

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTRIATAL BILATERAL EN UN MODELO MURINO DE HEMIPARKINSONISMO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

SAGAT SAMAEL VILLAFRANCA MARTÍNEZ

ASESOR: Dr. JOSÉ BARGAS DÍAZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2025



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Vniver4dad Nacional AvFn9Ma de Mexico UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN SECRETARIA GENERAL DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



CUAUTITLAN

PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: Caracterización de la actividad estriatal bilateral en un modelo murino de hemiparkinsonismo

_, que presenté para obtener el

título/grado de: <u>Licenciado en Bioquímica Diagnóstica</u>, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Sagat Samael Atlafranca Martínez 421036684

Nombre y número de cuenta del egresado(a)



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN SECRETARÍA GENERAL DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

VNIVERADAD NACIONAL AVIMMA DE MEXICO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN PRESENTE



DE TITULACIÓN de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo Tesis y Examen Profesional**

Caracterización de la actividad estriatal bilateral en un modelo murino de hemiparkinsonismo.

Que presenta el pasante: Sagat Samael Villafranca Martínez Con número de cuenta: <u>421036684</u> para obtener el título de: <u>Licenciado en Bioquímica Diagnóstica.</u>

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU" Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de marzo de 2025.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

NOMBRE

FIRMA

PRESIDENTE Dra. María Esther Revuelta Miranda VOCAL Dr. José Bargas Díaz **SECRETARIO** M. en D. María Verónica Vázquez Cianca **1er. SUPLENTE** Dr. Diego Lezama Martínez **2do. SUPLENTE** Dra. Diana Ramírez Hernández

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme educación y cultura, por ser un espacio abierto comprometido a brindar una educación de calidad.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi alma mater. Por cada uno de los profesores que integran al personal académico, por su disposición a ayudar y formar profesionistas.

Al Dr. José Bargas Díaz por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su compromiso y dedicación a la docencia, por compartir su conocimiento en diversas disciplinas y por su asesoría continua para la realización de este trabajo.

A la Dra. Montserrat Padilla Orozco por su asesoría experimental y académica, por ser parte fundamental de mi formación profesional.

A la cDra. Alejandra Fuentes Serrano por su dedicación y compromiso a la ciencia, por su apoyo y continua retroalimentación.

Al Fis. Juan Antonio Laville C., técnico académico, por su apoyo en la elaboración de los proyectos realizados dentro del laboratorio y disposición a siempre ayudar.

A los miembros del laboratorio BL-101 y BL-103, Martín García, Aidán Ortega, Yohana Parrado, Héctor Vázquez y Maricela Saucedo, por su apoyo en mi desarrollo académico dentro del laboratorio.

A la Dra. Claudia V. Rivera y a todo el personal encargado del cuidado, mantenimiento y manejo de los animales en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

Agradezco a mi jurado, por la asesoría y disposición en la revisión de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En profundo agradecimiento a mi madre, por ser la principal promotora de mis sueños, por su apoyo y sacrificio, por su guía y ejemplo, por su cariño y atenciones. Con respeto y admiración.

A mi padre, por su dedicación, sus enseñanzas y consejos que serán mi guía en mi futuro desarrollo como persona y profesionista, por los valores que me compartió.

A mis hermanos por su cariño incondicional, por acompañarme en cada etapa de mi vida, por las risas y las peleas que atesoraré.

Al Dr. Bargas por compartir su experiencia y emoción por la ciencia, por confiar en mi para trabajar en su laboratorio, por la oportunidad y su ayuda en este camino tan emocionante para mí.

A la Dra. Montserrat Padilla por su paciencia y tiempo, por sus atenciones, consejos, por apoyarme e introducirme a la investigación, por transmitir su entusiasmo y la energía inmersa en sus palabras de aliento. Te agradezco bastante.

A la cDra. Alejandra Fuentes por su continua retroalimentación, disposición a ayudar y paciencia, por sus consejos, por su trabajo duro y entusiasmo.

A la Dra. Maritere Domínguez Rojas por su apoyo académico, asesoría y dedicación a la docencia, por preocuparse por el desarrollo de sus alumnos e impulsarme a seguir mis objetivos.

A mis amigos de la universidad Sebastián, Mauricio, Dansof, Luisa, Tafolla, Edgar, Abril, Mafer, Fernanda, Nava, Fernando, Alan, a todos ustedes por el apoyo durante la carrera, por los consejos, las noches de desvelo y por las fiestas, me llevo una parte de ustedes.

A Frida, Raiza, Amakally, Ailyn, Gali, Gabriel, Wendy, Edwin por estar en los momentos felices y complicados, brindándome su apoyo y siendo parte de mi vida.

Alessandra Franco y Francisco Zamora, gracias por ser parte de mi familia.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8 0
GLOSARIO	1
INTRODUCCIÓN	3
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1 Breve introducción anatómica1	5
1.2 Los ganglios basales1	6
1.3 Neuronas Estriatales de Proyección (SPNs) 2	20
1.4 Interneuronas estriatales 2	21
1.5 Enfermedad de Parkinson 2	21
1.5.1 Descripción y características2	21
1.5.2 Diagnóstico2	22
1.5.3 Etiología2	23
1.6 Modelos animales de la enfermedad de Parkinson	23
1.7 Imagenología de calcio 2	25
1.7.1 Importancia del calcio en las neuronas2	25
1.7.2 Imagenología de calcio como técnica experimental2	26
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. OBJETIVOS	28
3.1 General 2	28
3.2 Específicos 2	<u>29</u>
4. HIPÓTESIS	<u>29</u>
5. METODOLOGÍA	<u>29</u>
5.1 Obtención de ratones y grupos experimentales	31
5.2 Privación de dopamina y evaluación del modelo de hemiparkinsonismo 3	32
5.3 Infección viral	32

	5.4 Obtención de cortes cerebrales	33		
	5.5 Registro de la actividad espontánea estriatal	33		
	5.6 Análisis de los videos de imagenología de calcio	34		
	5.7 Análisis estadístico de los datos	38		
6.	RESULTADOS	39		
7. DISCUSIÓN				
8.	B. CONCLUSIÓN			
9.	REFERENCIAS	50		

ABREVIATURAS

SC

MLR

Colículo superior

Región locomotora mesencefálica

Abreviatura	Español	Inglés
GB	Ganglios basales	Basal ganglia
EP	Enfermedad de Parkinson	Parkinson´s disease
SNc	Sustancia nigra pars compacta	Substancia nigra pars compacta
DA	Dopamina	Dopamine
6-OHDA	6-hidroxidopamina	6-hydroxyidopamine
GPe	Globo pálido externo	Globus Pallidus Externus
STN	Núcleo subtalámico	Subthalamic nucleus
GPi	Globo pálido interno	Globus Pallidus Internus
SNr	Sustancia nigra pars reticulata	Substancia nigra pars reticulata
SPNs	Neuronas estriatales de proyección	Striatal Projection Neurons
dSPNs	Neuronas estriatales de proyección de la	Direct striatal projection neurons
	vía directa	
iSPNs	Neuronas estriatales de	Indirect striatal projection
	proyección de la vía indirecta	neurons
D ₁ R	Receptor de dopamina clase 1	Dopamine D1-class receptor
D ₂ R	Receptor de dopamina clase 2	Dopamine D2-class receptor
GABA	Ácido γ-aminobutírico	Gamma aminobutyric acid
AC	Adenilato ciclasa	Adenylate cyclase
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico	Cyclic Adenosine Monophosphate
PKA	Proteína Cinasa A	Protein kinase A
PLC	Fosfolipasa C	Phospholipase C
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato	Inositol 1,4,5-triphosphate
CaCaM	Calcio Calmodulina	Calcium Calmodulin
PP2B	Proteína Fosfatasa 2B	Protein phosphatase 2B
REM	Movimiento Ocular Rápido	Rapid Eye Movement
VTA	Área tegmental ventral	Ventral Tegmental Area

- Ventral Tegmental Area
- Superior colliculus
- Mesencephalic locomotor región

Núcleo pedunculopontino	Pedunculopontine nucleus
Interneuronas de umbral de disparo bajo	Low-threshold spike Interneurons
Interneuronas de disparo rápido	Fast spiking interneurons
Interneuronas colinérgicas	Cholinergic interneurons
Acetilcolina	Acetylcholine
Neuronas tónicamente activas	Tonically active neurons
1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-
	tetrahydropyridine
Alfa-Sinucleína	Synuclein Alpha
Cinasa 2 con repeticiones ricas en	Leucine-rich repeat kinase 2
leucina	
Desglicasa	Desglycase
Cinasa inducida por PTEN	PTEN inuced kinase 1
Parkina	Parkin
Factor A de transcripción mitocondrial	Transcription Factor A
	mitochondrial
Calmodulina	Calmodulin
Especies reactivas de oxígeno	Reactive oxygen species
Receptores nicotínicos de acetilcolina	Nicotinic Acetylcholine Receptors
Canales de potencial transitorio del	Transient receptor potential
receptor tipo C	canonical
Indicadores de calcio codificados	Genetically Encoded Calcium
genéticamente	Indicators
Proteína verde fluorescente	Green Fluorescent Protein
Virus Adeno-Asociado	Adeno-associated viruses
Repetidos Terminales Invertidos	Inverted Terminal Repeats
Regiones de interés	Regions of interest
Función de distribución acumulada	Cumulative distribution function
Fascículo Prosencefálico Medial	Medial Forebrain Bundle
	Núcleo pedunculopontinoInterneuronas de umbral de disparo bajoInterneuronas colinérgicasAcetilcolinaNeuronas tónicamente activas1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinaAlfa-SinucleínaCinasa 2 con repeticiones ricas enleucinaDesglicasaCinasa inducida por PTENParkinaFactor A de transcripción mitocondrialCalmodulinaEspecies reactivas de oxígenoReceptores nicotínicos de acetilcolinaCanales de potencial transitorio delreceptor tipo CIndicadores de calcio codificadosgenéticamenteProteína verde fluorescenteVirus Adeno-AsociadoRegiones de interésFunción de distribución acumuladaFascículo Prosencefálico Medial

RESUMEN

El modelo murino de hemiparkinsonismo inducido por la inyección de 6hidroxidopamina es una herramienta ampliamente utilizada para estudiar diversos aspectos de la enfermedad de Parkinson. Este modelo produce una depleción dopaminérgica unilateral que se traduce en giros ipsilaterales al sitio de la lesión, utilizados comúnmente para evaluar la eficacia del modelo. Sin embargo, la actividad estriatal subyacente a esta conducta no ha sido completamente caracterizada, ya que la mayoría de los estudios se han centrado en el hemisferio lesionado, resultando en una escasa investigación de la actividad estriatal en el hemisferio no afectado por la depleción dopaminérgica (Yu, et al., 2022).

