Ortega et al., 2016;

Fig. 2. Striatal microcircuit activity in vitro: comparing spontaneous, stimulated, DA-depleted and DA-depleted stimulated conditions. (A–D top) Representative raster plots showing neuronal activity in single experiments of Ca^{2+} imaging recording with single cell resolution (each row in the y-axis shows the activity of a single cell - numbered; x-axis is time in min, in this and other related figures). Each dot in the plot represents firing as the first time derivative of the somatic Ca^{2+} transient from a single cell (Pérez-Ortega et al., 2016). Histograms at the middle in panels A to D show cellular coactivity and significant neuronal coactivity peaks (dotted line denotes significance level). Neurons belonging to the same neuronal ensembles are presented by different colors in their respective coactivity peaks. (A) Control striatal activity without stimulation shows little spontaneous activity (top), intervals without activity, and no significant coactive events (bottom). (B) Administration of an adequate cortical stimulus (CtxS; see Experimental Procedures and Aparicio-Juárez et al., 2019) increases overall activity in the circuit (top) reflected by significant peaks of coactivity (middle) made by different neuronal groups (colored). Each significant coactivity peak is represented by a colored circle at the bottom showing a sequence of activation of network states. The sequence of activation shows alternation between states which may reach closed cycles or reverberations (triangle at bottom right). (C) In contrast to control (panel A), non-stimulated dopamine (DA) depleted striatum shows high overall spontaneous activity (top), without applying any electrical or chemical stimuli. Significant coactivity peaks are also present (middle). However, sequences of network states show that most activity is due to a highly recurrent state (red). This behavior disrupts alternation and reverberations during the time shown (bottom right). (D) Administration of a cortical stimulus in a DA-depleted striatum dissolves the highly recurrent state and more diverse neuronal ensembles reappear as significant peaks of coactivity (middle). The sequence of network states shows again alternation (bottom) and reverberation (bottom right) between network states. Raster-plots are representative examples of samples in each condition (non-stimulated control, $n = 12$ experiments; Ctr + CtxS, $n = 5$ experiments; non-stimulated DA-depleted striatum, $n = 33$ experiments; DA-depleted + CtxS, $n = 7$ experiments).

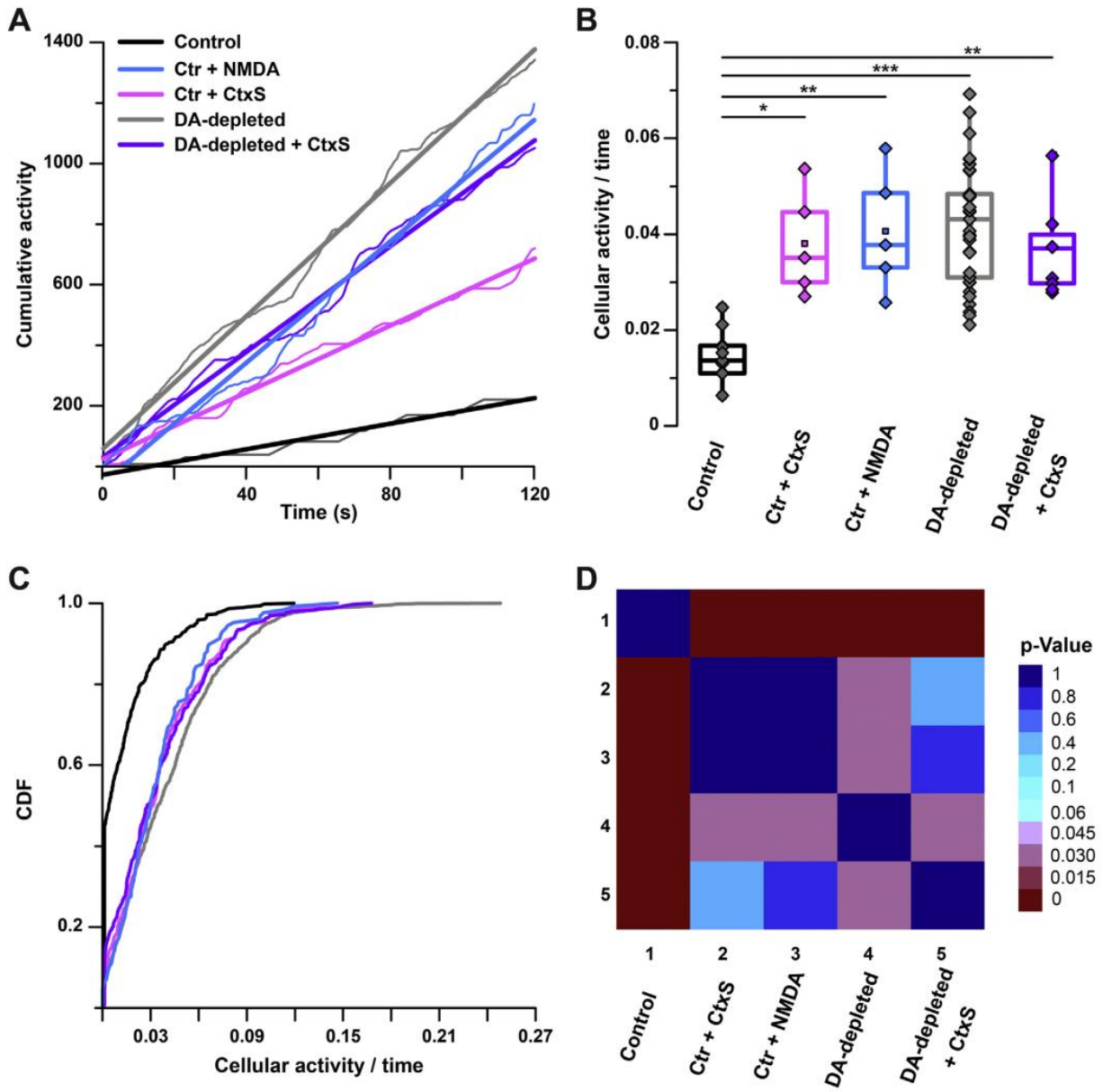


Fig. 3. Measurements of microcircuit activity in different conditions: control (Ctr) without any stimulus, control plus cortical stimulation (Ctr + CtxS), control plus NMDA administration (Ctr + NMDA), non-stimulated DA-depleted tissue (DA-depleted) and cortically stimulated DA-depleted microcircuits (DA-depleted + CtxS). (A) Cumulative activity graphs from single representative experiments as those in Fig. 2 were built adding the areas under activity histograms along time. Straight lines are fitted to the data and the slopes of fitted lines denote cellular activity along time (activity/time). (B) Box and density plots of cellular activity along time in samples of different conditions, each point is a slope obtained as in (A). All conditions are significantly different to the control (Kruskal-Wallis test with post-hoc FDR test; $P < 0.001$) but there are no differences between Ctr + CtxS, Ctr + NMDA and DA-depleted + CtxS with or without stimulation, suggesting that the level of activity is equivalent (Ctr, $n = 12$ experiments; Ctr + CtxS, $n = 5$ experiments; Ctr + NMDA, $n = 5$ experiments; non-stimulated DA-depleted, $n = 33$ experiments; DA-depleted + CtxS, $n = 7$ experiments), implying that differences between control and DA-depleted circuits reside in the dynamics and not the level of activity. (C) Still, we built Cumulative distribution functions (CDFs) using all cells from the different experimental samples in each condition: (Ctr, $n = 449$ cells; Ctr + CtxS, $n = 173$ cells; Ctr + NMDA, $n = 127$ cells; DA-depleted, $n = 1258$ cells; DA-depleted + CtxS, $n = 287$ cells). For these data, Kolmogorov Smirnov test (with post hoc pair-wise comparisons using FDR (Benjamini et al., 2006)) yielded significant differences between the non-stimulated DA-depleted circuit and stimulated Ctr and DA-depleted circuits. (D) A matrix of the significant P values confirms that control non-stimulated microcircuit differs from all four conditions. The non-stimulated DA-depleted condition shows activity significantly higher to that from Ctr + CtxS, Ctr + NMDA and DA-depleted + CtxS microcircuits. No significant differences between Ctr + CtxS, Ctr + NMDA and DA-depleted + CtxS conditions were found. *denotes statistical significance in this and other figures. FDR stands for false discovery rate correction.

Aparicio-Juárez et al., 2019). A difference with non-stimulated DA-depleted microcircuits and Ctr stimulated circuits was revealed ($P < 0.03$; Kolmogorov Smirnov tests, FDR

correction test). A color matrix with post hoc FDR corrected test P-values is shown in Fig. 3D. Note that there are no significant differences between Ctr + NMDA and Ctr + CtxS

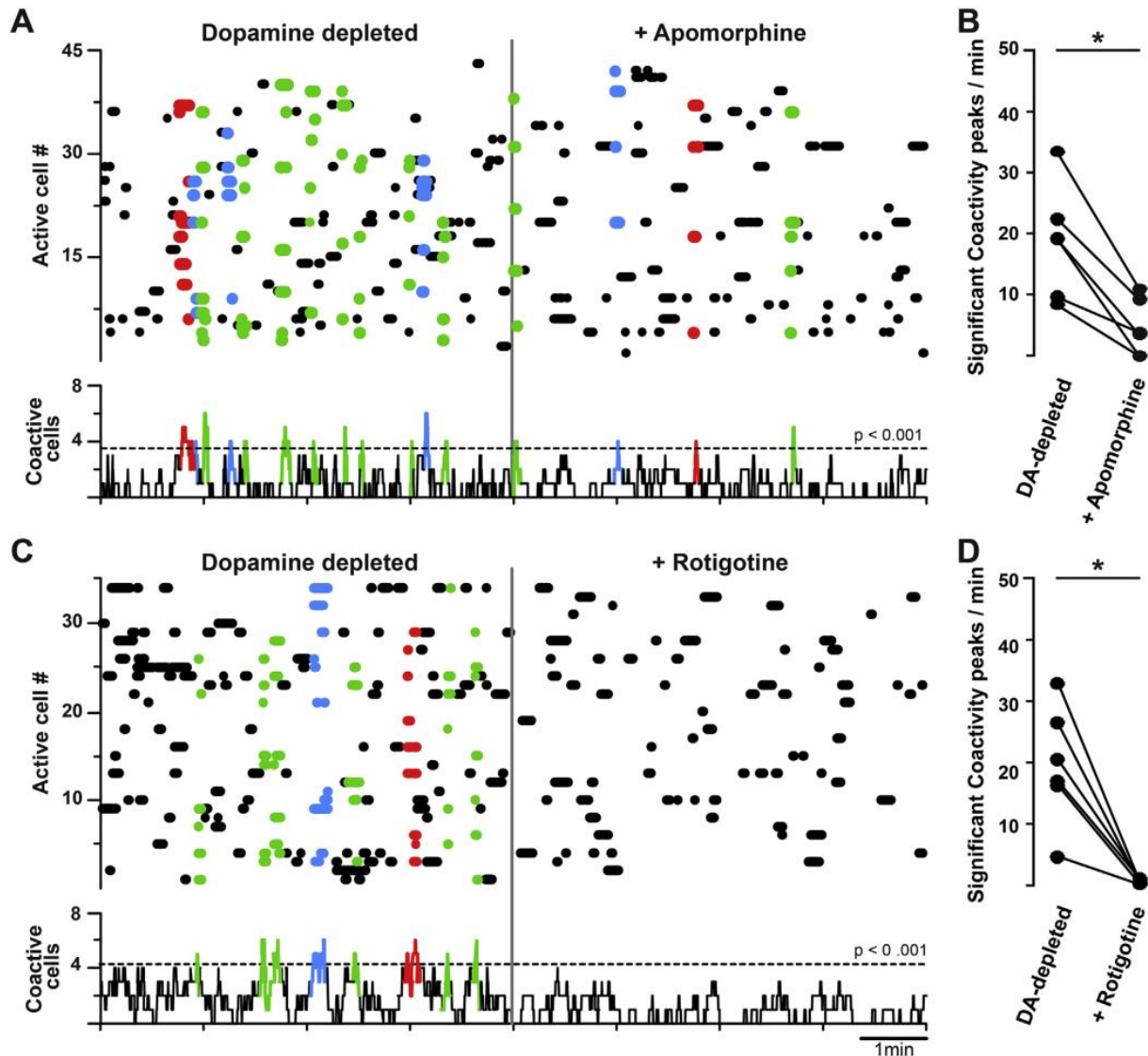


Fig. 4. $D_{1,2}$ -class of DA-agonists decrease the spontaneous activity of DA-depleted microcircuits in vitro. Left sections of the raster plots (A and C) show representative non-stimulated DA-depleted microcircuit activity. Notice that in both cases peaks of significant coactivity and a highly recurrent ensemble are evident (green) prior to DA-agonists administration as shown in the histograms below. DA-agonists were added after the vertical line. (A) Addition of apomorphine (20 μ M) reduces the number of significant coactivity peaks. (B) The reduction of coactivity peaks per minute significantly decreased after apomorphine administration compared with DA-depleted microcircuit without treatment ($n = 6$ experiments; Wilcoxon matched pairs signed rank test or Wilcoxon T test, $P = 0.0313$). (C) Addition of rotigotine (10 μ M) not only decreased overall activity but also eliminated most significant peaks of coactivity (bottom). (D) This is clear when comparing significant peaks of coactivity per minute before and after rotigotine administration ($n = 6$ experiments; $P = 0.0313$; Wilcoxon T test).

conditions, suggesting that both ways to activate striatal microcircuits are equivalent.

Dopamine receptor agonists reduce enhanced spontaneous activity in the DA-depleted microcircuit

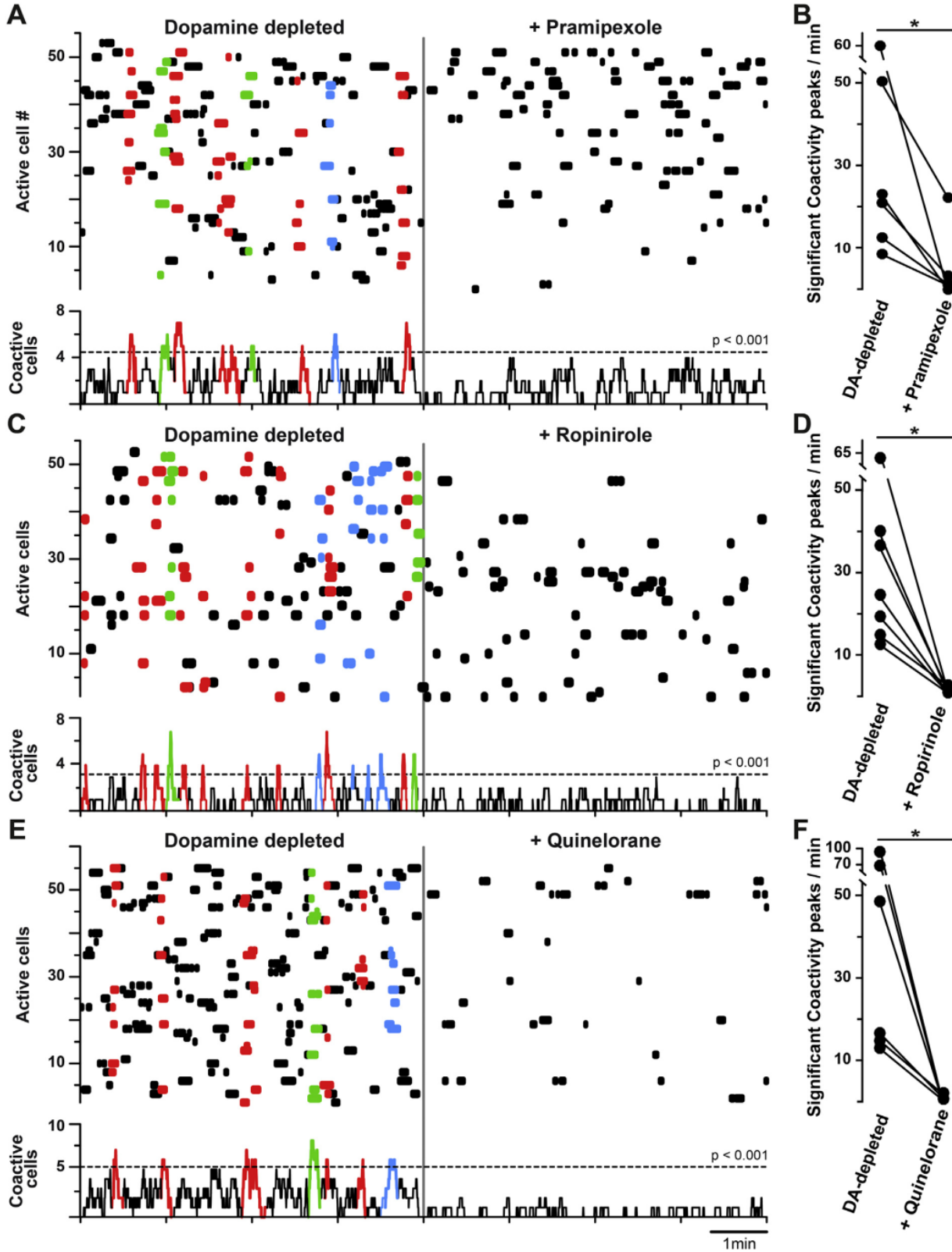
Typically, the DA-depleted microcircuit exhibits an excess of activity compared to non-stimulated controls (cf., Fig. 2A and C). Previously, we demonstrated that the application of L-DOPA reduces spontaneous activity of the DA-depleted microcircuit to control-like levels and that this action is reversible upon washing off L-DOPA (Plata et al., 2013). Now, we compare dopamine receptor agonists (DA-agonists) in the

absence of stimulus. First, we tested less selective DA-agonists (Fig. 4), that is, agonists with considerable actions on both D_1 and D_2 receptor classes. The most used in PD treatment are apomorphine and rotigotine, which bind to both D_1 - and D_2 -class receptors with different affinities.

