



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DEL ESTRIADO DORSOLATERAL
PROVOCADOS POR LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE DOPAMINA**

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

PRESENTA:
JOB PÉREZ BECERRA

TUTOR:
DR. LUIS ALBERTO CARRILLO REID
INB, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO
INB, UNAM

DR. ELIAS MANJARREZ LÓPEZ
INSTITUTO DE FISILOGIA, BUAP

JURIQUILLA, QUERÉTARO, JUNIO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Abreviaturas

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
δ	Delta
θ	Theta
β	Beta
γ	Gamma
A ₂ AR	Receptor de Adenosina
AMP	Adenosín Monofosfato
mCBGT	Circuito motor cortico-ganglio basal-tálamo cortical
CWT	Transformada Continua de Wavelets
DLS	Estriado dorsolateral
DMS	Estriado dorsomedial
EP	Enfermedad de Parkinson
FSI	Interneuronas de disparo rápido
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GB	Ganglios Basales
Gi	Proteína G inhibitoria
GPe	Globo Pálido Externo
Gpi	Globo Pálido Interno
Gs	Proteína G estimulante
IBI	Intervalo inter-ráfaga
L-Dopa	Levodopa
LFP	Potencial Local de Campo
MSNs	Neuronas Espinosas Medianas
dMSNs	Neuronas espinosas medianas de la vía directa

iMSNs	Neuronas espinosas medianas de la vía indirecta
MFB	Fascículo prosencefálico medial
SOM	Somatostatina
SN	Sustancia Nigra
SNpc	Sustancia Nigra pars compacta
SNr	Sustancia Nigra pars reticulata
STN	Núcleo Subtalámico
TAN	Neuronas Tónicamente Activas
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
VTA	Área Tegmental Ventral

Contenido

Abreviaturas.....	2
Resumen.....	6
Introducción	7
Enfermedad de Parkinson.....	7
Ganglios basales	9
Actividad eléctrica durante la Enfermedad de Parkinson.....	14
Control de ensamblajes neuronales del estriado en la Enfermedad de Parkinson.....	16
Antecedentes.....	18
Hipótesis.....	20
Objetivos	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos:	20
Estrategia experimental	21
Análisis del LFP utilizando la transformada de Wavelets	24
Transformada de Fourier.....	24
Transformada continua de Wavelets (CWT).....	25
Análisis de ráfagas del LFP	26
Estadística.....	28
Resultados	30
Conducta en campo abierto.....	30
Efecto de la liberación controlada de dopamina en el LFP registrado en el DLS de ratones control	32
Efecto de la liberación controlada de dopamina en el LFP registrado en el DLS de ratones hemiparkinsonianos.....	35
Efecto de la liberación controlada de dopamina en ráfagas del LFP registrado en el DLS de ratones control y hemiparkinsonianos	38
Ráfagas en la banda delta	38
Ráfagas en la banda theta	41
Ráfagas en la banda beta.....	44

Ráfagas en la banda gamma.....	47
Discusión.....	51
Conclusiones	56
Perspectivas	56
Referencias.....	57
Figuras suplementarias.....	62
Análisis de ráfagas por medio de rectificación.....	62
Agradecimientos	70

Resumen

Actualmente se sabe que en la enfermedad de Parkinson (EP) existen alteraciones en la actividad coordinada de grupos de neuronas; lo cual produce cambios en la conducta motora. Dichas alteraciones se encuentran asociadas a la muerte de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales localizadas en la Sustancia Nigra pars Compacta y que proyectan hacia el núcleo estriado, donde se integra información multisensorial y motora. Una de las características de la EP es el incremento en la potencia de la banda beta (12-30 Hz) en el núcleo estriado, ritmo neuronal que se asocia a la inhibición de los movimientos. Actualmente existen terapias para el tratamiento de la EP; la estimulación profunda y el uso de levodopa, principalmente. Sin embargo, estos tratamientos llegan a ser invasivos, inespecíficos y causar otras alteraciones a largo plazo. Por ello, es importante proponer nuevas alternativas en el remplazo de dopamina que permita liberar este neurotransmisor en el estriado, con un mayor control temporal y espacial y sin provocar efectos secundarios. Una alternativa para liberar dopamina de forma controlada es mediante el uso de RubiDopamina (RubiDopa), un compuesto de dopamina enjaulada que libera el neurotransmisor en presencia de luz.

Nuestro objetivo fue estudiar si la estimulación con RubiDopa podría ser capaz de restaurar la actividad eléctrica del estriado dorsolateral de ratones hemiparkinsonianos. Mediante el registro del potencial local de campo del estriado dorsolateral de ratones anestesiados, se registraron los cambios en ráfagas de las bandas delta, theta, beta y gamma al estimular con RubiDopa. Experimentos realizados en nuestro laboratorio, mostraron un incremento en la potencia de ráfagas de las bandas delta, theta y beta registradas en el estriado dorsolateral parkinsoniano en comparación a lo registrado en ratones control. La estimulación con RubiDopa en el estriado de ratones control produjo un decremento de la amplitud en las ráfagas registradas de la banda delta. Mientras que en ratones hemiparkinsonianos se observó un decremento significativo de la potencia de ráfagas en las bandas delta y theta. Estos resultados sugieren que la estimulación con RubiDopa disminuye alteraciones en la actividad de grupos neuronales del estriado dorsolateral durante la EP.

Introducción

Enfermedad de Parkinson

La EP es un trastorno neurodegenerativo complejo que presenta una gran diversidad de síntomas con repercusiones en la conducta motora y no motora. Entre estos signos, se encuentran las acinesias, bradicinesias (reducción del movimiento), rigidez muscular, temblores (movimientos involuntarios) y dificultad en la iniciación del movimiento (McGregor & Nelson, 2019; Poewe et al., 2017); sin embargo, otras alteraciones cognitivas y conductuales (signos no motores) pueden llegar a ser notorias incluso antes de la aparición de los signos motores (Jost, 2017). La incidencia de esta enfermedad ha tomado gran relevancia en nuestro país durante los últimos años; esto debido a que algunas estadísticas estiman que en México existen 68,715 personas con este padecimiento ("Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016," 2018). Por otra parte, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía menciona que nuestro país se reportan 50 casos por cada 100,000 habitantes.

La EP es un trastorno neurodegenerativo que aún no tiene cura; pero algunos de los signos y síntomas motores son tratados parcialmente con herramientas farmacológicas de remplazo de la dopamina, como lo es el uso de L-Dopa (levodopa). Entre las desventajas del uso de este tratamiento están las fluctuaciones en la concentración de L-Dopa, además de sus efectos no solo en el cerebro sino a nivel sistémico. Se sabe que el uso prolongado de L-Dopa puede generar la aparición de nuevos signos motores como las discinesias (Abbott, 2010; Liang, DeLong, & Papa, 2008; Ryan, Bair-Marshall, & Nelson, 2018). Si bien se ha documentado que el uso de levodopa corrige alteraciones en la actividad eléctrica cerebral de pacientes parkinsonianos, se sabe también que esta terapia de sustitución dopaminérgica no mimetiza la forma en la que se libera dopamina de manera fisiológica (Jenkinson & Brown, 2011). Por otra parte, es común notar que los signos no motores de la enfermedad de Parkinson no responden favorablemente

a la terapia con L-Dopa; lo que se vuelve un problema al intentar mejorar la calidad de vida de estos pacientes (Hisahara & Shimohama, 2011; Ryan et al., 2018).

Otra estrategia terapéutica que ha demostrado resultados en pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada es la estimulación cerebral profunda; la cual resulta ser una opción que, además de ser altamente invasiva, también es poco específica en la estimulación de poblaciones neuronales que podrían estar siendo especialmente alteradas en la EP (Brittain, Sharott, & Brown, 2014; Groiss, Wojtecki, Südmeyer, & Schnitzler, 2009; Tinkhauser et al., 2017). Aún hace falta desarrollar y estudiar nuevas tecnologías que permitan aplicar una terapia eficaz, menos invasiva y con mayor control al momento de la estimulación que no genere efectos a largo plazo y corrija las alteraciones durante la EP.

Los resultados en los tratamientos antes mencionados no resultan ser homogéneos en el universo de pacientes con EP. No obstante, se ha encontrado que las alteraciones cognitivas y conductuales de pacientes con esta enfermedad se encuentran estrechamente relacionadas al deterioro de la vía nigroestriada (Poewe et al., 2017). Esta vía está conformada por neuronas dopaminérgicas localizadas en la Sustancia Nigra *pars compacta* (SNpc) que proyectan hacia los núcleos Caudado-Putamen pertenecientes al grupo de los Ganglios Basales (Gerfen et al.) (McGregor & Nelson, 2019; Poewe et al., 2017) (fig. 1).

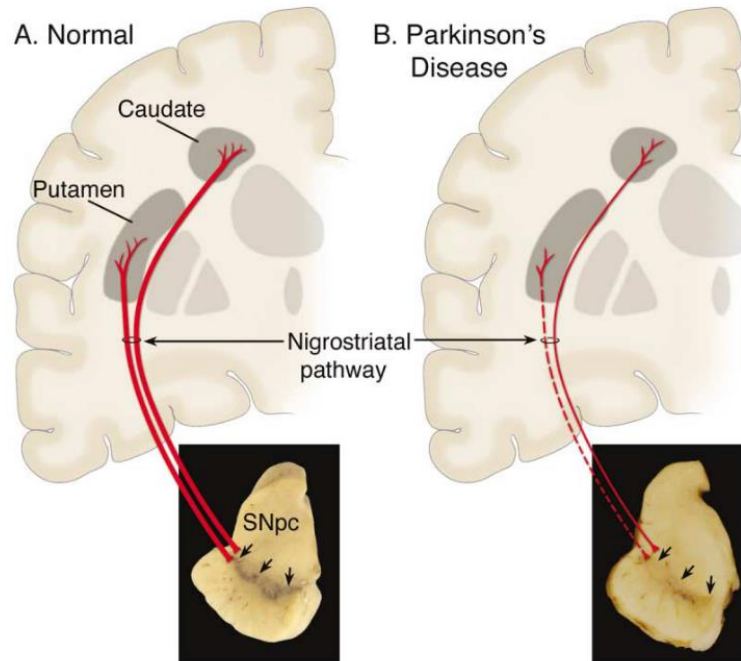


Figura 1. Representación esquemática del deterioro de la vía nigroestriatal durante la EP. Neuronas de la SNpc envían proyecciones dopaminérgicas (en color rojo) a los núcleos caudado-putamen (estriado) durante condiciones normales (A). En la enfermedad de Parkinson (B) la vía nigroestriatal se degenera por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Imagen tomada de (Poewe et al., 2017).

Ganglios basales

Los GB son un conjunto de núcleos subcorticales involucrados en varias funciones motoras, cognitivas y conductuales; entre ellas el procesamiento sensorial, la recompensa, la toma de decisiones, y la planeación-ejecución de movimientos (Redgrave et al., 2010). Se sabe que este grupo de núcleos subcorticales interconectados juegan un papel crucial en el desarrollo de los síntomas motores característicos de la EP (Poewe et al., 2017). Dentro del grupo de núcleos que componen a los GB se encuentran: el núcleo subtalámico (STN), los segmentos externo e interno del globo pálido (GPe, GPi), las Sustancia Nigra pars compacta (SNpc), pars reticulata (SNr) y el núcleo Caudado-Putamen, también conocido como núcleo estriado (Deffains et al., 2016). El estriado, también conocido como neostriado, es el principal núcleo de los GB que recibe un gran número de proyecciones provenientes de otras áreas del encéfalo. El núcleo estriado (en roedores) se encuentra dividido en tres principales áreas: el estriado ventral,

conocido como núcleo accumbens; el estriado dorsal, que a su vez se divide en estriado dorsomedial (DMS) y dorsolateral (DLS). El DLS muestra una relevancia importante en el aprendizaje y ejecución de tareas motoras, así como en el procesamiento de la información somatosensorial (Costa et al., 2006; McGregor & Nelson, 2019), además se han demostrado alteraciones durante la EP (McGregor & Nelson, 2019).

Las proyecciones que recibe el estriado son diversas. Algunas de ellas provienen de neuronas glutamatérgicas de la corteza (cortico-estriatales). Otras aferencias glutamatérgicas vienen de núcleos talámicos. Otra proyección más, como se mencionaba anteriormente, se origina por neuronas dopaminérgicas de la SNpc y conforman a la vía nigroestriada; cuya relevancia en el ámbito médico se debe a que estas proyecciones muestran un daño importante durante la EP (Poewe et al., 2017). A la interconexión entre estas estructuras se le conoce como el circuito motor cortico-ganglio basal-tálamo cortical (Merchant & Bartolo, 2018), mismo que se describe a continuación.

Las proyecciones talámicas y corticales glutamatérgicas, así como las dopaminérgicas de SNpc, hacen sinapsis en neuronas espinosas medianas (MSNs) del estriado (Costa et al., 2006). Las MSNs son un grupo de neuronas que componen principalmente al núcleo estriado, incluyendo la porción del DLS. La distribución de estas neuronas es homogénea dentro de este núcleo, y a diferencia de la corteza carece de aparente organización estructural. Se sabe que aproximadamente el 90 a 95% del total de neuronas en el estriado son MSNs inhibitorias; cuyo principal neurotransmisor es el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Gagnon et al., 2017). El porcentaje de neuronas restante (5-10%) en el estriado lo componen interneuronas de disparo rápido GABAérgicas (*fast spiking*, FSI) y colinérgicas tónicamente activas (*tonically active neurons*, TAN); las cuales también participan en el circuito canónico del estriado (Tepper & Bolam, 2004). Lo anterior convierte a las MSNs en las principales neuronas de recepción y proyección de información dentro del estriado (McGregor & Nelson, 2019).

Dentro de la población de MSNs existen dos subgrupos de neuronas que difieren esencialmente en el receptor de dopamina que expresan; esta diferencia da origen a dos proyecciones antagonistas dentro del modelo clásico de los GB, las vías directa e indirecta (Albin, Young, & Penney, 1989; Gerfen et al., 1990). De manera general y de acuerdo con el modelo clásico del funcionamiento de los GB; la activación de la vía directa está relacionada al inicio del movimiento por medio de la excitación de MSNs que expresan receptores a dopamina del tipo D1 (dMSNs). Debido a que el acople de este receptor esta dado con una proteína del tipo Gs estimulante; se sabe que la activación del receptor D1 promueve la despolarización de dMSNs por la producción de AMP cíclico y otras vías de señalización (Hisahara & Shimohama, 2011).

De acuerdo con el modelo clásico, estas proyecciones gabaérgicas proyectan directamente su input inhibitorio sobre el GPi y SNr, los núcleos de salida de los GB. El GPi y SNr inhiben a su vez al tálamo por medio de proyecciones inhibitorias. De tal manera que un incremento en la actividad de la vía directa (dMSNs) daría como resultado la desinhibición del tálamo, promoviendo la activación de la corteza y como consecuencia final, un incremento en la facilitación de los movimientos. Durante la EP, se ha reportado que la activación de la vía directa se encuentra mermada por la denervación dopaminérgica de la vía nigroestriatal (Ryan et al., 2018); lo cual conlleva a una menor excitación de la corteza y a la pérdida del movimiento producida por un mayor tono inhibitorio de los núcleos GPi y SNr hacia el tálamo (McGregor & Nelson, 2019).

Por otra parte, la activación de la vía indirecta está dada por un incremento del disparo de otra población de MSNs (iMSNs). La activación de la vía indirecta puede verse frenada por el acople de dopamina en el receptor de dopamina que expresan las iMSNs, el cual es del tipo D2. El receptor D2 se encuentra acoplado a proteínas del tipo Gi (inhibitoria); y su activación disminuye la excitabilidad de iMSNs, y por lo tanto de la vía indirecta. El decremento en la activación de la indirecta facilita el movimiento; mientras que incremento de la vía indirecta promueve la disminución de los movimientos. En el modelo clásico, el incremento de la vía indirecta inhibe al

GPe, el cual proyecta un tono inhibitorio sobre el STN, núcleo de los GB que proyecta terminales glutamatérgicas (excitador) sobre los núcleos de salida (GPi y SNr). El incremento en la actividad de estos núcleos inhibitorios incrementa la inhibición del tálamo y sus eferencias excitadoras hacia la corteza para finalmente disminuir el movimiento. En la EP, y de acuerdo con la teoría clásica de los GB, la actividad de la vía indirecta (iMSNs) se vería incrementada al disminuir el input dopaminérgico sobre estas vía y por lo tanto apoyaría la generación de los síntomas motores durante la enfermedad (McGregor & Nelson, 2019) (figura 2).

Algunas de las características clínicas de la EP, entre ellas los síntomas motores centrales (temblor, bradicinesia y rigidez), se derivan de patrones de actividad aberrantes reportados en MSNs pertenecientes a las vías directa e indirecta (Jáidar et al., 2019; Parker et al., 2018). El conocer en su totalidad la forma en la que se establecen estos patrones de actividad aberrantes en el estriado durante la EP, nos permitiría en un futuro encontrar estrategias farmacológicas más certeras en la reversión de la actividad aberrante de grupos neuronales asociados a los signos y síntomas motores y no motores de la EP.

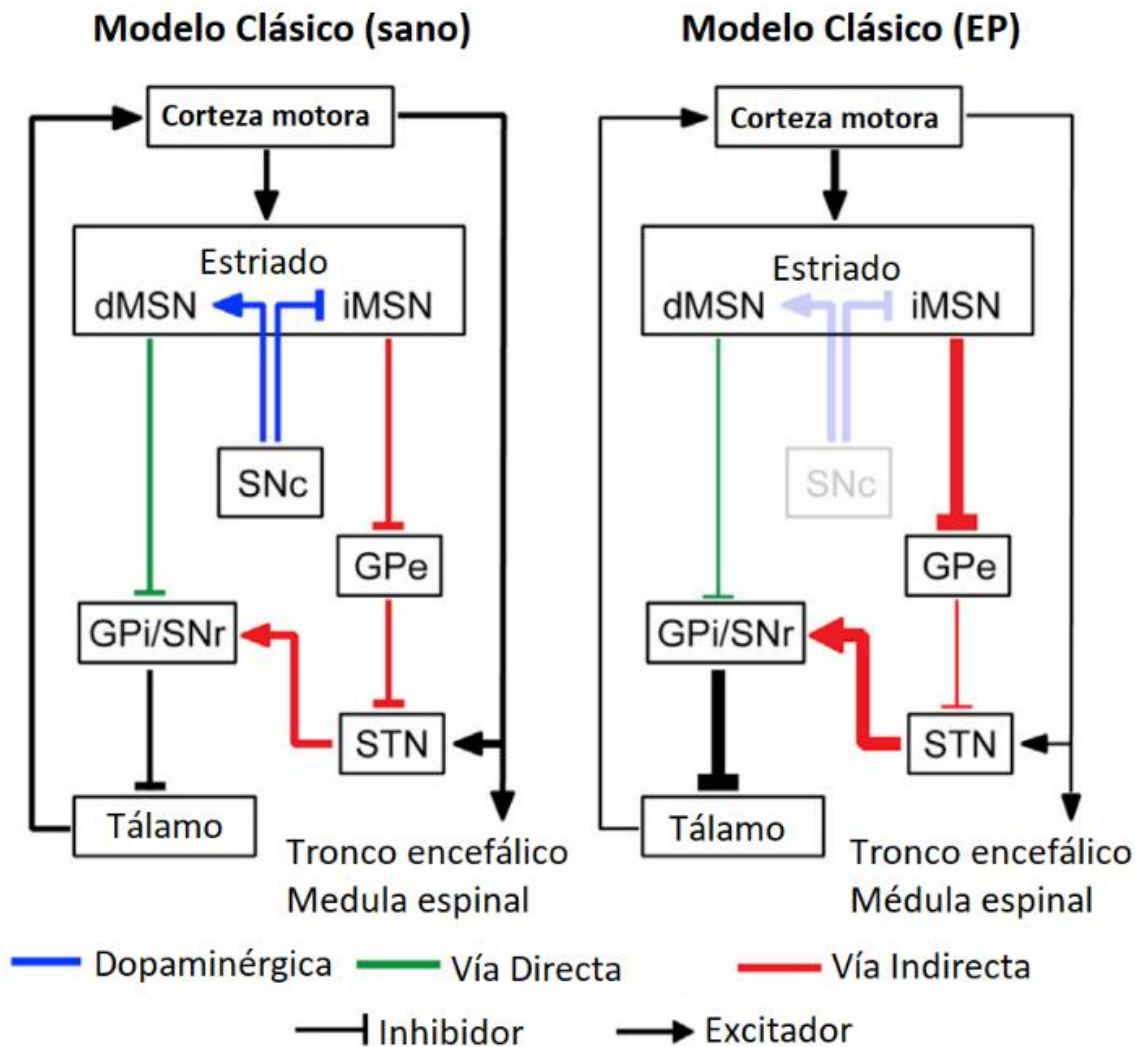


Figura 2. Modelo clásico de los ganglios basales en condiciones normales y durante EP. Modelo clásico de los ganglios basales en condiciones fisiológicas normales (izquierda); la vía directa se compone de proyecciones gabaérgicas que inhiben directamente al GPI y SNr. Estos inhiben a su vez al tálamo por proyecciones gabaérgicas inhibitorias, lo que concluye en la desinhibición del tálamo e induce la activación de la corteza para el inicio del movimiento; la vía indirecta inhibe la inhibición del STN por medio del GPe, lo que conlleva a un incremento del tono inhibitorio del GPI y SNr sobre el tálamo. Modelo clásico de los GB durante la EP (derecha); la activación de la vía directa se encuentra mermada por la denervación dopaminérgica de la vía nigroestriatal, mientras que la vía indirecta se encuentra sobre activada. Lo anterior conlleva a una disminución del movimiento producida por un incremento del tono inhibitorio de los núcleos de salida (GPI y SNr) hacia el tálamo. Imagen tomada y modificada de (McGregor & Nelson, 2019).