Aunque se han reportado cambios en la concentración y liberación de neurotransmisores, así como en la actividad de enzimas relacionadas con su biosíntesis, no se ha determinado si estas modificaciones alteran la actividad neuronal en el hemisferio contralateral a la lesión. Algunos otros trabajos han explorado la actividad estriatal en dicho hemisferio y su influencia en la conducta, pero generalmente bajo distintas configuraciones experimentales *(in vivo)* y, en muchos casos, en presencia de intervenciones farmacológicas que pueden sesgar los resultados (Molochnikov, et al., 2014),

Con el fin de minimizar la influencia de variables externas y caracterizar la actividad basal de manera más precisa, en esta tesis se analiza la actividad espontánea de las neuronas estriatales en tejido *in vitro*, sin intervenciones experimentales adicionales, tanto en el hemisferio lesionado como en el no lesionado. Para este propósito, se utilizó la técnica de imagenología de calcio con el indicador fluorescente GCaMP6f en cortes cerebrales de ratones intactos (control) y modelos hemiparkinsonianos. Este enfoque permitió monitorear indirectamente la actividad de decenas de neuronas estriatales de manera simultánea y con resolución de célula única. Los resultados revelaron que la lesión unilateral produce un aumento significativo en la actividad espontánea del núcleo estriado en el hemisferio lesionado, mientras que la actividad neuronal del hemisferio no lesionado se mantiene similar a la observada en los hemisferios de ratones control.

GLOSARIO

- Receptor de transmisores: proteínas que reciben un ligando y señaliza cambios químicos y/o físicos en las células.
- Receptores ionotrópicos: grupo de canales iónicos transmembranales que se abren o cierran en respuesta a la unión de un mensajero químico dejando pasar carga eléctrica.
- Receptores metabotrópicos: subtipo de receptores de membrana que no forman un poro de canal iónico, sino que utilizan mecanismos de transducción de señales, para activar una serie de eventos intracelulares utilizando productos químicos como segundos mensajeros.
- *Neurotransmisor:* mensajeros químicos del cerebro que pueden enviar señales excitadoras, inhibidoras o moduladoras en las neuronas.
- Neuromodulador: sustancia química liberada por neuronas modifica los efectos de otros neurotransmisores, la excitabilidad o el metabolismo.
- Plasticidad: capacidad del sistema nervioso para modificar su estado, creando estructuras y conexiones neuronales, en función de las condiciones del medio.
- Síndrome parkinsoniano: se refiere a presentar los síntomas de la enfermedad de Parkinson.
- *Discinesias:* movimientos involuntarios, erráticos y anormales que pueden afectar a las extremidades, el tronco o la mandíbula.
- Distonía: contracciones musculares involuntarias, sostenidas o intermitentes, que causan movimientos de torsión repetidos y/o posturas anómalas que se producen por la contracción muscular simultánea de músculos.
- *Disfunción autonómica:* condición que ocurre cuando el sistema nervioso autónomo no funciona apropiadamente.
- Cirugía estereotáxica: técnica quirúrgica tridimensional que permite localizar exactamente estructuras dentro del cerebro.

- *Bregma:* punto anatómico en el cráneo humano donde convergen la sutura coronal y sagital.
- Lambda: punto anatómico situado en la intersección de la sutura sagital y la sutura lambdoidea en el cráneo.
- Anosmia: pérdida total del sentido del olfato.
- *Potencial de membrana:* diferencia de potencial eléctrico que existe entre ambos lados de la membrana celular.
- *Potencial de acción:* señal eléctrica que viaja a lo largo del axón y transporta información de una neurona a otra.
- Neurona postsináptica: neurona que recibe señales excitadoras, inhibidoras o moduladoras modificando su excitabilidad.
- Neurona presináptica: célula nerviosa que envía señales a la neurona postsináptica a través de la sinapsis.
- *Depleción:* pérdida o disminución.
- *Frames:* imagen concreta dentro de una sucesión de imágenes en movimiento.
- *Microcircuito:* conjunto de conexiones e interacciones entre un grupo determinado de neuronas.
- Vector viral: virus modificado que se utiliza para introducir material genético exógeno especifico en el núcleo de una célula.
- *Deterioro cognitivo:* disminución de las capacidades intelectuales que puede afectar la memoria, el lenguaje, la atención y el razonamiento.
- Neuronas aferentes: neurona que transmite información desde un sitio a otro del sistema nervioso central.
- Agonista: fármaco o sustancia que se une a un receptor en el interior o superficie de una célula y produce la misma respuesta que la sustancia endógena que normalmente se une a dicho receptor.

INTRODUCCIÓN

Los ganglios basales son un grupo de núcleos localizados en el encéfalo debajo de la corteza y separados por el cuerpo calloso (Waldvogel, et al., 2015). Tienen múltiples funciones asociadas con la recompensa, la cognición, el control motor, el aprendizaje de procedimientos, la formación de hábitos y la toma de decisiones. Implementan mecanismos de control para el inicio de movimientos facilitando los movimientos voluntarios filtrando movimientos no deseados. El funcionamiento anormal de los GB genera trastornos motores conocidos genéricamente como "Desordenes del Movimiento" (*Movement Disorders*, en inglés) que constituyen toda una rama de la neurología. El ejemplo más conspicuo y común de estos es la enfermedad de Parkinson (Young, et al., 2023)

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad crónica neurodegenerativa más frecuente, se caracteriza por la presencia de síntomas tanto motores como no motores y, aunque es más común en personas mayores, también puede manifestarse en adultos jóvenes. La causa de la enfermedad es desconocida, pero se ha relacionado con varios factores como la edad, la exposición a toxinas, factores genéticos y trastornos de la microbiota (Beitz, 2014; Young, et al., 2023). Estos factores serían la causa de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNc), del tegmento ventral y otras. Lo que lleva a una disminución en la biosíntesis de dopamina (DA). Este neurotransmisor actúa como un modulador del sistema motor mediante la regulación de la excitabilidad neuronal en los GB, particularmente en el estriado, así como otras estructuras cerebrales, facilitando la selección y realización de secuencias de movimientos (Tritsch, et al., 2012).

Para investigar diversos aspectos de la enfermedad, su patogénesis y sus mecanismos fisiopatológicos, así como el diseño de nuevas terapias, se han desarrollado múltiples modelos animales basados en el uso de neurotoxinas y técnicas de manipulación genética. Entre los modelos inducidos por neurotoxinas, el más utilizado para lesionar la vía nigroestriatal es el modelo de la 6-

13

hidroxidopamina (6-OHDA), molécula que produce la pérdida aguda de neuronas dopaminérgicas (Blandini, et al., 2008). La implementación de diversas técnicas experimentales ha sido fundamental para investigar la fisiopatología. Entre estas se encuentra la imagenología de calcio, que permite estudiar la actividad neuronal al detectar en tiempo real los cambios en las concentraciones de calcio intracelular (Ca²⁺) que se generan por los disparos neuronales de potenciales de acción. Esta técnica permite monitorear la actividad de múltiples neuronas con resolución de nivel celular (Grienberger, et al., 2012). En este contexto, la imagenología de calcio hace posible comparar la actividad neuronal en microcircuitos en condiciones control contra aquellos privados de DA, proporcionando información valiosa sobre las alteraciones producidas por la depleción dopaminérgica (Pérez-Ortega, et al. 2016).

Los numerosos estudios que han utilizado el modelo murino de hemiparkinsonismo usando imagenología de calcio, se han concentrado en registrar la actividad del estriado del hemisferio lesionado, sin abordar qué pasa con el hemisferio opuesto a la lesión. Los trabajos que sí lo han examinado, efectúan pruebas *in vivo*, mientras el animal se mueve, lo que hace pensar que la actividad observada en el hemisferio no depletado de DA se debe al movimiento y no a la patología. Además, distintos autores usan varias intervenciones farmacológicas, por lo que la actividad estriatal basal de este hemisferio *in vitro* no se ha caracterizado; entonces ¿tiene algún nivel de actividad patológica o es idéntico al de un animal no lesionado?

Por todo lo anterior, esta tesis tiene el objetivo de estudiar y comparar la actividad espontánea global del núcleo estriado en el modelo con depleción unilateral de DA y en animales intactos, registrando tejido *in vitro* de ambos hemisferios y en ausencia de intervenciones experimentales adicionales.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Breve introducción anatómica

El sistema nervioso está organizado en dos subdivisiones principales: sistema nervioso central y sistema nervioso periférico.

El sistema nervioso central está formado por el encéfalo y la médula espinal (conectada al encéfalo a través del foramen magno del hueso occipital). Estas estructuras derivan del tubo neuronal ectodérmico, el cual, durante el desarrollo del cerebro, induce la formación de tres regiones conocidas como vesículas encefálicas primarias: el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Tanto el prosencéfalo, como el rombencéfalo se subdividen y forman las vesículas encefálicas secundarias. El prosencéfalo se diferencia en telencéfalo y diencéfalo, y el rombencéfalo lo hace en metencéfalo y mielencéfalo (Tortora, et al., 2006).

El cerebro consta de sustancia gris externa (corteza cerebral) y masa interna de sustancia blanca (axones mielinizados; Nova, et al., 2023). La corteza cerebral mide de 2 a 4 mm de espesor, se organiza en diferentes áreas funcionales que procesan estímulos y son responsables de funciones sensitivas, motoras y cognitivas superiores. Sus neuronas reciben información de varias estructuras subcorticales, entre ellas el tálamo (Nova, et al., 2023). La corteza contiene pliegues que se denominan giros o circunvoluciones, entre estos existen grietas más profundas llamadas fisuras. La fisura longitudinal divide al cerebro en dos partes denominadas hemisferios cerebrales, estos se conectan internamente por el cuerpo calloso. Cada hemisferio se subdivide en lóbulos, que se denominan según los huesos que los cubren: frontal, parietal, temporal y occipital (Tortora, et al., 2006). Los dos hemisferios del cerebro realizan cálculos complementarios y hacen contribuciones únicas para realizar una tarea (Grimshaw, 1998).