$D_{1,2}$ -class agonists reduced the enhanced spontaneous activity of DA-depleted microcircuits. Both 20 μ M apomorphine (Fig. 4A; representative raster; the gray line divides activity before and after administering the drug) and 10 μ M rotigotine (Fig. 4B, representative) showed similar effects by reducing microcircuit activity significantly. Coactivity peaks per minute were compared before and after drug administration (Wilcoxon T test), and their reduction was demonstrated

in samples of both apomorphine (Fig.4B, n = 6 experiments; P = 0.0313) and rotigotine (Fig. 4D; n = 6 experiments; P = 0.0313). The assay shows that at therapeutic but saturating concentrations rotigotine performance is better than that of apomorphine.

More selective D₂-class (D_{2/3}) receptor agonists are also used for the early treatment of PD (Stocchi et al., 2016). To explore the effects of these agonists on the enhanced spontaneous activity of DA-depleted microcircuits, 10 μM pramipexole (Fig. 5A; n = 6 experiments), 10 μM ropinirole (Fig. 5C;



$n = 7$ experiments) and $10 \mu\text{M}$ quinlorane (Fig. 5E; $n = 6$ experiments) were applied. All of them reduced the excess in spontaneous activity of DA-depleted microcircuits (pramipexole: Fig. 5B, $P = 0.0313$; ropinirole: Fig. 5D; $P = 0.0156$; quinlorane: Fig. 5F; $P = 0.0313$; Wilcoxon T tests). To conclude, all DA-agonists tested reduced the pathological spontaneous activity of DA-depleted microcircuits.

D₂-class receptor agonists were more effective in decreasing the spontaneous activity of DA-depleted microcircuits

All DA-agonists reduced the excess in pathological spontaneous activity of non-stimulated DA-depleted microcircuits (see previous section). To better evaluate whether there were differences between the different DA-agonists, a Kruskal-Wallis ANOVA analysis with FDR post hoc correction test between the cumulative cellular activity was made (Fig. 6A). As previously mentioned, spontaneous neuronal activity of the non-stimulated DA-depleted microcircuit was significantly enhanced in comparison with non-stimulated Ctr microcircuit ($P < 0.0001$; control: $n = 12$ experiments; DA-depleted microcircuit: $n = 33$ experiments). Then we compared the activity of DA-depleted microcircuits after a DA-agonist was added with that of non-stimulated DA-depleted microcircuits (Kruskal-Wallis ANOVA, $P < 0.0001$, post hoc FDR correction test). Activity in non-stimulated DA-depleted circuits was significantly larger than the activity in DA-depleted microcircuits plus L-DOPA (Fig. 6A; $P = 0.0004$; $n = 7$ experiments), confirming previous studies (Plata et al., 2013). Surprisingly, however, DA-depleted microcircuits treated with apomorphine or rotigotine were not significantly different from the non-stimulated DA-depleted microcircuits (Fig. 6A; $P = 0.99$; $n = 6$ experiments and Fig. 6A; $P = 0.5$; $n = 6$ experiments), suggesting that less selective agonists have a more limited action on the spontaneous activity of DA-depleted microcircuits (Jáidar et al., 2010). Nonetheless, when adding more selective D₂-agonists to DA-depleted microcircuits, activity was significantly less than that found in untreated DA-depleted microcircuits, namely: pramipexole (Fig. 6A; $P = 0.00015$; $n = 6$ experiments), ropinirole (Fig. 6A; $P = 0.0001$; $n = 8$ experiments) and quinlorane (Fig. 6A; $P = 0.0001$; $n = 6$ experiments). These results suggest that more selective D₂-class agonists were better than less selective D_{1,2}-class agonists in reducing the excess of spontaneous activity observed in non-stimulated DA-depleted microcircuits.

An even more stringent test was performed by comparing cumulative probability distribution functions (CDFs) for each condition using all cells from each experiment (Fig. 6B–D). First, we compared non-stimulated control CDF ($n = 449$ cells, black trace; Fig. 6B) with that of the non-stimulated DA-depleted

microcircuit ($n = 1258$ cells, gray trace; Fig. 6B), and with the DA-depleted + L-DOPA ($n = 232$ cells, red trace; Fig. 6B). There was no significant difference between control microcircuit activity and DA-depleted microcircuit plus L-DOPA ($P = 0.15$; Kolmogorov–Smirnov test with FDR correction), suggesting that in this stage of experimental early Parkinsonism (i.e., “L-DOPA honey moon”), L-DOPA tends to return the microcircuit dynamics to control conditions. As expected, the CDF of the non-stimulated DA-depleted microcircuit was significantly different from these two conditions, its CDF was far right to control and L-DOPA CDFs (Fig. 6B; see graded pseudocolored matrix of paired P-values in Fig. 6E).

Using this stringent test, most DA-agonists employed could not match L-DOPA actions (Fig. 6C and D; see graded pseudocolored matrix of paired P-values in Fig. 6E Kolmogorov–Smirnov test with FDR corrections). However, quinlorane was not significantly different from the non-stimulated control (207 cells, $P = 0.06$). Every other CDF was significantly different from control CDF: apomorphine = 262 cells, $P = 6.6 \times 10^{-12}$; rotigotine = 139 cells, $P = 5.0 \times 10^{-6}$; pramipexole = 255 cells, $P = 0.004$; ropinirole = 249 cells, $P = 0.006$. This analysis showed that apomorphine and rotigotine CDFs were to the right of the control and L-DOPA CDFs (Fig. 6C), while D₂-agonists CDFs superimpose in part with control and L-DOPA CDFs (Fig. 6D). We conclude that D₂-agonists better reduce the excess of spontaneous activity of non-stimulated DA-depleted microcircuits, but no agonist completely emulates L-DOPA actions in this respect. Up to now, we have compared non-stimulated DA-depleted microcircuits before and after addition of L-DOPA or DA-agonists: all DA-agonists reduced spontaneous resting pathological activity when compared one by one. Though, only L-DOPA (and to a minor extent quinlorane) approached the activity of non-stimulated controls. Activity remained significantly different from control microcircuit after the reduction of pathological activity by any of the DA-agonists. It has been previously demonstrated (Aparicio-Juárez et al., 2019, Fig. 2D) that cortical stimulation reduces overall activity restoring neural ensembles sequences similar to control for a limited period of time. Therefore, we asked how DA agonists would interact with this action, perhaps prolonging it. In addition, a comparison between DA agonists actions may suggest which are the more effective.

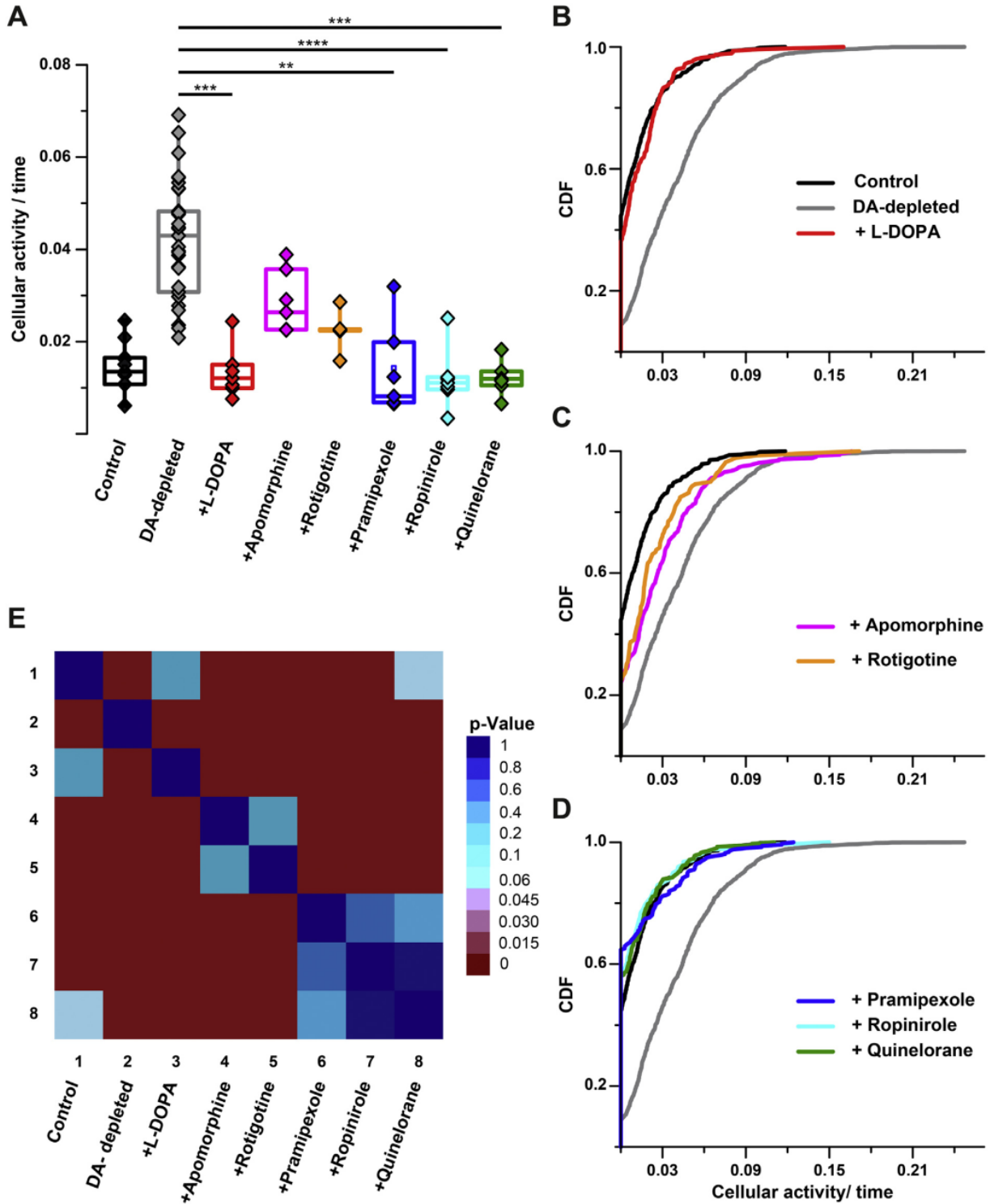
DA-agonists actions on cortical stimulated DA-depleted microcircuits

To answer the previous questions CtxS was applied to DA-depleted microcircuits previously infused with L-DOPA or other DA-agonists. First, a representative raster plot of L-DOPA is shown in Fig. 7A (top) divided into three different epochs separated by vertical lines. Left epoch shows the

Fig. 5. Comparison of D₂-class receptor agonists effects on DA-depleted microcircuits in vitro. Panels: representative raster plots of spontaneously active DA-depleted microcircuits before and after addition of a dopamine D₂-class receptor agonist (separated by a vertical line). Histograms at bottom show significant peaks of coactive neurons in the same frame. Dotted lines on the histograms show the significance coactivity threshold to record a neuronal ensemble. (A) Representative experiment showing DA-depleted microcircuit spontaneous activity and the reduction of this activity after addition of $10 \mu\text{M}$ pramipexole. (B) Pramipexole reduced the number of significant peaks of coactivity per min ($n = 6$ experiments; $P = 0.0313$; Wilcoxon T test). (C) After the vertical line $10 \mu\text{M}$ ropinirole was added to the DA-depleted microcircuit. (D) Reduction of coactivity peaks is obvious ($n = 7$ experiments; $P = 0.0156$; Wilcoxon T test). (E) When adding $10 \mu\text{M}$ quinlorane reduction of activity was evident and (F) coactivity peaks were virtually abolished ($n = 6$ experiments; $P = 0.0313$; Wilcoxon T test).

typical spontaneous activity of a DA-depleted microcircuit. Middle epoch shows the decrease of this spontaneous activity due to L-DOPA administration. Right epoch illustrates network activity after cortical stimulation (CtxS) in the continuous presence of L-DOPA, showing that activity is enhanced again. Coactivity histograms and sequences of transitions between network states (below the raster plots) show significant coactivity peaks in the DA-depleted microcircuit both before and after CtxS + L-DOPA.

However, a difference is evident: the untreated DA-depleted microcircuit exhibits a highly recurrent network state that impedes reverberation (bottom), while the stimulated DA-depleted microcircuit in the presence of L-DOPA shows a variety of coactivity peaks and alternation between network states including reverberation (bottom; $n = 4$ experiments, see also Aparicio-Juárez et al., 2019) resembling control activity (see Fig. 2A). In the presence of L-DOPA the DA-depleted microcircuit is able respond to a



cortical command with near control-like dynamics: a sequence of network states. This experimental protocol was then applied to DA-depleted microcircuits when administering rotigotine, a representative $D_{1,2}$ -agonist (Fig. 7B), pramipexole, a more selective D_2 -agonist ($D_{2,3}$; Fig. 8A) and ropinirole, another D_2 -agonist (Fig. 8B). Similar results to the sole administration of L-DOPA were obtained: prior to stimulation a highly recurrent state is impeding alternation and DA-agonists application have a silencing effect. When CtxS was delivered in the continuous presence of DA-agonists, network dynamics became a sequence of alternating network states.

Specifically, rotigotine induced less peaks of coactivity than L-DOPA (Mann–Whitney T test, $P = 0.02$), although it restored alternation between network states and closed cycles. On the other hand, pramipexole induced a more balanced alternation between network states, although in the experiment shown, closed cycles did not appear (see statistics below). Ropinirole did not restore alternation completely during the sequence of network states, but closed cycles could be present in some cases.

Performance comparison of DA-agonists on cortical activated DA-depleted microcircuits

As shown in Fig. 2, CtxS briefly and transiently recovers control stimulated network dynamics in DA-depleted microcircuits by inducing a sequence of network states activity, similar to that induced in Ctr circuits. However, this change towards control dynamics only lasts approximately 30 min (Fig. 9A top), unless L-DOPA is administered (see Aparicio-Juárez et al., 2019). In that case, a DA-depleted circuit activated by CtxS maintains the alternation of network states for a longer period of time, e.g., 60 min. Therefore, here we compare the actions of CtxS plus the presence of L-DOPA or other DA-agonists (after 60 min), and solely CtxS (30 min), over DA-depleted circuits. First, we used the number of transitions between network states to achieve a closed cycle, a measure of how much alternation between network states is allowed by the circuit (Pérez-Ortega et al., 2016), presented in pie plots (Fig. 9A). A

colored scale (at the bottom) shows the number of transitions required to reach a closed cycle, where black color indicates the cases in which a closed cycle was not reached during the time of recording. Even in control conditions (Ctr + CtxS) sequences of neuronal ensembles may not reach a closed cycle during the course of the experiment (12%). When DA-depleted microcircuits receive a cortical stimulus (DA-depleted + CtxS) the highly recurrent state is transiently abolished and microcircuit dynamics resembles that of the Ctr + CtxS microcircuits (Fig. 9A top): where only a minority of sequences do not reach closed cycles (18%; $P = 0.206$; Kolmogorov–Smirnov test with post hoc FDR correction). This confirms that cortical stimulation briefly (30 min) relieves the microcircuit from the highly recurrent state as previously reported (Aparicio-Juárez et al., 2019). The maintenance of control-like network dynamics in stimulated DA-depleted microcircuits for longer time, e.g., 60 min, requires the action of L-DOPA (Aparicio-Juárez et al., 2019). Therefore, here we compared to what extent different DA-agonist could prolong the action of CtxS in terms of network alternation sequences and closed cycles (Pérez-Ortega et al., 2016).