Actividad eléctrica durante la Enfermedad de Parkinson

La actividad neuronal del estriado puede ser estudiada de diversas maneras; una es por el registro de la actividad eléctrica de neuronas individuales (actividad unitaria); otra por el registro de grupos neuronales por medio del registro del potencial local de campo (LFP, *local field potential*) *in vivo*. El registro del LFP permite estudiar la actividad coordinada de ensambles neuronales en frecuencias lentas (0.5 - 100 Hz). Los cambios en el voltaje de esta señal eléctrica pueden verse influenciados por cualquier flujo de carga a través de cualquier membrana celular. Sin embargo, son los eventos presinápticos, postsinápticos y variaciones del voltaje sub-umbrales de la membrana celular de grandes conjuntos de neuronas los que, sumando su actividad coordinada, muestran una mayor influencia en los cambios de frecuencias registrados en el LFP, induciendo un incremento de la potencia en el espectro (Buzsáki, Anastassiou, & Koch, 2012).

El LFP se divide en distintos ritmos aislados de bandas de frecuencias que pueden ir desde un rango con frecuencias bajas hasta rangos de alta frecuencia. Dependiendo de la bibliografía, el LFP se puede dividir en las bandas: delta (1-5 Hz), theta (5-12 Hz), beta (12-30 Hz) y gamma (30-80 Hz) (Chen, Lei, & Xu, 2018). En la bibliografía se ha estudiado cual es el correlato funcional entre estos ritmos y el output conductual y motor no solo durante condiciones homeostáticas, sino también durante la EP. Un ejemplo es el caso de la banda delta, misma en la que se ha estudiado principalmente su relación con la etapa de sueño de ondas lentas; además, en términos de movimiento, se ha observado que durante acciones motoras existe una desincronización de esta banda (Leung & Yim, 1993). En el caso de la banda theta, un ritmo asociado principalmente al hipocampo y la memoria, el incremento en la potencia de esta banda esta correlacionado positivamente con la iniciación del movimiento y con la aparición de temblores en los pacientes parkinsonianos (Asch et al., 2020). Por otro lado, la banda beta ha sido estudiada en su relación con la ejecución de tareas motoras, de tal modo que un incremento en la potencia de la banda beta inhibe la ejecución del movimiento (Brown, 2003), como es el caso de los pacientes parkinsonianos. Análogamente, la banda gamma ha sido relevante en esta patología, ya que el incremento de la potencia de este

ritmo se asocia a la facilitación del movimiento en pacientes que han sido expuestos a una terapia de remplazo de dopamina (Brown, 2003), por lo que se le considera como un ritmo procinético.

En la actualidad se sabe que la EP produce alteraciones en diferentes núcleos de los GB, incluyendo componentes del circuito motor cortico-ganglio basal-tálamo cortical (mCBGT): Estas alteraciones modifican la sincronización y funcionamiento de grandes grupos neuronales. Por medio del registro del LFP, se ha estudiado que la sincronización anómala de poblaciones neuronales durante la EP está orientada principalmente a un incremento en la potencia de la banda beta, la cual se ubica entre los 12-30 Hz. Estos cambios en la banda beta han sido registrados en núcleos como el STN, el GPe y el estriado pertenecientes a este circuito motor (Chen et al., 2018; Deffains et al., 2016; Sharott, Vinciati, Nakamura, & Magill, 2017; Tachibana, Iwamuro, Kita, Takada, & Nambu, 2011; Tinkhauser et al., 2017). Por otra parte, se ha reportado que la potencia de la banda gamma se encuentra reducida durante la EP (Chen et al., 2018). Lo anterior contribuyendo a alteraciones en el mCBGT.

Pocos son los artículos que han reportado alteraciones en el LFP registrado en el estriado (caudado-putamen). Estudios realizados en primates no humanos reportaron alteraciones en la actividad de potenciales de acción y LFP de algunos núcleos de los GB después de la inducción de la EP. Algunos registros del LFP en el estriado apuntan a que no hay un incremento o alteraciones de la banda beta (Deffains et al., 2016). Otros estudios realizados en ratas reportan que la potencia en la banda beta del estriado incrementa con la lesión unilateral de 6-OHDA (Sharott et al., 2017). En ratones Parkinsonianos se ha reportado un incremento en la potencia de la banda beta y un decremento en la banda gamma del estriado bajo diferentes condiciones (Chen et al., 2018; Costa et al., 2006); pero no cuando el registro se realiza con el ratón anestesiado con isoflurano (Chen et al., 2018).

La actividad neuronal y sus alteraciones relacionadas a la EP pueden ser estudiadas por medio del registro de neuronas individuales. En lo que respecta a las alteraciones en el registro unitario de neuronas en el estriado dorsal, se ha encontrado que la denervación dopaminérgica incrementa la tasa de disparo en

algunas neuronas, mientras que en otras disminuye. Estos resultados han sido reportados en primates no humanos (Liang et al., 2008; Singh et al., 2016), ratas (Sharott et al., 2017) y ratones en libre movimiento (Chen et al., 2018; Costa et al., 2006; Ryan et al., 2018; Sagot, Li, & Zhou, 2018). Además, es importante tomar en cuenta si el sujeto experimental se encuentra en libre movimiento, con cabeza fija o bajo los efectos de algún anestésico; lo anterior debido a que las diferencias en la tasa de disparo cambian bajo estas condiciones (Chen et al., 2018; Costa et al., 2006; Ryan et al., 2018).

Control de ensambles neuronales del estriado en la Enfermedad de Parkinson

El desarrollo de la farmacología ha permitido el uso de agonistas y antagonistas dopaminérgicos que, aplicados a una determinada preparación, puede ayudarnos a entender cuál es el papel de la dopamina en el control motor y la coordinación de ensambles neuronales bajo condiciones patológicas y control (Burkhardt, Jin, & Costa, 2009; Costa et al., 2006). Si bien la administración sistémica de agonistas o antagonistas dopaminérgicos ha ayudado a estudiar cual es el efecto de los cambios en la concentración de dopamina sobre el LFP, el efecto de estos fármacos no tiene una buena resolución temporal y espacial.

En los últimos años se han desarrollado tecnologías con una mayor resolución espacial y temporal para el control específico de ensambles neuronales. Una técnica que ha tomado relevancia en el control óptico de ensambles neuronales es la optogenética; la cual consiste en la inserción de canal-rodopsinas sensibles a la luz en la membrana celular de tipos neuronales específicos para controlar su actividad con una alta resolución temporal y espacial (Gradinaru, Mogri, Thompson, Henderson, & Deisseroth, 2009; Kravitz et al., 2010).

Mediante la técnica de optogenética, Kravitz y cols. reportaron que la activación controlada de dMSNs y iMSNs puede modular la conducta motora conforme a la teoría clásica del funcionamiento de los GB (Kravitz et al., 2010). Ellos mismos mencionan que la activación bilateral específica de iMSNs genera en los ratones un *estado parkinsoniano* en el que se observan bradicinesias, pérdida del movimiento

fino, disminución del desplazamiento y otros signos motores característicos de la EP. En adición, este grupo de investigación reportó que la activación controlada de dMSNs en un modelo parkinsoniano controla la disminución del movimiento y la aparición de signos motores asociados a la EP (Gradinaru et al., 2009; Kravitz et al., 2010).

Una técnica similar a la optogenética es la opto farmacología, esto con respecto a la estimulación lumínica; la cual se basa en el desarrollo y uso de neurotransmisores *enjaulados* en compuestos sensibles a luz. Estos neurotransmisores, al estar enjaulados no pueden interactuar con su receptor, solo hasta que se haya estimulado con luz su liberación. Dichos neurotransmisores pueden ser administrados y activados con una alta precisión temporal y espacial sin la necesidad de realizar manipulaciones en el genoma celular como lo es con la optogenética. Neurotransmisores enjaulados como el RubiGlutamato, RubiGABA o la RubiDopa (dopamina enjaulada) han sido utilizados con el objetivo de manipular la actividad de ensamblajes neuronales durante condiciones *in vitro* e *in vivo* (Andino-Pavlovsky et al., 2017b; Araya, Andino-Pavlovsky, Yuste, & Etchenique, 2013; Fino et al., 2009)

En años recientes, Taura y colaboradores reportaron el efecto de un antagonista enjaulado y selectivo del receptor de Adenosina ($A_{2A}R$, expresado en iMSNs). El receptor de Adenosina ($A_{2A}R$) se encuentra formando heterómeros con el receptor D2 a su vez acoplados a una proteína Gs (excitadora). Ellos demostraron que la estimulación bilateral en presencia del antagonista enjaulado del $A_{2A}R$, incrementaba la distancia recorrida en ratones control además de corregir alteraciones de la conducta motora de ratones parkinsonianos. Sin embargo, ellos no precisan sobre qué es lo que podría estar sucediendo con la actividad neuronal al liberar este compuesto.

Si bien estas investigaciones están orientadas al control óptico de ensamblajes neuronales por medio de optogenética u optofarmacología; los estudios orientados al control óptico simultáneo al registro eléctrico del estriado en condiciones fisiológicas normales y durante estados patológicos como la EP son aún escasos.

Antecedentes

Como se mencionó antes, Costa y colaboradores estudiaron los ensambles del estriado dorsolateral y la corteza motora durante cambios en la concentración de dopamina en un modelo de Parkinson *knock out* del transportador de dopamina y ratones control (Costa et al., 2006). Además de estudiar las alteraciones en la actividad unitaria, ellos observaron que el LFP registrado en el estriado también se veía modificado por variaciones en la concentración de dopamina. En condiciones donde la concentración de dopamina en el estriado es menor, ellos reportan un decremento de la potencia en los ritmos theta y gamma, además de un aumento en la potencia de las bandas delta y beta. Este comportamiento fue inverso cuando se administró L-Dopa (terapia de remplazo dopaminérgica) de manera sistémica (Costa et al., 2006). Otras investigaciones de este grupo sugieren que los cambios del LFP en el estriado, están siendo provocados principalmente por la inactivación/activación de receptores D2. Lo anterior debido a que la aplicación sistémica de antagonistas del receptor D2 promueve un aumento de la potencia en las bandas delta y beta en ratones control (Burkhardt et al., 2009).

La disminución de la potencia de la banda delta coincide con lo reportado por otro grupo de investigación, quienes al inducir la liberación de dopamina por medio de la estimulación del VTA (un núcleo que manda proyecciones dopaminérgicas al estriado) registran un decremento de la potencia de este ritmo. El decremento de la potencia de la banda delta también se asocia al inicio de los movimientos (Leung & Yim, 1993).

Otros resultados reportados por Ryan y colaboradores estudian las alteraciones en la tasa de disparo neuronal durante la EP y posterior a la administración de agonistas dopaminérgicos (L-Dopa) (Ryan et al., 2018). En ese artículo, este grupo reporta que la administración de L-Dopa genera un estado disquinético (movimientos anormales) en ratones control y parkinsonianos, inducido por una actividad anómala de MSNs (Ryan et al., 2018). De este trabajo, se podría concluir que la terapéutica de la EP debería estar dirigida a un control estricto en la temporalidad con la que se libera dopamina en el estriado y evitar así la activación

descontrolada de grupos neuronales que podrían generar la aparición de otros síntomas no deseados la conducta de movimiento en pacientes parkinsonianos.

El uso de compuestos enjaulados, como la Rubi-Dopa, para el control de ensamblajes neuronales durante el registro eléctrico ha sido escasamente reportado en la bibliografía. Andino-Pavlovsky y colaboradores reportaron que la aplicación y estimulación lumínica de RubiDopa en la corteza prefrontal medial de ratas produce cambios en el acople fase-amplitud entre las bandas delta-gamma del LFP, sin que hubiera cambios en la potencia de estas bandas (Andino-Pavlovsky et al., 2017a). El acople fase-amplitud ocurre cuando la amplitud de oscilaciones de mayor frecuencia (gamma) es modificada por la fase de oscilaciones de menor frecuencia (delta) (Andino-Pavlovsky et al., 2017a).

La estimulación del estriado, realizada por la aplicación de este neurotransmisor enjaulado, podría tener efectos más relevantes sobre el LFP debido a la relevancia de la dopamina, no solo en los ganglios basales sino también en el DLS. A futuro, el uso de RubiDopa puede sentar las bases para el desarrollo de una terapia de remplazo dopaminérgica menos invasiva, con mayor control, eficaz y con un menor número de efectos adversos en pacientes con EP.

Los antecedentes descritos anteriormente dan origen a nuestro tema de investigación; el cual busca responder cuales son los cambios en la actividad eléctrica de grupos neuronales frente a la liberación controlada de dopamina en el estriado mediante el uso de compuestos enjaulados como la RubiDopa. Esto con el propósito de estudiar la actividad anómala del LFP durante la EP y revertirla en el corto plazo. Lo anterior, con el fin de proponer el uso de nuevas alternativas en el tratamiento de la EP y mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Hipótesis

La actividad eléctrica anómala de grupos neuronales del estriado dorsolateral registrada de ratones hemiparkinsonianos es restaurada por la liberación local y controlada de dopamina.

Objetivos

Objetivo general

Implementar una técnica de estudio que permita determinar si la liberación controlada de dopamina en el estriado dorsolateral restaura la actividad global de grupos neuronales del estriado en ratones lesionados con 6-OHDA

Objetivos específicos:

1. Estandarizar el registro de la actividad eléctrica del estriado dorsolateral simultáneo a la administración y estimulación con RubiDopa.
2. Estudiar si la actividad eléctrica del estriado dorsolateral puede ser modulada por la liberación controlada de dopamina *in vivo* en ratones control.
3. Estudiar si la actividad eléctrica del estriado dorsolateral puede ser modulada por la liberación controlada de dopamina *in vivo* en ratones hemiparkinsonianos.
4. Evaluar si la estimulación con RubiDopa corrige las alteraciones observadas en la actividad eléctrica de ratones hemiparkinsonianos.

Estrategia experimental

Para este protocolo se utilizaron 5 ratones hembra de la cepa y 1 macho C57BL/6J de 8-10 semanas de edad que fueron expuestos a un ciclo inverso de luz-oscuridad de 12 horas en presencia de agua y comida *ad libitum*. Los modelos de estudio fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM y se utilizaron bajo los lineamientos éticos de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Para la generación de nuestro modelo de EP, se utilizaron 3 ratones (2 hembras y un macho) unilateralmente lesionados por la administración de 6-OHDA (1 μ l de 4 mg/ml de concentración diluida en 0.02% de ácido ascórbico en solución salina y administrado a una tasa de 0.5 μ l/min) en SNpc (AP: -3 mm, ML: -1.3 mm, DV: -5 mm) (fig. 3A). Dicho modelo de la EP, emula la pérdida de dopamina observada en pacientes humanos, ya que se degenera la inervación dopaminérgica de los GB (vía nigroestriada). El modelo de ratón unilateralmente lesionado por 6-OHDA en SNpc demuestra una degeneración rápida de la vía nigroestriada desde las primeras 24 horas de la administración de la toxina (Dauer & Przedborski, 2003) que llega a ser completa después de las 2 semanas de la lesión. Durante el periodo de recuperación post operatorio, los ratones fueron provistos diariamente de comida triturada, y suplementos alimenticios suministrados directamente en el hocico del ratón, así como administración diaria de solución dextrosa (5% de glucosa) subdérmica y agua *ad libitum*.

La comprobación de la lesión se realizó por medio de una prueba conductual de nuestro modelo hemiparkinsoniano. Para ello se realizó una prueba de campo abierto después de dos semanas de haber realizado la lesión por 6-OHDA. En este procedimiento se contabilizó el número de giros contralaterales al sitio de la lesión después de la administración de apomorfina (subcutánea, 0.5 mg/kg) durante un tiempo de 10 minutos. La apomorfina es un agonista selectivo de receptores dopaminérgicos que induce la conducta de giro contralateral al sitio de la lesión (Björklund & Dunnett, 2019).

Posterior a la prueba de campo abierto se realizó el protocolo de registro. Como parte de uno de los objetivos de este proyecto de tesis, se llevó a cabo la implementación de la técnica para el registro de la actividad eléctrica del estriado dorsolateral de manera simultánea a la liberación controlada (estimulación de 15 Hz) de dopamina utilizando Rubi-Dopamina (RubiDopa). Durante la realización de la craneotomía se utilizó isoflurano como anestésico (~1%). Mientras que, para el registro de la actividad eléctrica, se utilizó Uretano como anestésico a una dosis de 1 g/kg. El uretano es utilizado debido a que este anestésico induce largos periodos de narcosis y no produce alteraciones importantes en la actividad neuronal (Haumesser et al., 2017). A lo largo del registro, se comprobó la ausencia de reflejos en el ratón, en caso de mostrarlos, se administraron dosis reducidas de Uretano como refuerzo.

Por medio de cirugía estereotáxica, y utilizando como referencia el Atlas estereotáxico de Allen, se introdujo en el DLS una fibra óptica acoplada a un inyector (AP: +0.2 mm, ML: -2.5 mm, DV: -3.2 mm) con un ángulo de 30° en el hemisferio derecho. En ratones hemiparkinsonianos la fibra acoplada al inyector se introdujo en el hemisferio ipsilateral a la lesión producida por 6-OHDA realizada dos semanas antes del registro. El inyector nos permitió administrar de forma local el compuesto RubiDopa. La RubiDopa es un compuesto de Rutenio que se encuentra asociado a una molécula de dopamina, de tal forma que la dopamina no pueda interactuar directamente con receptores expresados en la membrana celular. Al excitar con luz a este compuesto se libera localmente el neurotransmisor dopamina en el medio donde fue localmente administrado (Andino-Pavlovsky et al., 2017b; Araya et al., 2013), en este caso el DLS.

El sitio de registro de la actividad eléctrica del DLS (AP: 0.5 mm, ML: -2.5 mm, DV: -3.2 mm) se realizó por medio de *silicon probes* (Neuronexus, A4x4-tet-5mm-150-200-121) de 64 canales en arreglos de 16 tetrodos ubicada a 300 µm del sitio de administración de RubiDopa. El registro se realizó durante un protocolo de estimulación que consistió en registrar la actividad basal, el periodo de estimulación con RubiDopa (1.5 µl de 300 µM diluido en solución de ácido ascórbico al 0.02%) a

una frecuencia de 15 Hz (ciclo de trabajo del 20%), así como el periodo post estimulación (fig. 3B). Una vez finalizado el registro, se extrajo el cerebro para su posterior análisis histológico (fig. 4).

La estimulación se realizó con una fibra óptica acoplada a un led manipulado por un generador de pulsos (DC2100 ThorLabs) (fig. 3B). La señal eléctrica fue adquirida por el sistema Plexon (Digital Headstage Processor) y capturada a una frecuencia de 40 KHz (fig. 3B). Para la obtención del LFP, la señal se procesó online por un filtro de tipo paso bajo a una frecuencia de corte <300 Hz determinada por el sistema de captura. El análisis del LFP se realizó por medio de la transformada de Wavelets, análisis que se explica en el apartado siguiente.

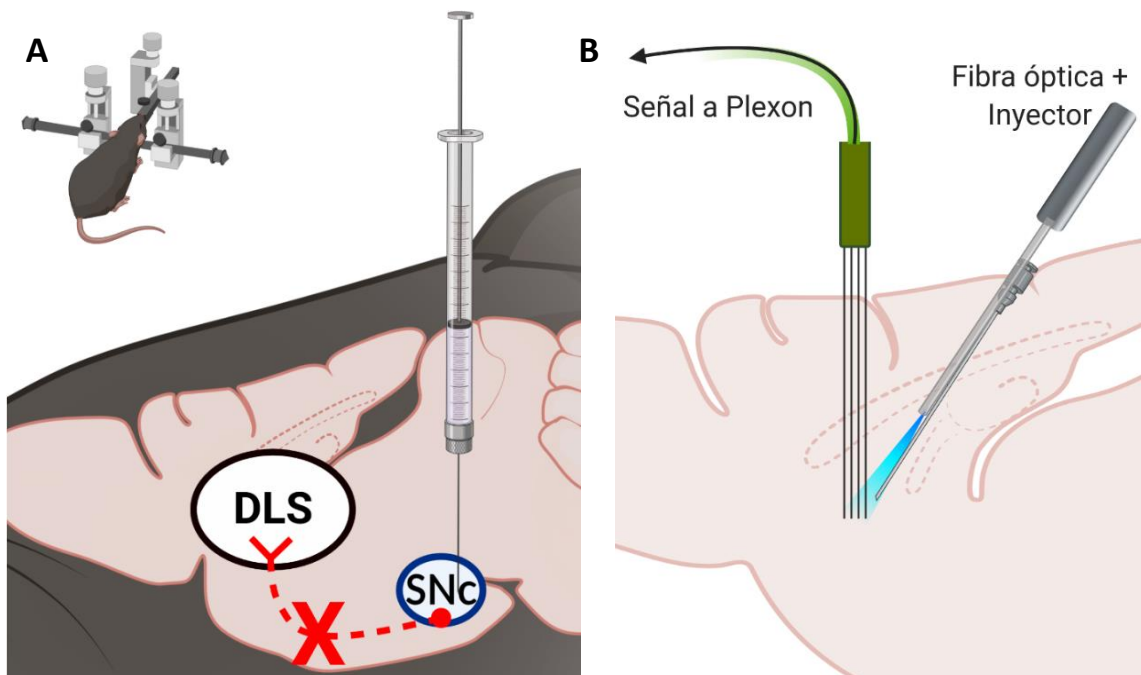


Figura 3. Cirugía y registro extracelular. A) 3 Ratones de la cepa C57BL/6J fueron lesionados unilateralmente en SNpc por la inyección de 6-OHDA para eliminar las proyecciones nigroestriales dopaminérgicas. En los ratones control no se realizó este procedimiento. B) El inyector acoplado a una fibra óptica fue introducido en el DLS para la estimulación con RubiDopa. El registro de la actividad eléctrica se hizo a una distancia de 300 μ m anterior al sitio de estimulación.