Otra estructura de relevancia es el tálamo, el cual mide alrededor de 3 cm de largo, está ubicado en el centro del cerebro y representa el 80% del diencéfalo (Tortora, et al., 2006), está formado por dos estructuras simétricas, cada mitad tiene forma

alargada en el eje anteroposterior, lo cual le da su apariencia ovoidea (Torres, 2023). El tálamo contribuye a las funciones motoras al transmitir información desde el cerebelo y los ganglios basales hasta el área motora primaria de la corteza cerebral (Tortora, et al., 2006; Shepherd, 2004).

1.2 Los ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son un conjunto de núcleos subcorticales interconectados (Young, et al., 2023) que están conformados por el núcleo estriado (putamen, núcleo caudado y núcleo accumbens) reconocido como el núcleo de entrada principal a los GB, los llamados núcleos de relevo: el globo pálido externo (GPe) y el núcleo subtalámico (STN), y los núcleos de salida: el globo pálido interno (GPi) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Además, se cuenta entre ellos también el núcleo modulador dopaminérgico: la sustancia nigra pars compacta (SNc; Simonyan, 2019). Estos núcleos se ven involucrados principalmente en la selección e implementación de movimientos voluntarios en respuesta a estímulos internos y externos, inhibiendo simultáneamente los movimientos antagónicos, competitivos o de interferencia. Además de su función motora, los GB están implicados en una amplia variedad de procesos no motores, incluyendo la regulación de las emociones, el lenguaje, la toma de decisiones, el aprendizaje, la memoria procedimental y la interpretación de la información sensorial (Simonyan, 2019; Young, et al., 2023; Calabresi, et al., 2014; Shepherd, 2004).

El núcleo estriado y el globo pálido se localizan en el telencéfalo, mientras que el núcleo subtalámico en el tálamo ventral (diencéfalo). Por otra parte, tanto la SNc y la SNr se encuentran en el mesencéfalo (Purves, et al., 2001; Shepherd, 2004).

Su organización estructural básica fue descrita por Nauta y Mehler en 1966, quienes, usando una tinción de impregnación de plata observaron la degeneración de axones después de lesionar, identificando así vías separadas que tenían su origen en el estriado y enviaban proyecciones a segmentos del GPe y el GPi, así como proyecciones que iban del GPi y de la SNr al tálamo y a las áreas motoras del mesencéfalo (Gerfen, 2023). A finales de la década de 1980 se propuso el modelo clásico de los GB, que reconoció a las dos vías descritas por Nauta y Mehler, como la vía directa y la vía indirecta. Además, este modelo estableció que las vías eran antagónicas: mientras la vía directa favorece el movimiento, la indirecta lo inhibe (Albin et al., 1989; Gerfen, 1992; Simonyan, 2019).

Se considera que el estriado es el principal núcleo de entrada a los GB porque recibe abundantes entradas excitatorias provenientes de la corteza cerebral y del tálamo. Está conformado principalmente por neuronas de proyección que poseen abundantes espinas dendríticas, que es dónde reciben la mayoría de sus sinapsis (SPNs; "Striatal Projection Neurons"; por sus siglas en inglés). Estas constituyen el 90% de sus neuronas y se dividen en dos grupos: las dSPNs y las iSPNs. Las dSPNs expresan el receptor de DA de clase 1 (D₁R) y proyectan monosinápticamente a los núcleos de salida de los GB (GPi/SNr), formando parte de la vía directa del modelo de Albin et al. (1989). Estas neuronas usan como transmisor al GABA y son inhibidoras, esto es disminuyen el disparo de las neuronas de GPi/SNr, que también son inhibidoras (Gerfen, 1992) y su blanco son los circuitos tálamo-corticales y los núcleos del tallo cerebral como el PPN. Al haber dos neuronas inhibidoras en serie, el papel de las dSPNs es desinhibir a los circuitos tálamo-corticales encargados del movimiento. Es por lo que las dSPNs promueven el movimiento (Figura 1).

Por su parte, las iSPNs expresan el receptor de DA de clase 2 (D₂R) y envían proyecciones al GPe. Estas neuronas también usan como transmisor al GABA y son inhibidoras. Después de hacer sinapsis con las neuronas del GPe, también inhibidoras, estas establecen conexiones con el STN y con los núcleos de salida (GPi/SNr). Las neuronas del STN usan como neurotransmisor al glutamato y son excitadoras: tienen como blanco a GPi/SNr, lo que aumenta el disparo de sus neuronas y por tanto la inhibición de estos núcleos sobre los circuitos tálamo-corticales encargados del movimiento. Por lo que las iSPNs reprimen el movimiento. Debido al mayor número de relevos sinápticos entre el estriado y GPi/SNr a esta vía se le conoce como indirecta (Gerfen, 1992; Figura 1). Se supone que, actuando en

17

conjunto, las dSPNs promueven los movimientos deseados o necesarios mientras que las iSPNs restringen los movimientos antagónicos o no deseados, lo que es fundamental para el control motor.

El mismo esquema se repite con las proyecciones de dSPNs e iSPNs al tallo cerebral: MLR/PPN, núcleos encargados de los circuitos de la locomoción y la postura (Gerfen, 2023).

Sin embargo, el GPe también manda proyecciones inhibidoras a GPi/SNr. Por lo que el balance entre excitación e inhibición de los núcleos de salida es más complejo.

En suma, todas las SPNs son GABAérgicas, y sólo el 5% de estas poseen ambos tipos de receptores dopaminérgicos (D₁R y D₂R; He, et al., 2021; Simonyan, 2019; Matamales et al., 2009).

La actividad de los GB es regulada por múltiples neuromoduladores, cuyos receptores (usualmente acoplados a proteínas G) inician la señalización a través de segundos mensajeros que afectan la transmisión sináptica. Uno de los más importante es la DA, cuya síntesis se ve afectada en trastornos como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia y la adicción.

La DA actúa como un modulador de la excitabilidad de las neuronas en el estriado que participan en la selección de los movimientos. Incrementa la actividad de las dSPNs a través de los D1R que activan proteínas G_{s/olf} y la vía de AC/AMPc/PKA (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 1997) mientras disminuye la actividad de las iSPNs a través de los receptores D2R acoplados a una proteína G_{i/o} y la vía de la PLC/IP₃/CaCaM/PP2B (Hernández-López et al., 2000). Esto es, el control motor depende de cuáles movimientos pasan y cuáles se suprimen es controlado por la DA a través de la activación y la restricción del disparo de las dSPNs y las iSPNs, respectivamente.

A nivel presináptico, la DA actúa disminuyendo la liberación de GABA en los blancos de las SPNs de ambas vías a través de los mismos receptores (Guzmán et al., 2003; Tecuapetla et al., 2007). También actúa sobre otras terminales, por ejemplo, de glutamato desde las terminales de las proyecciones corticales y talámicas (Flores-Hernández et al., 1997; Tritsch, et al., 2012).

La inervación dopaminérgica del estriado dorsal o sensoriomotor surge principalmente de la vía nigroestriatal proveniente de la SNc, mientras que la del estriado ventral surge de las células del área tegmental ventral (VTA; "Ventral Tegmental Area"; por sus siglas en inglés) (Yin, 2024).





contrario, la activación de las iSPNs inhibe las neuronas GABAérgicas del GPe que proyectan hacia el STN, provocando la desinhibición de sus neuronas glutamatérgicas, las cuales proyectan a los núcleos de salida GPi y SNr. La estimulación de estos núcleos GABAérgicos provoca la inhibición de las neuronas glutamatérgicas de los circuitos tálamo-corticales y así, la represión de los movimientos no deseados. Se representa la inervación dopaminérgica al estriado por la SNc. Adaptado de Gerfen, 2023.

1.3 Neuronas Estriatales de Proyección (SPNs)

Las SPNs tienen somas que miden entre 12 y 20 µm de diámetro, se caracterizan por tener alrededor de 6 troncos dendríticos principales que se ramifican en dendritas secundarias y terciarias alcanzando longitudes totales de 250 µm. Estas dendritas tienen miles de espinas dendríticas, que son los sitios en los que se establecen las sinapsis provenientes de corteza y tálamo. Pero las SPNs tienen colaterales axónicas entre ellas que mantienen disparos esporádicos a frecuencias de entre 1 a 2 Hz *in vivo, a* pesar de las entradas excitatorias masivas (Kita et al., 1988; Shepherd, 2004).

En animales con libre movimiento, las SPNs muestran rápidas fluctuaciones en el potencial de membrana (Mahon et al., 2006; Kimura, 1990; Schultz, et al., 2003). que cambia entre dos estados: un potencial hiperpolarizado llamado "down state" (alrededor de -80 a -70 mV) y un estado despolarizado llamado "up state" (-60 a -40 mV) durante el cual puede haber trenes de potenciales de acción (Hernández-López, et al., 1997; Wilson, et al., 1981; Wilson et al., 1996; Vergara-Aragón, et al., 2003). El "down state" se debe principalmente a conductancias de potasio, por ejemplo: Kir2, además de la corriente de fuga, lo que mantiene el potencial de membrana cerca del potencial de equilibrio del ion potasio (alrededor de -90 mV; Jiang et al., 1991; Kita et al., 1984). Este estado se ha observado en experimentos *in vitro* (Vergara-Aragón et al., 2003). Debido a la inhibición entre ellas, las conductancias de potasio y que cada entrada excitatoria deja de una a dos sinapsis en cada SPN (sinapsis *en passant*), se necesita de varias neuronas aferentes para superar el umbral de disparo (Yin, 2024). Pero si hay varias neuronas aferentes.