It was found that, even if L-DOPA induces alternation of network states in the stimulated condition, a higher percentage of non-closed cycles, 36%, is revealed as compared with Ctr + CtxS ($P = 0.007$; $n = 4$ experiments; Kolmogorov–Smirnov test with post hoc FDR correction in this and next comparisons of this section). Still, most sequences had closed cycles. Using the same test other agonists yield: rotigotine ($P = 0.002$, $n = 4$ experiments), pramipexole ($P = 0.016$, $n = 4$ experiments) and ropinirole ($P = 1 \times 10^{-9}$, $n = 4$ experiments). The results suggest that even when active DA-depleted circuits exhibit sequences of network states. However, no DA-agonist, including L-DOPA, is capable of completely resembling the Ctr + CtxS circuit.

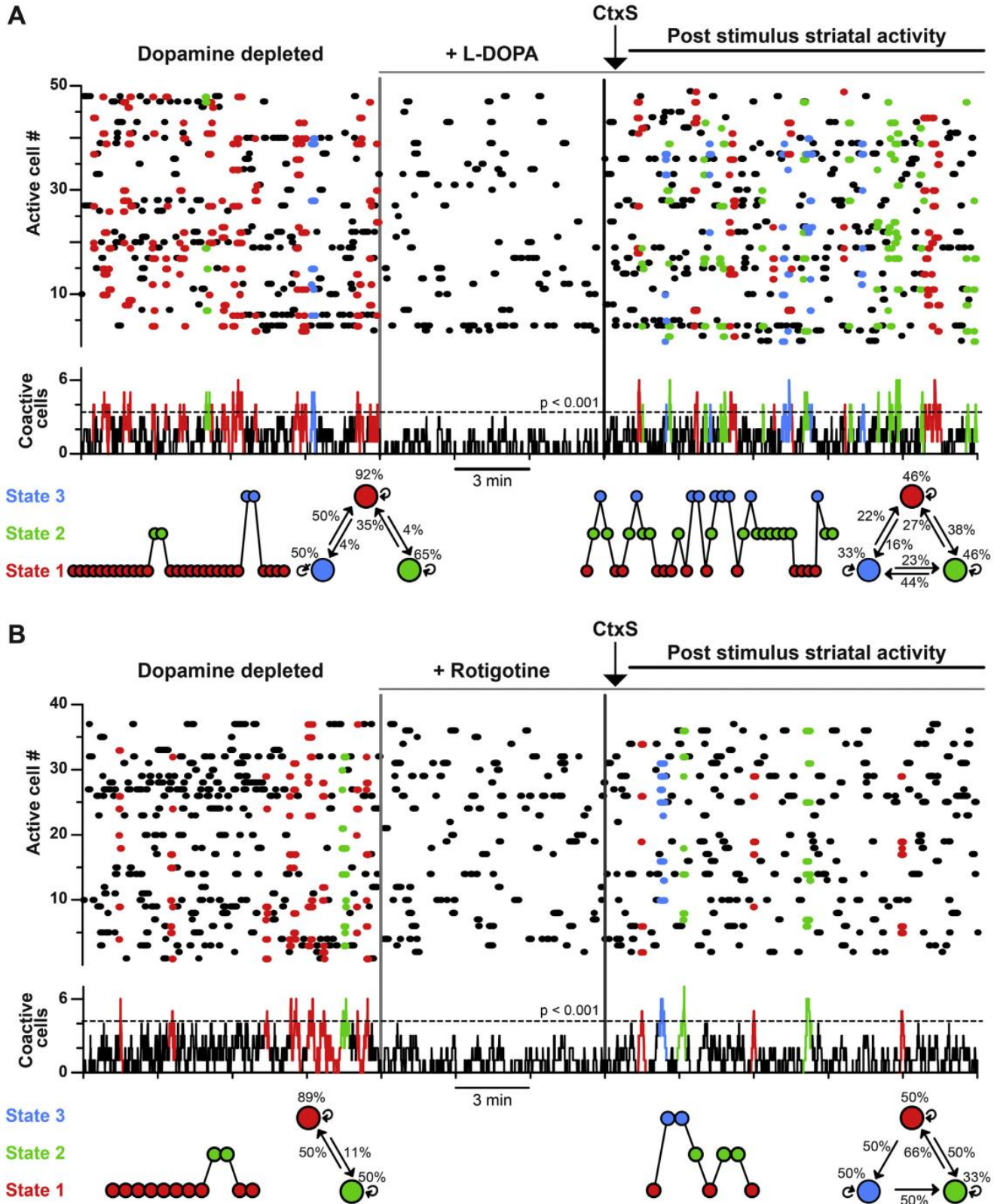
Since all active DA-depleted circuits exhibit several closed cycles we asked how many transitions between network states were needed to reach them, excluding the instances in which there were no closed cycles during recording time. Fig. 9B shows this comparison with density plots: Ctr + CtxS distribution was compared (Kruskal–Wallis

Fig. 6. D_2 -class receptor agonists were more effective in decreasing the excess of spontaneous activity in DA-depleted microcircuits. (A) As in Fig. 3B, cellular activity over time was compared among the different experimental conditions (experiments/condition: non-stimulated control (Ctr) = 12, non-stimulated DA-depleted = 33, non-stimulated DA-depleted + L-DOPA = 7, +apomorphine = 6, +rotigotine = 6, +pramipexole = 6, +ropinirole = 8, +quinelorane = 6). As previously mentioned, activity over time of the non-stimulated DA-depleted microcircuit is significantly larger than that of the non-stimulated control microcircuit ($P < 0.0001$). DA-depleted microcircuit activity significantly decreased (Kruskal–Wallis ANOVA, $P < 0.0001$, with FDR correction) after administration of L-DOPA ($P < 0.0004$), and D_2 -class agonists, namely: pramipexole ($P = 0.00015$), ropinirole ($P = 0.0001$) and quinelorane ($P = 0.0001$). However, $D_{1,2}$ -class agonists: apomorphine ($P = 0.99$) and rotigotine ($P = 0.5$) failed to differ from the DA-depleted microcircuit. (B) Cumulative distribution functions (CDFs) of cell activity from: non-stimulated control ($n = 449$ cells; black trace); non-stimulated DA-depleted ($n = 1258$ cells; gray trace) and DA-depleted + L-DOPA ($n = 232$ cells; red trace) microcircuits. Note that when adding L-DOPA to the DA-depleted microcircuit its CDF greatly resembles the one from control microcircuit ($P = 0.15$; Kolmogorov–Smirnov test with FDR correction). Non-significant differences with non-stimulated controls predicts a good therapeutic effect. (C) In this respect, CDFs from DA-depleted microcircuits after the addition of apomorphine ($n = 262$ cells; $P = 6.6 \times 10^{-12}$) and rotigotine ($n = 139$ cells; $P = 5.0 \times 10^{-6}$) showed significant differences with non-stimulated controls, that is, less selective DA-agonists did not approach the control; these DA-agonists stay in between non-stimulated Ctr and non-stimulated DA-depleted circuits. (D) In addition, compared to control CDF, CDFs from DA-depleted microcircuits after the addition of D_2 -class selective DA-agonist were also significantly different to non-stimulated Ctr: pramipexole ($n = 255$ cells; $P = 0.004$), ropinirole ($n = 249$ cells; $P = 0.006$) and quinelorane ($n = 207$ cells; $P = 0.06$). However, the CDFs of these DA-agonists are nearer to control CDF (black line). (E) A matrix of P-values from pairwise comparisons, based on CDFs (Kolmogorov–Smirnov test with FDR corrections) shows that only the action of L-DOPA was not statistically different from control activity. All DA-agonists statistically differ from the control using this stringent test. D_2 -agonists do not differ much among them.

ANOVA with post hoc FDR correction) with: DA-depleted microcircuits plus CtxS at 30 min ($P = 0.149$), and with DA-depleted microcircuits plus CtxS and DA-agonists at 60 min: L-DOPA ($P = 0.736$), rotigotine ($**P = 0.003$), pramipexole ($P = 0.199$) and ropinirole ($***P = 0.001$). These

results suggest that L-DOPA and pramipexole have a better performance than rotigotine and ropinirole in DA-depleted microcircuit dynamics.

In order to unveil drugs' efficacy while making a hierarchical scale between them we used the recurrence index test



(Aparicio-Juárez et al., 2019), a measure of how much a pathological microcircuit has a highly recurrent network state that curtails alternation between neuron groups. Using this metric, all DA-agonists were significantly similar to control stimulated circuits (O'Brien homogeneity of variance test): DA-depleted + CtxS (30 min) $P = 0.073$, and at 60 min: L-DOPA + CtxS ($P = 0.186$); rotigotine + CtxS ($P = 0.079$); pramipexole + CtxS ($P = 0.214$); ropinirole + CtxS, $P = 0.071$). These results suggest that clinically available DA-agonists help maintaining microcircuit dynamics away from the typically highly recurrent dominant state network seen in DA-depleted conditions, even if they fail to completely preserve CtxS effects along time.

DISCUSSION

Previously, we have described some properties of the striatal microcircuit at histological scale (dozens of neurons) in vitro, to compare controls with DA-depleted microcircuits (Carrillo-Reid et al., 2008; Jáidar et al., 2010; Carrillo-Reid et al., 2011; López-Huerta et al., 2013; Pérez-Ortega et al., 2016). Because between molecular-cellular studies (Millan, 2010) and in vivo animal models (Liang et al., 2008; Dunnet and Lelos (2010) or clinical studies (Lam, 2000), there is a gap: pharmacological tools or studies at the microcircuit level in vitro, where drug concentrations can be controlled. The present work intends to use some previously described striatal microcircuit properties in vitro to compare antiparkinsonian agents used in PD therapeutics.

Spontaneous striatal activity

As seen in vitro, non-stimulated control striatal microcircuits at a histological scale show little activity (Plata et al., 2013; Aparicio-Juárez et al., 2019), similar to the activity seen in resting subjects in vivo (Mink, 2003; Parker et al., 2018). In contrast, striatal microcircuits depleted of dopamine show a significantly enhanced spontaneous activity, mainly consisting of a highly recurrent network state (Liang et al., 2008; Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016; Jáidar et al., 2019), with both indirect and direct pathway striatal projection neurons (Parker et al., 2018; Jáidar et al., 2019). Because the non-stimulated microcircuit behaves differently in control and after DA-depletion, exhibiting different functional network architectures (Pérez-Ortega et al., 2016), here we considered the non-stimulated and stimulated microcircuits separately.

The present results show that pramipexole, ropinirole and quinlorane, more selective D_2 -class DA-receptor agonists

($D_{2,3}$ -types), greatly decrease the enhanced spontaneous activity of non-stimulated DA-depleted microcircuits. Less selective $D_{1,2}$ -agonists such as apomorphine and rotigotine were not that good in decreasing this enhanced spontaneous activity. L-DOPA was better in suppressing this enhanced spontaneous activity than any other DA-receptor agonist, suggesting that when a Parkinsonian subject is at rest, D_2 -class DA-agonists signaling would better control rigidity and resting tremor, the clinical correlates of this enhanced activity.

Cortical stimulated striatal microcircuits

Striatal microcircuit activity in vitro can be elicited in control conditions by chemical or electrical stimulus. Low concentrations of NMDA (2 μ M in mice) maintains in vitro microcircuits activated for long periods of time (Fig. 3, see also Carrillo-Reid et al., 2008), as well as, electrical cortical stimulation (Control + CtxS). Activation of control microcircuits significantly above spontaneous activity can last about half an hour or more (Fig. 2B, Aparicio-Juárez et al., 2019), resembling in vivo microcircuits during movement (Mink, 2003; Cui et al., 2014; Parker et al., 2018). The mechanism by which the striatal microcircuit remains active long after the stimulus is unknown. A working hypothesis is that spontaneously active excitatory interneurons, such as cholinergic interneurons (Goldberg and Wilson, 2005; Tepper et al., 2018; Surmeier et al., 2011) may ignite microcircuit activation.

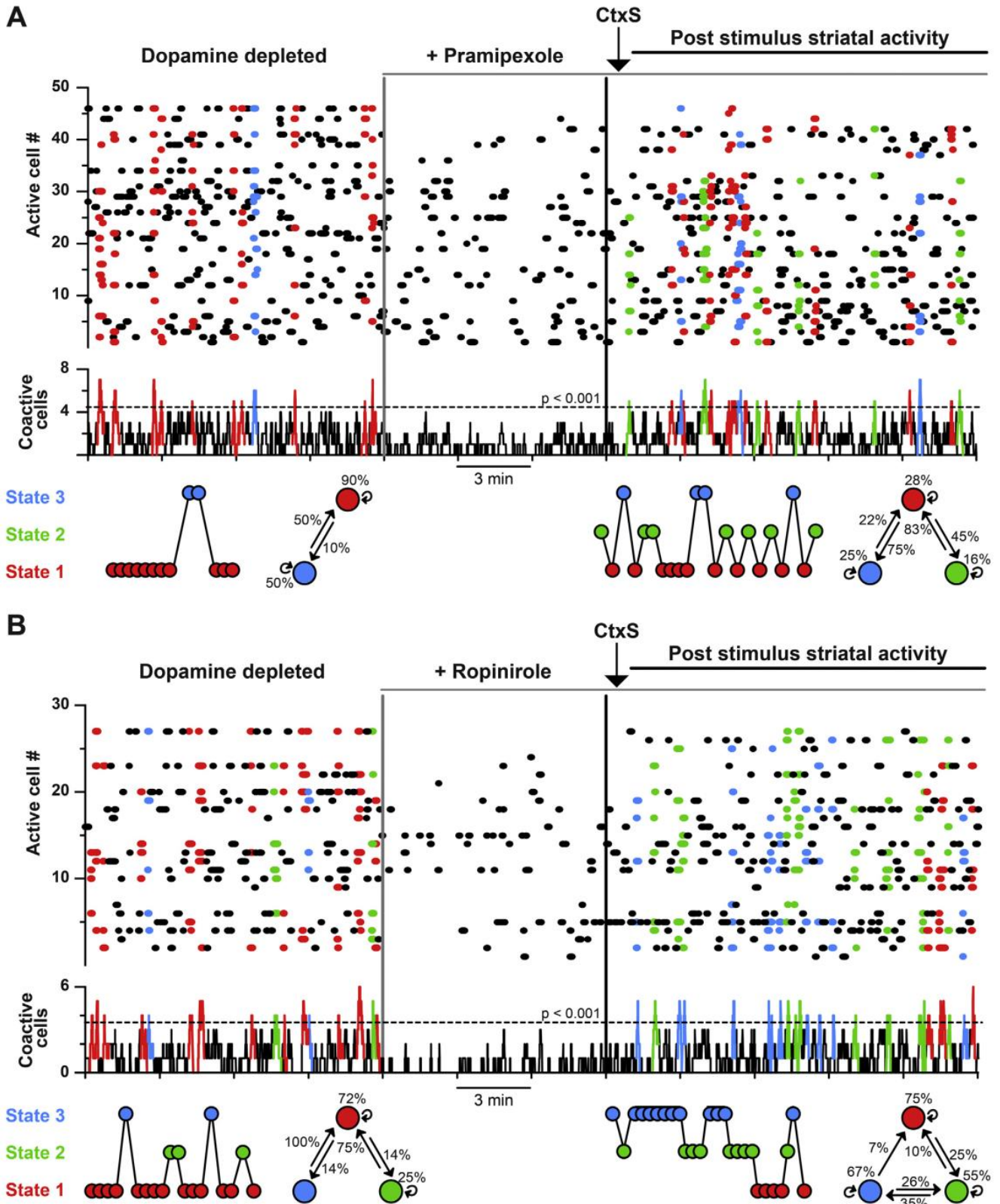
Once activated, striatal microcircuits are characterized by sequences of significant and transient coactivity peaks, given by different neuronal groups or ensembles (Hebb, 1949; Edelman, 1993; Carrillo-Reid et al., 2008; Buzsaki, 2010; Carrillo-Reid et al., 2017; Klaus et al., 2017), composed of functionally connected neurons (Buzsaki, 2010; Carrillo-Reid et al., 2015). Different neuronal groups show alternation between them (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009; 2017), reflecting behavioral stages in vivo (Klaus et al., 2017; Owen et al., 2018; Parker et al., 2018). In contrast, alternation between ensembles is restricted in DA-depleted microcircuits in which a highly recurrent network state which correlates with in vivo locked or disturbed locomotion, and reduced encoding specificity (Parker et al., 2018). Changes in synaptic plasticity after DA-depletion have been reported (e.g., Calabresi et al., 2006; Gerfen and Surmeier, 2011; Barroso-Flores et al., 2015; Deffains and Bergman, 2015) and those might underlie the lack of alternation between ensembles.