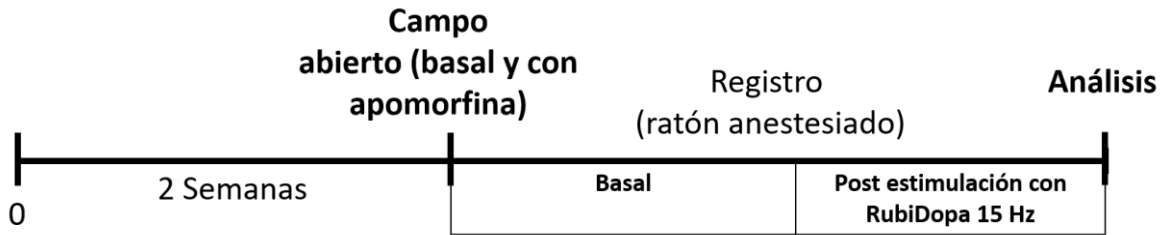


Figura 4. Protocolo experimental. Ratones control intactos y lesionados por una inyección unilateral de 6-OHDA en SNpc, fueron utilizados en este protocolo experimental. 2 semanas después de la lesión, el grupo hemiparkinsoniano fue evaluado en una prueba de campo abierto antes y después de la aplicación de apomorfina para cuantificar la cantidad de giros ipsilaterales y contralaterales al sitio de lesión. Durante el registro de la señal eléctrica, se realizó un protocolo de estimulación con RubiDopa (15 Hz, 300 μ M). Se registró el periodo posterior a la estimulación. Finalmente se realiza el análisis del LFP.

Análisis del LFP utilizando la transformada de Wavelets

Antes de describir a la transformada de Wavelets, es necesario dar una introducción hacia el uso de la transformada de Fourier, mencionar algunas de sus desventajas en el análisis del LFP y justificar el uso de Wavelets.

Transformada de Fourier

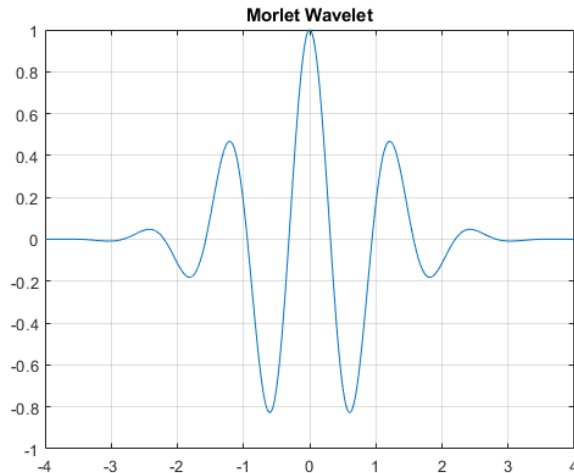
La transformada de Fourier es un método matemático que permite estudiar señales en el dominio de la frecuencia. Esto permite conocer la magnitud con la que distintas frecuencias podrían estar siendo representadas en el registro del LFP. Sin embargo, este análisis no permite conocer a plenitud en que parte del registro se dan estos incrementos o decrementos de la frecuencia en función del tiempo; por lo que este tipo de herramienta matemática resulta ideal para el análisis de señales que son estacionarias (continuas, sin variación), es decir, señales que no tienen cambios repentinos en el voltaje (discontinuas).

El registro del LFP es una señal eléctrica que presenta puntos de transición donde ocurren cambios drásticos del voltaje provocados por la activación coordinada de grupos de neuronas. Este tipo de señales discontinuas no llegan a ser bien representadas por el análisis de Fourier, por lo que es necesario el uso de otra herramienta que se describe a continuación: la transformada de Wavelets (Torrence & Compo, 1998).

Transformada continua de Wavelets (CWT)

La transformada continua de Wavelets (CWT) es una herramienta que sirve para el estudio de series de tiempo (Jobert, Tismer, Poiseau, & Schulz, 1994). Este tipo de análisis ha empezado a aplicarse para el estudio de señales biológicas como el electrocardiograma (Addison, 2005) y el electroencefalograma (Slimen, Boubchir, Mbarki, & Seddik, 2020), dada la buena resolución temporal que brinda (Jobert et al., 1994). La CWT genera un producto a partir del registro del LFP y de una función de onda conocida como wavelet madre (en este caso de tipo morlet), la cual se traslada y re escala el registro dependiendo de la dilatación de la función madre. El análisis de wavelets tiene una mejor resolución temporal para diferentes rangos de frecuencias. Además, permite estudiar registros con puntos de transición repentinos del voltaje (como se observan en los ritmos cerebrales) mismos que no son bien representados por el análisis de Fourier; por otra parte Fourier está sujeto a una resolución fija de las ventanas de tiempo y frecuencia (Jobert et al., 1994).

Para realizar el análisis del LFP, se utilizaron funciones preestablecidas en el *Wavelet Toolbox* de MATLAB 2020b. Para todos los análisis se utilizó una función tipo Morlet como wavelet madre, debido a que este tipo de onda se asemeja más a las ráfagas observadas en el LFP. Además, ya se ha reportado el uso de esta función en análisis del LFP (Sen & Dostrovsky, 2007). Para la realización de los escalogramas, gráficas que representan la señal en el tiempo y la frecuencia, se utilizó la función *CWT* de un fragmento de 5 minutos del LFP, especificando la frecuencia de captura (1 KHz) (figs. 7B y 9B).



Wavelet madre tipo Morlet utilizada para el análisis. Tomada de https://la.mathworks.com/help/wavelet/ref/morlet.html?s_tid=doc_ta

Para obtener el espectro de frecuencias del LFP utilizando la CWT, se tomaron fragmentos de 5 minutos del registro, antes y después de la estimulación con RubiDopa en DLS. Estos fragmentos fueron introducidos en la función *timeSpectrum*, la cual genera el *Time-Averaged Wavelet Spectrum* de la señal (figs. 8A y 10A); esta función genera el espectro de frecuencias del registro por medio del cálculo de la media de la potencia registrada durante 5 minutos. Si bien este análisis no nos permite saber cuáles son las frecuencias dominantes durante el registro, con este procedimiento no se puede conocer con exactitud la variación de la potencia de diferentes bandas de frecuencia durante el tiempo.

Las bandas de frecuencias de interés para el procesamiento del LFP se ubicaron en el rango de 1 a 80 Hz. Distintas bandas del LFP fueron aisladas con los siguientes rangos de frecuencias: delta de 1-5 Hz; theta de 5-10 Hz; beta de 12-30 Hz; gamma de 30-80 Hz. Estos rangos fueron seleccionados de acuerdo con lo reportado por un grupo de estudio que previamente reportó las alteraciones del LFP en estriado de ratones parkinsonianos (Chen et al., 2018).

Análisis de ráfagas del LFP

Con el objetivo de estudiar los eventos temporales dentro del LFP procedimos a analizar las ráfagas del LFP. Una ráfaga es un punto de transición donde la potencia de una determinada banda del LFP muestra un incremento; esto por la actividad

oscilatoria coordinada de grupos neuronales. El análisis de ráfagas fue realizado por medio del procesamiento offline del LFP. Se estudiaron las ráfagas de ritmos específicos (delta, theta, beta, gamma), con los objetivos de conocer si el patrón de la actividad poblacional de grupos neuronales en distintas frecuencias pudiera estar afectado durante la EP y si estas alteraciones eran reversibles por la estimulación con RubiDopa.

Para el análisis de ráfagas se utilizó la función *scaleSpectrum*, la cual permite obtener la potencia de una banda de frecuencias en función del tiempo utilizando la transformada de Wavelets. *ScaleSpectrum* calcula el cuadrado de la potencia media (valor absoluto) de una banda en función del tiempo. La potencia fue adquirida mediante el cálculo del valor absoluto del número complejo, obtenido del re-escalamiento de la señal con la wavelet madre. Lo anterior se obtuvo para cada una de las bandas del LFP (fig. 5, abajo). Para la detección de las ráfagas en este trazo procesado, se estableció un valor umbral del percentil 85 del trazo (fig. 5, línea color azul). La función *findpeaks* de MATLAB fue utilizada para la detección de eventos. Finalmente, se midieron diferentes características de las ráfagas; como la amplitud, duración, número de ráfagas por ventana de cinco minutos, intervalo inter-ráfaga (IBI, interburst interval) y coeficiente de variación (rango/mediana) de las ráfagas antes y después de la estimulación con RubiDopa. Como ejemplo, en la figura 5 se muestra el procesamiento del LFP en la banda beta (12-30 Hz). Para el procesamiento de otras bandas se siguió el mismo procedimiento (no ilustrados en la fig. 5).

Adicionalmente, se efectuó el análisis de ráfagas por medio de un procesamiento offline del LFP previamente reportado en la bibliografía (Tinkhauser et al., 2017). Para aislar las ráfagas en cada ritmo del LFP (delta, theta, beta y gamma), se realizó primero el filtrado de la señal en los distintos rangos de frecuencias del espectro mediante la aplicación de un filtro pasabandas, después se rectificó la señal y finalmente esta fue suavizada con un filtro de media de 400 ms (Tinkhauser et al., 2017). Los resultados obtenidos de este análisis se muestran al final como figuras suplementarias (suplementarias 1, 2, 3, 4). El análisis de estas señales fue

complementario al análisis de ráfagas por wavelets ya que la CWT tiene una mejor resolución temporal en la identificación de periodos de transición del voltaje, a diferencia del proceso de rectificación y suavizado del LFP. Los resultados del análisis por rectificado del LFP muestran conclusiones similares a las reportadas por el análisis de Wavelets, especialmente en los resultados de la amplitud de las ráfagas (sup. 1, 2, 3, 4). Una diferencia clara entre ambos análisis está en los intervalos inter-ráfaga (IBI) donde no se observaron diferencias en el análisis rectificado, mientras que en el análisis de wavelets sí.

Estadística

En lo que respecta al análisis de la potencia registrada por el espectro obtenido por la CWT. Se obtuvo la pendiente del cambio de la potencia inducido por la estimulación RubiDopa. El cambio significativo de la pendiente es un indicativo del incremento o decremento de la potencia en un rango de frecuencias determinado. Para ello se realizó la prueba t-test para determinar si el valor de la pendiente era diferente de cero (tabla suplementaria 7).

Para el análisis estadístico se aplicó la prueba de suma de rango de Wilcoxon ($p < 0.05$), debido a la distribución no normal de la mayoría de nuestras variables. Este análisis estadístico fue realizado únicamente en las variables de amplitud, duración e IBI, haciendo la comparación antes y después de la aplicación de RubiDopa en ambos grupos de ratones; así como la comparación del efecto de la lesión entre ratones control y hemiparkinsonianos en el periodo de actividad en estado basal (antes de la aplicación de RubiDopa). Dado que la N experimental es pequeña ($N=3$), puede resultar difícil poder hacer conclusiones precisas acerca del efecto de la aplicación de RubiDopa. Con la finalidad de realizar un primer acercamiento a evaluar nuestro fenómeno de estudio, se tomó aleatoriamente una población de ráfagas equitativa por cada ratón registrado (tabla suplementaria 5). En las variables del *número total de ráfagas* por intervalo de 5 minutos y el *coeficiente de variación* se utilizaron todas las ráfagas registradas por ratón; en estas variables solo se pudo evaluar la tendencia en los resultados.

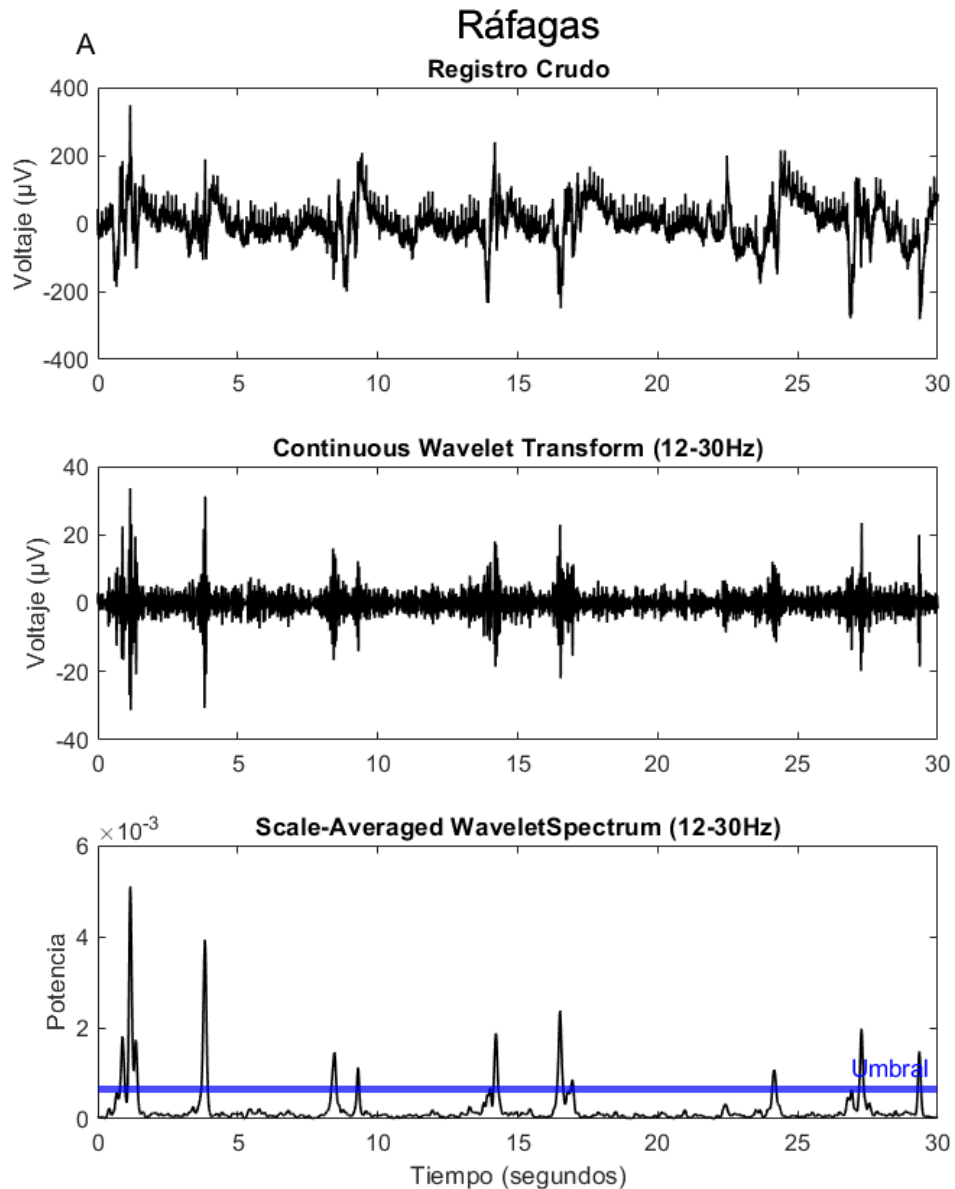


Figura 5. Procesamiento de ráfagas en la banda Beta por el método de Wavelets. Ráfagas en la banda beta fueron preprocesadas por la función *scaleSpectrum* de Matlab (A). Esta función calcula la potencia de la banda de frecuencias de interés con análisis de Wavelets (en medio). A partir del umbral de la señal procesada, se identificaron las ráfagas en la banda de interés (panel inferior). Ráfagas en otras bandas fueron estudiadas siguiendo este mismo método de procesamiento. Características como la amplitud, duración e IBI de las ráfagas fueron cuantificados.

Resultados

Conducta en campo abierto

Con el objetivo de caracterizar conductualmente a nuestro modelo hemiparkinsoniano (Chen et al., 2018; Jáidar et al., 2019); realizamos una prueba conductual de campo abierto para la evaluación de la conducta de giro posterior a la aplicación de un agonista dopaminérgico, apomorfina en una dosis de 0.5 mg/kg. La conducta de giro contralateral al sitio de lesión (en este caso giros hacia la izquierda) inducida por la aplicación de apomorfina es un indicativo del grado de lesión dopaminérgica producida por la degeneración de la vía nigroestriada (Björklund & Dunnett, 2019). Al realizar el análisis del comportamiento, en el mapa de calor observamos que, en condiciones basales, el ratón control llega a desplazarse más que un ratón hemiparkinsoniano; al administrar apomorfina el movimiento reduce (fig. 6A,1-2). En el ratón hemiparkinsoniano se observa un incremento la conducta de giro contralateral (fig. 6A,3-4). Nuestros resultados demostraron que al administrar apomorfina subcutánea en ratones unilateralmente lesionados con 6-OHDA, se observa una tendencia al incremento del giro contralateral al sitio de lesión (lesión en hemisferio derecho) en comparación con los ratones control, los cuales no mostraron una tendencia al giro contralateral (número de giros ipsilaterales - número de giros contralaterales) (fig. 6B). Lo anterior nos permite determinar que los ratones hemiparkinsonianos de estudio cuentan con

un avanzado grado de lesión (60-100%) de las neuronas dopaminérgicas de la SNC al sitio donde se aplicó 6-OHDA (Björklund & Dunnett, 2019).

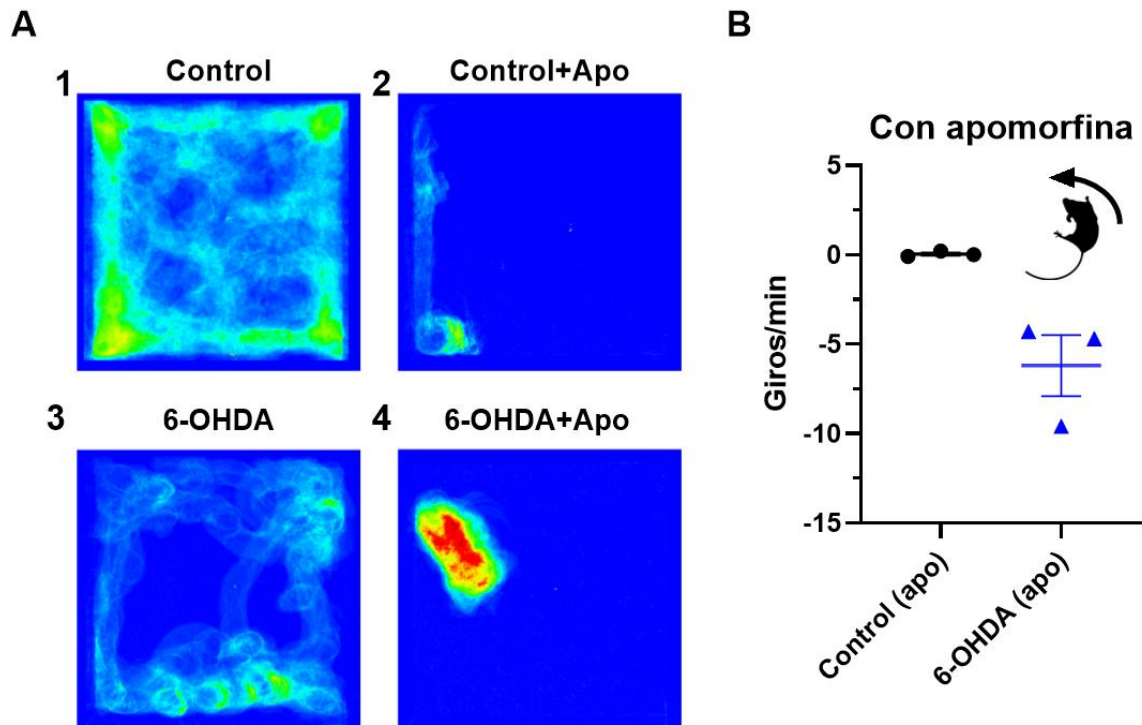


Figura 6. Análisis de la conducta en la prueba de campo abierto. En el panel A se muestran los mapas de calor de la actividad de un ratón control (1 y 2) y un ratón hemiparkinsoniano (3 y 4) antes y durante la aplicación de apomorfina (Apo); el grupo control muestra una mayor distribución de movimiento por todo el campo bajo condiciones basales, sin embargo su desplazamiento disminuye al aplicar apomorfina; en el caso del ratón lesionado se observa que su desplazamiento disminuye en el campo y que este se limita a un área reducida cuando se aplica apomorfina subdérmica. Nuestros resultados muestran que al aplicar apomorfina (0.5 mg/kg) en el ratón hemiparkinsoniano (lesión en hemisferio derecho) hay un incremento en la cantidad de giros contralaterales al sitio de la lesión (ipsilaterales - contralaterales) por minuto (en sentido contrario a la lesión). En el caso de ratones control, no se observa una preferencia de giro al aplicar apomorfina

Efecto de la liberación controlada de dopamina en el LFP registrado en el DLS de ratones control

Para estudiar el efecto de la liberación controlada de dopamina en DLS de ratones control, se aplicó RubiDopa, un compuesto de dopamina enjaulado en un compuesto de Rutenio. La estimulación a 15 Hz durante 5 minutos se realizó de manera simultánea al registro del LFP *in vivo* durante condiciones de anestesia con uretano. El efecto de la administración de RubiDopa fue evaluado después del protocolo de estimulación a 15 Hz para evitar el análisis de ruido fotoeléctrico provocado por la estimulación. En la figura 7 se muestra una ventana de 100 segundos de un registro del LFP de un ratón control durante la condición basal (panel A, superior) y posterior a la aplicación de RubiDopa (panel A, inferior). El escalograma del registro en ratones control muestra una ligera disminución en la potencia de frecuencias lentas al comparar el efecto de la administración de RubiDopa (línea roja) registrado durante 5 minutos posteriores al registro de la actividad basal (fig. 7B) (suplementaria 6).