1.4 Interneuronas estriatales

El 10% de la población neuronal estriatal no son SPNs, sino que son interneuronas que reciben entradas glutamatérgicas de corteza y tálamo, conformando módulos o circuitos locales entre ellas y con las SPNs (Kawaguchi, et al., 1995; Tecuapetla, et al., 2010). Las principales interneuronas son: a) las de disparo de bajo umbral (LTSIs; "low-threshold spike interneurons", por sus siglas en inglés) que inervan principalmente el árbol dendrítico de las SPNs controlando así las entradas excitadoras que reciben (Straub, et al., 2016), b) las interneuronas de disparo rápido (FSIs; "fast spiking interneurons"; por sus siglas en inglés) que inervan principalmente la región perisomática de las SPNs modulando la producción de potenciales de acción (Straub, et al., 2016), c) y las interneuronas colinérgicas (CINs; "cholinergic interneurons"; por sus siglas en inglés) que son principalmente moduladores de las SPNs junto con la DA, pues la acetilcolina que liberan actúa a través de receptores muscarínicos acoplados a proteínas G (Pérez-Roselló et al., 2005; Pérez-Burgos et al., 2008; Carrillo-Reid et al., 2009; Pérez-Ramírez et al., 2015). Estas son las interneuronas principales y más abundantes, hay otras clases, y todas tienen diferentes modos de disparo, marcadores moleculares y propiedades de membrana (Yin, 2024).

1.5 Enfermedad de Parkinson

1.5.1 Descripción y características

La Enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson en su trabajo "Un ensayo sobre la parálisis temblorosa", en el cual la describe como una enfermedad neurológica que presenta temblor en reposo y una peculiar discapacidad motora progresiva (Samii, 2004).

El trastorno afecta del 1-2 % de la población mayor de 60 años, porcentaje que aumenta con la edad. En México la incidencia es de 50 casos nuevos por cada 100,000 habitantes (INAPAM, 2019; Secretaría de Salud, 2024). Es una enfermedad neurodegenerativa progresiva e incapacitante, hasta que el paciente no puede

valerse por sí mismo. Puede asociarse con demencia, depresión y síntomas sensoriales, lo que provoca un gran desgaste del sistema de salud, al igual que presión física, emocional y económica de las familias con pacientes (OMS, 2023). Como la causa inmediata es la privación de DA por la muerte de neuronas en la SNc, el tratamiento es substitutivo administrando L-DOPA, precursor de DA, que es sintetizada por las terminales que le quedan vivas al paciente. La alternativa son los agonistas a los receptores de DA (Lara-González et al., 2019). Sin embargo, el alivio es temporal, primero porque las terminales y neuronas siguen muriendo, segundo, porque la misma L-DOPA produce efectos colaterales en la mayoría de los pacientes como los son las discinesias (Calderón et al., 2022): movimientos anormales involuntarios (abnormal involuntary movements o AIMs por sus siglas en inglés) – se trata de una coreoatetosis con distonía.

Pero la EP esta dentro de una gama amplia de síndromes parkinsonianos y se distingue de estas otras enfermedades por la asimetría de los síntomas al inicio de la enfermedad, así como su respuesta a la medicación dopaminérgica (Bartels et al. 2009; Ropper et al. 2014; Williams, 2013).

1.5.2 Diagnóstico

El diagnóstico clínico se basa principalmente en la identificación de características motoras, como el temblor en reposo asimétrico de progresión lenta, la rigidez y la bradicinesia, signos que se hacen evidentes cuando han muerto cerca del 50-70% de las neuronas dopaminérgicas. Además, se ha reportado la aparición de síntomas no motores que pueden desarrollarse años antes que los déficits motores, como anosmia, estreñimiento, depresión y trastorno del sueño REM (Rapid Eye Movement; por sus siglas en inglés). En las etapas avanzadas de la enfermedad, pueden aparecer otros síntomas no motores, como disfunción autonómica, dolor y deterioro cognitivo (Simon, 2019).

Es importante señalar que, al comienzo de los síntomas motores, la EP suele presentarse con signos unilaterales (que afectan a un solo lado del cuerpo), sugiriendo la afectación predominante de un hemisferio (Agosta, et al., 2019). Sin embargo, a medida que la sintomatología progresa y se agrava, el cerebro muestra una degeneración progresiva en el hemisferio contralateral (Booij et al., 1997; Choe et al., 1998; Wang et al., 2015). De forma que, cuando la EP avanza significativamente, estos signos se extienden hacia ambos lados del cuerpo.

1.5.3 Etiología

En cuanto a la etiología de la EP, numerosos estudios sugieren que su origen es multifactorial. Sin embargo, se ha identificado que los factores de riesgo más significativos son la edad y el sexo, donde los hombres mayores de 60 años son más susceptibles que las mujeres (teniendo una tasa de prevalencia de 3:2). Entre otras posibles causas, se han reportado cerca de 90 loci asociados a riesgo genético, y se ha encontrado que factores ambientales, como la exposición a pesticidas y contaminantes en el agua, junto con hábitos de vida como el consumo de tabaco, café, la práctica de ejercicio, y el estado de la microbiota intestinal pueden impactar significativamente en el desarrollo de la enfermedad (Beitz, 2014; Tolosa et al., 2021).

1.6 Modelos animales de la enfermedad de Parkinson

Con el objetivo de estudiar diferentes aspectos de la EP y desarrollar nuevas terapias, se han generado una amplia variedad de modelos animales usando neurotoxinas y técnicas de manipulación genética. En la generación de modelos neurotóxicos, los compuestos más utilizados son la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la rotenona y el paraquat. Por su parte, los modelos transgénicos han sido resultado de la manipulación de genes como los que expresan la alfa-sinucleína (SNCA), la cinasa 2 con repeticiones ricas en leucina (LRRK2), la cinasa 1 inducida por PTEN (PINK1), la parkina (PRKN), la proteína desglicasa (DJ-1) y el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM, modelo Mitopark; Antony, et al., 2011; Chia et al., 2020).

De entre todos, el modelo inducido por la inyección intracerebral de 6-OHDA, ha sido uno de más utilizados en la investigación debido a que algunos de los signos

motores de la EP en humanos son consistentes con los observados en los modelos animales (Chia et al., 2020). La 6-OHDA, debido a su similitud estructural con la dopamina, tiene una alta afinidad por el transportador del neuromodulador, el cual, transporta la toxina al interior de las neuronas dopaminérgicas. Una vez dentro, la neurotoxina se acumula en el citosol y se oxida generando especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo peróxido de hidrógeno, radicales de superóxido y radicales hidroxilos. Además, la 6-OHDA también se acumula en la mitocondria, donde inhibe la actividad de la cadena transportadora de electrones bloqueando el complejo I.

La administración de 6-OHDA en diferentes regiones del cerebro provoca un patrón distintivo de degeneración neuronal. La inyección directa en el estriado daña los axones terminales seguido por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SNc, mientras que la inyección directa en la SNc o en el MFB ("Medial Forebrain Bundle", por sus siglas en inglés) provoca la destrucción masiva de las neuronas en estos núcleos (Ungerstedt, 1968; Chia et al., 2020; Blandini, et al., 2008).

Los roedores son comúnmente utilizados para generar modelos de estudio debido a su fácil manejo en el laboratorio, la disponibilidad de cepas transgénicas, y la existencia de protocolos bien establecidos. A lo largo de los años, se han desarrollado diversas pruebas conductuales para monitorear el deterioro de la función motora en roedores lesionados unilateralmente con 6-OHDA. Entre las pruebas más utilizadas destacan aquellas que cuantifican el comportamiento rotacional inducido por fármacos como la anfetamina, que provoca giros ipsiversivos (hacia el lado de la lesión), y la apomorfina, que induce giros contraversivos (hacia el lado opuesto de la lesión; Blandini, et al., 2008).

Estas pruebas fueron introducidas alrededor de 1970 por Urban Ungerstedt y Gordon Arbuthnott, quienes incluyeron el diseño de un rotómetro que les facilitó el registro de los giros y les permitió realizar pruebas simultáneas en diferentes ratas. Este dispositivo permitió registrar giros completos (360°) en cualquier dirección durante intervalos de tiempo específicos, además de distinguir entre giros netos y giros parciales (en vueltas/minuto) durante el período de la prueba (Björklund, et al., 2019). La cuantificación de los giros ipsiversivos y contraversivos se ha empleado como una medida para evaluar la eficacia de la depleción dopaminérgica inducida por 6-OHDA en modelos hemiparkinsonianos; sin embargo, los mecanismos que provocan estos giros se comprenden parcialmente.

1.7 Imagenología de calcio.

1.7.1 Importancia del calcio en las neuronas.

El calcio es un mensajero intracelular esencial en las neuronas de los mamíferos. Los iones de calcio generan señales intracelulares que determinan una larga variedad de funciones en cada tipo de células en los organismos biológicos. En el sistema nervioso, la entrada de calcio en las terminaciones presinápticas permite la exocitosis de las vesículas que contienen los neurotransmisores (Shepherd, 2004). En la postsinapsis, un aumento transitorio del nivel de calcio en las espinas dendríticas es esencial para la inducción de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad neuronal (Zucker, 1999).

Las neuronas de los mamíferos expresan múltiples tipos de canales de calcio dependientes de voltaje y de ligandos, que permiten la entrada de estos iones al interior celular (Bean, 2007). La mayoría de las neuronas tienen una concentración intracelular basal de aproximadamente 50-100 nM, que puede aumentar transitoriamente a valores 10 a 100 veces más altos durante la generación de potenciales de acción (Berridge et al., 2000). Además de los canales de calcio activados por estos, la activación de receptores de glutamato ionotrópicos, de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) y de canales de potencial transitorio del receptor tipo C (TRPC) pueden también facilitar la entrada del ion (Fucile, 2004; Higley et al., 2008; Ramsey et al., 2006). En esta tesis nos interesa la entrada de calcio a las SPNs por el disparo de potenciales de acción.

1.7.2 Imagenología de calcio como técnica experimental

La imagenología de calcio es una técnica experimental que nos permite seguir en el tiempo, la actividad eléctrica de decenas de neuronas simultáneamente con resolución de célula única. Se basa en la detección de cambios en la concentración de calcio intracelular usando indicadores fluorescentes afines a este ion (Carrillo-Reid, et al., 2008; Grienberger, 2022).