Interestingly, in CtxS DA-depleted microcircuits, the highly recurrent state disappears temporarily, mitigating

Fig. 7. Cortical stimulation activates DA-depleted microcircuits similarly to control stimulated circuits when $D_{1,2}$ -class dopamine receptor agonists are present. Representative raster-plots are divided by vertical lines into three epochs. 1) Non-stimulated DA-depleted spontaneous activity, 2) Addition of 10 μ M L-DOPA (A) or 10 μ M rotigotine (B) to the microcircuit, and 3) Activity after cortical stimulation (CtxS) in the presence of DA-agonists. Histograms below each raster plot show significant coactivity events, which are colored according to network states. In both cases (A and B) non-stimulated DA-depleted microcircuits show a highly recurrent state (colored in red) and less alternation, confirmed by the sequence of network states which fail to form closed loops. Both L-DOPA (A) and rotigotine (B) eliminate significant coactivity peaks and decrease spontaneous activity. In that condition, cortical stimulation reignites activity in the DA-depleted circuit in the presence of the DA-agonists. Microcircuits exhibit several and alternating significant peaks of coactivity (histogram and sequences at bottom). Activation sequences now allow reverberations during recording time. At glance, peaks of coactivity are less likely to occur after cortical stimulation in the presence of rotigotine as compared to L-DOPA.

pathological network dynamics (Figs. 2, 3). There are no significant differences when comparing Ctr + CtxS with DA-depleted + CtxS circuits within 30 min of stimulation (in early Parkinsonism). However, after 30 min the highly recurrent state is reestablished. L-DOPA administration

prolongs the improvement (e.g., 60 min), which in in vitro activated circuits is seen as a recovery of network states alternations (Aparicio-Juárez et al., 2019). We used different statistical analyses to compare the actions of different DA-agonists in DA-depleted + CtxS microcircuits 60 min



after the stimulus, using the property of alternation between ensembles activity. We focused on the actions of the most used DA-agonists in PD therapeutics (Blandini and Armen-tero, 2014; Stocchi et al., 2016). Future work will test other drugs (Millan, 2010).

Dopamine receptor agonists actions on cortical stimulated striatal microcircuits

At a first glance (see statistical comparisons below), all DA-agonists had an action similar to that of L-DOPA on DA-depleted + CtxS microcircuits (Figs. 7, 8): alternation between network states and closed cycles during the time of recording were recovered. The highly recurrent network state was dissolved (Jáidar et al., 2010; Aparicio-Juárez et al., 2019).

However, we quantitatively compared the actions of DA-agonists with different metrics. First, distributions of the number of transitions required to close a cycle were compared (pie plots in Fig. 9A black color indicates that no cycle was closed during recording time; Kolmogorov–Smirnov tests with post hoc FDR corrections). Within the first 30 min after the stimulus, DA-depleted + CtxS circuits yielded a distribution that was not significantly different than that from Ctr + CtxS circuits ($P = 0.206$). In contrast, all DA-agonists tested 60 min after CtxS in DA-depleted circuits had distributions of the number of transitions required to close a cycle significantly different than Ctr + CtxS circuits, suggesting that no DA-agonist, including L-DOPA, is capable of maintaining CtxS effects.

Thereafter, we excluded the cases with unclosed cycles. The measurements showed that L-DOPA and pramipexole produce a better performance than rotigotine and ropinirole, suggesting that L-DOPA and pramipexole will better improve movement in Parkinsonian subjects.

Finally, the presence of a highly recurrent network state is another signature of in vitro DA-depleted microcircuits. The presence of this condition may be measured with a recurrence index (Aparicio-Juárez et al., 2019). This is shown in box plots as increased variance (Fig. 9C; O'Brien homogeneity of variance test). A comparison of DA-agonists in DA-depleted + CtxS circuits after 60 min of stimulation showed that all DA-agonists have some benefit on stimulated DA-depleted circuits.

Correlations

The present work aims to show that the use of behavioral tests in animal models of PD (Liang et al., 2008; Dunnet

and Lelos, 2010) as well as molecular and cellular studies (Millan, 2010) to investigate neurological therapies may be assisted with in vitro bio-assays that record several neurons during microcircuit dynamics. The theoretical framework to find circuit features to measure quantitatively posits that vertebrate neurons work together forming neuronal ensembles or groups (e.g., motoneurons pools) and that a microcircuit of histological scale can be seen as a temporal sequence of neuronal ensembles (Hebb, 1949; Edelman, 1993; Carrillo-Reid et al., 2008; Buzsaki, 2010; Carrillo-Reid et al., 2017; Klaus et al., 2017). In addition, synaptic plasticity abnormalities during PD have been described (Calabresi et al., 2006; Gerfen and Surmeier, 2011), as well as the connections within an ensemble (Carrillo-Reid et al., 2017) and closed cycles or reverberations (Carrillo-Reid et al., 2008). Moreover, sequences of neuronal ensembles have been correlated with motor actions in vivo (Klaus et al., 2017; Owen et al., 2018; Parker et al., 2018), showing the crucial role of interneurons (Owen et al., 2018).

By using this framework, we provide circuitry correlates to the usefulness of D_2 -class agonists as initial mono-therapy in early PD, evidencing insufficient performance in the case of ropinirole, and supporting L-DOPA as the leading option in advanced PD (Rascol et al., 1998; Reichmann, 2000; Radad et al., 2005; UK PD MED Collaborative Group, 2014; Zesiewicz et al., 2017). Further, we show a poorer performance of the less selective $D_{1,2}$ DA-agonists. Not expected in the logic that occupancy of both receptors may be thought to prevent the disarray in their signaling, but consistent with previous results showing that bath application of a selective D_1 -agonist (SKF81297) does not revert the enhanced spontaneous activity in non-stimulated DA-depleted microcircuits (Jáidar et al., 2010). Microcircuit results support previous multivariate binding analyses that show that these two classes of agonists belong to different pharmacological families (Millan, 2010). In addition, a subtle difference between pramipexole and ropinirole was disguised. In the present bio-assay the chosen DA-agonists were administered continuously and for a short period of time, in contrast to a pulsatile activation for a very long time (Fabbrini et al., 1988). Long-lasting and dramatic reduction in motor complications have been observed in advanced PD patients when the treatment is not pulsatile (Nutt et al., 2000; Devos and DUOPOPA Study Group, 2009). Therefore, our results support the development of an oral long-acting form of L-DOPA (Olanow and Stocchi, 2017) since all DA-agonists were below L-DOPA performance. At the

Fig. 8. Cortical stimulation activates DA-depleted microcircuits similarly to the control stimulated circuit when D_2 -class dopamine receptor agonists are present. Representative raster-plots are divided by vertical lines into three epochs. 1) Non-stimulated DA-depleted spontaneous activity, 2) Addition of 10 μ M pramipexole (A) or 10 μ M ropinirole (B) to the microcircuit, and 3) activity after cortical stimulation (CtxS) in the presence of DA-agonists. Histograms below each raster plot show coactivity events, and significant peaks are colored according to network states. In both cases (A and B) non-stimulated DA-depleted microcircuits show a highly recurrent state (colored in red) and less alternation, confirmed by the sequence of network states which fail to form closed loops. Both pramipexole (A) and ropinirole (B) are sufficient to abolish significant coactivity peaks. Finally, cortical stimulation reignites activity in the DA-depleted circuit in the presence of DA-agonists. Stimulated network activity now exhibits different significant coactivity peaks (histogram and sequences at bottom) that alternate their activity forming sequences. In these cases, pramipexole better reduced activity of the highly recurrent network state, however, in this case closed cycles did not appear during recording time (A), on the other hand, ropinirole shows less alternation between network states but closed cycles or reverberations were commonly completed.

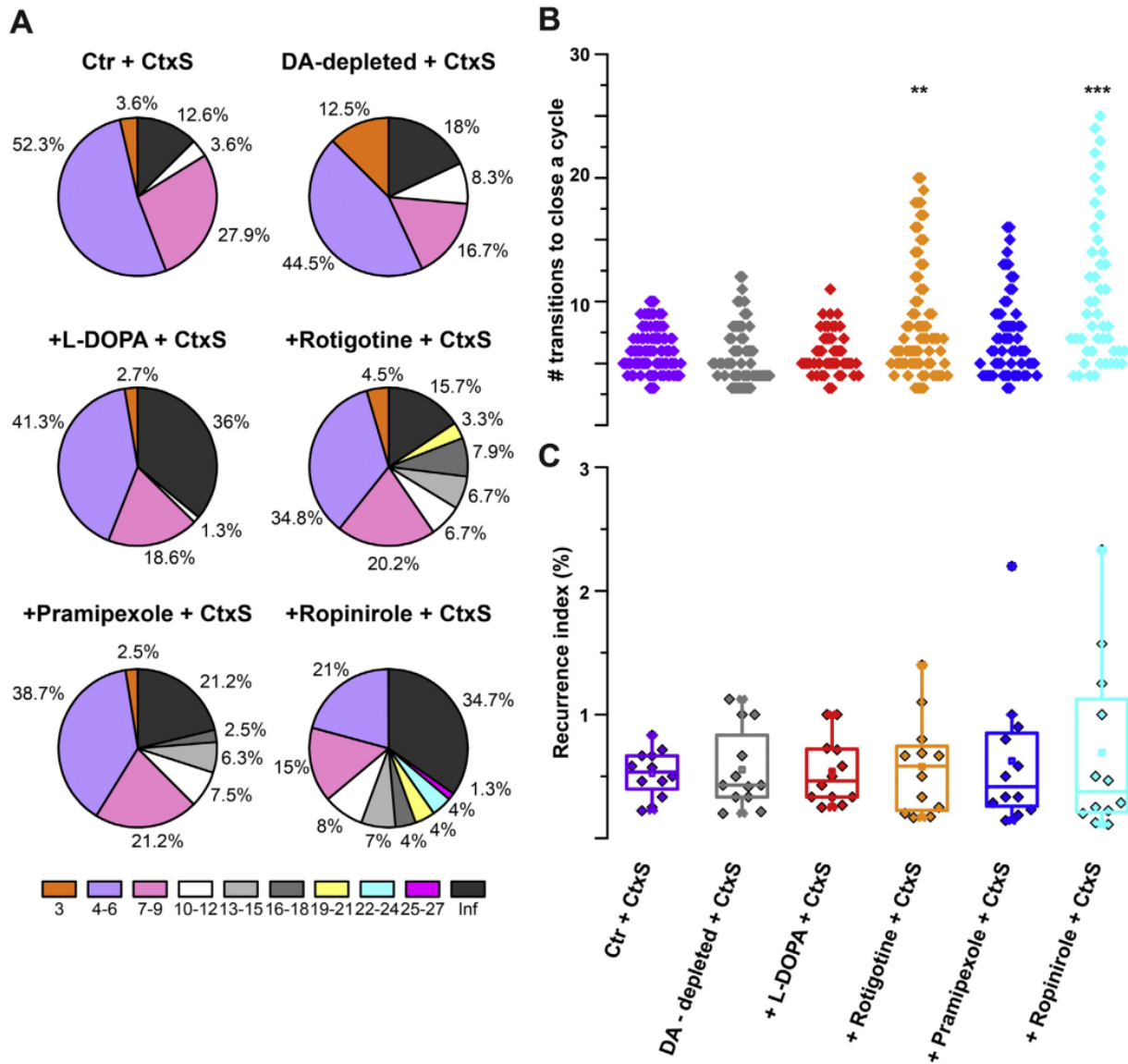


Fig. 9. Performance comparisons of DA-agonists on cortical activated DA-depleted microcircuits. (A) Pie plots show number of network state transitions necessary to close a cycle (see color scale below), including the cases in which there were no closed cycles during recording (in black). Top: the first 30 min after cortical stimulation of the DA-depleted microcircuit in absence of any drug ($n = 4$ experiments) was compared with control stimulated microcircuits ($n = 5$ experiments): there is no significant difference (Kolmogorov–Smirnov test with post hoc FDR correction, $P = 0.206$). Then, actions of DA-agonists on DA-depleted + CtxS circuits were compared with CtxS control circuits 60 min after stimulation (Aparicio-Juárez et al., 2019). In this condition, we compared different DA-agonists to find which one was not statistically different (resembled more) to control activated circuits: L-DOPA ($P = 0.007$, $n = 4$ experiments), rotigotine ($P = 0.002$, $n = 4$ experiments), pramipexole ($P = 0.016$, $n = 4$ experiments) and ropinirole ($P = 1 \times 10^{-9}$, $n = 4$ experiments). The results of this stringent test were that no DA-agonist, including L-DOPA, is capable to completely resemble the control activated (Ctr + CtxS) circuit. (B) To see if these results were due to the number of incomplete cycles, we excluded them from the analyses and simply looked at the number of transitions required to close a cycle (when they could be closed during recording time). These data are displayed in density plots: Ctr + CtxS distribution was compared (Kruskal-Wallis ANOVA with post hoc FDR correction) with: DA-depleted + CtxS at 30 min ($P = 0.149$) and with CtxS plus a given DA-agonist at 60 min: L-DOPA + CtxS ($P = 0.736$), rotigotine + CtxS (** $P = 0.003$), pramipexole + CtxS ($P = 0.199$) and ropinirole + CtxS (** $P = 0.001$). This metric shows that L-DOPA and pramipexole produce a better microcircuit performance than rotigotine and ropinirole after CtxS. (C) A third metric was the recurrence index (Aparicio-Juárez et al., 2019) which indicates the appearance of a highly recurrent network state, shown in Tukey box plots as increased variance, and compared with the O'Brien homogeneity of variance test. In this perspective, DA-depleted + CtxS (30 min) $P = 0.073$ was not significantly different. While DA-agonists + CtxS compared at 60 min yield: L-DOPA + CtxS ($P = 0.186$); rotigotine + CtxS ($P = 0.079$); pramipexole + CtxS ($P = 0.214$); ropinirole + CtxS, $P = 0.071$), showing that all DA-agonists have some positive effect on active stimulated DA-depleted circuits, maintaining them out of a complete Parkinsonian dynamics after being activated by CtxS.

same time we confirm that no drug, including L-DOPA, completely restores circuitry function. However, new drugs and drug combinations (Millan, 2010) can also be tested with the present preparation. In addition, the action of CtxS to

the DA-depleted circuit suggests that a combination of electrical plus pharmacologic stimulation may be helpful.

In conclusion, the present results show that microcircuit properties can be used to compare different drugs used in

neurological disorders, in particular, Parkinson's disease. By using calcium imaging with single cell resolution and recording dozens of cells simultaneously we found different effectiveness of DA-agonists in reversing pathological network dynamics in both, the resting non-stimulated tissue and the active stimulated one. A hierarchy in agonists performance was found: L-DOPA > selective D₂-class agonists > less selective D_{1,2}-class agonists. Paralleling cellular, behavioral and clinical studies (Baker et al., 2009; Bello et al., 2017; Blandini and Armentero, 2014; UK PD MED Collaborative Group, 2014).

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.058>.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Antonio Laville, Dagoberto Tapia and Ariadna Aparicio-Juárez for technical support, Claudia Rivera and Héctor Malagón for their help at the animal facility. This work was supported by public grants CONACYT Frontera 57 y FON.INS. 29-10 and DGAPA-UNAM: IN201603 to J.B. Esther Lara-González is student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received doctoral fellowship 218676 from CONACYT. Data in this work are part of her doctoral dissertation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Esther Lara-González: Study conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting of manuscript. Mariana Duhne: Study conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data. Fátima Ávila-Cascajares: Acquisition of data, Drafting of manuscript, Critical revision. Silvia Cruz: Acquisition of data. and José Bargas: Study conception and design, Critical revision.