Posteriormente en la figura 8 se compara el espectro de potencias, así como la mediana de la potencia (gráfica de cajas) de las bandas de frecuencias antes (en negro) y después (en azul) de la aplicación de RubiDopa (basal y post RubiDopa) registrado de ratones control. Las líneas más delgadas de color gris (basal) y azul (post RubiDopa) muestran el espectro de potencias registrado por cada ratón (fig. 8A). Las líneas de diferente color en la gráfica de cajas (azul, naranja y amarillo) muestran el cambio en la potencia producida por la estimulación con RubiDopa registrado por ratón (N=3). Posterior a la administración y estimulación local con RubiDopa (azul) a una frecuencia de 15 Hz, se observa que el espectro de potencias registrado en ratones control muestra una tendencia a disminuir en comparación al estado basal (negro) (fig. 8A). Esta disminución se observó especialmente en la banda theta, donde los tres ratones muestran una disminución de la potencia (N=3). En las otras bandas se observa una ligera tendencia en la disminución de la potencia. Los valores de la pendiente no resultaron ser estadísticamente distintas a cero (valor de la pendiente donde no habría efecto) con una N = 3 (suplementaria 7).

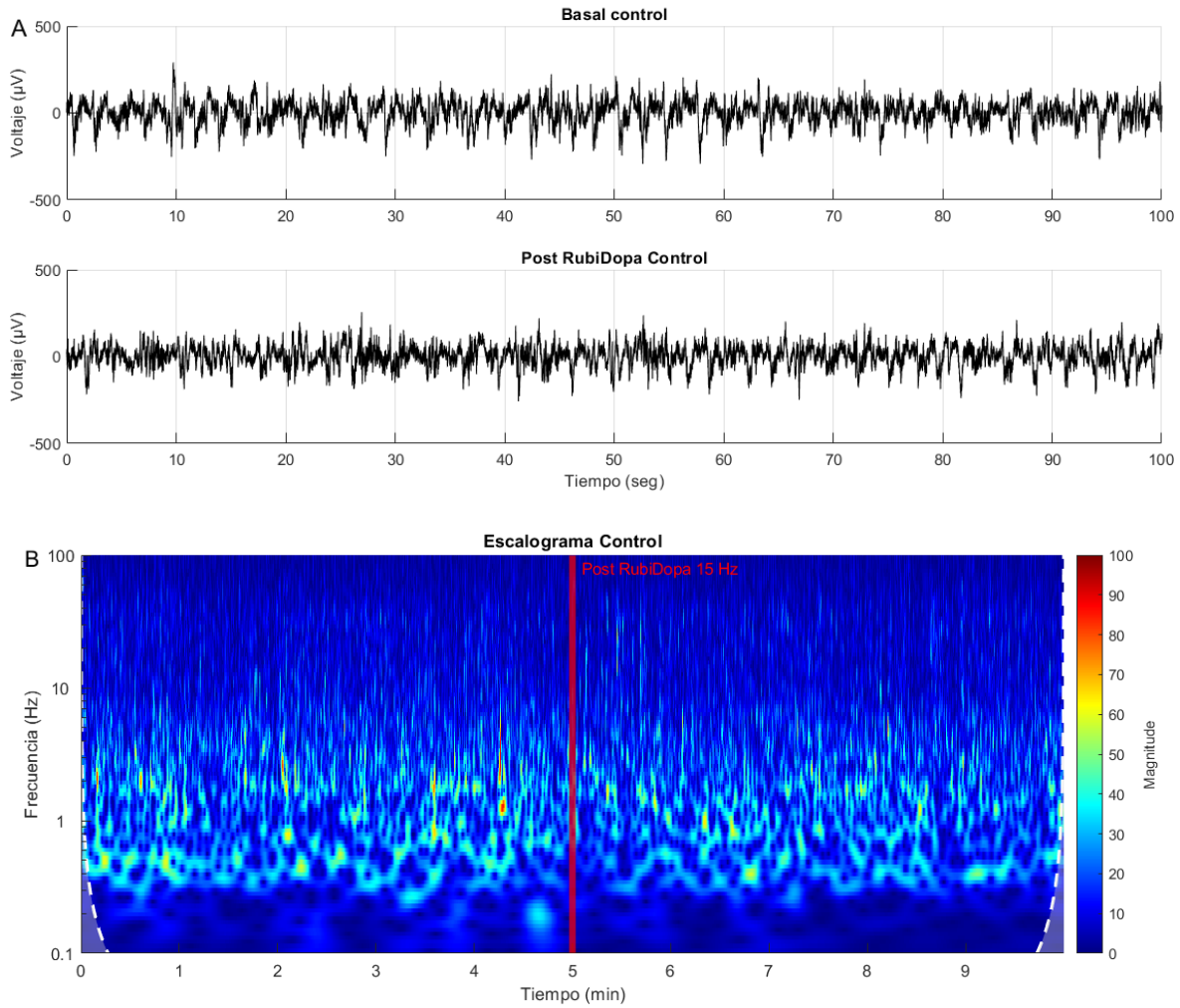


Figura 7. Registro del LFP anterior y posterior a la estimulación con RubiDopa en DLS de ratón control. Registro del LFP (panel A) anterior (arriba) y posterior a la administración y estimulación con RubiDopa (abajo) durante ventanas de 100 segundos. Escalograma de del registro (panel B) del LFP en DLS de ratones control antes y después de la aplicación y estimulación con RubiDopa a 15 Hz (línea color rojo). El escalograma fue generado con la función CWT de MATLAB. La escala en el eje de la frecuencia es logarítmica (0.1-100 Hz).

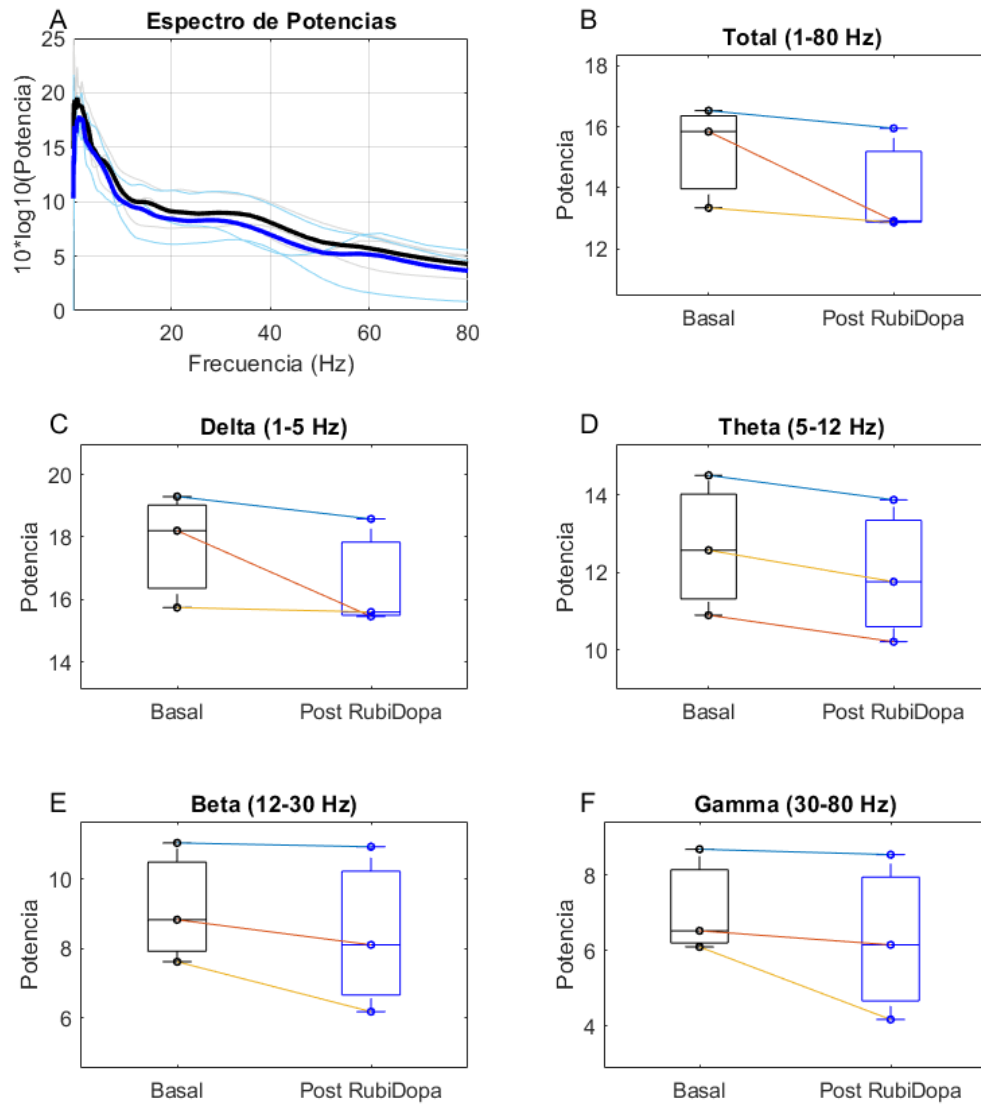


Figura 8. Espectro de potencias del LFP en ratones control antes y después de la aplicación de RubiDopa. En el panel A se muestra la media del espectro de potencias del LFP bajo condiciones basales sin estimulación en ratones control (negro) y post RubiDopa (líneas azules). Las líneas más delgadas muestran el espectro registrado por ratón. Graficas de caja de la potencia medida de bandas de frecuencias registradas del LFP: total (B), delta (C), theta (D), beta (E) y gamma (F). Las líneas de cambio en las gráficas de cajas con diferente color representan el cambio de la potencia de cada ratón registrado (N = 3)

Efecto de la liberación controlada de dopamina en el LFP registrado en el DLS de ratones hemiparkinsonianos

El estudio de la liberación controlada de dopamina en DLS también fue realizado en ratones hemiparkinsonianos; a los cuales se les inyectó la toxina 6-OHDA en SNpc 2-3 semanas antes de realizar el registro. Durante el registro se administró RubiDopa de manera local *in vivo* en condiciones de anestesia con Uretano. En la figura 9 se muestra una ventana de 100 segundos de un registro de LFP en DLS realizado en un ratón hemiparkinsoniano durante la condición basal (panel A, superior) y posterior a la aplicación de RubiDopa (panel A, inferior). El escalograma del registro en un ratón unilateralmente lesionado con 6-OHDA muestra una disminución importante de la potencia en todas las bandas de frecuencias, así como una disminución de la frecuencia de aparición de ráfagas (fig. 9B). A diferencia del ratón control, el ratón hemiparkinsoniano muestra una actividad discontinua del LFP.

Posteriormente, en la figura 10 se hace una comparación del espectro de potencias, así como la potencia de las bandas de frecuencias antes y después de la aplicación y estimulación a 15 Hz con RubiDopa (basal y post RubiDopa) en ratones hemiparkinsonianos. Las líneas más delgadas de color gris (basal) y rojo (post RubiDopa) muestran el espectro de potencias registrado por cada ratón (fig. 10A). Posterior a la administración y estimulación local con RubiDopa (rojo), se observa que el espectro de potencias registrado en ratones lesionados con 6-OHDA muestra una tendencia a disminuir en comparación al estado basal (en color negro) (fig. 10A). También se observa una tendencia en la disminución de la potencia de la banda beta en al menos dos ratones registrados. El incremento de la potencia de la banda beta está fuertemente ligado a la EP y a la depleción de dopamina en el circuito mCGBT (Merchant & Bartolo, 2018). La tendencia en la disminución de la potencia se observó más en las bandas cuyas frecuencias son bajas, sin embargo, el cambio de la potencia (pendiente) no resultó ser estadísticamente diferente del cero (N=3) (fig. 10) (suplementaria 7).

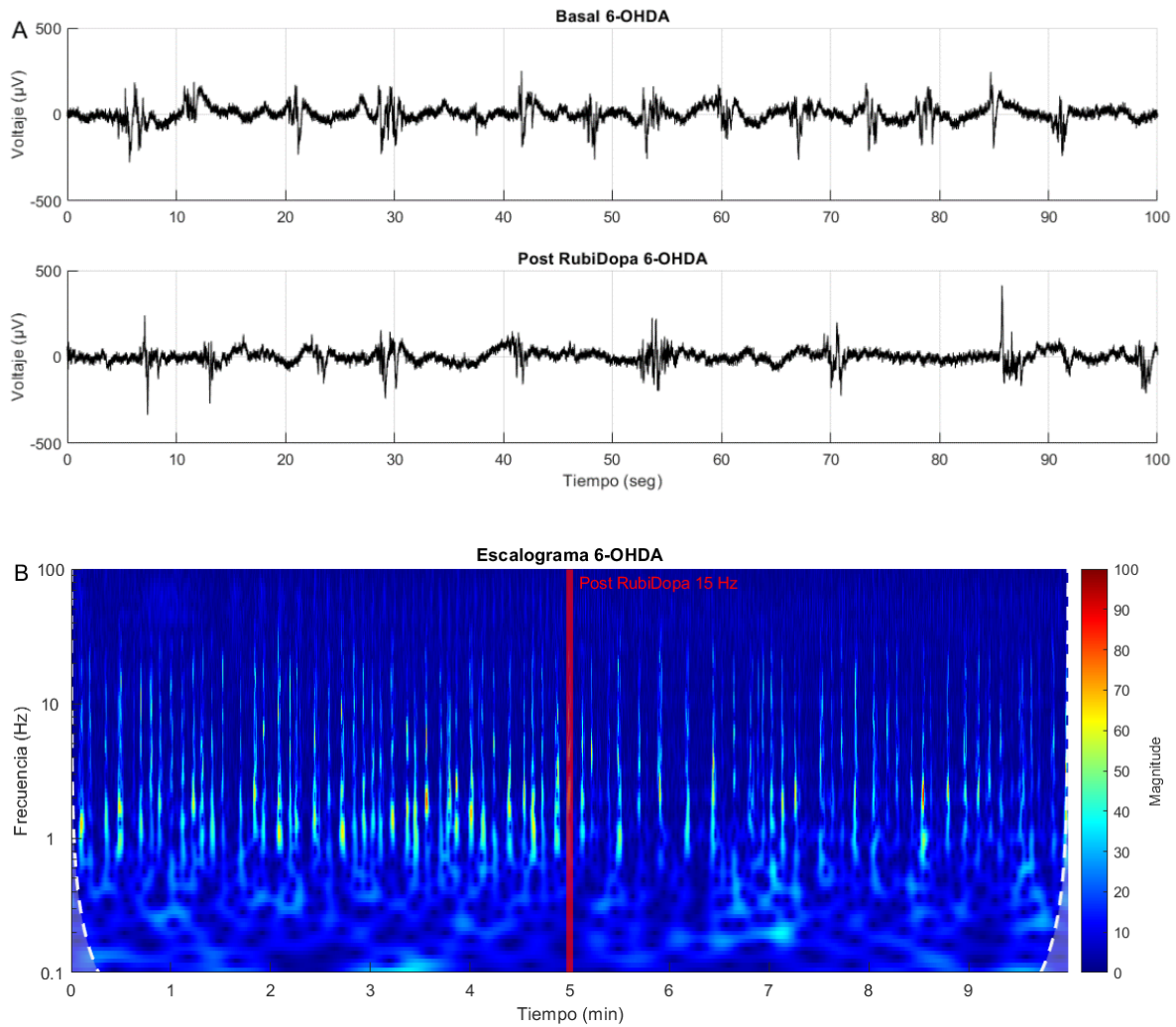


Figura 9. Registro del LFP antes y después de la estimulación con RubiDopa en DLS de un ratón hemiparkinsoniano. Registro del LFP (panel A) anterior (arriba) y posterior a la administración y estimulación con RubiDopa (abajo) en un ratón hemiparkinsoniano. Escalograma de la señal (panel B) de ratones antes y después de la aplicación y estimulación con RubiDopa a 15 Hz. El escalograma fue generado con la función CWT de MATLAB. La escala en el eje de la frecuencia es logarítmica.

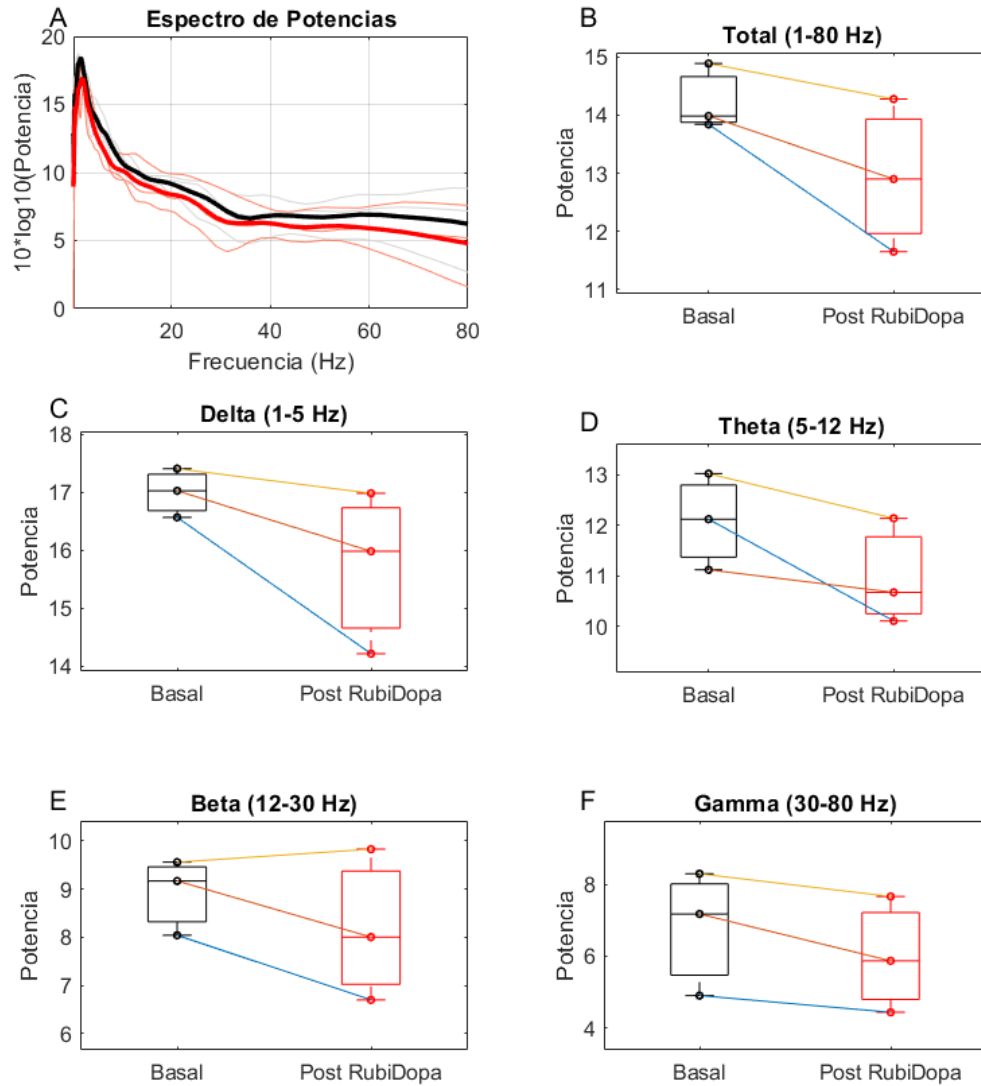


Figura 10. Espectro de potencias del LFP en ratones hemiparkinsonianos antes y después de la aplicación de RubiDopa. En el panel A se muestra el espectro de potencias del LFP bajo condiciones basales sin estimulación en ratones hemiparkinsonianos (negro) y post RubiDopa (rojo). Las líneas más delgadas muestran el espectro registrado por ratón. Graficas de caja de la potencia medida de bandas de frecuencias registradas del LFP: total (B), delta (C), theta (D), beta (E) y gamma (F). Las líneas de cambio en las gráficas de cajas con diferente color representan a cada ratón registrado (N = 3).

Efecto de la liberación controlada de dopamina en ráfagas del LFP registrado en el DLS de ratones control y hemiparkinsonianos

Debido a que el espectro de frecuencias obtenido por CWT no muestra los momentos de transición donde ocurren los incrementos de potencia, se realizó también el análisis de las ráfagas registradas de distintas bandas de frecuencias. Para ello se realizó el procesamiento offline del LFP con el fin de obtener el *scale-average wavelet spectrum*, señal que fue utilizada para el estudio de las ráfagas y cuyo procesamiento fue previamente explicado en el apartado de *Estrategia experimental* (fig. 5).

Ráfagas en la banda delta

En la figura 11 se observan los registros típicos de la potencia del LFP en la banda delta en función del tiempo antes (arriba) y después de la aplicación de RubiDopa (abajo) en ratones control (panel A) y hemiparkinsoniano (panel B, color rojo). La aplicación de RubiDopa muestra una disminución de la potencia en el registro de ambos grupos de ratones, además de diferencias en el patrón de las ráfagas entre controles y hemiparkinsonianos durante condiciones basales (antes de la estimulación con RubiDopa).