El progreso de la imagenología de calcio ha involucrado dos procesos paralelos: el desarrollo y mejora continua de los sensores de calcio, y el desarrollo e implementación de la instrumentación adecuada. Los primeros indicadores de calcio usados para monitorear la dinámica del ion al interior de las células fueron fotoproteínas bioluminiscentes de unión a calcio, como la aequorina (Ashley, et al., 1968; Shimomura, et al., 1962). Posteriormente, se desarrollaron indicadores mucho más sensibles y versátiles, resultado de la hibridación de quelantes selectivos a Ca²⁺. Un importante avance por parte del laboratorio de Roger Tsien, fue la introducción de los indicadores de calcio codificados genéticamente y basados en proteínas (GECIs; "Genetically Encoded Calcium Indicators"; por sus siglas en inglés) de los cuales uno de los más utilizados es el indicador proteico GCaMP (Grienberger, et al., 2012)

Este indicador se compone de una proteína verde fluorescente (GFP; "Green Fluorescent Protein"; por sus siglas en inglés) fusionada a la calmodulina (CaM) y a un péptido proveniente de la cinasa de miosina (M13). La presencia de calcio (Ca²⁺) causa un cambio conformacional en el complejo CaM-M13 provocando el aumento de fluorescencia de la GFP (Figura 2; Carter, et al., 2022). El pico de excitación del fluoróforo es a una longitud de onda de 480 nm y su pico de emisión es en 510 nm. Muchas generaciones de indicadores GCaMP obtenidos por mutagénesis han presentado mejoras en su fluorescencia, relación señal-ruido y fotoestabilidad. Sin embargo, en células excitables, monitorear flujos rápidos de Ca²⁺ requiere una resolución de milisegundos y por tanto tasas de disminución y aumento de la fluorescencia de hasta 1000 s⁻¹ (Helassa, et al., 2015). GCaMP6f puede emitir señales fluorescentes congruentes con la aparición de potenciales de acción. La

señal tarda ~50 ms en aparecer cuando se dispara un potencial de acción (time-topeak) y su tiempo de caída (decay time) es de ~140 ms (Akerboom, et al., 2012; Douglas, et al., 2014).

De esta manera, el aumento en la fluorescencia sigue al aumento en las concentraciones de calcio intracelular resultado de los disparos neuronales, haciendo posible visualizar indirectamente la actividad eléctrica de las neuronas.

Existen diferentes formas de lograr la expresión de los GECIs en las células de interés, una de ellas es mediante el uso de vectores virales como el Virus Adeno-Asociado (AAV, por sus siglas en inglés), el cual tiene la ventaja de no ser patógeno a corto plazo y provocar una respuesta inmunitaria escasa. Los vectores AAV recombinantes (rAAV) modernos se generan reemplazando todo el genoma viral entre los repetidos terminales invertidos (ITR, por sus siglas en inglés) con un caset transcripcional aproximadamente menor a 5 kb de longitud (Applied Biological Materials, 2024).



Figura 2. Imagenología de calcio usando GCaMP. (A) Representación esquemática del funcionamiento del indicador proteico GCaMP al unirse al calcio intracelular. (B) Ejemplo de la fluorescencia de GCaMP *in vivo*. Las tres imágenes muestran neuronas del mismo espécimen expresando GCaMP, que muestran diferentes niveles de fluorescencia a través del tiempo relacionado a su actividad neuronal. Adaptado de *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (p. 169; Carter et al., 2022).

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el modelo murino de hemiparkinsonismo inducido por 6-OHDA ha sido ampliamente utilizado para investigar los efectos de la depleción dopaminérgica en la actividad neuronal del núcleo estriado, la mayoría de los estudios se han enfocado en analizar este parámetro en el hemisferio lesionado. Si bien, existen trabajos que exploran esta actividad en el hemisferio opuesto a la lesión, lo hacen en condiciones experimentales in vivo y bajo la influencia de fármacos, factores que pueden sesgar los resultados cuando se trata de describir la actividad basal estriatal. Por otro lado, otros trabajos han reportado cambios en la concentración de neurotransmisores y en la actividad de las enzimas involucradas en su biosíntesis, sugiriendo la presencia de mecanismos compensatorios. Sin embargo, no se ha comprobado si estos mecanismos influyen en la actividad estriatal. Por todas estas razones, se propone analizar y comparar la actividad espontánea del núcleo estriado en ambos hemisferios utilizando tejido in vitro de modelos hemiparkinsonianos y animales intactos. Los modelos in vitro son esenciales para realizar bioensayos de drogas novedosas con potencial uso terapéutico, pues en ellos las concentraciones de las drogas en equilibrio pueden ser controladas abriendo la posibilidad de realizar pruebas de concentraciónrespuesta.

3. OBJETIVOS

3.1 General

3.1.1 Registrar la actividad neuronal global del núcleo estriado mediante imagenología de Ca²⁺ en tejido in vitro sin estimulación, obtenido de los dos hemisferios de ratones intactos y hemiparkinsonianos, con el fin de comparar su actividad y evaluar si existen diferencias significativas.

3.2 Específicos

- 3.2.1 Lesionar unilateralmente, por medio de cirugía estereotáxica la SNc, utilizando la neurotoxina 6-OHDA para generar el modelo murino de hemiparkinsonismo y realizar su validación mediante conducta de giro.
- 3.2.2 Realizar una transfección viral mediante cirugía estereotáxica en ratones C57BL/6J, para lograr la expresión de la proteína indicadora de calcio GCaMP6f bajo el promotor sinapsina.
- 3.2.3 Obtener registros de la actividad espontánea de decenas de neuronas estriatales en ambos hemisferios mediante imagenología de calcio en ratones sanos y hemiparkinsonianos.
- 3.2.4 Comparar mediante pruebas estadísticas la actividad estriatal bilateral en ratones sanos y hemiparkinsonianos.

4. HIPÓTESIS

La actividad neuronal espontánea estriatal del hemisferio no lesionado de un animal hemiparkinsoniano es menor a la del hemisferio lesionado cuando se registran *in vitro*.

5. METODOLOGÍA

Para el diseño experimental se emplearon ratones C57BL/6J, divididos en cuatro grupos experimentales: hemisferio derecho e izquierdo de animales intactos y el hemisferio lesionado y no lesionado de ratones hemiparkinsonianos. Para lograr la depleción dopaminérgica se realizó una cirugía estereotáxica inyectando 6-OHDA en la SNc. La eficacia de la depleción se validó 10 días después con la prueba de

conducta de giro. Posteriormente a todos los grupos se les realizó una transfección viral para lograr la expresión del indicador fluorescente de calcio GCaMP6f en neuronas estriatales. Después de 15 días se obtuvieron los cerebros y se realizaron cortes de 250 µm, a los cuales se les registró la actividad espontánea estriatal mediante imagenología de calcio (Figura 3). Los datos obtenidos fueron analizados, se construyeron gráficos para su interpretación y se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas. El diseño experimental tiene aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (CICUAL-IFC; Protocolo de laboratorio JBD257-25).



Figura 3. Diseño experimental. Ratones hemiparkinsonianos: Se muestra la obtención del modelo murino de hemiparkinsonismo inyectando 6-OHDA en la SNc mediante cirugía estereotáxica.

Después de 10 días se evaluó el grado de depleción dopaminérgica a través de la conducta de giro inyectando subcutáneamente apomorfina, sí los ratones presentaron 100 rotaciones contralaterales o más por hora y ninguna o pocas rotaciones ipsilaterales se les realizó la transfección viral. **Controles & Hemiparkinsonianos:** Se realizó la entrega del vector viral a todos los grupos, en donde el AAV se inyectó en el estriado del hemisferio derecho o izquierdo (dependiendo del grupo experimental y/o de la lesión). Finalmente, se obtuvieron cortes cerebrales y se realizó el registro de la actividad neuronal espontánea mediante imagenología de calcio. Debajo de cada procedimiento se indican los días transcurridos desde el nacimiento del ratón.

5.1 Obtención de ratones y grupos experimentales

Para los experimentos realizados se utilizaron ratones C57BL/6J criados y alojados en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en condiciones de temperatura, humedad y ciclos de luz/oscuridad controlados, suministrando *ad libitum* agua y alimento, siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio contenidas en la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999.

Dichos ratones fueron separados en los siguientes grupos experimentales:

- *Hemisferio derecho animal intacto (HD):* Ratones control usados para registrar la actividad espontánea estriatal del hemisferio derecho.
- *Hemisferio izquierdo animal intacto (HI):* Ratones control usados para registrar la actividad espontánea estriatal del hemisferio izquierdo.
- Hemisferio lesionado de animal hemiparkinsoniano (HL): Ratones a los que se les inyecto 6-OHDA en la SNc del hemisferio derecho y se registró la actividad espontánea estriatal del hemisferio lesionado (derecho).
- Hemisferio no lesionado de animal hemiparkinsoniano (HNL): Ratones a los que se les inyecto 6-OHDA en la SNc del hemisferio derecho y se registró la actividad espontánea estriatal del hemisferio no lesionado (izquierdo).

5.2 Privación de dopamina y evaluación del modelo de hemiparkinsonismo

Se realizó una cirugía estereotáxica a los ratones pertenecientes a los grupos HL y HNL para la obtención del modelo murino hemiparkinsoniano. Dichos ratones fueron anestesiados por vía inhalatoria con isoflurano a una concentración de 2 a 3% en oxígeno. Se inyectaron 0.6 µL 6-OHDA [10 µg/µL] a una tasa de 0.2 µL/minuto en la SNc del hemisferio derecho usando el microinyector automático Nanoject II (Microinjectors, Drummond Scientific Company, Broomall, PA) en las siguientes coordenadas, utilizando Bregma como referencia: -2.6 mm anteroposterior (AP), - 1.5 mm lateromedial (LM) y -4.6 mm ventrodorsal (DV). Después de 10 días, el grado de depleción dopaminérgica se evaluó mediante la conducta de giro. Para esto, se inyectó apomorfina por vía subcutánea (0.5 mg/kg en solución salina con 0.02% ascorbato) y se registraron los giros ipsilaterales (del mismo lado de la lesión) y contralaterales (sentido contrario a la lesión) al sitio de lesión con el software RotaCount 2.0 por 60 minutos. Se consideró como un buen modelo de hemiparkinsonismo a aquellos ratones que presentaron más de 100 rotaciones contralaterales en una hora y ninguna o pocas rotaciones ipsilaterales.