DECLARATIONS OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Ahlskog JE, Muentner MD. (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16:448-458, <https://doi.org/10.1002/mds.1090>.
- Aparicio-Juárez A, Duhne M, Lara-González E, Ávila-Cascajares F, Calderón V, Galarraga E, Bargas J. (2019) Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *Eur J Neurosci* 49:834-848, <https://doi.org/10.1111/ejn.13806>.
- Aquino CC, Fox SH. (2015) Clinical spectrum of levodopa-induced complications. *Mov Disord* 30:80-89, <https://doi.org/10.1002/mds.26125>.
- Baker WL, Silver D, White CM, Kluger J, Aberle J, Patel AA, Coleman CI. (2009) Dopamine agonists in the treatment of early Parkinson's disease: a meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord* 15:287-294, <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.07.004>.
- Ballion B, Frenois F, Zold CL, Chetrit J, Murer MG, Gonon F. (2009) D2 receptor stimulation, but not D1, restores striatal equilibrium in a rat model of parkinsonism. *Neurobiol Dis* 35:376-384, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.019>.
- Barroso-Flores J, Herrera-Valdez MA, Lopez-Huerta VG, Galarraga E, Bargas J. (2015) Diverse short-term dynamics of inhibitory synapses converging on striatal projection neurons: differential changes in a rodent model of Parkinson's disease. *Neural Plast* 573543, <https://doi.org/10.1155/2015/573543>.
- Bello EP, Casas-Cordero R, Galiñanes GL, Casey E, Belluscio MA, Rodríguez V, Noaín D, Murer MG, Rubinstein M. (2017) Inducible ablation of dopamine D2 receptors in adult mice impairs locomotion, motor skill learning and leads to severe parkinsonism. *Mol Psychiatry* 22:595-604, <https://doi.org/10.1038/mp.2016.105>.
- Benjamini Y, Krieger AM, Yekutieli D. (2006) Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika* 93:491-507, <https://doi.org/10.1093/biomet/93.3.49>.
- Blandini F, Armentero M-T. (2014) Dopamine receptor agonists for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 23(3):387-410, <https://doi.org/10.1517/13543784.2014.869209>.
- Brooks DJ. (2000) Dopamine agonists: their role in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68:685-690, <https://doi.org/10.1136/jnnp.68.6.685>.
- Burke RE, O'Malley K. (2013) Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 246:72-83, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.011>.
- Buzsáki G. (2010) Neural syntax: cell assemblies, synapses, and readers. *Neuron* 68:362-385, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.023>.
- Cacace F, Mineo D, Viscomi MT, Latagliata EC, Mancini M, Sasso V, Vannelli A, Pascucci T, Pendolino V, Marcello E, Pelucchi S, Puglisi-Allegra S, Molinari M, Picconi B, Calabresi P, Ghiglieri V. (2017) Intermittent theta-burst stimulation rescues dopamine-dependent corticostriatal synaptic plasticity and motor behavior in experimental parkinsonism: possible role of glial activity. *Mov Disord* 32:1035-1046, <https://doi.org/10.1002/mds.26982>.
- Calabresi P, Picconi B, Parnetti L, Di Filippo M. (2006) A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurol* 5:974-983, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70600-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70600-7).
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci* 17:1022-1030, <https://doi.org/10.1038/nn.3743>.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibanez-Sandoval O, HernandezCruz A, Galarraga E, Bargas J. (2009) Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 101:737-749, <https://doi.org/10.1152/jn.90975.2008>.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson TOR. (1957) 3, 4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180(4596):1200.
- Carrillo-Reid L, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E, Bargas J. (2011) Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: receptor-specific configuration of cell assemblies. *J Neurosci* 31:14972-14983, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3226-11.2011>.
- Carrillo-Reid L, Lopez-Huerta VG, Garcia-Munoz M, Theiss S, Arbutnot GW. (2015) Cell assembly signatures defined by short-term synaptic plasticity in cortical networks. *Int J Neural Syst* 251550026, <https://doi.org/10.1142/S0129065715500264>.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Bargas J. (2008) Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99:1435-1450, <https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>.
- Carrillo-Reid L., Tecuapetla F., Ibáñez-Sandoval O., Hernández-Cruz A., Galarraga E., Bargas J.. (2009) Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 101:737-749, <https://doi.org/10.1152/jn.90975.2008>.
- Carrillo-Reid L, Yang W, Bando Y, Peterka DS, Yuste R. (2017) Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science* 353:691-694, <https://doi.org/10.1126/science.aaf7560>.
- Chen F, Jin L, Nie Z. (2017) Safety and efficacy of Rotigotine for treating Parkinson's disease: a meta-analysis of randomised controlled trials. *J Pharm Pharm Sci* 20:285-294, <https://doi.org/10.18433/J3Q35D>.
- Cui G, Jun SB, Jin X, Luo G, Pham MD, Lovinger DM, Vogel SS, Costa RM. (2014) Deep brain optical measurements of cell type-specific neural activity in behaving mice. *Nat Protoc* 9:1213-1228, <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.080>.

- De Deurwaerdere P, Di Giovanni G, Millan MJ. (2017) Expanding the repertoire of L-DOPA's actions: a comprehensive review of its functional neurochemistry. *Prog Neurobiol* 151:57-100, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.07.002>.
- Deffains M, Bergman H. (2015) Striatal cholinergic interneurons and cortico-striatal synaptic plasticity in health and disease. *Mov Disord* 30:1014-1025, <https://doi.org/10.1002/mds.26300>.
- Devos D, French DUODOPA Study Group. (2009) Patient profile, indications, efficacy and safety of duodenal levodopa infusion in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 24:993-1000, <https://doi.org/10.1002/mds.22450>.
- Dunnet SB, Lelos M. (2010) Behavioral analysis of motor and non-motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *Prog. Brain Res* 184:35-51, [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)84003-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)84003-8).
- Edelman GM. (1993) Neural Darwinism: selection and reentrant signaling in higher brain function. *Neuron* 10:115-125.
- Fabbrini G, Mouradian MM, Juncos JL, Schlegel J, Mohr E, Chase TN. (1988) Motor fluctuations in Parkinson's disease: central pathophysiological mechanisms, part I. *Ann Neurol* 24:366-371, <https://doi.org/10.1002/ana.410240303>.
- Foley P. (2000) The L-DOPA story revisited. Further surprises to be expected? *J Neural Transm Suppl* 2000:1-20.
- Gerfen CR, Surmeier DJ. (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34:441-466, <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>.
- Goldberg J.A., Wilson C.J.. (2005) Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 25:10230-10238, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2734-05.2005>.
- Hebb DO. (1949) *The Organization of Behavior*. New York: Wiley, 1949.
- Heuer A, Smith GA, Lelos MJ, Lane EL, Dunnett SB. (2012) Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behav Brain Res* 228:30-43, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.027>.
- Hu X-T, Wang RY. (1988) Comparison of effects of D-1 and D-2 dopamine receptor agonists on neurons in the rat caudate putamen: an electrophysiological study. *J Neurosci* 8:4340-4348.
- Jáidar O, Carrillo-Reid L, Hernández A, Drucker-Colin R, Bargas J, Hernández-Cruz A. (2010) Dynamics of the parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J Neurosci* 30:11326-11336, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1380-10.2010>.
- Jáidar O, Carrillo-Reid L, Nakano Y, Lopez-Huerta VG, Hernandez-Cruz A, Bargas J, Garcia-Munoz M, Arbutnot GM. (2019) Synchronized activation of striatal direct and indirect pathways underlies the behavior in unilateral dopamine-depleted mice. *Eur J Neurosci* , <https://doi.org/10.1111/ejn.14344>.
- Jenner P, Katzenschlager R. (2016) Apomorphine - pharmacological properties and clinical trials in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 33(1):S13-S21, <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.12.003>.
- Jimenez-Shahed J. (2016) A review of current and novel levodopa formulations for the treatment of Parkinson's disease. *Ther Deliv* 7:179-191, <https://doi.org/10.4155/tde.15.96>.
- Klaus A, Martins GJ, Paixao VB, Zhou P, Paninski L, Costa RM. (2017) The spatiotemporal Organization of the Striatum Encodes Action Space. *Neuron* 95:1171-1180, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.015>.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC. (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622-626, <https://doi.org/10.1038/nature09159>.
- Lam YW. (2000) Clinical pharmacology of dopamine agonists. *Pharmacotherapy* 20:17S-25S.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T. (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373:2055-2066, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60492-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60492-X).
- Lees AJ, Tolosa E, Olanow CW. (2015) Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr. *Mov Disord* 30:19-36, <https://doi.org/10.1002/mds.26120>.
- Lemaire N, Hernandez LF, Hu D, Kubota Y, Howe MW, Graybiel AM. (2012) Effects of dopamine depletion on LFP oscillations in striatum are task- and learning-dependent and selectively reversed by L-DOPA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:18126-18131, <https://doi.org/10.1073/pnas.1216403109>.
- Liang L, DeLong MR, Papa SM. (2008) Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci* 28:7537-7547, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-08.2008>.
- Linazasoro G, Spanish Dopamine Agonists Study Group. (2004) Conversion from dopamine agonists to pramipexole. An open-label trial in 227 patients with advanced Parkinson's disease. *J Neurol* 251:335-339, <https://doi.org/10.1097/hnf.0b013e318067bcc4>.
- López-Huerta VG, Carrillo-Reid L, Galarraga E, Tapia D, Fiordelisio T, Drucker-Colin R, Bargas J. (2013) The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of parkinsonism. *J Neurosci* 33:4964-4975, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4721-12.2013>.
- Mercuri NB, Bernardi G. (2005) The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci* 26:341-344, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.05.002>.
- Millan MJ. (2010) From the cell to the clinic: a comparative review of the partial D2/D3 receptor agonist and α 2-adrenoceptor antagonist, pibedil, in the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* 128:229-273, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.06.002>.
- Mink JW. (2003) The basal ganglia. In: Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JM, Spitzer NC, & Zigmon MJ, editors. *Fundamental Neuroscience*. Amsterdam: Academic Press. p. 815-839.
- Mizuno Y, Nomoto M, Hasegawa K, Hattori N, Kondo T, Murata M, Takeuchi M, Takahashi M, Tomida T, Rotigotine Trial Group. (2014) Rotigotine vs ropinirole in advanced stage Parkinson's disease: a double-blind study. *Parkinsonism Relat Disord* 20:1388-1393, <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.10.005>.
- Morissette M, Di Paolo T. (2018) Non-human primate models of PD to test novel therapies. *J Neural Transm (Vienna)* 125:291-324, <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1722-y>.
- Nutt JG, Obeso JA, Stocchi F. (2000) Continuous dopamine-receptor stimulation in advanced Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23: S109-S115.
- Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodríguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, Stoessl AJ. (2017) Past, present, and future of Parkinson's disease: a special essay on the 200th anniversary of the shaking palsy. *Mov Disord* 32:1264-1310, <https://doi.org/10.1002/mds.27115>.
- Olanow CW, Stocchi F. (2017) Levodopa: a new look at an old friend. *Mov Disord* , <https://doi.org/10.1002/mds.27216>.
- Ossowska K, Wolfarth S. (1995) Stimulation of glutamate receptors in the intermediate/caudal striatum induces contralateral turning. *Eur J Pharmacol* 273:89-975.
- Owen SF, Berke JD, Kreitzer AC. (2018) Fast-spiking interneurons supply feedforward control of bursting, calcium, and plasticity for efficient learning. *Cell*. 172:683-695, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.005>.
- Parker JG, Marshall JD, Ahanonu B, Wu YW, Kim TH, Grewe BF, Zhang Y, Li JZ, Ding JB, Ehlers MD, Schnitzer MJ. (2018) Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. *Nature*, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0090-6> Epub ahead of print.
- Pérez-Ortega J, Duhne M, Lara-González E, Plata V, Gasca D, Galarraga E, Hernández-Cruz A, Bargas J. (2016) Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol Dis* 91:347-361, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.023>.
- Picconi B, Hernández LF, Obeso JA, Calabresi P. (2017) Motor complications in Parkinson's disease: striatal molecular and electrophysiological mechanisms of dyskinesias. *Mov Disord* , <https://doi.org/10.1002/mds.27261>.
- Plata V, Duhne M, Pérez-Ortega JE, Barroso-Flores J, Galarraga E, Bargas J. (2013) Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of parkinsonian tissue in vitro. *Biomed Res Int* 2013519184, <https://doi.org/10.1155/2013/519184>.

- Radad K, Gille G, Rausch WD. (2005) Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep* 57:701-712.
- Rascol O, Brooks DJ, Brunt ER, Korczyn AD, Poewe WH, Stocchi F. (1998) Ropinirole in the treatment of early Parkinson's disease: a 6-month interim report of a 5-year levodopa-controlled study. 056 study group. *Mov Disord* 13:39-45, <https://doi.org/10.1002/mds.870130111>.
- Reichmann H. (2000) Long-term treatment with dopamine agonists in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* 247:17-19, <https://doi.org/10.1007/PL00007768> Suppl 4.
- Sharma S, Singh S, Sharma V, Singh VP, Deshmukh R. (2015) Neurobiology of L-DOPA induced dyskinesia and the novel therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother* 70:283-293, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.01.029>.
- Shen T, Ye R, Zhang B. (2017) Efficacy and safety of pramipexole extended-release in Parkinson's disease: a review based on meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Neurol* 24:835-843, <https://doi.org/10.1111/ene.13303>.
- Sprenger F, Poewe W. (2013) Management of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *CNS Drugs* 27:259-272, <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0053-2>.
- Stocchi F. (2009) Dopamine receptor agonists in the treatment of advanced Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15: S54-S57, [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70836-3](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70836-3).
- Stocchi F, Torti M, Fossati C. (2016) Advances in dopamine receptor agonists for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother* 17:1889-1902, <https://doi.org/10.1080/14656566.2016.1219337>.
- Surmeier DJ, Carrillo-Reid L, Bargas J. (2011) Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198:3-18, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.051>.
- Tepper J.M., Koós T., Ibanez-Sandoval O., Tecuapetla F., Faust T.W., Assous M.. (2018) Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons: Update 2018. *Front Neuroanat* 12:91, <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00091>. eCollection 2018.
- Thomas D, Tovey SC, Collins TJ, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P. (2000) A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* 28:213-223.
- UK PD MED Collaborative Group. (2014) Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial. *Lancet* 384:1196-1205, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60683-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60683-8).
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW. (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485-493.
- Wang Y, Zhou FM. (2017) Striatal but not Extrastriatal dopamine receptors are critical to dopaminergic motor stimulation. *Front Pharmacol* 8(935), <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00935>.
- Zesiewicz TA, Chriscoe S, Jimenez T, Upward J, Davy M, VanMeter S. (2017) A randomized, fixed-dose, dose-response study of ropinirole prolonged release in advanced Parkinson's disease. *Neurodegener Dis Manag* 7:61-72, <https://doi.org/10.2217/nmt-2016-0038>.

(Received 5 February 2019, Accepted 30 April 2019)
(Available online 9 May 2019)

VII. DISCUSIÓN

Las patologías de los ganglios basales son, en primer lugar, una gama de desórdenes de movimiento, desde la dificultad para realizar una acción, como en la enfermedad de Parkinson, hasta acciones exacerbadas como en la distonía (Mink, 2003; Balestrino & Schapira, 2019). Además, los ganglios basales son núcleos del cerebro anterior que están involucrados en la selección de acciones y diversos procesos cognitivos, como el aprendizaje de procedimientos, los hábitos y la conducta dirigida a la adquisición de metas (Cisek and Kalaska, 2010; Hikosaka et al., 2018; Athalye et al., 2020). La contribución de los ganglios basales a la selección de una acción no está bien entendida, en general se cree que el estriado evalúa la acción que se llevará a cabo y retroalimenta a la corteza a través del tálamo, basada en los estados sensoriales, así como en experiencias pasadas (Bostan et al., 2018). La dopamina desempeña un papel fundamental en este proceso, tanto como modulador de la excitabilidad celular momento a momento como modulador de cambios a largo plazo en la fuerza sináptica que da forma a la actividad de la red neuronal (Surmeier., et al 2011), la evaluación subjetiva de la experiencia (Romo & Rossi-Pool, 2020) y la predicción de errores en las acciones que llevan a recibir una recompensa (Schultz, 2016). La degeneración de la vía nigroestriatal que ocurre en la enfermedad de Parkinson priva al estriado de dopamina provocando cambios en la plasticidad sináptica (Calabresi et al., 2006; Barroso-Flores et al., 2015; Deffains and Bergman, 2015) así como un exceso de actividad neuronal (Jáidar et al., 2010).