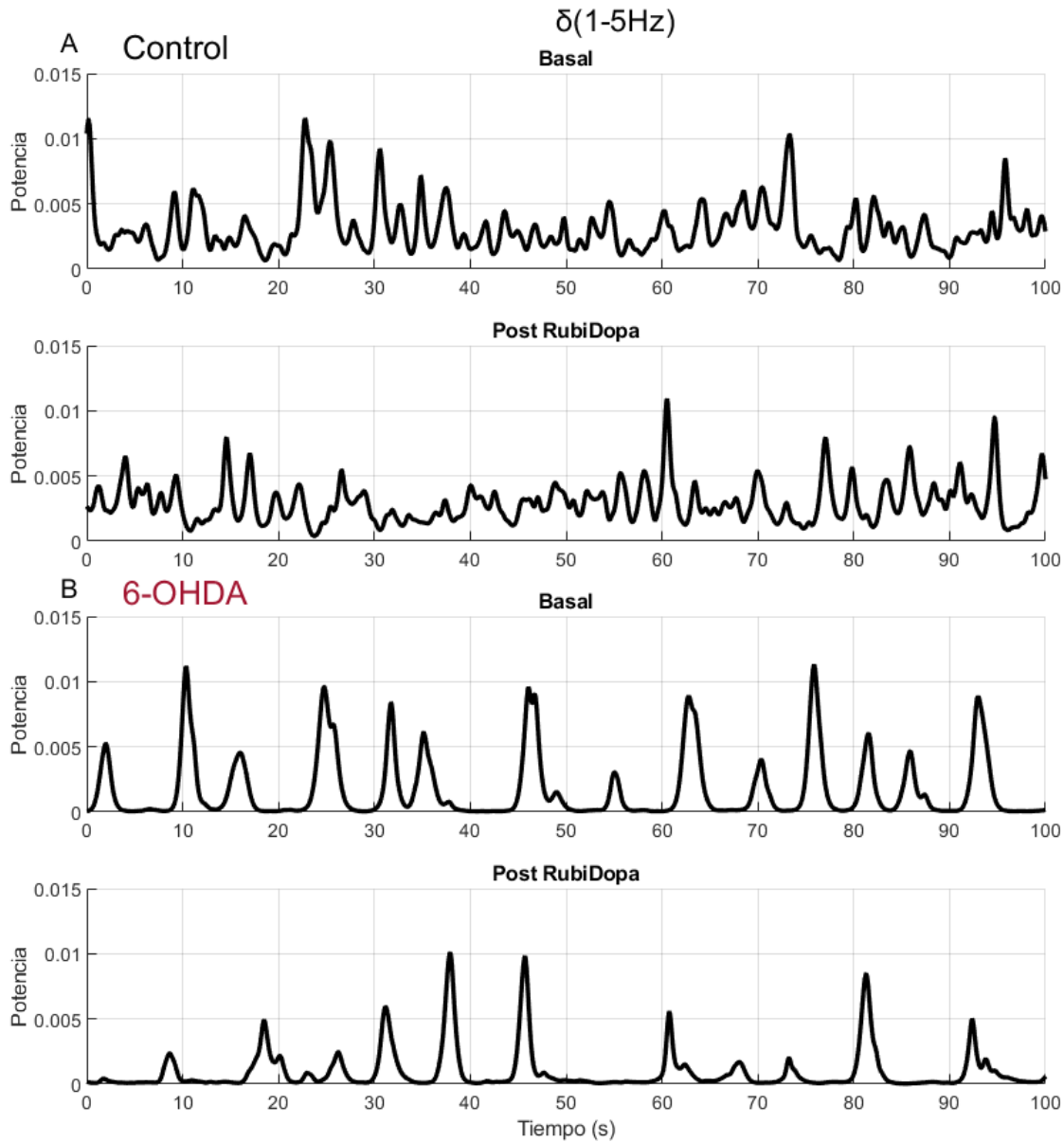


Figura 11. Registros típicos de la potencia en banda delta en función del tiempo antes y después de la estimulación con RubiDopa. Scale-Average Wavelet Spectrum de la banda delta del LFP antes (basal) y después de la estimulación con RubiDopa a 15 Hz (Post RubiDopa) en DLS de ratones control (panel A) y hemiparkinsonianos lesionados con 6-OHDA (panel B).

En la figura 12 se muestran las variables estudiadas de ráfagas en la banda delta de 3 ratones control y 3 ratones lesionados antes y después de la aplicación con RubiDopa. El número de ráfagas estudiadas por ratón se igualó tomando aleatoriamente un número de ráfagas por cada ratón para la comparación estadística antes y después de la estimulación de RubiDopa a 15 Hz en las variables de la amplitud, la duración e IBI (sup. 5). La lesión inducida por 6-OHDA en ratones hemiparkinsonianos induce un incremento significativo en la amplitud de ráfagas de la banda delta ($P = 0.008$) (fig. 12A). La aplicación de RubiDopa disminuye significativamente la amplitud de las ráfagas en Delta (fig. 12A) en ratones control ($P = 0.01$) y hemiparkinsonianos ($P = 0.012$); en ratones hemiparkinsonianos se muestra una tendencia a corregir la amplitud de las ráfagas en delta a lo mostrado por ratones control. La estimulación con RubiDopa no modifica la duración media de las ráfagas en ratones control, pero si disminuyen su duración en ratones hemiparkinsonianos de manera significativa ($P = 0.039$) (fig. 12B). El número de ráfagas registradas en un intervalo de cinco minutos muestra una tendencia a disminuir en al menos dos ratones control, mientras que en ratones hemiparkinsonianos disminuyó en los tres ratones registrados (fig. 12C). El IBI no mostró cambios significativos después de la estimulación con RubiDopa en ambos grupos de ratones (fig. 12D). Finalmente, el coeficiente de variación no mostró una tendencia clara en el grupo control, sin embargo, en ratones hemiparkinsonianos si se observó una tendencia a incrementar después de la estimulación con RubiDopa (fig.12E) ($N = 3$).

En conclusión, la estimulación con RubiDopa disminuye significativamente la potencia de ráfagas en la banda delta registradas de ratones hemiparkinsonianos, que bajo condiciones patológicas muestran un incremento de la amplitud a comparación de ráfagas registradas de ratones control. Este decremento de la amplitud de las ráfagas podría estar ligado a la tendencia en el decremento de la potencia en la banda delta registrada en el espectro de potencias de ratones control y hemiparkinsonianos (figs. 8 y 10 respectivamente). La aplicación de RubiDopa también influye sobre la duración de las ráfagas registradas de ratones hemiparkinsonianos, disminuyendo la duración.

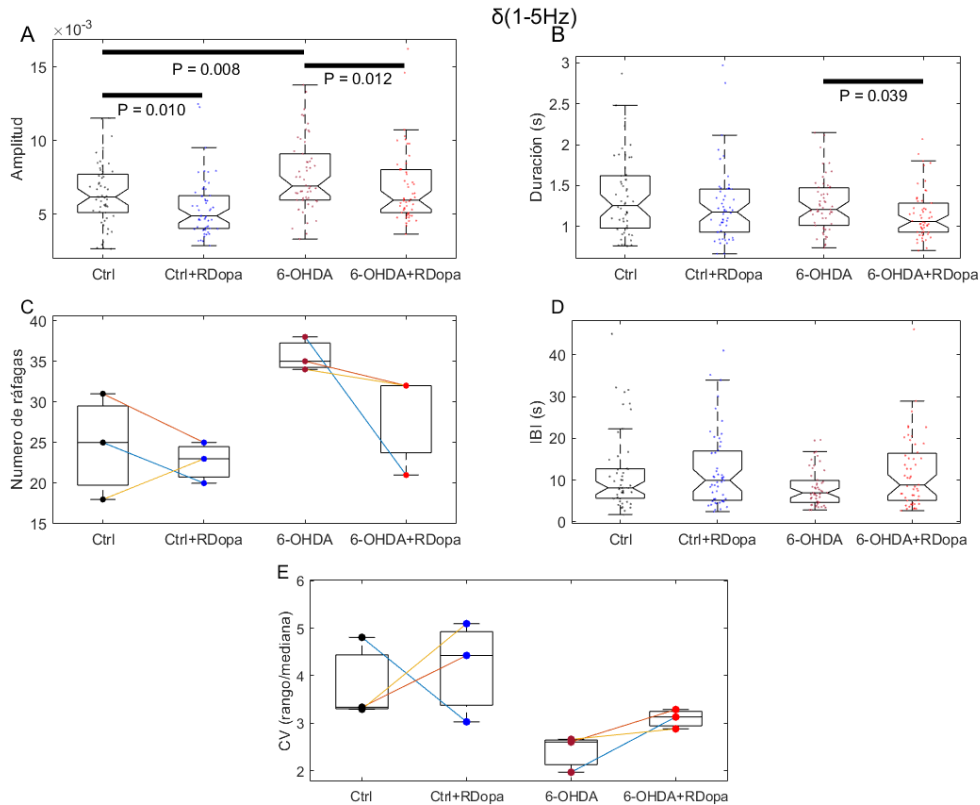


Figura 12. Efecto de la estimulación con RubiDopa en ráfagas de la banda delta registradas en ratones control y hemiparkinsonianos. Graficas de cajas de la A: Amplitud, B: Duración, C: Numero de ráfagas, D: Intervalo Inter ráfaga (IBI) y E: coeficiente de variación registradas de ráfagas en la banda delta del LFP en DLS de ratones control y hemiparkinsonianos bajo condiciones basales y posterior a la estimulación con RubiDopa a 15 Hz. Control (Ctrl), post RubiDopa control (Ctrl+RDopa), hemiparkinsoniano (6-OHDA), post RubiDopa hemiparkinsoniano (6-OHDA+RDopa). Las líneas de diferentes colores muestran el cambio por cada ratón registrado.

Ráfagas en la banda theta

Ráfagas en la banda Theta fueron estudiadas a partir del procesamiento offline del LFP explicado en el apartado de *Estrategia experimental* (fig. 5) en un rango de 5-12 Hz. En la figura 13 se observan los registros típicos de la potencia del LFP en el ritmo theta en función del tiempo antes (arriba) y después de la aplicación de RubiDopa (abajo) en ratones control (panel A) y hemiparkinsoniano (panel B, color rojo). La aplicación de RubiDopa muestra una disminución de la potencia en el registro de ambos grupos de ratones, pero con una mayor disminución en ratones

hemiparkinsonianos. Ratones hemiparkinsonianos muestran una mayor amplitud en ráfagas de la banda theta.

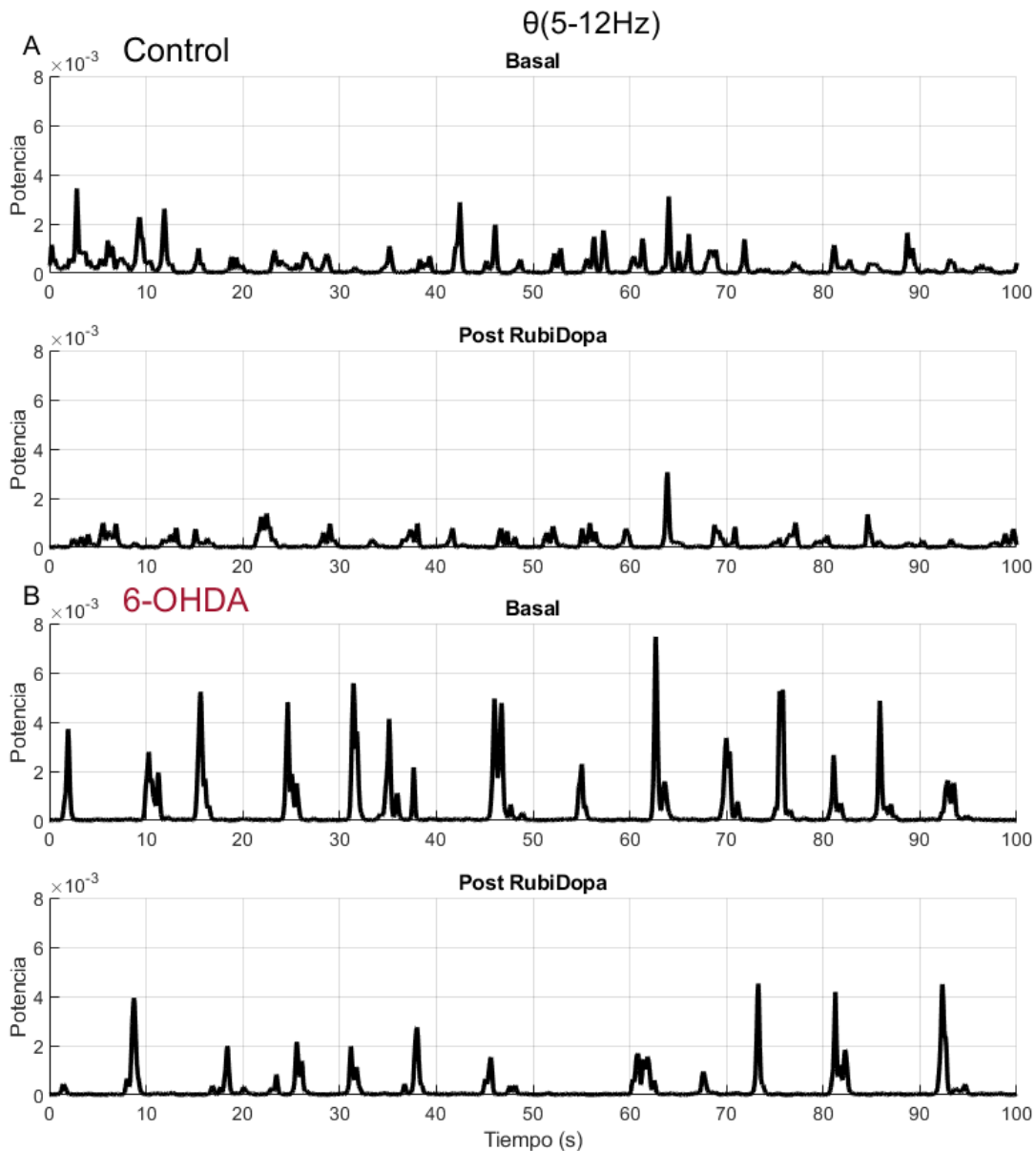


Figura 13. Registros típicos de la potencia en banda theta en función del tiempo antes y después de la estimulación con RubiDopa. Scale-Average Wavelet Spectrum de la banda theta del LFP antes (basal) y después de la estimulación con RubiDopa a 15 Hz (Post RubiDopa) en DLS de ratones control (panel A) y hemiparkinsonianos lesionados con 6-OHDA (panel B).

En la figura 14 se muestran las variables estudiadas de ráfagas en la banda theta de 3 ratones control y 3 ratones hemiparkinsonianos antes y después de la aplicación con RubiDopa. Para la comparación estadística se equilibró el número de ráfagas (sup. 5). La lesión inducida por 6-OHDA en ratones hemiparkinsonianos provoca el incremento significativo en la amplitud de ráfagas de la banda theta a comparación de la amplitud de las ráfagas de ratones control ($P < 0.001$) (fig. 14A). La estimulación con RubiDopa disminuye significativamente la amplitud de las ráfagas en theta únicamente en los ratones hemiparkinsonianos (fig. 14A) ($P = 0.018$). Con respecto a la duración de las ráfagas, se observó un decremento significativo de la duración en ratones hemiparkinsonianos (fig. 14B) ($P = 0.015$). La estimulación con RubiDopa no modifica la duración media de las ráfagas en ambos grupos (fig. 14B). El número de ráfagas registradas en un intervalo de cinco minutos muestra una ligera tendencia a disminuir en ambos grupos (fig. 14C). El IBI mostró un incremento en ratones hemiparkinsonianos a diferencia de ratones control ($P = 0.02$) (fig. 14D). Finalmente, el coeficiente de variación no mostró una tendencia clara en ninguno de los grupos (fig. 14E) ($N = 3$).

En conclusión, la lesión con 6-OHDA produce un incremento de la potencia de ráfagas de la banda theta del DLS. Sin embargo, la estimulación con RubiDopa produce una disminución de la amplitud de ráfagas registradas de ratones hemiparkinsonianos, normalizando parcialmente las alteraciones provocadas por la lesión. En ratones control no se observaron efectos. En las ráfagas theta se observa un incremento del IBI en ratones hemiparkinsonianos a comparación de ratones control (fig. 14E)

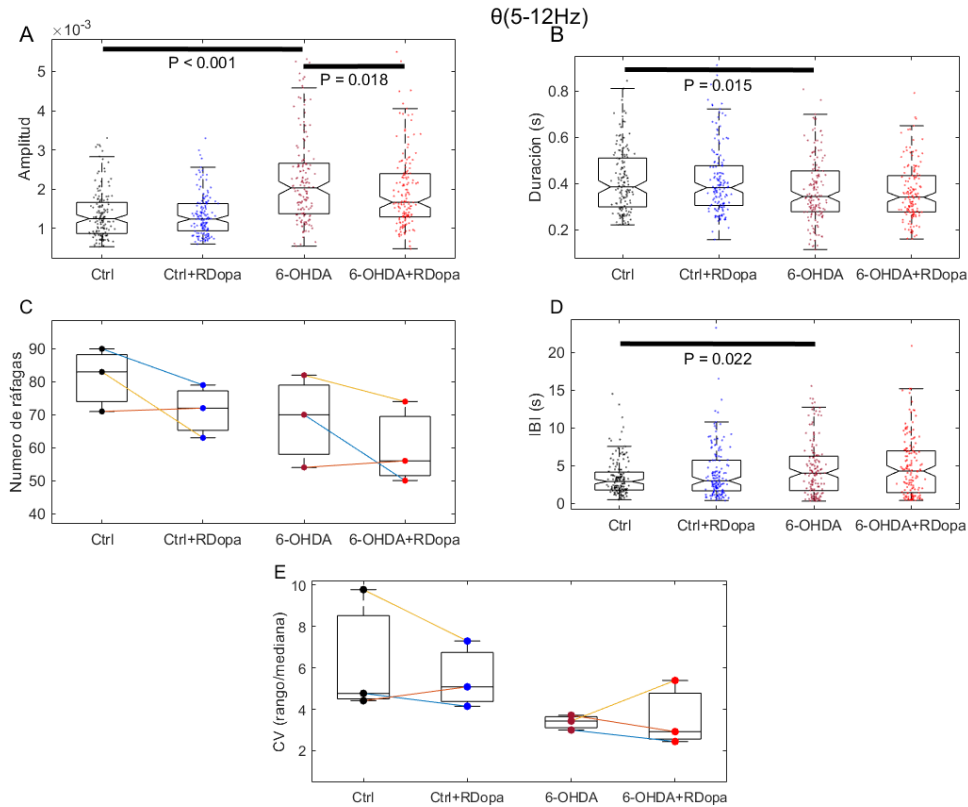


Figura 14. Efecto de la estimulación con RubiDopa en ráfagas de la banda theta registradas en ratones control y hemiparkinsonianos. Gráficas de cajas de la A: Amplitud, B: Duración, C: Numero de ráfagas, D: Intervalo Inter ráfaga (IBI) y E: coeficiente de variación registradas de ráfagas en la banda theta del LFP en DLS de ratones control y hemiparkinsonianos bajo condiciones basales y posterior a la estimulación con RubiDopa a 15 Hz. Control (Ctrl), post RubiDopa control (Ctrl+RDopa), hemiparkinsoniano (6-OHDA), post RubiDopa hemiparkinsoniano (6-OHDA+RDopa).

Ráfagas en la banda beta

También se realizó el análisis de ráfagas en la banda beta (β) delimitada entre los 12 y 30 Hz. En el panel A de la figura 15 muestran los registros típicos del LFP en la banda beta antes (arriba) y después de la aplicación de RubiDopa (abajo) de un ratón control en una ventana de 100 segundos. En el panel B se muestra el registro típico de un ratón hemiparkinsoniano. La aplicación de RubiDopa muestra una disminución de la potencia en ráfagas de en uno de los ratones hemiparkinsonianos

(fig.15B). Durante condiciones basales se muestra un incremento de la potencia en ráfagas de la banda beta registradas en el DLS de ratones hemiparkinsonianos.