5.3 Infección viral

Se utilizó el virus adenoasociado pAAV.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 (AAV1) #100837 (https://www.addgene.org/100837/) para expresar GCaMP6f bajo el promotor de sinapsina (proteína presente en todas las neuronas). Para la cirugía estereotáxica los ratones de los grupos HD y HL se anestesiaron como se describe previamente y se inyectaron 0.25 µL del vector viral en el estriado del hemisferio derecho en las coordenadas +0.9 mm AP, -1.7 mm LM y -2.8 mm DV con respecto a Bregma. Se llevó a cabo el mismo procedimiento en el estriado del hemisferio izquierdo para los grupos HI y HNL, con las siguientes coordenadas: +0.9 mm AP, +1.7 mm LM y -2.8 mm DV.

5.4 Obtención de cortes cerebrales

Después de 15 días post-operatorios, los ratones infectados se anestesiaron con ketamina-xilacina (85 mg/kg y 15 mg/kg respectivamente), una vez que se corroboró la profundidad anestésica, enseguida se les realizó una perfusión intracardiaca con una solución de sacarosa fría preparada en el laboratorio, cuya composición fue: 234 mM sacarosa, 28 mM NaHCO₃, 7 mM dextrosa, 4.54 mM piruvato, 0.28 mM ácido ascórbico, 2.5 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 1.44 mM NaH₂PO₄ y 0.4 mM CaCl₂ a 4°C (pH=7.4). Posteriormente, el cerebro fue extraído y los hemisferios separados con un corte sagital, al hemisferio izquierdo o derecho (dependiendo del lado infectado) se le realizó un corte parahorizontal con un ángulo de 30° y se obtuvieron cortes de 250 µm usando un vibrátomo (PELCO easiSlicer; Ted Pella, Redding, CA). Los cortes cerebrales obtenidos se mantuvieron en una solución de fluido cerebroespinal artificial, con la siguiente composición: 126 mM NaCl, 15 mM dextrosa, 26 mM NaHCO₃, 0.2 mM de tiourea, 0.2 mM ácido ascórbico, 2.5 mM KCl, 1.3 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2.0 mM CaCl₂, a un pH de 7.4 y una osmolaridad de 300 \pm 5 mOsm/L, de igual manera estos cortes fueron perfundidas con 95% O₂ y 5% CO₂.

5.5 Registro de la actividad espontánea estriatal

Después de 30 minutos de reposo, los cortes cerebrales obtenidos se colocaron en una placa de microscopio equipado con un objetivo de inmersión en agua 20X DIC-IR (Olympus XLUMPLFLN Objective, 1 NA, 2 mm WD; New York) para su observación. La estimulación del fluoróforo se realizó con un láser LED acoplado a filtros de excitación y emisión específicos para los parámetros de GCaMP6f. Las longitudes de onda utilizadas fueron 460-480 nm para la excitación y 495-540 nm para la emisión (Olympus Japan U-MGFPHQ). Los videos de imagenología fueron obtenidos con una cámara CoolSnap K4 (Photometrics Inc, Huntington Beach, CA) controlada con el programa Im-Patch © (Instituto de Fisiología Celular; acceso libre: www.im-patch.com). Se realizaron registros de 2160 cuadros, con una tasa de

adquisición de 6 cuadros por segundo, hasta obtener registros de 6480 cuadros por rebanada. De esta manera la actividad neuronal en cada grupo experimental se infirió a través de la señal de fluorescencia emitida por la proteína GCaMP6f. Finalmente, al término de cada registro se usó una solución de KCI [15 mM] para determinar la viabilidad del tejido, considerando únicamente aquellos cortes cerebrales que tuvieron el 85% de células viables (responsivas).

5.6 Análisis de los videos de imagenología de calcio

El análisis de los registros se inició con el programa ImageJ (National Institutes of Health; acceso libre: https://imagej.nih.gov/ij/index.html), con el que se filtraron los videos para mejorar el contraste (Figura 4A) y así detectar regiones de interés (ROIs), correspondientes a los somas neuronales activos que tuvieron fluctuaciones de fluorescencia (Figura 4B).

Usando el programa Im-Patch©, los transitorios de calcio se calcularon como Δ F/F0, Δ F corresponde a la diferencia Fi-F0, donde Fi es la intensidad de la fluorescencia al interior de los ROIs en cada cuadro y F0, la fluorescencia de fondo, es el área alrededor de los sitios de interés. Posteriormente, se calcula la derivada del transitorio de Ca²⁺, d(Δ F/F0)/dt, respecto al tiempo. La porción positiva de la derivada indica el rápido aumento de la fluorescencia y coincide con la aparición de potenciales de acción generados por pulsos de corriente en registros simultáneos (Padilla-Orozco, et al., 2022). Se tomó como actividad neuronal a los cambios de fluorescencia que superaron un umbral estadístico de 2.5 desviaciones estándar (Figura 4C).

La actividad eléctrica inferida se usó para obtener matrices binarias C x F, donde C representa el número de células activas y F el número de cuadros o *frames* en cada video, en ellas el número 1 indica el momento en el que una neurona en específico disparó potenciales de acción y 0 el momento en el que no disparó (Figura 4D). Con estas matrices binarias se construyeron gráficos tipo ráster donde cada valor 1 fue

reemplazado por un punto y 0 por espacios vacíos. También se construyeron histogramas de coactividad neuronal, para lo que se sumó la actividad de todas las neuronas que exhibieron actividad en un cuadro específico del registro a lo largo del experimento (Figura 4E).



Figura 4. Procesamiento de los registros obtenidos por imagenología de calcio. A) Video de la actividad espontánea estriatal. (I) Ejemplo de un cuadro de registro obtenido con los parámetros de excitación y emisión específicos para GCaMP6f. (II) El mismo cuadro filtrado con el programa Image J. (B) Selección manual de somas neuronales que tuvieron fluctuaciones de fluorescencia en el campo (regiones de interés, ROIs). (C) Registro simultáneo de una interneurona colinérgica del estriado que ilustra el procesamiento de la señal fluorescente (III) Se muestra el disparo espontáneo de la neurona registrado con la técnica extracelular de Patch Clamp cell-attached. (IV) Transitorios de calcio (Δ F/F0). Estos se definieron como el cambio de la fluorescencia de un soma neuronal respecto a la fluorescencia de fondo a lo largo del registro. (V) Derivada en el tiempo del transitorio de calcio [d(Δ F/F0)/dt]. Cuando el valor de la derivada supera las 2.5 desviaciones estándar se considera actividad neuronal. (VI) Acercamiento de una sección del registro. Adaptado de Padilla-Orozco, et al. (2022). (D) Ejemplo de matriz binaria. Las columnas representan las células que exhibieron actividad a lo largo del registro y las filas son los cuadros de registro (E) Gráfico tipo ráster e histograma de coactividad. En las ordenadas se muestra el número de células activas y en las

abscisas el tiempo de registro. Los puntos representan el instante en el que una célula en específico tuvo actividad, la ausencia de estos representa la falta de actividad. El histograma de coactividad se obtuvo sumando la actividad en las filas de las matrices binarias, de esta manera se obtiene el número de células que tuvieron actividad por cada cuadro de registro.

Con el objetivo de cuantificar la actividad neuronal se emplearon dos métricas: la tasa de actividad acumulada y la función de distribución acumulada (CDF). Las cuales fueron calculadas usando scripts creados en el laboratorio con el software MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

El primer paso fue calcular la actividad acumulada, definida como la suma acumulada de la actividad neuronal a lo largo de todo el experimento. Este cálculo se realizó utilizando los histogramas de coactividad, sumando las columnas correspondientes a cada cuadro del registro [Figura 5A(I), B(I)]. Posteriormente, a esta sumatoria se le aplicó un ajuste lineal, cuya pendiente resultante se denominó tasa de actividad acumulada [Figura 5A(I), B(I); Figura 7]. Esta métrica se empleó como indicador de la actividad neuronal neta en cada experimento individual.

Los valores de las tasas de actividad acumulada se representaron mediante gráficos de caja (*boxplots*), lo que permitió observar la distribución de los datos de cada grupo experimental. Estos gráficos muestran las medianas, los rangos intercuartílicos (Q1-Q3) y posibles valores atípicos (outliers), proporcionando una herramienta útil para comparar la distribución de actividad neuronal entre grupos. La comparación de las medianas y la dispersión dentro de cada grupo permitió identificar posibles diferencias significativas en la actividad acumulada entre los grupos experimentales (Figura 5C). Dichas diferencias se corroboraron más adelante mediante análisis estadísticos.

Adicionalmente, se calcularon los promedios y los errores estándar de la media de la actividad acumulada de los experimentos que integran cada grupo experimental [Figura 5A(II), B(II)]. Estas mediciones complementaron la visualización gráfica, mostrando que, a pesar de la dispersión de los datos, los valores de los distintos grupos experimentales se separan de manera clara (Figura 8). Lo que refuerza la hipótesis de que existen diferencias significativas entre ellos.



Figura 5. Cuantificación y representación de la actividad neuronal. A partir del histograma de coactividad se obtuvo la suma acumulada de los cuadros del registro para cada uno de los experimentos dentro de una misma condición [A(I); B(I)]. El resultado obtenido de esta acumulación de actividad se muestra para cada uno de los experimentos del grupo "hemisferio izquierdo animal intacto (HI)" representados por líneas rojas opacas [A(II)] y con líneas azules opacas los experimentos del "hemisferio lesionado animal hemiparkinsoniano (HL)" [B(II)]. Posteriormente para ambos grupos se ajustó una recta a cada una de estas líneas, cuya pendiente indicó la tasa de acumulación de la actividad neuronal. Para las dos condiciones el promedio de la actividad de los experimentos está representado por la línea de color verde oscuro y el área sombreada indica el

error estándar de la media. **(C)** Las pendientes obtenidas (tasas de actividad acumulada) se graficaron en diagramas de cajas para comparar la actividad total de las diferentes condiciones.

Por otra parte, se calculó la función de distribución acumulada (CDF; "cumulative distribution function"; por sus siglas en inglés), una métrica que permite comparar distintas condiciones experimentales al evaluar la probabilidad acumulada de la actividad de todas las neuronas que integran dichas condiciones (incluyendo las de todos los experimentos; Figura 10). La CDF se obtuvo calculando, para cada neurona, la proporción de cuadros activos respecto al total de cuadros registrados. Estos valores se acumularon progresivamente hasta incluir a todas las neuronas y finalmente fueron normalizados respecto al mayor valor de actividad registrada.