Previamente hemos descrito algunas propiedades del microcircuito estriatal a escala histológica in vitro, siguiendo docenas de neuronas simultáneamente. Entre los estudios moleculares y celulares y los estudios que se hacen en animales in vivo, hay una brecha: no entendemos como los módulos o microcircuitos funcionan. Registrar la actividad neuronal a escala histológica nos ha permitido comenzar a estudiar el microcircuito del estriado in vitro, donde es posible controlar la concentración de fármacos (Carrillo-Reid et al., 2008; Jáidar et al., 2010; Carrillo-Reid et al., 2011; López-Huerta et al., 2013; Pérez-Ortega et al., 2016). Como continuación, el presente trabajo usa algunas de las

propiedades descritas del microcircuito estriatal para comparar fármacos antiparkinsonianos usados en la terapia de la enfermedad de Parkinson. El microcircuito estriatal control muestra escasa actividad espontánea (Plata et al., 2013), similar a la que se observa en sujetos en reposo (Mink, 2003; Parker et al., 2018). Pero cuando hay ausencia de dopamina en el estriado, la actividad de este microcircuito se incrementa y consistentemente aparece un ensamble dominante y altamente recurrente en la red que destruye la secuencia control entre diversos ensambles. Así, la arquitectura funcional de la red neuronal del estriado es diferente a la del control después de haber privado al microcircuito de dopamina en un modelo hemiparkinsoniano con 6-OHDA (Pérez-Ortega et al., 2016).

Las diferencias funcionales de la red neuronal del estriado en condiciones normales y parkinsonianas nos permiten tener un bioensayo donde preguntamos: si uso tal droga, ¿es posible recrear el circuito a una red que se parezca a la encontrada en condiciones control? Así pusimos a prueba la capacidad de fármacos antiparkinsonianos de uso clínico para observar qué tanto restauran la red funcional del estriado. Encontramos que pramipexole, ropinirole y quinelorane, agonistas de los receptores clase D2, abolen la actividad espontánea incrementada, regresando la actividad neuronal a niveles control. Sorprendentemente la apomorfina y la rotigotina, agonistas de ambas clases de receptores a dopamina (D1,2) no fueron tan buenos para disminuir este aumento espontáneo del microcircuito estriatal parkinsoniano. Como se esperaba, la L-DOPA tuvo el mejor efecto terapéutico, quizá porque es convertida en las terminales sinápticas a dopamina haciendo posible su liberación dinámica según los requerimientos (Berke, 2018). Lo que sugiere que cuando un sujeto parkinsoniano está en reposo la activación de los agonistas dopaminérgicos de la clase D2 serían lo mejor para controlar la rigidez y el temblor en reposo.

Para activar al microcircuito estriatal, es necesario aplicar una entrada excitatoria, lo que permite observar su dinámica. Por ejemplo, una concentración baja de NMDA puede mantener el circuito activado (Grillner, 2006; Carrilo-Reid et al., 2008). Lo mismo un estímulo cortical que puede activar el circuito estriatal por largos periodos de tiempo (Aparicio-Juárez et al., 2019). Como sucede con los

microcircuitos in vivo durante el movimiento (Cui et al., 2014; Parker et al., 2018). El mecanismo de cómo se mantiene activo el estriado después del estímulo cortical no está claro, pero es posible que la entrada excitatoria active un mecanismo oscilatorio capaz de generar patrones de disparo recurrente (Surmeier et al., 2011). Las conexiones recíprocas entre las interneuronas de bajo umbral y las interneuronas colinérgicas (Elghaba et al., 2016) podrían crear una actividad de red sostenida. Las interneuronas colinérgicas estriatales son marcapasos y las interneuronas GABAérgicas también pueden poseer esta propiedad (Koós & Tepper, 1999, Berke et al., 2004, Ding et al., 2010, Tepper et al., 2010), pudiendo formar un oscilador básico de inhibición-excitación, descrito en otros lugares como el circuito entre el núcleo subtalámico y el globo pálido externo (Bevan et al., 2002). Una vez que el microcircuito estriatal ha sido activado, este exhibe espontáneamente secuencias de picos de coactividad significativa a dados por diferentes grupos de neuronas o ensambles, compuestos por neuronas funcionalmente conectadas. Los ensambles de neuronas muestran alternancia y recurrencia pudiendo generar ciclos cerrados de actividad por varios minutos (Hebb, 1949; Edelman, 1993; Carrillo-Reid et al., 2008; Buzáki, 2010) y que son reflejo de la conducta in vivo (Carrillo-Reid et al., 2017; Klaus et al., 2017; Sheng et al., 2019).

La actividad neuronal espontánea del microcircuito parkinsoniano tiene una dinámica radicalmente diferente al circuito control. En ausencia de alguna entrada excitatoria, el microcircuito privado de dopamina muestra un exceso de actividad generado por un ensamble neuronal dominante con alto nivel de recurrencia, que recluta la mayoría de las neuronas en un solo estado de la red y que hace que las transiciones hacia otros ensambles disminuyan: el circuito se queda trabado en un mismo estado (Jáidar et al., 2010; López-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013; Pérez-Ortega et al., 2016). En estas condiciones, es interesante que un estímulo cortical al microcircuito estriatal privado de dopamina (parkinsoniano) puede disolver el ensamble dominante de manera temporal, mitigando la dinámica patológica de la red (Aparicio-Juárez et al., 2019). En los pacientes este fenómeno puede estar relacionado con los eventos de *Kinesia Paradoxa*, una fuerte entrada sensorial puede aliviar temporalmente la dificultad de iniciar una secuencia motora en los enfermos de Parkinson (Banou,

2015). No hay diferencia significativa entre la dinámica del microcircuito estriatal parkinsoniano después de un estímulo cortical y la actividad que un microcircuito estriatal control después de ser activado de la misma manera. No obstante, después de 30 minutos el ensamble altamente recurrente se reactiva en el microcircuito parkinsoniano. Sin embargo, L-DOPA prolonga (60 min) la mejora que produce el estímulo cortical al microcircuito parkinsoniano, manteniendo la alternancia de los ensambles durante más tiempo (Aparicio-Juárez et al., 2019). Como continuación de estos hallazgos previos, comparamos la acción de diferentes agonistas dopaminérgicos después del estímulo corticoestriatal sobre el microcircuito parkinsoniano, analizando qué tanto regresa la alternancia entre los ensambles de la red estriatal en condiciones control. Nos enfocamos en probar la acción de fármacos dopaminérgicos usados en el tratamiento de la EP, sentando las bases para que en futuros trabajos probemos otras moléculas (Millan, 2010; Stocchi et al., 2016).

Todos los agonistas dopaminérgicos usados tuvieron una acción similar a la de la L-DOPA, mejoraron la secuencia temporal entre los ensambles del microcircuito estriatal, se volvieron a mostrar ciclos cerrados de actividad y el ensamble altamente recurrente fue disuelto. Pero al comparar la distribución del número de transiciones necesarias para formar un ciclo cerrado de actividad, ningún fármaco fue capaz de mostrar la misma distribución del control estimulado, solo la dinámica generada después del estímulo corticoestriatal en el microcircuito parkinsoniano los primeros 30 min tuvo una distribución del número de transiciones para generar un ciclo cerrado similar al control estriatal estimulado. Sugiriendo que ningún agonista dopaminérgico, incluyendo la L-DOPA, es capaz de restaurar completamente el circuito control. Si excluimos los casos donde los ciclos no llegan a cerrarse, la L-DOPA y el pramipexole producen un mejor desempeño que la rotigotina y el ropinirole, sugiriendo que son los mejores fármacos para recuperar la movilidad en los sujetos parkinsonianos. Otra característica de los microcircuitos estriatales parkinsonianos es el ensamble neuronal altamente recurrente, esta característica puede ser medida con el índice de recurrencia, que en una gráfica de caja muestra una gran varianza (Aparicio-Juárez et al., 2019). Una comparación del efecto de los agonistas dopaminérgicos en el microcircuito parkinsoniano estimulado corticalmente

mostró que todos los fármacos tienen un beneficio al reducir la aparición del ensamble recurrente, mejorando la alternancia con otros ensambles de la red. Un resultado esperado porque estos fármacos antiparkinsonianos han sido parte del tratamiento de la enfermedad de Parkinson por más de una década (Blandini and Armentero, 2014; Stocchi et al., 2016). Lo que valida nuestro bioensayo para probar nuevos tratamientos.

El presente trabajo apunta a mostrar que un bioensayo *in vitro*, como el que hemos usado para comparar la acción de diferentes agonistas dopaminérgicos, es útil para investigar nuevas terapias farmacológicas y complementa a los estudios que se realizan a nivel molecular y celular, así como a las pruebas conductuales en modelos animales de la EP (Liang et al., 2008; Dunnet and Lelos, 2010). El marco teórico para encontrar características medibles de la red neuronal postula que las neuronas que trabajan juntas forman ensambles neuronales, así definimos la dinámica del microcircuito a escala histológica como una secuencia temporal de ensambles neuronales (Hebb, 1949; Edelman, 1993; Carrillo-Reid et al., 2008; Buzsáki, 2010; Carrillo-Reid et al., 2017; Klaus et al., 2017). Las conexiones neuronales en un ensamble (Carrillo-Reid et al., 2017), la secuencia temporal, los ciclos cerrados y reverberantes, han sido caracterizados en el estado fisiológico de la red estriatal (Carrillo-Reid et al., 2008), los cambios que ocurren en la dinámica de los ensambles de un microcircuito estriatal parkinsoniano son evidentes (Jaidar et al., 2010; Plata et al., 2012). Las propiedades del conectoma funcional de mundo pequeño, de escala libre y jerárquica, que se encuentran en condición fisiológica, se pierden en la condición parkinsoniana. Esto brinda la posibilidad de cuantificar la fisiopatología a escala histológica. Por lo tanto, las secuencias temporales de los ensambles de la condición patológica son completamente diferente a la del estriado control (Pérez-Ortega et al., 2016).

Bajo este marco hemos proporcionado correlatos a nivel del microcircuito de escala histológica de los tratamientos con los agonistas de la clase D2 usados como monoterapia inicial para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, confirmando que la L-DOPA sigue siendo la mejor opción (Rascol et al., 1998; Reichmann, 2000; Radad et al., 2005; UK PD MED Collaborative Group, 2014;

Zesiewicz et al., 2017). Además, mostramos que la eficacia de los agonistas mixtos, de ambas clases de receptores dopaminérgicos D1 y D2, es menos eficaz que la de los agonistas selectivos para el receptor de la clase D2. Podría pensarse que la ocupación de ambos receptores debería prevenir mejor el desarreglo de las vías de señalización, pero consistente con resultados previos, la aplicación de un agonista selectivo D1 (SKF81297) no abole el incremento espontáneo de la actividad neuronal encontrada en un microcircuito estriatal parkinsoniano (Jáidar et al., 2010). Estos resultados obtenidos del microcircuito estriatal soportan un análisis bioquímico y farmacológico multivariado que muestra que estas clases de agonistas pertenecen a diferentes familias farmacológicas (Millan, 2010).

En el bioensayo *in vitro* del estriado aquí utilizado los agonistas dopaminérgicos fueron administrados continuamente y por un corto periodo de tiempo, a diferencia de la administración prolongada y pulsátil que ocurre en los pacientes de le EP (Fabbrini et al., 1988). La reducción de complicaciones motoras se logra cuando la liberación del fármaco es continua (Nutt et al., 2000; Devos and DUOPOPA Study Group, 2009). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan el desarrollo de una presentación de liberación prolongada de L-DOPA en forma oral (Olanow and Stocchi, 2017), dado que todos los agonistas dopaminérgicos tuvieron un desempeño por debajo de la L-DOPA. Al mismo tiempo confirma que ninguna droga, incluyendo la L-DOPA, restaura la función del microcircuito estriatal de manera completa. Sin embargo, nuevos fármacos o combinación de estos pueden ser probados en el microcircuito estriatal *in vitro* hasta encontrar una mejor combinación de los mismos. Además, la acción restauradora del estímulo cortical en el microcircuito parkinsoniano sugiere que una combinación de fármacos con estímulo eléctrico puede ejercer un efecto benéfico sinérgico para terapia de la enfermedad de Parkinson.

En general, las propiedades de un microcircuito cerebral pueden ser usadas para comparar diferentes fármacos de patologías neurológicas, en particular la enfermedad de Parkinson. Mediante el uso de imagenología de calcio con resolución de célula única, registrando docenas de neuronas simultáneamente encontramos diferentes eficacias de los agonistas dopaminérgicos para revertir la

actividad neuronal patológica mostrada por el microcircuito parkinsoniano espontáneamente o activado por un estímulo cortical. El orden jerárquico encontrado fue: L-DOPA > agonistas de la clase D2 > agonistas de la clase D1,2. Como se encontró en estudios a nivel celular, conductual y clínicos (Baker et al., 2009; Bello et al., 2017; Blandini and Armentero, 2014; UK PD MED Collaborative Group, 2014).

VIII. ANEXO

Análisis de registros de imagenología de calcio. La actividad de un microcircuito estriatal in vitro, es decir, decenas de neuronas activas al mismo tiempo, se registró mediante la entrada de calcio durante el disparo neuronal utilizando a la molécula fluorescente Calcium Orange.

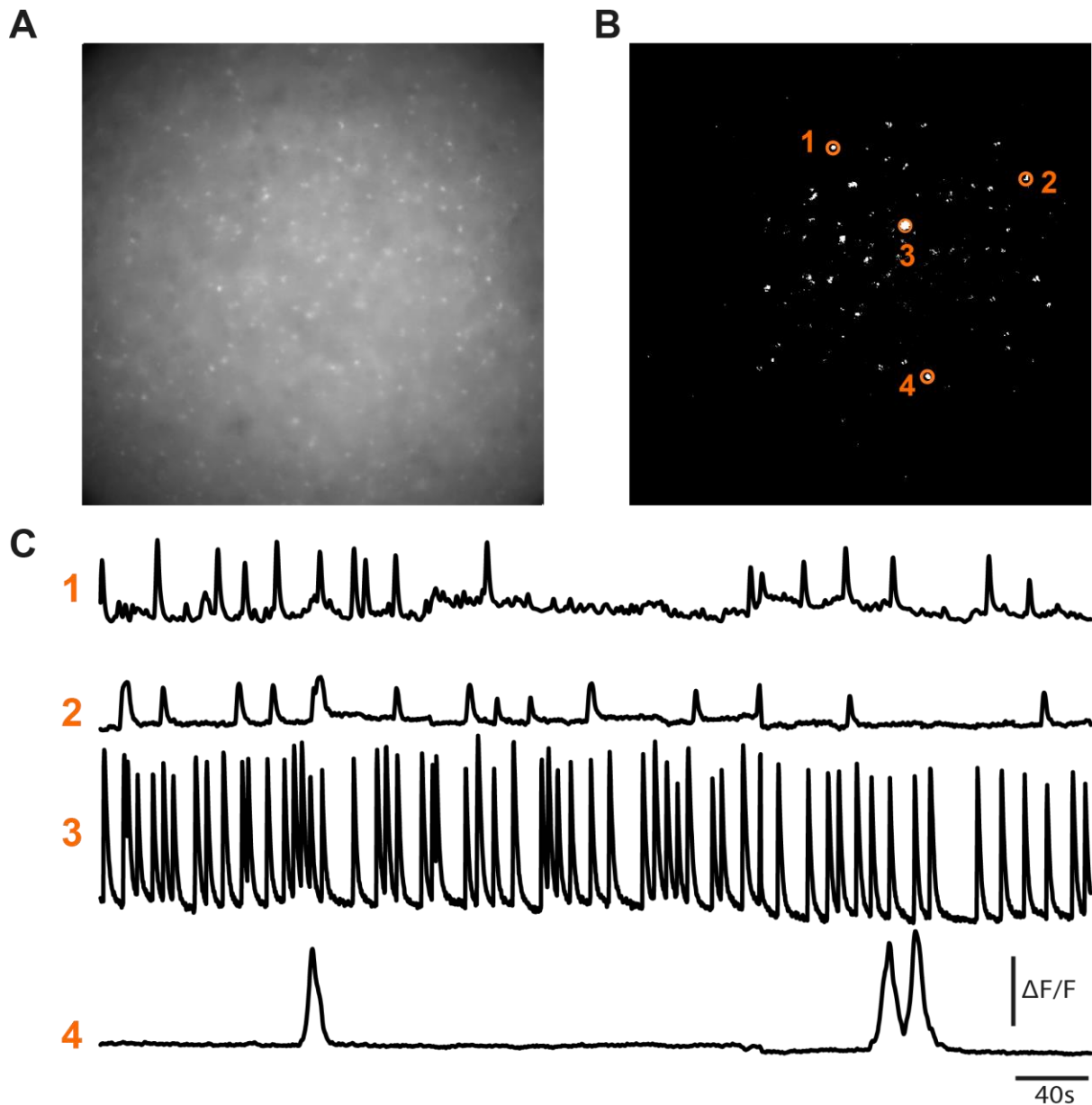


Figura i. Imagenología de calcio. A Neuronas cargadas con Calcium Orange en una rebanada de estriado proveniente de un ratón lesionado con 6-OHDA. B Detección automática del contorno de las células de la imagen iA. C Transitorios de calcio registrados de 4 células activas espontáneamente, señaladas en círculos naranjas en iB.