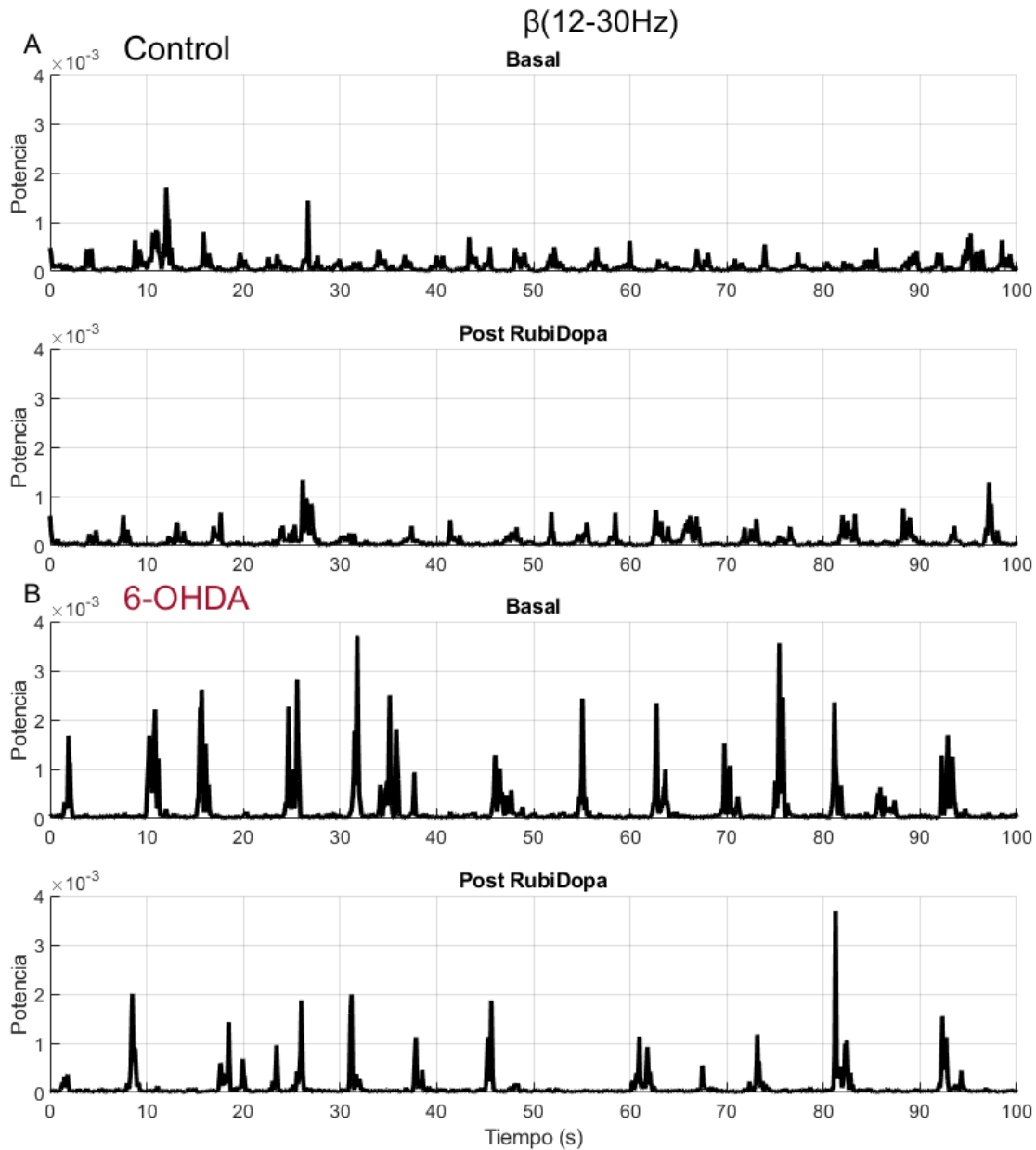


Figura 15. Registros típicos de la potencia en banda beta en función del tiempo antes y después de la estimulación con RubiDopa. Scale-Average Wavelet Spectrum de la banda beta del LFP antes (basal) y después de la estimulación con RubiDopa a 15 Hz (Post RubiDopa) en DLS de ratones control (panel A) y hemiparkinsonianos lesionados con 6-OHDA (panel B).

En la figura 16 se muestran las variables estudiadas de ráfagas en la banda beta de 3 ratones control y 3 ratones hemiparkinsonianos antes y después de la aplicación con RubiDopa. El número de ráfagas estudiadas por ratón se equilibró para la comparación estadística antes y después de la aplicación de RubiDopa (sup. 5) y entre grupos. La lesión inducida por 6-OHDA provoca en ratones hemiparkinsonianos un aumento significativo en la amplitud de ráfagas de la banda beta ($P < 0.001$) y disminución significativa de la duración de las ráfagas ($P < 0.001$) (fig. 16A). Sin embargo, la aplicación de RubiDopa no disminuye la amplitud de las ráfagas en beta de ratones control ni hemiparkinsonianos (fig. 16A). Tampoco modifica la duración media de las ráfagas en ninguno de los dos grupos de manera significativa (fig. 16B). En el análisis de ráfagas por medio del rectificado del LFP si se observó una disminución significativa de la amplitud de las ráfagas después de la estimulación con RubiDopa en ratones hemiparkinsonianos (sup 3). El número de ráfagas registradas en un intervalo de cinco minutos disminuyó considerablemente en uno de los ratones control, mientras que en ratones hemiparkinsonianos se observó una tendencia a disminuir (fig. 16C). El IBI no mostró estar incrementado en ráfagas de ratones hemiparkinsonianos a comparación del control y tampoco se observaron cambios en esta variable después de la aplicación de RubiDopa en ninguno de los dos grupos (fig. 16D). Finalmente, el coeficiente de variación no mostró una tendencia de cambio clara en el grupo control, así como en ratones hemiparkinsonianos (fig. 16E) (N = 3).

En conclusión, se observan cambios significativos en la amplitud y duración de las ráfagas registradas en la potencia beta de ratones hemiparkinsonianos en comparación a lo presentado por ratones control, sin embargo, estas alteraciones no son sensibles a la estimulación con RubiDopa a una frecuencia de 15 Hz. La estimulación con mayor frecuencia podría reflejar cambios en la amplitud de las ráfagas

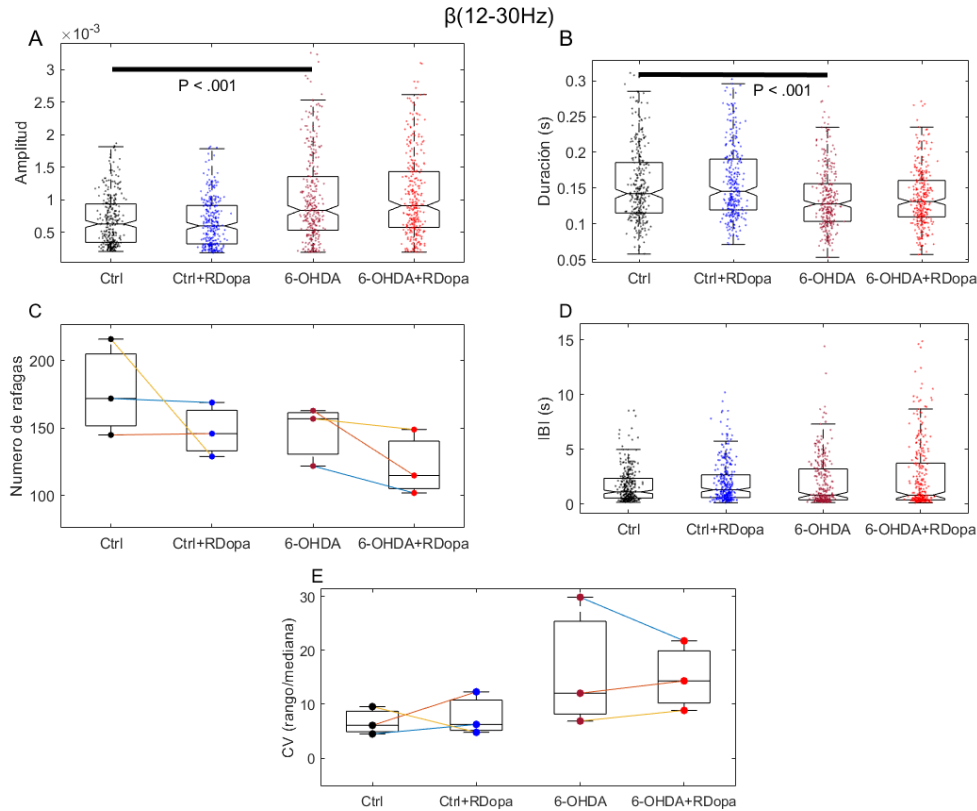


Figura 16. Efecto de la estimulación con RubiDopa en ráfagas de la banda beta registradas en ratones control y hemiparkinsonianos. Graficas de cajas de la A: Amplitud, B: Duración, C: Numero de ráfagas, D: Intervalo Inter ráfaga (IBI) y E: coeficiente de variación registradas de ráfagas en la banda beta del LFP en DLS de ratones control y hemiparkinsonianos bajo condiciones basales y posterior a la estimulación con RubiDopa a 15 Hz. Control (Ctrl), post RubiDopa control (Ctrl+RDopa), hemiparkinsoniano (6-OHDA), post RubiDopa hemiparkinsoniano (6-OHDA+RDopa).

Ráfagas en la banda gamma

Finalmente se realizó el mismo análisis con interés en la potencia del ritmo gamma (γ), la cual se encuentra entre los 30-80 Hz. La figura 17 muestra el registro típico procesado de la actividad en la banda gamma y el efecto de la liberación controlada de dopamina con RubiDopa en DLS de ratones control (panel A) y hemiparkinsonianos (panel B) en una ventana de 100 segundos.

En la figura 18 se muestran las variables estudiadas de ráfagas en la banda gamma de 3 ratones control y 3 ratones hemiparkinsonianos antes y después de la

aplicación con RubiDopa. Para la comparación estadística, se tomó un número de ráfagas equivalente entre los ratones pertenecientes a un grupo (control o hemiparkinsoniano) (sup. 5). En estos resultados no se observaron cambios en la amplitud de las ráfagas entre controles y hemiparkinsonianos durante condiciones basales (fig. 18A). La aplicación de RubiDopa tampoco modifica la amplitud de las ráfagas en gamma en ratones control y hemiparkinsonianos (fig. 18A). Con respecto a la duración media de las ráfagas, se observó un decremento significativo de la duración de estas en ratones hemiparkinsonianos contra los ratones control ($P = 0.05$) (fig. 18B). Pero no se observaron cambios en la duración media de las ráfagas de ambos grupos provocados por la estimulación con RubiDopa (fig. 18B). En ratones control se muestra que la aplicación de RubiDopa genera una tendencia en la disminución en el número de ráfagas (fig. 18C). El IBI mostró un incremento notorio en ratones hemiparkinsonianos en comparación a lo mostrado por ratones control ($P < 0.001$); al estimular la liberación de dopamina solo se observó un aumento del IBI de ratones control, pero no de ratones hemiparkinsonianos ($P < 0.006$) (fig. 18D) Finalmente, el coeficiente de variación no mostró una tendencia clara en ninguno de los dos grupos (fig. 18E) ($N = 3$).

En conclusión, la lesión con 6-OHDA produce alteraciones significativas en la duración de las ráfagas, así como en el IBI, sin embargo, la estimulación con RubiDopa solo produjo un incremento del IBI en el grupo control.

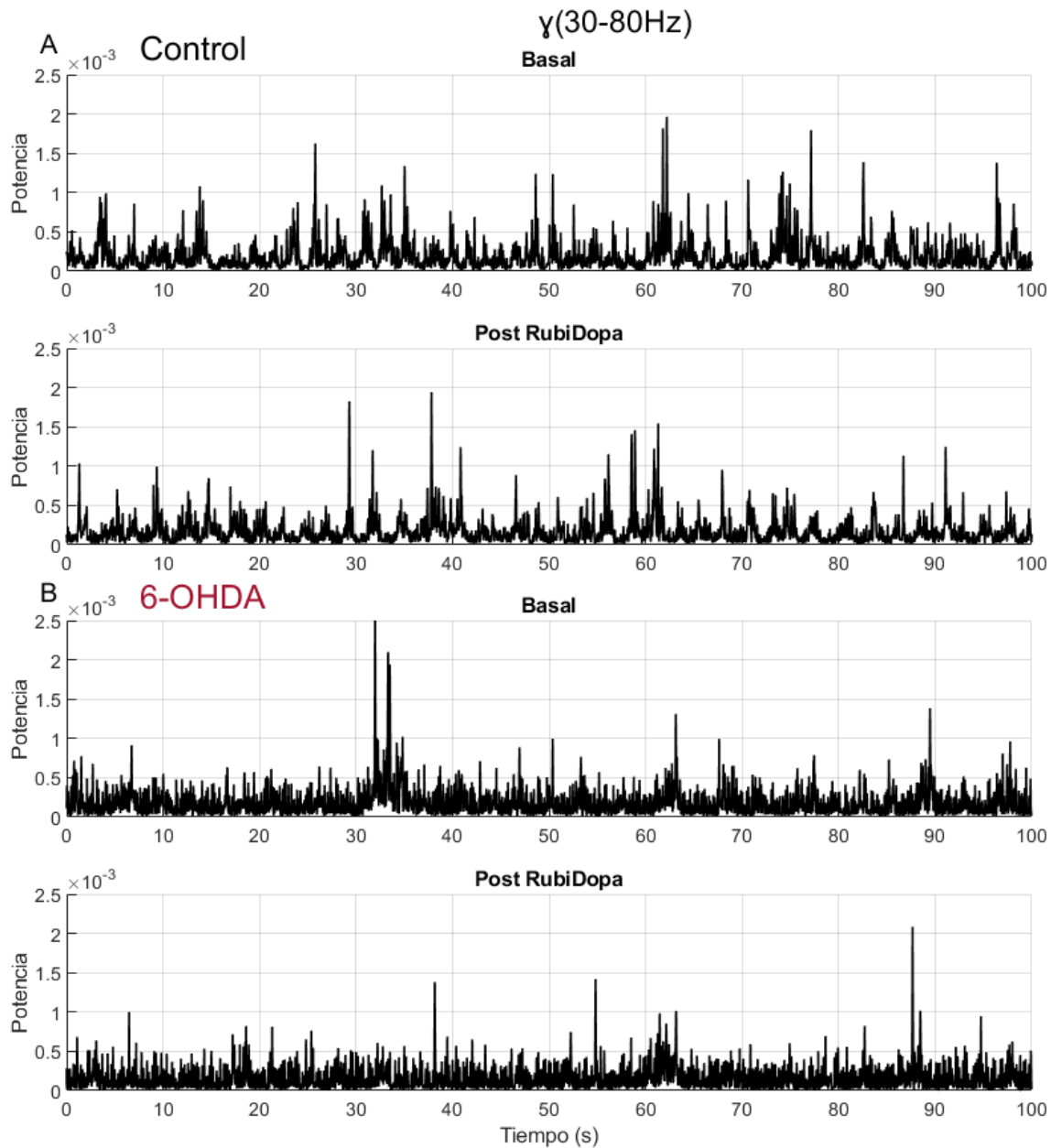


Figura 17. Registros típicos de la potencia en banda gamma en función del tiempo antes y después de la estimulación con RubiDopa. Scale-Average Wavelet Spectrum de la banda gamma del LFP antes (basal) y después de la estimulación con RubiDopa a 15 Hz (Post RubiDopa) en DLS de ratones control (panel A) y hemiparkinsonianos lesionados con 6-OHDA (panel B).

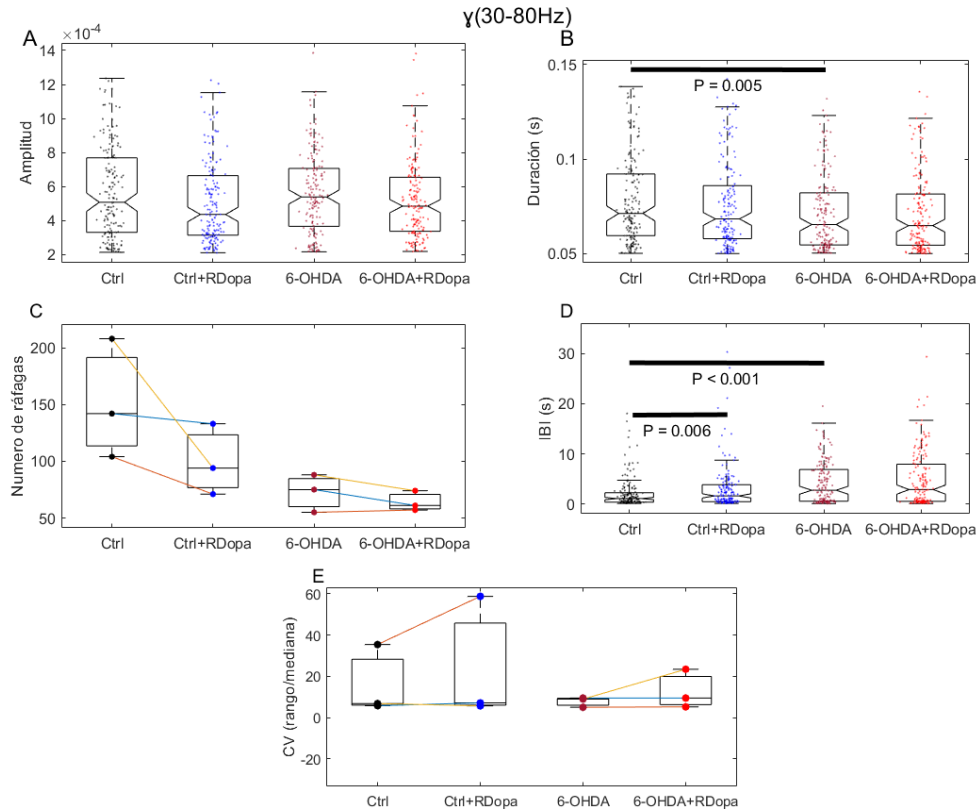


Figura 18. Efecto de la estimulación con RubiDopa en ráfagas de la banda gamma registradas en ratones control y hemiparkinsonianos. Graficas de cajas de la A: Amplitud, B: Duración, C: Numero de ráfagas, D: Intervalo Inter ráfaga (IBI) y E: coeficiente de variación registradas de ráfagas en la banda gamma del LFP en DLS de ratones control y hemiparkinsonianos bajo condiciones basales y posterior a la estimulación con RubiDopa a 15 Hz. Control (Ctrl), post RubiDopa control (Ctrl+RDopa), hemiparkinsoniano (6-OHDA), post RubiDopa hemiparkinsoniano (6-OHDA+RDopa).

Discusión

En primer lugar, la aplicación subdérmica de 0.5 mg/kg de apomorfina en ratones hemiparkinsonianos provocó una conducta de giro contralateral al sitio de lesión, característica del modelo hemiparkinsoniano. El modelo generado por la inyección de 6-OHDA en SNpc, a comparación de la inyección realizada en el fascículo prosencefálico medial (MFB, *medial forebrain bundle*), no incide considerablemente sobre las proyecciones dopaminérgicas que provienen del VTA. Por lo que el grado de lesión en ratones lesionados en SNc no llegar a ser siempre del 100%. En estos ratones la tendencia al giro ipsilateral de la lesión es evidente a simple vista; sin embargo, existe un mayor grado de correlación entre el giro contralateral inducido por apomorfina y el grado de la lesión de la vía dopaminérgica (Björklund & Dunnett, 2019). De acuerdo con lo reportado anteriormente en este modelo de enfermedad de Parkinson y por el número de giros contralaterales dados por minuto en nuestros ratones, el grado de lesión dopaminérgica alcanzado en este protocolo fue de moderado a severo. Lo cual indica que hubo una degradación de la vía nigroestriada de al menos el 60% en dos de los ratones y un 90 - 100% en uno de los ratones hemiparkinsonianos (Björklund & Dunnett, 2019).

Comparando los resultados de ambos análisis de ráfagas podemos concluir que la EP genera un incremento significativo en la amplitud de la potencia de ráfagas de las bandas delta, theta y beta registradas en el DLS de ratones hemiparkinsonianos en comparación ratones control. También se observó una disminución significativa en la duración de ráfagas de las bandas theta, beta y gamma de ratones hemiparkinsonianos en comparación a la duración de las ráfagas de ratones control. Nuestros resultados sugieren que la EP no solo altera la potencia con la que grupos neuronales podrían estar representándose en el estriado; en adición, podrían existir alteraciones en la duración y temporalidad de las ráfagas en bandas del LFP, lo cual no se aborda comúnmente en la bibliografía.

El incremento en la potencia de estos tres ritmos (delta, theta y beta) está asociado a lo reportado durante la EP (Asch et al., 2020; Brown, 2003; Jenkinson & Brown, 2011; Leung & Yim, 1993). Al aplicar RubiDopa (1.5 μ l, 300 μ M)

y estimular a una frecuencia de 15 Hz se observó una disminución significativa de la amplitud de ráfagas de las bandas delta y theta registradas en el en el DLS hemiparkinsoniano. Lo anterior demuestra que parcialmente se revirtieron las alteraciones en la actividad espontanea de ráfagas del modelo hemiparkinsoniano mediante la utilización de un método que permite la liberación controlada de dopamina. En el grupo control solo se observó una disminución en la potencia de las bandas el delta.

Al estudiar el efecto de la estimulación con RubiDopa sobre el LFP de ratones control y hemiparkinsonianos se observó una disminución de la potencia en frecuencias bajas, pertenecientes a la banda delta del LFP. Este decremento en la potencia delta, podría deberse al incremento en la concentración de dopamina, lo cual ya ha sido reportando con anterioridad, por estimulación del VTA a 10 Hz (Leung & Yim, 1993). Se sabe que la disminución de la potencia de banda ocurre durante periodos de movimiento; dicho de otra manera, su desincronización favorece la generación de los movimientos (Leung & Yim, 1993). Esto es un indicativo de que la administración de RubiDopa podría tener repercusiones favorables en la conducta motora de los ratones hemiparkinsonianos.

Además, encontramos que la estimulación con RubiDopa produce un mayor efecto en la potencia delta, theta y beta del espectro en el DLS de ratones hemiparkinsonianos. Este incremento del efecto de la aplicación de RubiDopa en ratones lesionados podría estar explicado por investigaciones donde se demuestra que durante la enfermedad de Parkinson existe un aumento de la sensibilidad a dopamina, inducida por el incremento en el número de receptores (Hisahara & Shimohama, 2011; Lee, Seeman, Rajput, Farley, & Hornykiewicz, 1978).

En lo que respecta a la banda theta, se observó un incremento de la potencia en ráfagas registradas de ratones hemiparkinsonianos. Se sabe que el incremento de la potencia en la banda theta esta correlacionada positivamente con la generación de temblores en pacientes parkinsonianos (Asch et al., 2020). En el registro de la banda theta se observaron únicamente cambios en la amplitud de las ráfagas en los ratones hemiparkinsonianos; por lo que, en teoría, una disminución en la potencia

theta provocada por la liberación de dopamina en el estriado promovería la desaparición de estos signos de la enfermedad.