5.7 Análisis estadístico de los datos

Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). Todas ellas son libres de distribución o no paramétricas:

Kruskal Wallis con la prueba de Dunn *post hoc*: La prueba de Kruskal-Wallis determinó si existe o no una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de la actividad de las diferentes condiciones experimentales. Si los resultados fueron estadísticamente significativos (p≤ 0.05), se usa la prueba de Dunn, que realiza comparaciones por pares, entre cada grupo, para determinar con claridad qué grupos son estadísticamente diferentes.

Para las CDFs se comparan las distribuciones de la actividad neuronal directamente usando la siguiente prueba:

 Prueba de Kolmogórov-Smirnov: Comparó las distribuciones de la probabilidad acumulada de actividad de las diferentes condiciones y determinó si son diferentes o iguales.

6. RESULTADOS

La actividad espontánea de neuronas estriatales en tejido *in vitro* se registró mediante la técnica de imagenología de calcio. Esta actividad se representó en gráficos tipo ráster, que muestran las neuronas activas durante el registro, así como su coactividad (Figura 6). Cada experimento se hizo en un corte de tejido cerebral individual, proveniente de un animal diferente.

Los experimentos representativos de cada condición muestran que la actividad espontánea estriatal es similar en los dos hemisferios de ratones intactos (HD y HL) al igual que el número de neuronas registradas y su coactividad (Figuras 6A, C). Al lesionar la SNc del hemisferio derecho con la neurotoxina 6-OHDA (HL), la actividad espontánea en el núcleo estriado aumenta considerablemente, al igual que el número de neuronas activas con respecto a ambos hemisferios sanos. El histograma de coactividad muestra una mayor cantidad de cuadros activos y neuronas coactivas (Figura 6B). Al registrar la actividad del núcleo estriado en el hemisferio opuesto al de la lesión (HNL) se observa un aumento en la cantidad de neuronas activas a lo largo del registro, sin embargo, su actividad espontánea y número de células coactivas son estadísticamente no distinguibles de los registrados en los hemisferios de ratones sanos (Figura 6D).

Al calcular la actividad acumulada, se observa que los experimentos pertenecientes al HL tienen los valores más grandes en comparación a las demás condiciones. Por otro lado, la actividad acumulada es similar para los experimentos pertenecientes a los grupos HD, HI y HNL (Figura 7). Esta observación persiste en la figura 8, al obtener el promedio de la actividad acumulada de todos los experimentos, donde el sombreado alrededor de cada línea muestra el error estándar (SE) de la media por cada condición. El SE es un valor estadístico que indica la variabilidad de las estimaciones promedio de la actividad acumulada acumulada dentro de cada grupo experimental. En el HL, el área sombreada es más amplia, lo que indica una mayor variabilidad en los promedios de la actividad acumulada entre los experimentos que integran la condición. Por el contrario, en las demás condiciones, el área es más estrecha, reflejando mayor consistencia entre los experimentos, y, por lo tanto, una mayor precisión en la estimación del promedio. La clara separación de la actividad acumulada del hemisferio lesionado respecto a las demás condiciones demuestra que la lesión induce cambios significativos en la dinámica de la actividad espontánea estriatal (Figuras 7 y 8).



Figura 6. Actividad estriatal bilateral en los modelos murinos intacto y hemiparkinsoniano. Gráfico tipo ráster e histograma de coactividad que muestran la actividad espontánea estriatal en el hemisferio derecho de un ratón sano (A), en el hemisferio lesionado (derecho) de un modelo murino

hemiparkinsoniano (B), en el hemisferio izquierdo de un ratón sano (C) y en el hemisferio no lesionado (izquierdo) de un modelo murino hemiparkinsoniano, inducido con 6-OHDA (D).



Figura 7. Actividad acumulada de las diferentes condiciones experimentales. Cada línea corresponde a un experimento independiente en el que se registró la actividad espontánea de neuronas estriatales en tejido *in vitro.* A la actividad acumulada de cada experimento se le ajusto una línea recta. El código de colores representa la condición a la que pertenece cada experimento.



Figura 8. Promedio de la actividad acumulada obtenida de tejido in vitro de ratones intactos y hemiparkinsonianos. Se representa el promedio de la actividad acumulada de todos los experimentos para cada una de las condiciones. El área sombreada alrededor de cada línea corresponde al error estándar de la media. El código de colores indica la condición a la que pertenece la actividad.

La comparación de las tasas de actividad acumulada a través del gráfico de cajas corrobora las observaciones hechas en las figuras 7 y 8 (Figura 9). Al comparar las tasas de todos los grupos experimentales mediante la prueba de Kruskal Wallis se obtuvo un valor de p= 0.0032, por lo que se realizó la prueba de Dunn *post* hoc que comparó las condiciones en pares y cuyos resultados se muestran a continuación: no se observaron diferencias significativas en la actividad espontánea estriatal entre los grupos HD (n= 6) vs HI (n= 6; p= 0.7440). Por otro lado, existe una diferencia significativa al comparar la actividad del HD (n=6) con la del HL (n=6; p= 0.0008), pero no la existió al contrastar el HD (n=6) con el HNL (n=6; p= 0.3691). La actividad

espontánea estriatal del HI (n=6) tiene diferencias significativas respecto a la actividad del HL (n=6; p= 0.0025), pero no con la del HNL (n=6; p= 0.5676). Finalmente, al comparar la actividad entre los hemisferios del modelo 6-OHDA se pueden apreciar diferencias significativas [HL (n=6) vs HNL (n=6), p=0.0143].

Los resultados en conjunto muestran un aumento de la actividad estriatal tras la lesión de la SNc con 6-OHDA. Sin embargo, este incremento parece ser exclusivo del hemisferio lesionado, el hemisferio opuesto a la lesión posee una tasa de actividad similar a la observada en tejido proveniente de los ratones sanos, aunque se aprecia una mayor varianza.



Figura 9. Comparación de las tasas de actividad acumulada de todas las condiciones. Diagrama estadístico de cajas de las tasas de actividad acumulada de las diferentes condiciones para poder hacer comparaciones entre grupos. El tamaño de muestra de cada condición es de 6 experimentos. Los asteriscos sobre las líneas horizontales representan el nivel de significancia estadística entre las condiciones, resultante de la prueba de Dunn (Kruskal Wallis, p=0.0032), en donde *p< 0.05; **p<0.01; ***p< 0.001. El código de colores representa la condición a la que pertenece cada pendiente. A la derecha se muestra una tabla que resume los resultados de las pruebas estadísticas. Por último, se obtuvieron las CDF, que permiten visualizar la probabilidad de actividad de cada condición de manera acumulativa. En la figura 10, el grupo HL tiene una curva más desplazada hacia la derecha, en comparación a las demás condiciones, indicando mayor probabilidad de actividad de las neuronas. La prueba de Kolmogórov-Smirnov usada para comparar la curva de distribución del grupo HL (n= 271 neuronas) indica diferencias significativas respecto a los grupos experimentales: HD (n= 166 neuronas), HI (n= 200 neuronas) y HNL (n= 214 neuronas), con un valor de p<0.0001, para las tres condiciones.

La CDF del HD (n= 166 neuronas), no tiene diferencia significativa con la del HI (n= 200 neuronas; Kolmogórov-Smirnov, p= 0.1769), ni con la del HNL (n= 214 neuronas; Kolmogórov-Smirnov, p= 0.3230). Asimismo, no se observaron diferencias entre el HI (n= 200 neuronas) y el HNL (n= 214 neuronas; Kolmogórov-Smirnov, p= 0.9673). La figura muestra que las CDFs correspondientes a los hemisferios derecho e izquierdo de ratones intactos, al igual que la del hemisferio opuesto a la lesión, se superponen, lo que indica una probabilidad de actividad similar entre ellas.



Figura 10. Función de distribución acumulada de las diferentes condiciones experimentales. Estas funciones se construyeron usando todas las neuronas activas de los diferentes experimentos

en cada condición (hemisferio derecho animal intacto, n= 166 neuronas; hemisferio izquierdo animal intacto, n= 200; hemisferios lesionado animal hemiparkinsoniano, n= 271; hemisferio no lesionado animal hemiparkinsoniano, n= 214). El código de colores representa la condición a la que pertenece cada función. Las CDFs se compararon mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov, la cual verifica el grado de similitud entre dos distribuciones. A la derecha del gráfico, se muestra una tabla que resume los resultados obtenidos por esta prueba estadística.

7. DISCUSIÓN

Los vídeos de la actividad espontánea estriatal en tejido in vitro de ratones control (HD y HI) muestran pocos cuadros de registro activos con repetidos periodos de silencio (Figura 6). Esta actividad no es diferente entre hemisferios (Figuras 9 y 10). Estos resultados son congruentes con diversos trabajos in vitro anteriormente publicados, que muestran que los microcircuitos estriatales pertenecientes a ratones control muestran poca actividad espontánea (en comparación a ratones lesionados), similar a la observada en sujetos (*in vivo*) en reposo total (Plata, et al., 2013; Aparicio-Juárez, et al., 2019; Mink, 2003; Parker, et al., 2018). Esta escasa actividad espontánea, observada en tejido sano (Figura 6), se debe en parte a las características de las SPNs, que conforman la gran mayoría del total de neuronas en el núcleo (90-95%) y cuya actividad es usualmente por debajo de los 2 Hz, irregular y con largos periodos de silencio (Wilson, 1993), debido a dos factores principales: primero, el hiperpolarizado potencial de membrana en reposo (alrededor de -80 mV), el cual se debe en parte a la presencia de corrientes de potasio (rectificadores entrantes de tipo Kir; Pacheco-Cano et al., 1996; Mermelstein et al., 1998). Segundo, a fuertes entradas inhibitorias intrínsecas del microcircuito y activadas por la corteza (feed-forward y feed-back inhibition; Taverna et al., 2008; Flores-Barrera et al., 2009; 2010; 2011; López-Huerta et al., 2013). Lo que hace que se requiera una fuerte entrada excitatoria para transitar al up-state y disparar potenciales de acción (Mahon, et al. 2001; Arias-García et al., 2013; 2018; Vizcarra-Chacón et al., 2013). Así, en condiciones control los disparos neuronales son esporádicos y el estriado es clasificado como un núcleo cuasi-silente (Bargas, et al., 1999; Crutcher, et al. 1984; Kimura, 1992; Klaus, et al., 2016).