Las imágenes se tomaron a seis cuadros por segundo con el software Im-Patch© desarrollado en el laboratorio. Las neuronas se seleccionaron manualmente, por medio de filtros digitales, identificando los somas fluorescentes del campo. Los transitorios de calcio de cada región de interés fueron calculados a lo largo del tiempo restando un fondo local (4 veces el diámetro de la neurona de interés) de cada neurona cuadro por cuadro (Figura i). Los registros de los transitorios de calcio del microcircuito estriatal se hicieron en condiciones control, parkinsoniana y esta condición patológica en presencia de algún agonista dopaminérgico (Figura ii).

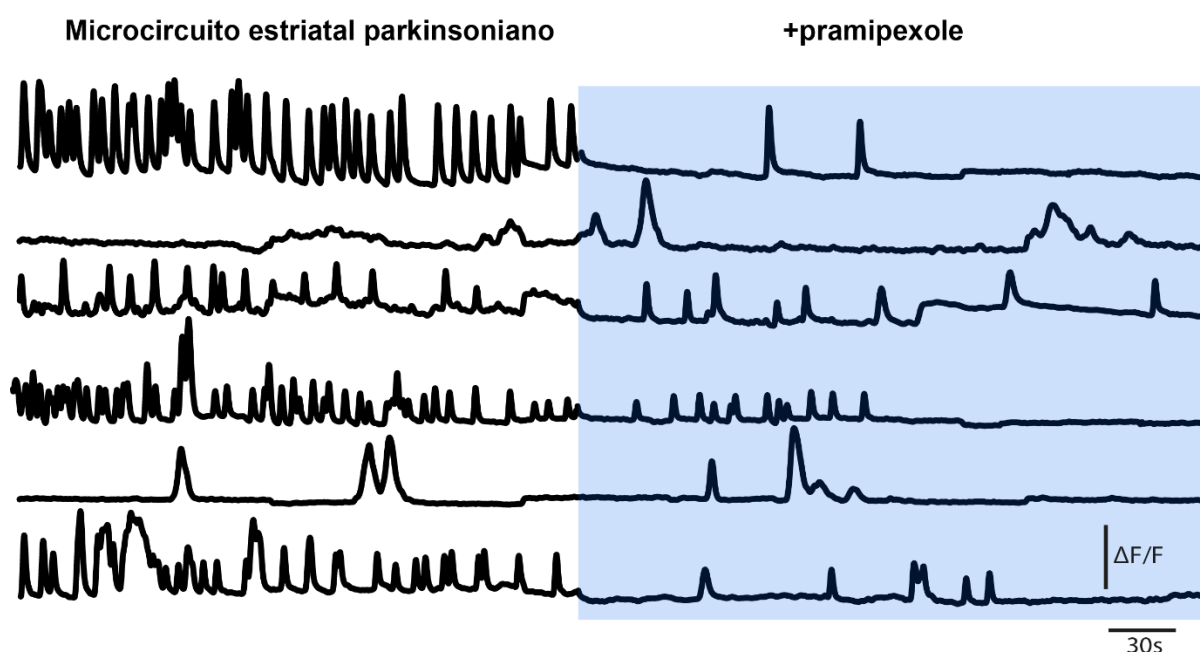


Figura ii. Registros de transitorios de calcio. Señales de Calcio de una rebanada de estriado parkinsoniana cargada con Calcium Orange a la que se le adicionó 10μ de pramipexole. Note que la presencia de este agonista dopaminérgico disminuye la cantidad de transitorios de calcio.

Cada que ocurre un potencial de acción entra calcio a la neurona y el fluoróforo emite una señal, a la que llamamos transitorio de calcio. La derivada positiva de un transitorio de calcio con respecto al tiempo corresponde en duración y magnitud a los potenciales de acción disparados. Por lo tanto, se asignan tantos unos según sea la primera derivada de la señal de calcio, solo son considerados los eventos fluorescentes de amplitudes mayores a 2.5 veces la desviación estándar del ruido. La actividad del microcircuito completo se puede representar a través de gráficos tipo ráster, donde las filas en el eje “y” representan la actividad de cada neurona en el microcircuito a lo largo del tiempo, y cada punto, la actividad de una célula en un cuadro (Figura 2, de los resultados).

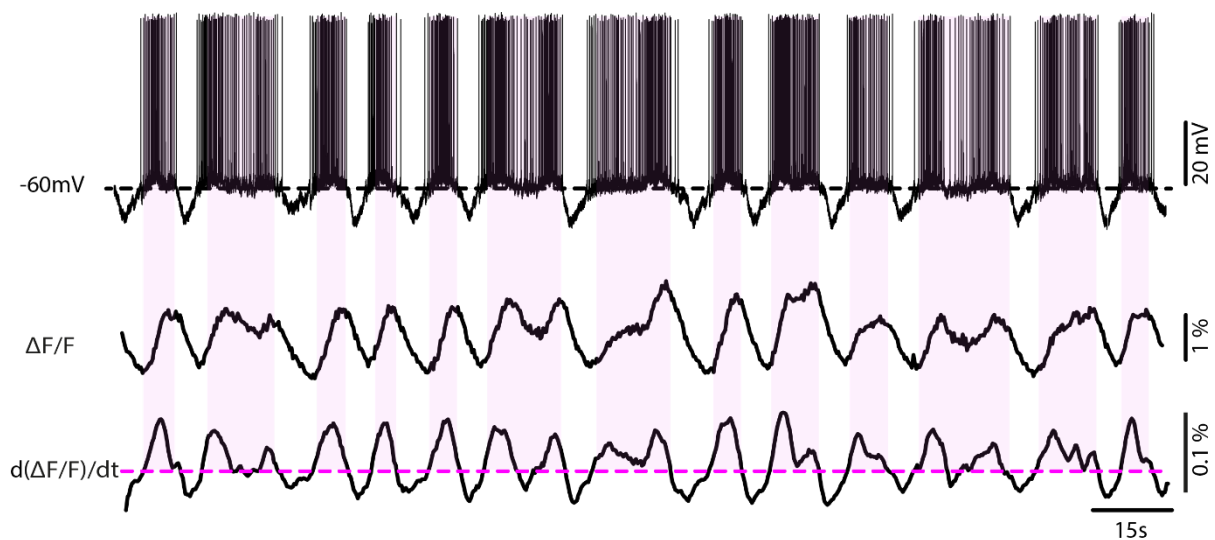


Figura iii. Registro simultaneo. Registro electrofisiológico (señal superior) simultanea al de imagenología de calcio (centro). Potenciales de acción en ráfagas y respectivos incrementos de calcio entrante, vistos como cambios en la señal de fluorescencia ($\Delta F/F$). La fase positiva de la derivada (parte inferior) del transitorio de calcio, $d(\Delta F/F)/dt$, corresponde a la duración de los potenciales de acción. solo son considerados los eventos de amplitudes mayores a 2.5 veces la desviación estándar del ruido, en la figura indica por la línea rosa punteada.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, M. (1991). *Corticonics: Neural Circuits of the Cerebral Cortex* (Cambridge: Cambridge University Press).
- Ahlskog, J.E., Muenter, M.D., 2001. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov. Disord.* 16, 448-58.
- Andres DS, Darbin O. Complex Dynamics in the Basal Ganglia: Health and Disease beyond the Motor System. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 30:101-114.
- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., Bargas, J., 2019. Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 49, 834-848.
- Aquino, C.C., Fox, S.H., 2015. Clinical spectrum of levodopa-induced complications. *Mov. Disord.* 30, 80-9.
- Arsalidou M, Duerden EG, Taylor MJ: The centre of the brain: topographical model of motor, cognitive, affective, and somato-sensory functions of the basal ganglia. *Hum Brain Mapp*; 34:3031–3054
- Assous M, Tepper JM. 2019. Excitatory extrinsic afferents to striatal interneurons and interactions with striatal microcircuitry. *Eur J Neurosci.* 49:593-603.
- Athalye VR, Carmena JM, Costa RM. 2019. Neural reinforcement: re-entering and refining neural dynamics leading to desirable outcomes. *Curr Opin Neurobiol.* 60:145-154
- Baker, W.L., Silver, D., White, C.M., Kluger, J., Aberle, J., Patel, A.A., Coleman, C.I., 2009. Dopamine agonists in the treatment of early Parkinson's disease: a meta-analysis. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, 287-294.
- Balestrino R, Schapira AHV.2020. Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 1, 27-42.
- Ballion B., Frenois, F., Zold, C.L., Chetrit, J., Murer, M.G., Gonon, F., 2009. D2 receptor stimulation, but not D1, restores striatal equilibrium in a rat model of Parkinsonism. *Neurobiol. Dis.* 35,376-84.
- Banou E. (2015) Kinesia paradoxa: a challenging Parkinson's phenomenon for simulation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 822, 165–177
- Barroso-Flores, J., Herrera-Valdez, M. A., Lopez-Huerta, V. G., Galarraga, E., Bargas, J., 2015. Diverse Short-Term Dynamics of Inhibitory Synapses Converging on Striatal Projection Neurons: Differential Changes in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *Neural Plast.* 573543.
- Beggs JM, Plenz D. 2003. Neuronal avalanches in neocortical circuits. *Journal of Neuroscience* 23:11167–11177.
- Bello, E.P., Casas-Cordero, R., Galiñanes, G.L., Casey, E., Belluscio, M.A., Rodríguez, V., Noaín, D., Murer, M.G., Rubinstein, M., 2017. Inducible ablation of dopamine D2 receptors in adult mice impairs locomotion, motor skill learning and leads to severe Parkinsonism. *Mol. Psychiatry.*
- Benjamini Y, Krieger A. M., Yekutieli D. 2006. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika* 93: 491–507.
- Berke JD. What does dopamine mean? 2018. *Nature Neuroscience.*21:787-793.
- Berke JD, Okatan M, Skurski J, Eichenbaum HB. 2004. Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron.* 43:883–896
- Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson CJ. 2002. Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends in neurosciences.* 25:525–531

- Blandini F, Armentero M-T. 2014. Dopamine receptor agonists for Parkinson's disease, *Expert Opinion on Investigational Drugs* 23:3, 387-410,
- Bostan AC, Dum RP, Strick PL. 2018. Functional Anatomy of Basal Ganglia Circuits with the Cerebral Cortex and the Cerebellum. *Prog Neurol Surg.* 33:50-61.
- Brooks D.J., 2000. Dopamine agonists: their role in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg. Psychiatry.* 68, 685-90.
- Burke R.E., O'Malley, K., 2013. Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 246,72-83.
- Burke DA, Rotstein HG, Alvarez VA. 2017. Striatal Local Circuitry: A New Framework for Lateral Inhibition. *Neuron.* 96:267-284.
- Buzsáki, G. (2004). Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* 7, 446–451.
- Buzsáki G, Draguhn A. 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926–1929.
- Buzsaki, G., 2010. Neural syntax: cell assemblies, synapsembles, and readers. *Neuron* 68:3 62-385.
- Cacace F, Mineo D, Viscomi MT, Latagliata EC, Mancini M, Sasso V, Vannelli A, Pascucci T, Pendolino V, Marcello E, Pelucchi S, Puglisi-Allegra S, Molinari M, Picconi B, Calabresi P, Ghiglieri V. 2017. Intermittent theta-burst stimulation rescues dopamine-dependent corticostriatal synaptic plasticity and motor behavior in experimental parkinsonism: Possible role of glial activity. *Mov Disord* 32:1035-1046.
- Calabresi, P., Picconi, B., Parnetti, L., Di Filippo, M., 2006. A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurol.* 5,974-83.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., Di Filippo, M., 2014. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat. Neurosci.* 17,1022-30.
- Calabresi P, Di Filippo M. 2015. The changing tree in Parkinson's disease. *Nat Neuroscience* 18:1196-8.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., & Magnusson, T. O. R. (1957). 3, 4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, 180(4596), 1200.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., Bargas, J., 2008. Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435-62
- Carillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibanez-Sandoval O, HernandezCruz A, Galarraga E, Bargas J. 2009. Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 101: 737–749.
- Carrillo-Reid, L., Hernández-López, S., Tapia, D., Galarraga, E., Bargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: receptor-specific configuration of cell assemblies. *J. Neurosci.* 31,14972-83.
- Carrillo-Reid, L., Lopez-Huerta, V. G., Garcia-Munoz, M., Theiss, S., Arbuthnott, G. W., 2015. Cell Assembly Signatures Defined by Short-Term Synaptic Plasticity in Cortical Networks. *Int. J. Neural Syst.* 25,15500-26.
- Carrillo-Reid, L., Yang W, Bando Y, Peterka DS, Yuste R. 2016. Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science* 353:691–694
- Carrillo-Reid, L., Larriva-Sahd J. 2019. Contributions of Lorente de Nó to the Nonlinear Circuitry of the Brain. *Anat Rec (Hoboken)*. [Epub ahead of print]
- Centonze D, Bracci E, Pisani A, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P. 2002. Activation of dopamine D1-like receptors excites LTS interneurons of the striatum. *Eur. J. Neurosci.* 15:2049–52.

- Chen, F., Jin, L., Nie, Z., 2017. Safety and Efficacy of Rotigotine for Treating Parkinson's Disease: A Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 20, 285-294.
- Cisek P, Kalaska JF. 2010. Neural mechanisms for interacting with a world full of action choices. *Annu Rev Neurosci.* 33:269-98.
- Costa RM, Lin SC, Sotnikova TD, Cyr M, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicolelis MA. 2006. Rapid alterations in corticostriatal ensemble coordination during acute dopamine-dependent motor dysfunction. *Neuron*, 52: 359-369.
- Criswell H, Mueller RA, Breese GR. (1988) Assessment of purine-dopamine interactions in 6-hydroxydopamine-lesioned rats: evidence for pre- and postsynaptic influences by adenosine. *J Pharmacol Exp Ther.* 244:493-500
- Cui G, Jun SB, Jin X, Luo G, Pham MD, Lovinger DM, Vogel SS, Costa RM. 2014. Deep brain optical measurements of cell type-specific neural activity in behaving mice. *Nat Protoc* 9, 1213-1228.
- De Deurwaerdère, P., Di Giovanni, G., Millan, M.J., 2017. Expanding the repertoire of L-DOPA's actions: A comprehensive review of its functional neurochemistry. *Prog. Neurobiol.* 151, 57-100.
- De Rijk MC, Rocca WA, Anderson DW, et al. A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Neurology* 1997; 48: 1277-81
- Deffains, M., Bergman, H., 2015. Striatal cholinergic interneurons and cortico-striatal synaptic plasticity in health and disease. *Mov. Disord.* 30, 1014-25.
- Dehaene S, Changeux JP. 2005. Ongoing spontaneous activity controls access to consciousness: a neuronal model for inattentive blindness. *PLoS Biol* 3:141.
- Devos, D; French DUODOPA Study Group. 2009. Patient profile, indications, efficacy and safety of duodenal levodopa infusion in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord.* 24, 993-1000.
- Diesmann M, Gewaltig MO, Aertsen A. 1999. Stable propagation of synchronous spiking in cortical neural networks. *Nature* 402:529-533.
- Ding JB, Guzman JN, Peterson JD, Goldberg JA, Surmeier DJ. 2010. Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron.* 67:294-307
- Duhne M, Lara-González E, Laville A, Padilla-Orozco M, Ávila-Cascajares F, Arias-García M, Galarraga E, Bargas J. 2020 Activation of parvalbumin-expressing neurons reconfigures neuronal ensembles in murine striatal microcircuits. *Eur J Neurosci.* [Epub ahead of print]
- Dunnet, S. B., Lelos, M., 2010. Behavioral analysis of motor and non-motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 184,35-51.
- Durstewitz D, Vitoz NM, Floresco SB, Seamans JK. 2010. Abrupt transitions between prefrontal neural ensemble states accompany behavioral transitions during rule learning. *Neuron* 66:438-448.
- Edelman GM. 1993. Neural Darwinism: selection and reentrant signaling in higher brain function. *Neuron* 10: 115-125.
- Elghaba, R., Vautrelle, N. & Bracci, E. (2016) Mutual control of cholinergic and low-threshold spike interneurons in the striatum. *Front. Cell Neuroscience*, 10, 111.
- English DF, Ibanez-Sandoval O, Stark E, Tecuapetla F, Buzsáki G, Deisseroth K, Tepper JM, Koos T. 2011. GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nat Neurosci.* 15:123-30