El grupo de Costa y colaboradores describió los cambios en la potencia de las bandas delta, theta, beta y gamma producidos por periodos de aquinesia, movimiento o administración de bloqueadores y agonistas (levodopa) dopaminérgicos en el registro del estriado in vivo (Burkhardt et al., 2009; Costa et al., 2006). Al administrar levodopa sistémica en estos ratones, ellos reportan un decremento de la potencia en las bandas delta y beta, y un incremento en la potencia de las bandas theta y gamma (Costa et al., 2006). En nuestros resultados, la estimulación con RubiDopa provocó el decremento de la potencia en la banda delta del LFP registrado en el DLS de ratones control (fig. 19A). Mientras que en ratones hemiparkinsonianos el decremento de la potencia fue mayor en las bandas delta, theta y beta del espectro (fig. 19B). La reducción en la banda delta concuerda con lo encontrado por el grupo de Costa. A diferencia de ellos, nosotros no observamos un incremento de la potencia en las bandas theta y gamma del espectro. Esto probablemente se debe a que ellos realizaron los registros con ratones en libre movimiento, mientras que en nuestros experimentos se realizó en ratones anestesiados.

Otro artículo publicado por el grupo de Costa reportó que el bloqueo de los receptores a dopamina del tipo D2, expresados por iMSNs, incrementan la potencia de las bandas delta/beta y decremента la potencia de la banda gamma. Por lo que cambios en el LFP del estriado podrían estar mediados principalmente por la activación o inactivación de neuronas de la vía indirecta (Burkhardt et al., 2009). Bajo este supuesto, se podría proponer que la disminución en la potencia de la banda delta, theta y beta del espectro de frecuencias que presentaron los ratones hemiparkinsonianos, podría estar inducida por la activación del receptor D2 al momento de la estimulación con RubiDopa.

El mecanismo que podría estar detrás de la desincronización se explica por registros en la configuración de whole-cell, realizados en rebanadas de la corteza y estriado de ratas lesionadas por aplicación de 6-OHDA. En los que se demostró que la

aplicación de un agonista selectivo a receptores D2 en este modelo, decrementa la amplitud de la corriente post sináptica excitatoria sobre el estriado (Picconi, Centonze, Rossi, Bernardi, & Calabresi, 2004). Por otra parte, otros estudios sugieren un decremento en la liberación de glutamato y decremento de los potenciales post sinápticos por una disminución en la entrada de calcio extracelular en las terminales presinápticas del estriado (Higley & Sabatini, 2010). Este decremento de la entrada sináptica proveniente de la corteza e inducida por agonistas D2 podría verse disminuida al aplicar agonistas dopaminérgicos como es el caso de la RubiDopa, promoviendo una desincronización de las bandas delta o beta registradas en el estriado, principalmente.

El incremento de la sincronización de la banda beta en distintas zonas del encéfalo que forman parte del circuito mCBGT se ha correlacionado con la aparición de síntomas relacionados a la enfermedad de Parkinson, así como la depleción dopaminérgica de la vía nigroestriada (Jenkinson & Brown, 2011; Merchant & Bartolo, 2018; Silberstein et al., 2003). Lo anterior llevó a la aplicación de terapias de reemplazo de dopamina, como el uso de Levodopa, para ayudar al tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, la administración sistémica de levodopa puede inducir otra serie de síntomas no asociados a la enfermedad de Parkinson; como disquinesias o padecimientos con implicaciones en la función cardíaca (Hisahara & Shimohama, 2011). La disminución de la potencia beta en el estriado de dos ratones lesionados que aquí presentamos, sugiere que se puede utilizar la RubiDopa como un método alternativo de terapia de reemplazo de dopamina para liberar este neurotransmisor con una mayor resolución temporal y espacial.

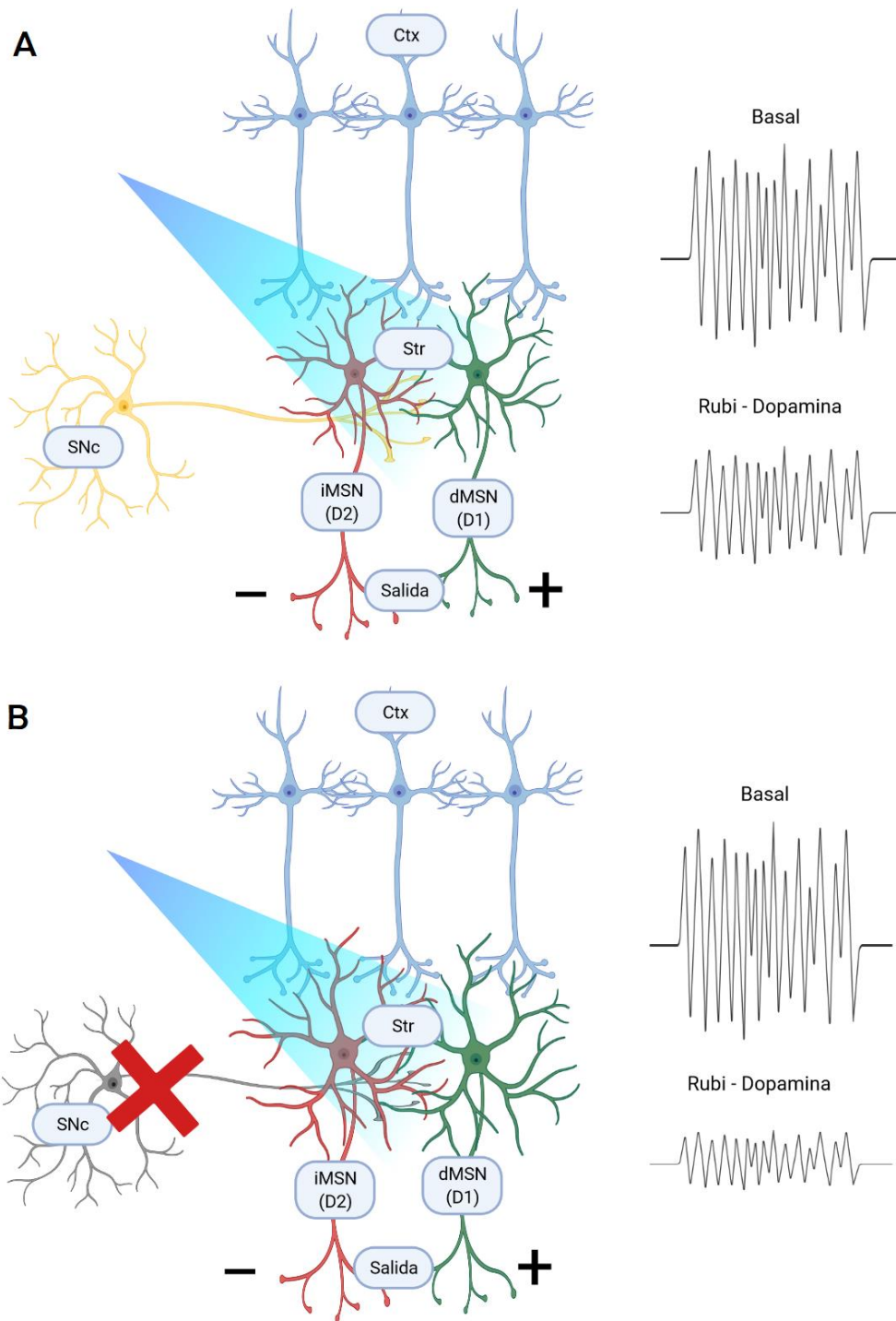


Figura 19. Figura resumen del efecto de la estimulación con RubiDopa en ratones control y hemiparkinsonianos en el circuito mCBGT. La estimulación con RubiDopa en DLS promueve la disminución de la potencia de ráfagas de baja frecuencia en ratones control (A) y hemiparkinsonianos (B); esto podría estar mediado principalmente por la inactivación de la vía indirecta (activación de iMSNs con receptor D2). El efecto de la estimulación con RubiDopa podría estar amplificado en ratones hemiparkinsonianos debido a un incremento en la sensibilidad a dopamina (panel B).

Conclusiones

- Se estandarizó el registro de la actividad eléctrica del estriado dorsolateral simultáneo a la administración y estimulación con RubiDopa
- La lesión por 6-OHDA induce un incremento en la potencia de ráfagas delta, theta y beta del DLS, así como una disminución de la duración de ráfagas en las bandas theta, beta y gamma.
- La liberación controlada de dopamina produce un decremento de la potencia en ráfagas de la banda delta de ratones control.
- La liberación controlada de dopamina produce un decremento significativo de la potencia en ráfagas de las bandas delta y theta de ratones hemiparkinsonianos, lo cual restaura parcialmente la actividad aberrante del DLS hemiparkinsoniano.

Perspectivas

En este proyecto se estudió la liberación de RubiDopa a una frecuencia de 15 Hz; sin embargo, podrían ponerse a prueba frecuencias de estimulación más altas que induzcan una mayor liberación de dopamina en el estriado.

Nuestros resultados sugieren que hay una mayor tendencia en la disminución de la potencia de las bandas Delta y Theta en el LFP en ratones hemiparkinsonianos. Por ello, otro aspecto importante para estudiar a futuro es si existe una correlación entre el grado de lesión dopaminérgica y el efecto de la liberación controlada de dopamina utilizando RubiDopa. Finalmente podría estudiarse si la estimulación recurrente o crónica restaura en su totalidad las alteraciones que la enfermedad de Parkinson podría estar generando en la actividad del estriado.

Finalmente, aun hace falta explorar a profundidad las posibles alteraciones en la temporalidad de las ráfagas, por medio de la realización de diagramas de Poincaré

Referencias

- Abbott, A. (2010). Levodopa: the story so far. *Nature*, *466*(7310), S6-7. doi:10.1038/466S6a
- Addison, P. S. (2005). Wavelet transforms and the ECG: a review. *Physiol Meas*, *26*(5), R155-199. doi:10.1088/0967-3334/26/5/r01
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, *12*(10), 366-375. doi:10.1016/0166-2236(89)90074-x
- Andino-Pavlovsky, V., Souza, A. C., Scheffer-Teixeira, R., Tort, A. B. L., Etchenique, R., & Ribeiro, S. (2017a). Dopamine Modulates Delta-Gamma Phase-Amplitude Coupling in the Prefrontal Cortex of Behaving Rats. *Front Neural Circuits*, *11*, 29. doi:10.3389/fncir.2017.00029
- Andino-Pavlovsky, V., Souza, A. C., Scheffer-Teixeira, R., Tort, A. B. L., Etchenique, R., & Ribeiro, S. (2017b). Dopamine Modulates Delta-Gamma Phase-Amplitude Coupling in the Prefrontal Cortex of Behaving Rats. *Front Neural Circuits*, *11*(29).
- Araya, R., Andino-Pavlovsky, V., Yuste, R., & Etchenique, R. (2013). Two-photon optical interrogation of individual dendritic spines with caged dopamine. *ACS Chem Neurosci*, *4*(8), 1163-1167. doi:10.1021/cn4000692
- Asch, N., Herschman, Y., Maoz, R., Auerbach-Asch, C. R., Valsky, D., Abu-Snineh, M., . . . Israel, Z. (2020). Independently together: subthalamic theta and beta opposite roles in predicting Parkinson's tremor. *Brain Commun*, *2*(2), fcaa074. doi:10.1093/braincomms/fcaa074
- Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2019). The Amphetamine Induced Rotation Test: A Re-Assessment of Its Use as a Tool to Monitor Motor Impairment and Functional Recovery in Rodent Models of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*, *9*(1), 17-29. doi:10.3233/jpd-181525
- Brittain, J. S., Sharott, A., & Brown, P. (2014). The highs and lows of beta activity in cortico-basal ganglia loops. *Eur J Neurosci*, *39*(11), 1951-1959. doi:10.1111/ejn.12574
- Brown, P. (2003). Oscillatory nature of human basal ganglia activity: relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov Disord*, *18*(4), 357-363. doi:10.1002/mds.10358
- Burkhardt, J. M., Jin, X., & Costa, R. M. (2009). Dissociable effects of dopamine on neuronal firing rate and synchrony in the dorsal

- striatum. *Front Integr Neurosci*, 3, 28.
doi:10.3389/neuro.07.028.2009
- Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci*, 13(6), 407-420. doi:10.1038/nrn3241
- Chen, H., Lei, H., & Xu, Q. (2018). Neuronal activity pattern defects in the striatum in awake mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 341, 135-145.
- Costa, R. M., Lin, S. C., Sotnikova, T. D., Cyr, M., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., & Nicolelis, M. A. (2006). Rapid alterations in corticostriatal ensemble coordination during acute dopamine-dependent motor dysfunction. *Neuron*, 52(2), 359-369.
doi:10.1016/j.neuron.2006.07.030
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909. doi:10.1016/s0896-6273(03)00568-3
- Deffains, M., Iskhakova, L., Katabi, S., Haber, S. N., Israel, Z., & Bergman, H. (2016). Subthalamic, not striatal, activity correlates with basal ganglia downstream activity in normal and parkinsonian monkeys. *Elife*, 23(5), 16443.
- Fino, E., Araya, R., Peterka, D. S., Salierno, M., Etchenique, R., & Yuste, R. (2009). RuBi-Glutamate: Two-Photon and Visible-Light Photoactivation of Neurons and Dendritic spines. *Front Neural Circuits*, 3, 2. doi:10.3389/neuro.04.002.2009
- Gagnon, D., Petryszyn, S., Sanchez, M. G., Bories, C., Beaulieu, J. M., De Koninck, Y., . . . Parent, M. (2017). Striatal Neurons Expressing D(1) and D(2) Receptors are Morphologically Distinct and Differently Affected by Dopamine Denervation in Mice. *Sci Rep*, 7, 41432.
doi:10.1038/srep41432
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., Jr., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250(4986), 1429-1432.
doi:10.1126/science.2147780
- Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. (2018). *Lancet Neurol*, 17(11), 939-953. doi:10.1016/s1474-4422(18)30295-3

- Gradinaru, V., Mogri, M., Thompson, K. R., Henderson, J. M., & Deisseroth, K. (2009). Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science*, 324(5925), 354-359. doi:10.1126/science.1167093
- Groiss, S. J., Wojtecki, L., Südmeyer, M., & Schnitzler, A. (2009). Deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Ther Adv Neurol Disord*, 2(6), 20-28. doi:10.1177/1756285609339382
- Haumesser, J. K., Kühn, J., Güttler, C., Nguyen, D. H., Beck, M. H., Kühn, A. A., & van Riesen, C. (2017). Acute In Vivo Electrophysiological Recordings of Local Field Potentials and Multi-unit Activity from the Hyperdirect Pathway in Anesthetized Rats. *J Vis Exp*(124). doi:10.3791/55940
- Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2010). Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat Neurosci*, 13(8), 958-966. doi:10.1038/nn.2592
- Hisahara, S., & Shimohama, S. (2011). Dopamine receptors and Parkinson's disease. *Int J Med Chem*, 2011, 403039. doi:10.1155/2011/403039
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Nakano, Y., Lopez-Huerta, V. G., Hernandez-Cruz, A., Vargas, J., . . . Arbuthnott, G. W. (2019). Synchronized activation of striatal direct and indirect pathways underlies the behavior in unilateral dopamine-depleted mice. *Eur J Neurosci*, 49(11), 1512-1528. doi:10.1111/ejn.14344
- Jenkinson, N., & Brown, P. (2011). New insights into the relationship between dopamine, beta oscillations and motor function. *Trends Neurosci*, 34(12), 611-618. doi:10.1016/j.tins.2011.09.003
- Jobert, M., Tismer, C., Poiseau, E., & Schulz, H. (1994). Wavelets-a new tool in sleep biosignal analysis. *J Sleep Res*, 3(4), 223-232. doi:10.1111/j.1365-2869.1994.tb00135.x
- Jost, W. H. (2017). [Nonmotor symptoms in Parkinson's disease]. *Nervenarzt*, 88(8), 874-887. doi:10.1007/s00115-017-0346-7
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), 622-626. doi:10.1038/nature09159
- Lee, T., Seeman, P., Rajput, A., Farley, I. J., & Hornykiewicz, O. (1978). Receptor basis for dopaminergic supersensitivity in Parkinson's disease. *Nature*, 273(5657), 59-61. doi:10.1038/273059a0

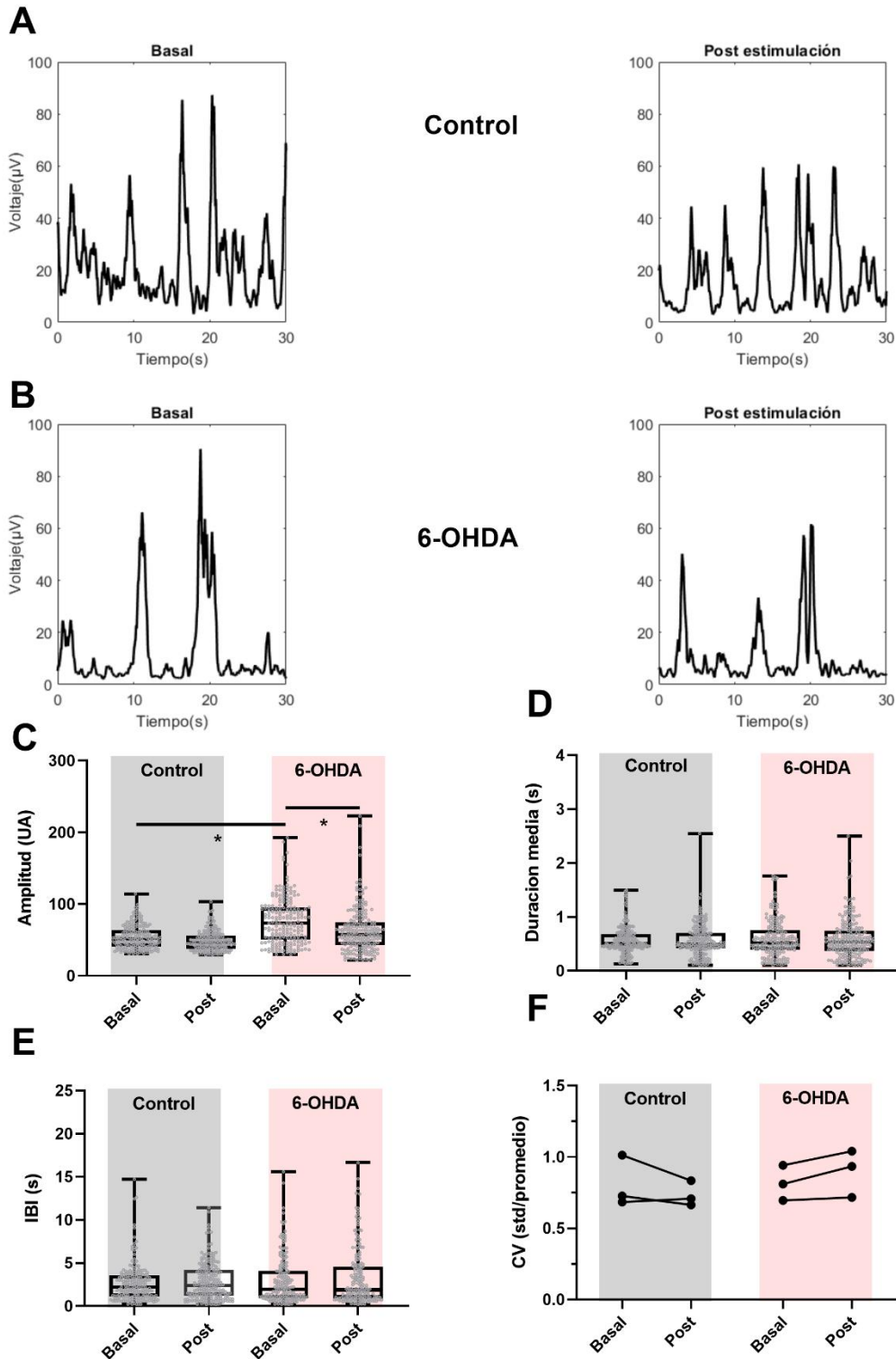
- Leung, L. S., & Yim, C. Y. (1993). Rhythmic delta-frequency activities in the nucleus accumbens of anesthetized and freely moving rats. *Can J Physiol Pharmacol*, *71*(5-6), 311-320. doi:10.1139/y93-049
- Liang, L., DeLong, M. R., & Papa, S. M. (2008). Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci*, *28*(30), 7537-7547.
- McGregor, M. M., & Nelson, A. B. (2019). Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease. *Neuron*, *101*(6), 1042-1056.
- Merchant, H., & Bartolo, R. (2018). Primate beta oscillations and rhythmic behaviors. *J Neural Transm (Vienna)*, *125*(3), 461-470. doi:10.1007/s00702-017-1716-9
- Parker, J. G., Marshall, J. D., Ahanonu, B., Wu, Y. W., Kim, T. H., Grewe, B. F., . . . Schnitzer, M. J. (2018). Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. *Nature*, *557*(7704), 177-182.
- Picconi, B., Centonze, D., Rossi, S., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2004). Therapeutic doses of L-dopa reverse hypersensitivity of corticostriatal D2-dopamine receptors and glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Brain*, *127*(Pt 7), 1661-1669. doi:10.1093/brain/awh190
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., . . . Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*, *3*, 17013. doi:10.1038/nrdp.2017.13
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., . . . Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, *11*(11), 760-772. doi:10.1038/nrn2915
- Ryan, M. B., Bair-Marshall, C., & Nelson, A. B. (2018). Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia. *Cell Rep*, *23*(12), 3438-3446.
- Sagot, B., Li, L., & Zhou, F. M. (2018). Hyperactive Response of Direct Pathway Striatal Projection Neurons to L-dopa and D1 Agonism in Freely Moving Parkinsonian Mice. *Front Neural Circuits*, *12*(57).
- Sen, A. K., & Dostrovsky, J. O. (2007). Evidence of intermittency in the local field potentials recorded from patients with Parkinson's disease: a wavelet-based approach. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, *8*(3), 165-171. doi:10.1080/17486700701502363
- Sharott, A., Vinciati, F., Nakamura, K. C., & Magill, P. J. (2017). A Population of Indirect Pathway Striatal Projection Neurons Is Selectively