- Fabbrini, G., Mouradian, M. M., Juncos, J. L., Schlegel, J., Mohr, E., Chase, T.N., 1988. Motor fluctuations in Parkinson's disease: central pathophysiological mechanisms, Part I. *Ann Neurol.* 24, 366-71. <https://doi.org/10.1002/ana.410240303>.
- Faust TW, Assous M, Shah F, Tepper JM, Koós T. 2015. Novel fast adapting interneurons mediate cholinergic-induced fast GABAA inhibitory postsynaptic currents in striatal spiny neurons. *Eur J Neurosci.* 42:1764-74
- Foley, P., 2000. The L-DOPA story revisited. Further surprises to be expected? *J Neural. Transm. Suppl.* 2000, 1-20.
- Galarraga E, Bargas J, Martínez-Fong D, Aceves J. (1987) Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neurosci Lett.* 29:81-351.
- Gatev P, Darbin O, Wichmann T: Oscillations in the basal ganglia under normal conditions and in movement disorders. *Mov Disord*2006; 21:1566–15772.
- Gerfen CR. 2003. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum animal model of Parkinson's disease. *Neuroscientist.* 9:455-62.
- Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P. 2002. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci.*15; 22:5042-54
- Gerfen, C.R., Surmeier, D.J., 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* 34,441-66.
- Harris KD, Csicsvari J, Hirase H, Dragoi G, Buzsáki G. 2003. Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature* 424:552–556.
- Hebb DO. 1949. *The Organization of Behavior.* New York: Wiley
- Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E. 1997. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J Neurosci.* 17:3334-42
- Heuer, A., Smith, G.A., Lelos, M.J., Lane, E.L., Dunnett, S.B., 2012. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behav. Brain Res.* 228, 30-43. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.027>
- Hu, X.-T., Wang, R. Y., 1988. Comparison of Effects of D-1 and D-2 Dopamine Receptor Agonists on Neurons in the Rat Caudate Putamen: An Electrophysiological Study. *J. Neurosci.* 8, 4340-4348.
- Hikosaka O, Ghazizadeh A, Griggs W, Amita H. 2018. Parallel basal ganglia circuits for decision making. *J Neural Transm.* 125:515-529
- Hintiryan, H., Foster, N. N., Bowman, I., Bay, M., Song, M. Y., Gou, L. Dong, H. W. 2016. The mouse cortico-striatal projectome. *Nature neuroscience*, 19(8), 1100–1114.
- Ibáñez-Sandoval O, Tecuapetla F, Unal B, Shah F, Koós T, Tepper JM. 2010. Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. *J Neurosci.* 30:6999-7016
- Ibáñez-Sandoval O, Tecuapetla F, Unal B, Shah F, Koós T, Tepper JM. 2011. A novel functionally distinct subtype of striatal neuropeptide Y interneuron. *J Neurosci.* 31:16757-69
- Ikegaya Y, Aaron G, Cossart R, Aronov D, Lampl I, Ferster D, Yuste R. 2004. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science* 304:559–564.

- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., Hernández-Cruz, A., 2010. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J. Neurosci.* 30, 11326-36.
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Nakano, Y., Lopez-Huerta, V.G., Hernandez-Cruz, A., Bargas, J., Garcia-Munoz, M., Arbuthnott, G.M., 2019. Synchronized activation of striatal direct and indirect pathways underlies the behavior in unilateral dopamine-depleted mice. *Eur. J. Neurosci.* 49:1512-1528
- Jankovic J. and Stacy M. 2007. Medical management of levodopa associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs* 21, 677–692
- Jenner, P., Katzenschlager, R., 2016. Apomorphine - pharmacological properties and clinical trials in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 33,1: S13-S21.
- Jimenez-Shahed, J., 2016. A review of current and novel levodopa formulations for the treatment of Parkinson's disease. *Ther. Deliv.* 7, 179-91.
- Jones LM, Fontanini A, Sadacca BF, Miller P, Katz DB. 2007. Natural stimuli evoke dynamic sequences of states in sensory cortical ensembles. *PNAS* 104:18772–18777
- Kawaguchi Y. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. 1993. *The Journal of neuroscience.* 13:4908–4923
- Klaus A, Martins GJ, Paixao VB, Zhou P, Paninski L, Costa RM. 2017. The Spatiotemporal Organization of the Striatum Encodes Action Space. *Neuron* 95: 1171–1180.
- König P, Engel AK, Roelfsema PR, Singer W. 1995. How precise is neuronal synchronization? *Neural Computation* 7:469–485.
- Koós T, Tepper JM. 1999. Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nature Neuroscience*, 2:467–472.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC. 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622-626.
- Lam, Y.W., 2000. Clinical pharmacology of dopamine agonists. *Pharmacotherapy* 20,17S-25S.
- Lees, A.J., Hardy, J., Revesz, T., 2009. Parkinson's disease. *Lancet* 373, 2055-66.
- Lees, A.J., Tolosa, E., Olanow, C.W., 2015. Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr. *Mov. Disord.* 30, 19-36.
- Lemaire, N., Hernandez, L. F., Hu, D., Kubota, Y., Howe, M. W., Graybiel, A. M., 2012. Effects of dopamine depletion on LFP oscillations in striatum are task- and learning-dependent and selectively reversed by L-DOPA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109, 18126-18131.
- Liang L, DeLong MR, Papa SM. 2008. Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci* 28, 7537-7547.
- Linazasoro, G; Spanish Dopamine Agonists Study Group. , 2004. Conversion from dopamine agonists to pramipexole. An open-label trial in 227 patients with advanced Parkinson's disease. *J. Neurol.* 251,335-9.
- Lorente de Nó R. 1933. Vestibulo-ocular reflex arc. *Arch Neurol Psychiatry* 30:245–291.
- López-Huerta, V.G., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Fiordeliso, T., Drucker-Colin, R., Bargas, J., 2013. The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of parkinsonism. *J. Neurosci.* 33, 4964-75.

- Mercuri, N.B., Bernardi, G. 2005. The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci.* 26, 341-344.
- Millan, M.J., 2010. From the cell to the clinic: A comparative review of the partial D2/D3 receptor agonist and α 2-adrenoceptor antagonist, piribedil, in the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacology & Therapeutics* 128: 229-273.
- Mink, J.W. 2003. The basal ganglia. In: *Fundamental Neuroscience* 2nd ed. (Ed.: Squire, L.R., Bloom, F.E., McConnell, S.K., Roberts, J.M., Spitzer, N.C., Zigmon, M.J.). Academic press p.p. 815-839.
- Mizuno, Y., Nomoto, M., Hasegawa, K., Hattori, N., Kondo, T., Murata, M., Takeuchi, M., Takahashi, M., Tomida, T.; Rotigotine Trial Group, 2014. Rotigotine vs ropinirole in advanced stage Parkinson's disease: a double-blind study. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20,1388-93.
- Mölter J, Avitan L, Goodhill GJ. 2018. Detecting neural assemblies in calcium imaging data. *BMC Biol.* 28:143.
- Morissette, M., Di Paolo, T., 2018. Non-human primate models of PD to test novel therapies. *J. Neural Transm.* (Vienna). 125, 291-324.
- Muñoz-Manchado AB, Foldi C, Szydlowski S, Sjulson L, Farries M, Wilson C, Silberberg G, Hjerling-Leffler J. 2016. Novel Striatal GABAergic Interneuron Populations Labeled in the 5HT3a (EGFP) Mouse. *Cereb Cortex.* 26:96-105.
- Nicolelis, M.A.L. (1999). *Methods for Neural Ensemble Recordings* (Boca Raton, FL: CRC Press).
- Nutt, J.G., Obeso, J. A., Stocchi, F., 2000. Continuous dopamine-receptor stimulation in advanced Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23, S109-15.
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., Burn, D., Halliday, G. M., Bezzard, E., Przedborski, S., Lehericy, S., Brooks, D. J., Rothwell, J. C., Hallett, M., DeLong, M. R., Marras, C., Tanner, C. M., Ross, G. W., Langston, J. W., Klein, C., Bonifati, V., Jankovic, J., Lozano, A. M., Deuschl, G., Bergman, H., Tolosa, E., Rodriguez-Violante, M., Fahn, S., Postuma, R. B., Berg, D., Marek, K., Standaert, D. G., Surmeier, D.J., Olanow, C. W., Kordower, J. H., Calabresi, P., Schapira, A. H.V., Stoessl, A. J., 2017. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov. Disord.* 32,1264-1310. <https://doi.org/10.1002/mds.27115>.
- Olanow, C. W., Stocchi, F., 2017. Levodopa: A new look at an old friend. *Mov. Disord.* <https://doi.org/10.1002/mds.27216>.
- Ossowska K, Wolfarth S., 1995, Stimulation of glutamate receptors in the intermediate/caudal striatum induces contralateral turning. *Eur J Pharmacol* 273: 89–975.
- Owen, S. F., Berke, J. D., Kreitzer, A. C., 2018. Fast-Spiking Interneurons Supply Feedforward Control of Bursting, Calcium, and Plasticity for Efficient Learning. *Cell.* 172, 683-695.
- Packer AM, Russell LE, Dagleish HW, Hausser M. 2015. Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution in vivo. *Nat Methods* 12: 140–146
- Parker, J. G., Marshall, J. D., Ahanonu, B., Wu, Y. W., Kim, T. H., Grewe, B. F., Zhang, Y., Li, J. Z., Ding, J. B., Ehlers, M. D., Schnitzer, M. J., 2018. Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. *Nature*. [Epub ahead of print]
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., Bargas, J., 2016. Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol. Dis.* 91,347-61.
- Picconi, B., Hernández, L. F., Obeso, J. A., Calabresi, P., 2017. Motor complications in Parkinson's disease: Striatal molecular and electrophysiological mechanisms of dyskinesias. *Mov Disord.*

- Picconi B, Piccoli G, Calabresi P. (2012) Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol.* 970:553-72
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J.E., Barroso-Flores, J., Galarraga, E., Bargas, J. 2013a. Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of Parkinsonian tissue in vitro. *Biomed. Res. Int.* 2013:519184.
- Plata V, Duhne M, Pérez-Ortega J, Hernández-Martínez R, Rueda-Orozco P, Galarraga E, Drucker-Colín R, Bargas J. 2013b. Global actions of nicotine on the striatal microcircuit. *Front Syst Neurosci.* 6, 7:78.
- Plenz D, Thiagarajan TC. 2007. The organizing principles of neuronal avalanches: cell assemblies in the cortex? *Trends Neurosci.* 30:101-10.
- Poo MM, Pignatelli M, Ryan TJ, Tonegawa S, Bonhoeffer T, Martin KC, Rudenko A, Tsai LH, Tsien RW, Fishell G, Mullins C, Gonçalves JT, Shtrahman M, Johnston ST, Gage FH, Dan Y, Long J, Buzsáki G, Stevens C. 2016. What is memory? The present state of the engram. *BMC Biol.* 19:14-40.
- Pringsheim T., Jette N., Frolikis A. et al. (2014) The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* 29, 1583–1590
- Radad, K., Gille, G., Rausch, W.D., 2005. Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacol. Rep.* 57,701-12.
- Rascol, O., Brooks, D. J., Brunt, E. R., Korczyn, A. D., Poewe, W. H., Stocchi, F., 1998. Ropinirole in the treatment of early Parkinson's disease: a 6-month interim report of a 5-year levodopa-controlled study. 056 Study Group. *Mov. Disord.* 13, 39-45.
- Raz A, Feingold A, Zelanskaya V, Vaadia E, Bergman H. 1996. Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates. *Journal of Neurophysiology* 76:2083–2088
- Reichmann, H., 2000. Long-term treatment with dopamine agonists in idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol.* 247 Suppl 4, 17-9
- Rendón-Ochoa EA, Hernández-Flores T, Avilés-Rosas VH, Cáceres-Chávez VA, Duhne M, Laville A, Tapia D, Galarraga E, Bargas J. (2018). Calcium currents in striatal fast-spiking interneurons: dopaminergic modulation of CaV1 channels. *BMC Neuroscience* 19:42.
- Romo R, Rossi-Pool R .2020. Turning Touch into Perception. *Neuron.* 105:16-33
- Russo E, Durstewitz D. 2017. Cell assemblies at multiple time scales with arbitrary lag constellations. *Elife.* 11. pii: e19428.
- Schultz W. J. 2016. Reward functions of the basal ganglia. *Neural Transm (Vienna).* 123:679-693.
- Sharma, S., Singh, S., Sharma, V., Singh, V. P., Deshmukh, R., 2015. Neurobiology of L-DOPA induced dyskinesia and the novel therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother.* 70, 283-93.
- Shen, T., Ye, R., Zhang, B., 2017. Efficacy and safety of pramipexole extended-release in Parkinson's disease: a review based on meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Neurol.* 24,835-843.
- Sheng MJ, Lu D, Shen ZM, Poo MM. 2019. Emergence of stable striatal D1R and D2R neuronal ensembles with distinct firing sequence during motor learning. *Proc Natl Acad Sci.* 116:11038-11047.
- Sironi, V. A. 2011. Origin and Evolution of Deep Brain Stimulation. *Front Integr Neurosci.* 5:42
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., Bolam, J.P. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.* 86:353-87

- Sprenger, F., Poewe, W., 2013. Management of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *CNS Drugs* 27, 259-72.
- Sporns O. 2012. From simple graphs to the connectome: networks in neuroimaging. *Neuroimage* 62:881–886.
- Stocchi, F., 2009. Dopamine receptor agonists in the treatment of advanced Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, S54-7.
- Stocchi, F., Torti, M., Fossati, C., 2016. Advances in dopamine receptor agonists for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin. Pharmacother.* 17, 1889-902.
- Strangman, G. (1996). Searching for cell assemblies: How many electrodes do I need? *J. Comput. Neurosci.* 3, 111–124.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z. 1996. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *The Journal of neuroscience.* 16:6579–6591
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198: 3-18.
- Sveinbjornsdottir S. 2016. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1:318-324
- Tanimura A, Pancani T, Lim SAO, Tubert C, Melendez AE, Shen W, Surmeier DJ. (2018) Striatal cholinergic interneurons and Parkinson's disease. *European Journal Neuroscience.* (10):1148-1158.
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J, Galarraga E. 2007. Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:10258-63
- Tepper JM, Bolam JP. 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol.* 14:685-92.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koós T, Ibáñez-Sandoval O. 2010. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in neuroanatomy.* 4:150
- Thomas, D., Tovey, S.C., Collins, T.J., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Lipp, P., 2000. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium.* 28, 213–223.
- Ungerstedt, U., Arbuthnott, G. W., 1970. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24, 485-93.
- UK PD MED Collaborative Group., 2014, Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial. *Lancet* 384: 1196–205.
- Vautrelle N, Carrillo-Reid L and Bargas J. 2009. Diversity of Up-State Voltage Transitions During Different Network States. In: Kuei-Yuan Tseng, ed. *Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson's Disease.* 1st.ed. Humana Press, 73-86
- Wang, Y., Zhou, F.M., 2017. Striatal but Not Extrastriatal Dopamine Receptors Are Critical to Dopaminergic Motor Stimulation. *Front. Pharmacol.* 8,935.
- Xenias HS, Ibáñez-Sandoval O, Koós T, Tepper JM. 2015. Are striatal tyrosine hydroxylase interneurons dopaminergic? *J Neurosci.* 35:6584-99.
- Yan Z, Song W.J and Surmeier J. (1997). D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J. Neurophysiol.* 77, 1003–1015.

- Yuste R, MacLean JN, Smith J, Lansner A. 2005. The cortex as a central pattern generator. *Nature Reviews Neuroscience* 6:477–483.
- Zesiewicz, T.A., Chriscoe, S., Jimenez, T., Upward, J., Davy, M., VanMeter, S., 2017. A randomized, fixed-dose, dose-response study of ropinirole prolonged release in advanced Parkinson's disease. *Neurodegener. Dis. Manag.* 7,61-72.
- Zold CL, Belluscio M, Kasanetz F, Pomata PE, Riquelme LA, Gonon F, Murer MG (2009) Converging into a unified model of Parkinson's disease pathophysiology. In: *Cortico-subcortical dynamics in Parkinson disease* (Tseng KY, ed), pp 143–156.