- Entrained to Parkinsonian Beta Oscillations. *J Neurosci*, 37(41), 9977-9998. doi:10.1523/jneurosci.0658-17.2017
- Silberstein, P., Kühn, A. A., Kupsch, A., Trottenberg, T., Krauss, J. K., Wöhrle, J. C., . . . Brown, P. (2003). Patterning of globus pallidus local field potentials differs between Parkinson's disease and dystonia. *Brain*, 126(Pt 12), 2597-2608. doi:10.1093/brain/awg267
- Singh, A., Mewes, K., Gross, R. E., DeLong, M. R., Obeso, J. A., & Papa, S. M. (2016). Human striatal recordings reveal abnormal discharge of projection neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(34), 9629-9634.
- Slimen, I. B., Boubchir, L., Mbarki, Z., & Seddik, H. (2020). EEG epileptic seizure detection and classification based on dual-tree complex wavelet transform and machine learning algorithms. *J Biomed Res*, 34(3), 151-161. doi:10.7555/jbr.34.20190026
- Tachibana, Y., Iwamuro, H., Kita, H., Takada, M., & Nambu, A. (2011). Subthalamo-pallidal interactions underlying parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia. *Eur J Neurosci*, 34(9), 1470-1484.
- Tepper, J. M., & Bolam, J. P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol*, 14(6), 685-692. doi:10.1016/j.conb.2004.10.003
- Tinkhauser, G., Pogosyan, A., Little, S., Beudel, M., Herz, D. M., Tan, H., & Brown, P. (2017). The modulatory effect of adaptive deep brain stimulation on beta bursts in Parkinson's disease. *Brain*, 140(4), 1053-1067. doi:10.1093/brain/awx010
- Torrence, C., & Compo, G. P. (1998). A Practical Guide to Wavelet Analysis %J Bulletin of the American Meteorological Society. 79(1), 61-78. doi:10.1175/1520-0477(1998)079<0061:Apgtwa>2.0.Co;2

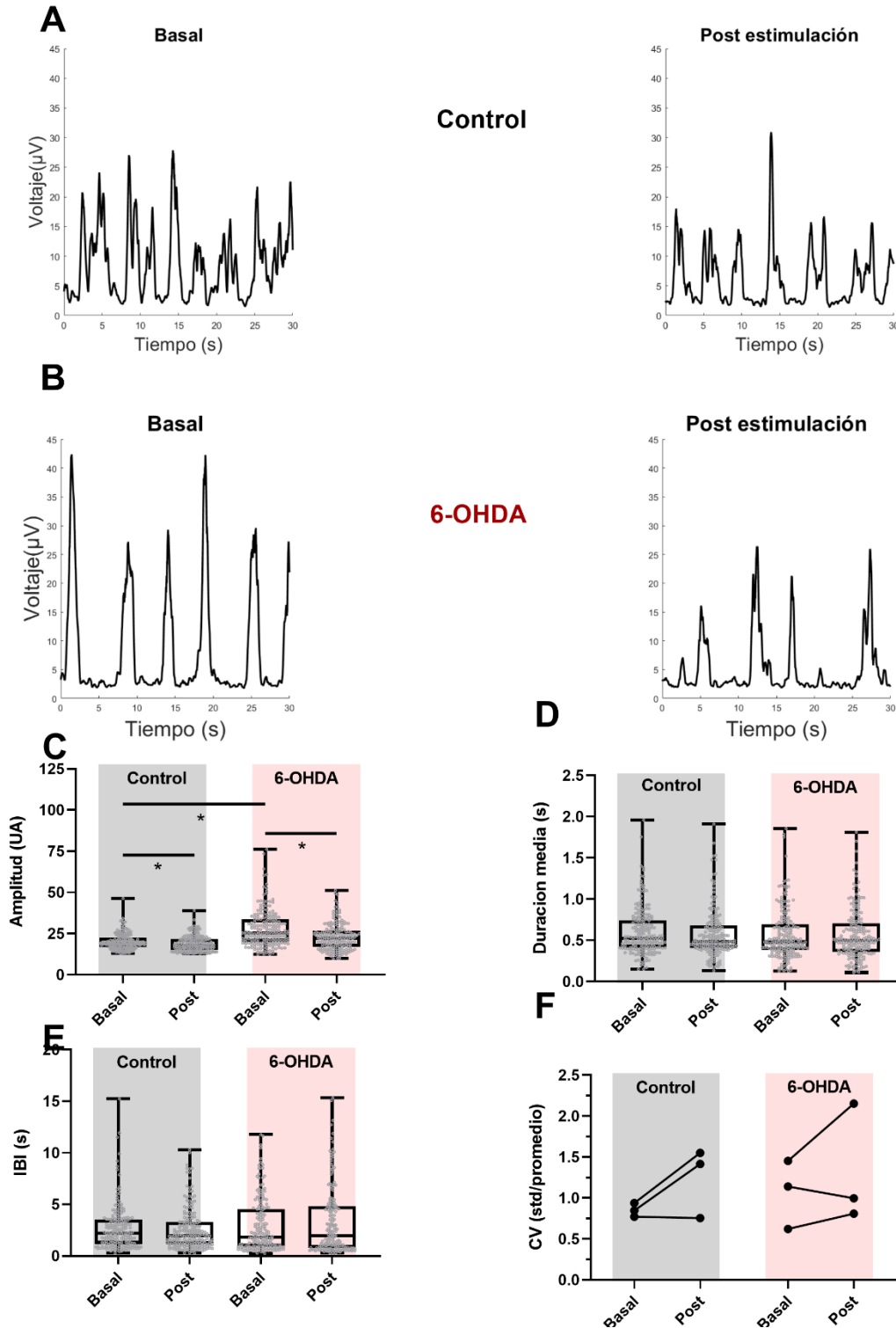
Figuras suplementarias

Análisis de ráfagas por medio de rectificación

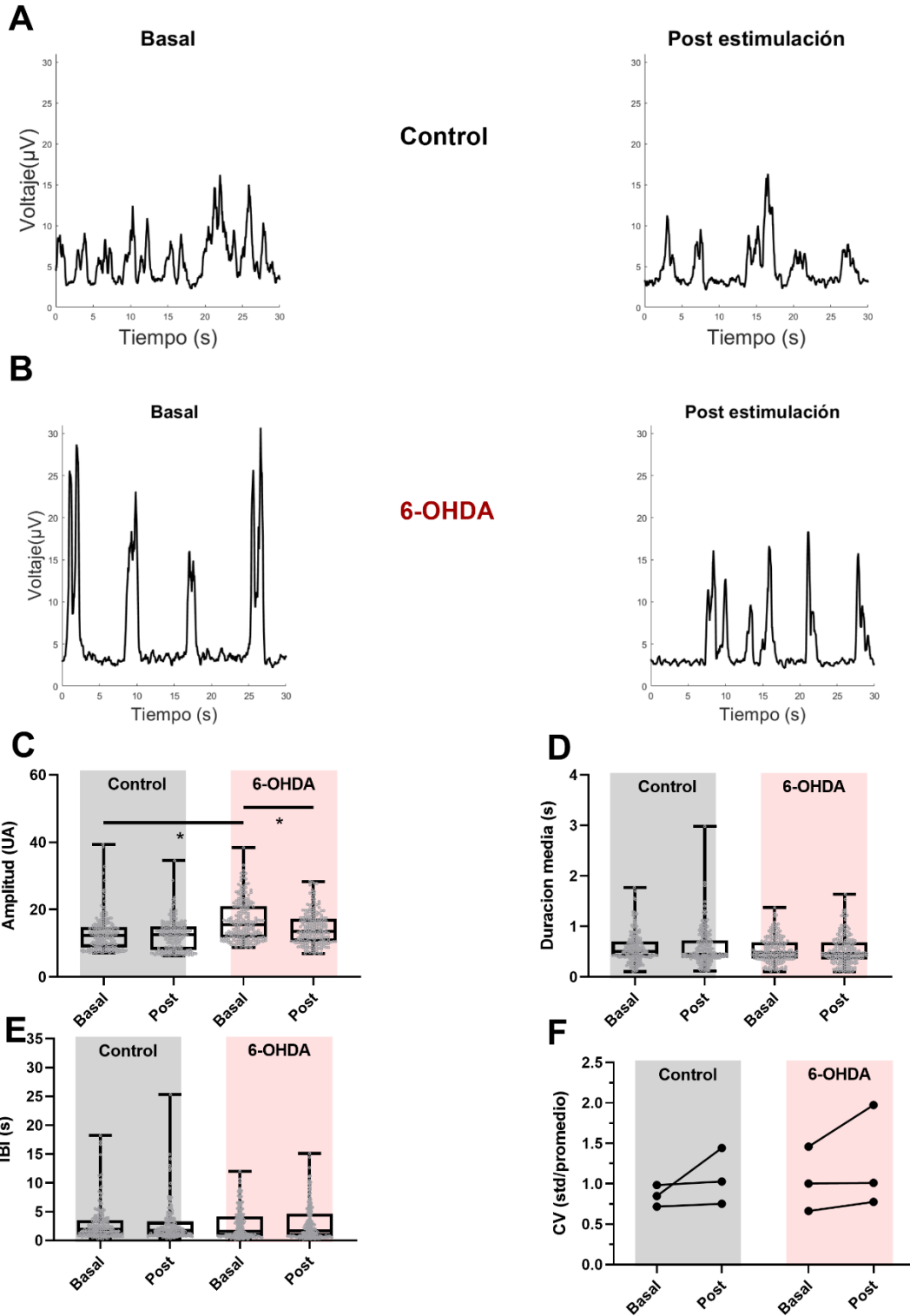
Para aislar las ráfagas, primero se realizó el filtrado del LFP en las distintas bandas del espectro con un filtro pasabandas dependiendo el rango de frecuencias de interés. Después se rectificó la señal y finalmente se suavizó con un filtro de media de 400 ms (Tinkhauser et al., 2017). Este procedimiento se realizó en todas las bandas (delta, theta, beta y gamma) para obtener los trazos procesados antes y después de la aplicación de RubiDopa (paneles A y B). Los resultados mostraron un incremento de la potencia en ráfagas de las bandas delta, theta y beta en ratones hemiparkinsonianos a comparación del ratón control durante las condiciones basales, previo a la estimulación con RubiDopa a 15 Hz (sup. 1C, 2C, 3C, 4C). No se observaron cambios significativos en la duración de las ráfagas (sup. 1D, 2D, 3D, 4D), ni en el IBI (sup. 1E, 2E, 3E, 4E). El CV mostró ligeros incrementos en las ráfagas de ratones hemiparkinsonianos a diferencia de los ratones control. La aplicación de RubiDopa muestra un efecto en la amplitud de las ráfagas en ambos grupos de ratones en todas las bandas de frecuencias.



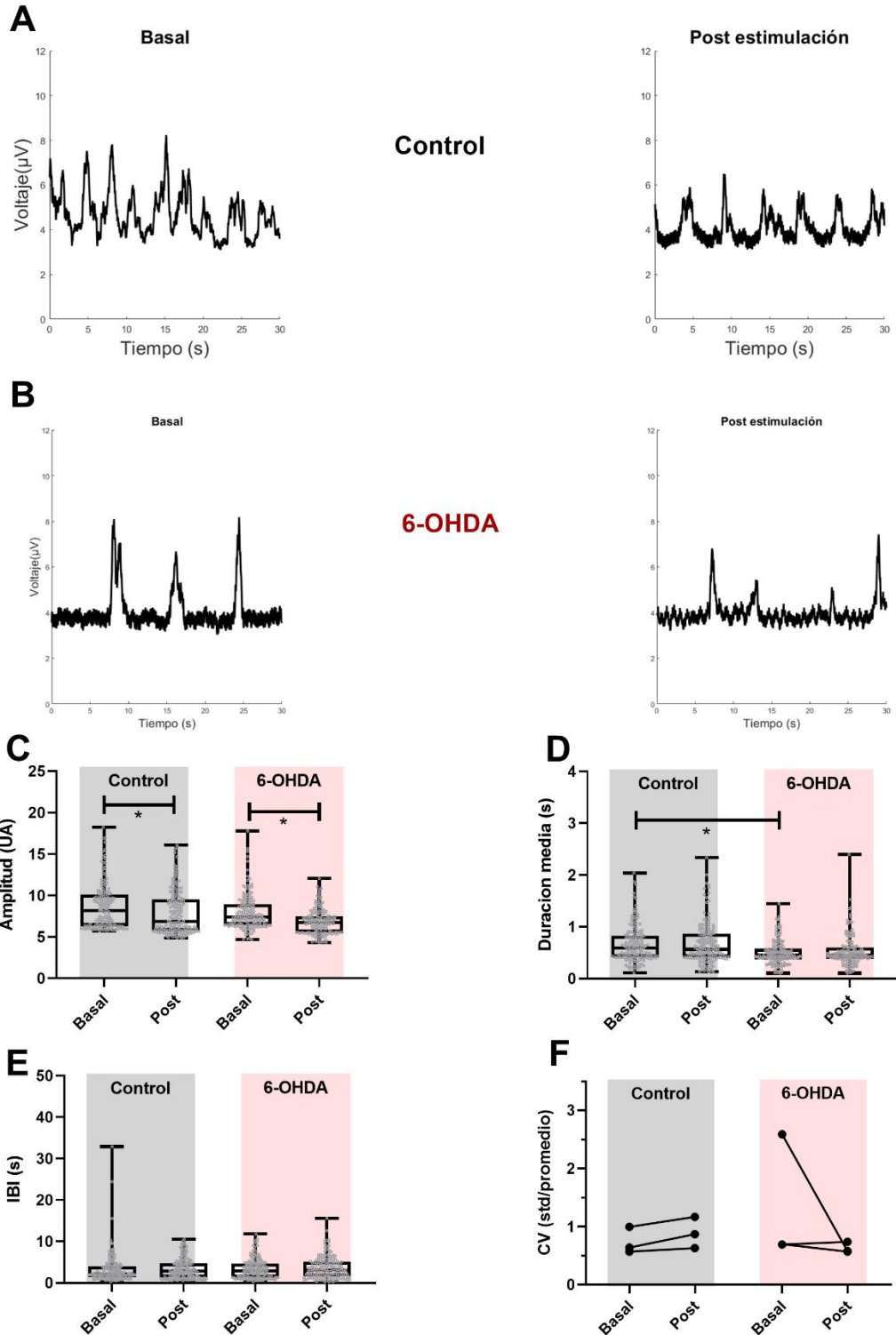
Suplementaria 1. Efecto de la estimulación con RubiDopa en ráfagas de la banda delta registradas de ratones control y hemiparkinsonianos por el método de filtrado rectificación y suavizado del LFP. Registro típico de ráfagas en delta (1-5 Hz) anterior y posterior a la estimulación con RubiDopa en ratones control (A) y lesionados (B). Medianas de la amplitud (C), duración (D), IBI (E) y CV(F)



Suplementaria 2. Efecto de la estimulación con RubiDopa en ráfagas de la banda theta registradas de ratones control y hemiparkinsonianos por el método de filtrado rectificación y suavizado del LFP. Registro típico de ráfagas en theta (5-12 Hz) anterior y posterior a la estimulación con RubiDopa en ratones control (A) y lesionados (B). Medianas de la amplitud (C), duración (D), IBI (E) y CV(F).



Suplementaria 3. Efecto de la estimulación con RubiDopa en ráfagas de la banda beta registradas de ratones control y hemiparkinsonianos por el método de filtrado rectificación y suavizado del LFP. Registro típico de ráfagas en beta (12-30 Hz) anterior y posterior a la estimulación con RubiDopa en ratones control (A) y lesionados (B). Medianas de la amplitud (C), duración (D), IBI (E) y CV(F).



Suplementaria 4. Efecto de la estimulación con RubiDopa en ráfagas de la banda gamma registradas de ratones control y hemiparkinsonianos por el método de filtrado rectificación y suavizado del LFP. Registro típico de ráfagas en gamma (30-80 Hz) anterior y posterior a la estimulación con RubiDopa en ratones control (A) y lesionados (B). Medianas de la amplitud (C), duración (D), IBI (E) y CV(F)

	<i>Ctrl</i>	<i>Ctrl+RDopa</i>	<i>6-OHDA</i>	<i>6-OHDA+RDopa</i>
<i>Delta</i>	18	18	18	18
<i>Theta</i>	50	50	50	50
<i>Beta</i>	102	102	102	102
<i>Gamma</i>	83	83	83	83

Suplementaria 5. Numero de ráfagas consideradas por ratón registrado para el análisis estadístico en la amplitud, duración e IBI por ratón en el análisis de ráfagas utilizando Wavelets

CONDICIÓN	RATON	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MEDIANA	RANGO	SIMETRIA	KURTOSIS	PENDIENTE (PSD)
BASAL CONTROL	1	9.70E-16	67.77800606	5.08028357	740.118201	-0.32134955	3.76205891	-0.934473389
	2	7.64E-15	97.29995425	-1.87860355	919.179486	0.28208676	4.56236151	-0.912444807
	3	2.93E-14	55.26623623	-0.15608868	665.77666	0.22928487	5.40704841	-0.895728018
POST RUBIDOPA CONTROL	1	-8.12E-16	60.85796987	4.93818818	591.587309	-0.4781046	3.78637374	-0.921576055
	2	-2.26E-15	54.57733018	1.10544897	518.000932	-0.24601793	4.32563508	-0.86863311
	3	-1.96E-15	58.45619152	2.13010464	616.968493	-0.20300439	3.79822132	-0.960740386
BASAL 6-OHDA	1	-1.04E-15	52.81061358	2.33882294	707.320643	-1.10160217	8.03681274	-0.93850473
	2	5.38E-15	49.93343901	-0.59381075	726.081025	-0.6143998	8.38540306	-0.818894966
	3	-4.59E-15	57.0076862	2.46257928	597.082297	-0.57106409	4.69110512	-0.791009802
POST RUBIDOPA 6-OHDA	1	8.62E-15	44.59759492	0.00421113	748.162976	-0.14644147	8.56034235	-0.916688175
	2	1.15E-15	40.69275044	0.5445087	592.628858	-0.96218191	10.34805	-0.865813626
	3	-1.47E-15	53.50636344	3.57270576	591.02845	-0.74416497	5.02266004	-0.883979587

Suplementaria 6. Estadística del LFP registrado del estriado durante diferentes condiciones

Banda		Control			6-OHDA		
		Potencia Basal	Potencia Post RubiDopa	Pendiente	Potencia Basal	Potencia Post RubiDopa	Pendiente
Total (1-80 Hz)	Raton1	16.53	15.95	-0.58	13.84	11.65	-2.19
	Raton2	15.84	12.92	-2.93	13.98	12.90	-1.08
	Raton3	13.34	12.86	-0.48	14.88	14.27	-0.61
Delta (1-5 Hz)	Raton1	19.30	18.58	-0.72	16.57	14.21	-2.36
	Raton2	18.20	15.46	-2.75	17.03	15.98	-1.05
	Raton3	15.74	15.60	-0.14	17.41	16.98	-0.43
Theta (5-12 Hz)	Raton1	14.51	13.87	-0.63	12.12	10.10	-2.02
	Raton2	10.89	10.20	-0.69	11.12	10.67	-0.45
	Raton3	12.57	11.76	-0.81	13.02	12.13	-0.89
Beta (12-30 Hz)	Raton1	11.04	10.93	-0.11	8.04	6.70	-1.34
	Raton2	8.82	8.10	-0.72	9.17	8.00	-1.17
	Raton3	7.61	6.17	-1.44	9.56	9.83	0.27
Gamma (30-80 Hz)	Raton1	8.68	8.54	-0.14	4.90	4.44	-0.47
	Raton2	6.52	6.15	-0.37	7.17	5.87	-1.30
	Raton3	6.09	4.17	-1.92	8.30	7.66	-0.63

Grupo	Total	Delta	Theta	Beta	Gamma
Control	0.239	0.268	0.006	0.188	0.283
6-OHDA	0.109	0.154	0.140	0.282	0.089

Suplementaria 7. Cambios en la potencia del espectro provocados por la estimulación con RubiDopa. Valores de potencia registrados por el análisis de espectro realizado con transformada de Wavelets (time-averaged Wavelet Spectrum) y su pendiente de cambio provocados por la estimulación con RubiDopa (tabla superior). Valores de P estadísticos de las pendientes de cambio provocadas por la estimulación con RubiDopa (tabla inferior). P estadístico por prueba t-test.

Agradecimientos

Esta tesis no habría sido posible sin el apoyo del Conacyt (CONACyT CF6653, CONACyT CF154039) y del programa PAPIIT (IA201819, IA201421).

Al programa de maestría en ciencias (Neurobiología), a la doctora Maricela Luna Muñoz, a la doctora Nuri Aranda López, quienes coordinan la maestría y apoyan a todos los alumnos, incluyéndome a mi

A mi tutor, el Dr. Luis Carrillo Reid, quien además de permitirme trabajar en su laboratorio, siempre estuvo coordinando el trabajo para desarrollar esta tesis

A mis cotutores, quienes siempre mostraron disponibilidad en apoyarme y además aportaron críticas constructivas a la tesis:

- Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco
- Dr. Elías Manjarrez López

A mis revisores por aportar críticas y observaciones a la tesis:

- Dra. Ana Leonor Rivera López
- Dr. Luis Alberto Téllez Lima
- Dr. José Fernando Peña Ortega

Al personal del bioterio quienes aportaron su tiempo para proporcionarme a los sujetos de estudio:

- Dra. Alejandra Castilla León
- Dra. María A. Carbajo Mata
- MVZ. José Martín García Servín

A la Dra. Deisy Gasca Martínez encargada de la Unidad de Análisis Conductual, quien me asesoró en el análisis de campo abierto

A mis compañeros de laboratorio

A mi familia, quienes siempre me apoyan ciegamente en todo lo que hago.

A Adriana