Pero algo sucede con el microcircuito estriatal privado de dopamina (HL) que exhibe un aumento significativo en la actividad espontánea comparada con la de ratones control (HD y HI; Figuras 6, 9 y 10). Este resultado ha sido reportado previamente (Liang, et al., 2008; Jáidar, et al., 2010; Lemaire, et al., 2012; Pérez-Ortega, et al., 2016). Se ha atribuido, en parte, a la potenciación de las entradas glutamatérgicas corticostriatales tras la depleción dopaminérgica (Calabresi, et al., 1993; Gubellini et al., 2002; Galarraga, et al., 1987) y a la pérdida de las entradas inhibitorias (Taverna et al., 2008; López-Huerta et al., 2013). En condiciones normales, las proyecciones dopaminérgicas provenientes de la SNc y las terminales glutamatérgicas de la corteza convergen en las SPNs, facilitando el balance excitación-inhibición en el circuito estriatal (Bouyer et al., 1984; Freund et al., 1984). Sin embargo, la depleción dopaminérgica induce cambios sobre la transmisión excitatoria en el estriado, reflejada en un aumento en la amplitud y frecuencia de los potenciales sinápticos espontáneos hacia las SPNs (Calabresi, et al., 2000; Galarraga, et al., 1987), así como los cambios ya mencionados en las entradas inhibidoras (Taverna et al., 2008; López-Huerta et al., 2013).

Además de los cambios en la transmisión sináptica en el microcircuito estriatal privado de DA, ocurren cambios en la morfología de las SPNs, los que podrían contribuir a los patrones de actividad anormal. La mayor alteración, descrita por primera vez en ratas lesionadas con 6-OHDA en el MFB y posteriormente en monos tratados con MPTP y pacientes con EP, es el cambio en el tamaño, forma e incluso pérdida de las espinas dendríticas de las SPNs, tanto de la vía directa como de la indirecta (Ingham, et al., 1989; Stephens, et al., 2005; Zaja-Milatovic, et al., 2005; Day, et al., 2006; Villalba, et al., 2009). Dado que estas estructuras son las principales receptoras de aferencias corticostriatales y talamostriatales, es probable que su pérdida aumente la alteración de la transmisión glutamatérgica (Smith, et al., 2013). Otros estudios han demostrado que la arborización dendrítica se reduce en las SPNs de ambas vías (Fieblinger et al., 2014).

De acuerdo con el modelo de las dos vías de los ganglios basales (Albin, et al., 1989; DeLong, 1990) la depleción dopaminérgica provoca que la actividad de las SPNs que integran la vía directa e indirecta se vea afectada de manera diferencial: las dSPNs reducen su tasa de disparo a causa de la falta de activación de los D₁R, donde la DA es facilitadora. En contraste, las iSPNs incrementan su tasa de disparo debido a la supresión de la activación de los D₂R, donde la DA es inhibidora. Estudios *in vitro* demuestran que tras lesiones con 6-OHDA la excitabilidad intrínseca y dendrítica de las dSPNs es menor, mientras que en las iSPNs aumenta, en comparación con ratones no lesionados (Fieblinger et al., 2014). Estos cambios se interpretan como adaptaciones homeostáticas que buscan contribuir a mantener la actividad balanceada de ambas vías en fases tempranas del parkinsonismo, pero que resultan insuficientes en fases posteriores (Mallet, et al., 2006; Galvan, et al., 2015).

En esta tesis, comprobamos que la privación de DA aumenta significativamente la actividad espontánea de las neuronas estriatales en el hemisferio lesionado, mientras que, el hemisferio no lesionado de un animal hemiparkinsoniano, parece no tener cambios significativos en su actividad con respecto a los controles (Figuras 9 y 10), excepto por un ligero aumento en la varianza. En este sentido, se ha reportado que tras la depleción unilateral de DA, se encuentran niveles menores de este neurotransmisor en el estriado ipsilateral a la lesión en comparación con el hemisferio contralateral, acompañado de alteraciones en el comportamiento, como son los giros ipsiversivos. Ambas características reflejan la lateralidad de la lesión (Smith, et al., 2008; Walker, et al., 2013; Björklund, et al., 2019; Blesa, et al., 2011).

En el estudio de Yu et al. (2022), en el que se evalúan distintos aspectos de la prueba de giro en el modelo murino de hemiparkinsonismo, se reportó que la anfetamina, un fármaco utilizado para aumentar la concentración de DA al inhibir su recaptación, incrementa la actividad de las SPNs en el hemisferio no lesionado produciendo giros ipsilaterales a la lesión. En el lado lesionado no hay terminales dopaminérgicas suficientes para que la anfetamina tenga efecto, mientras que en el

lado no lesionado sigue habiendo terminales dopaminérgicas. Asimismo, al administrar SKF 38393, un agonista dopaminérgico selectivo para D₁R, se registra mayor actividad en las SPNs del hemisferio lesionado acompañada de giro contralateral. Lo anterior se atribuye comúnmente a la sobreexpresión de D1Rs en el lado lesionado provocando hipersensibilidad de estos en respuesta a la depleción dopaminérgica (Gerfen, 2003; Robinson, et al., 1988; Ungerstedt, 1971). Por lo que los resultados del estudio sugieren que, en la conducta de giro inducida por fármacos, los ratones giran con dirección al hemisferio que tiene menor actividad estriatal. Si bien, estas observaciones *in vivo* se encuentran bajo la influencia de la manipulación farmacológica, sí reflejan el desequilibrio funcional entre los dos hemisferios, lo que se relaciona con los resultados obtenidos en el tejido *in vitro*, donde únicamente el lado lesionado presenta una actividad espontánea aumentada (Figuras 6; 9 y 10).

Pero, aunque no se observan cambios evidentes en la actividad neuronal estriatal del hemisferio no lesionado, no se puede descartar, a priori, que la lesión unilateral con 6-OHDA produzca alteraciones en el mismo. Estudios previos en diversos modelos animales de hemiparkinsonismo (lesión en la SNc) proponen una regulación entre el hemisferio sano y el depletado de DA (Blesa, et al., 2011), ya que se sabe que entre el 1% y 3% de las fibras dopaminérgicas que llegan al estriado de un hemisferio cerebral provienen de la SNc y del VTA del hemisferio opuesto (Molochnikov, et al., 2014), por lo que se ha sugerido una regulación entre las vías nigroestriatales y mesolímbicas de ambos hemisferios cerebrales que, tras la lesión unilateral, el hemisferio menos afectado (no lesionado) busca compensar la reducción de DA estriatal en el hemisferio más afectado (lesionado). Entre los mecanismos de compensación se proponen el incremento en la liberación de DA (Nieoullon, et al., 1977), el aumento de la tasa de recambio de dopamina (Andersson, et al., 1980), la regulación positiva de la tirosina hidroxilasa (Kozlowski, et al., 2004) y el aumento del contenido de GABA y glutamato (Masuo, et al., 1988), todos ellos en el estriado contralateral a la lesión. Todo lo anterior dificulta la interpretación de los experimentos in vivo. Por lo que pensamos conveniente

comprobar si estos cambios producen alteraciones *in vitro*, en el hemisferio no lesionado, ya libre de posibles circuitos compensatorios. Nuestros resultados demuestran que en el hemisferio no lesionado no se presenta una actividad significativa mayor que la registrada en animales no lesionados, aunque si se detecta un aumento en la varianza. Esto refuerza el uso del modelo *in vitro* para bioensayos de fármacos con potencial utilidad terapéutica y la comparación de la actividad neuronal entre los lados lesionado y no lesionado, pues la diferencia con el tejido de animales control no es significativa. Sin embargo, los presentes resultados podrían ayudar a reinterpretar los resultados obtenidos en modelos *in vivo*. ¿Por qué en este modelo si hay instancias en que el lado no lesionado tiene más actividad? Como hipótesis de trabajo pensamos que habría que estudiar el lado no lesionado en animales hemiparkinsonianos, pero sin el uso de fármacos que induzcan mayor lateralidad que la obtenida por la sola depleción de DA. En contraparte, en el modelo *in vitro* podrían usarse los diferentes fármacos usados *in vivo*, para corroborar las interpretaciones que se tienen de este modelo.

8. CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en esta investigación contribuyen a la caracterización de la actividad estriatal basal de los dos hemisferios del modelo murino de hemiparkinsonismo. Limitando la influencia de factores externos y enfocándose exclusivamente en la actividad espontánea del tejido, en condiciones *in vitro*, sin estimular, la lesión unilateral de la SNc con 6-OHDA genera un incremento significativo en la actividad global espontánea estriatal en el hemisferio lesionado. En contraste, el hemisferio no lesionado mantiene una actividad similar a la de los hemisferios de ratones sanos, los cuales no muestran diferencias significativas entre ellos.

9. REFERENCIAS

- Agosta, S., Magnago, D., Galante, E. (2019). Lateralized cognitive functions in Parkinson's patients: A behavioral approach for the early detection of sustained attention déficits. *Brain Research*, 1726, 1-30. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146486
- Akerboom, J., Tsai-Wen, C., Wardill, T., et al. (2012). Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci, 32*(40), 13819-13840. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, *12*(10), 366–375. 10.1016/0166-2236(89)90074-x
- Andersson, K., Schwarcz, R., Fuxe, K. (1980). Compensatory bilateral changes in dopamine turnover after striatal kainate lesión. *Nature, 283*(1), 94-96. https://doi.org/10.1038/283094a0
- Antony, P., Diederich, N., Balling, R. (2011). Parkinson's disease mouse models in translational Research. *Mamm Genome*, 22 (7), 401-419. doi: 10.1007/s00335-011-9330-x
- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., et al. (2019). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *Eur J Neurosci,* 49(6), 834-848. https://doi.org/10.1111/ejn.13806
- Applied Biological Materials. (2024). Adeno-Associated Virus An Introduction. https://info.abmgood.com/adeno-associated-virus-aav-introduction
- Arias-García, M., Tapia, D., Flores-Barrera, E., et al. (2013). Duration differences of corticostriatal responses in striatal projection neurons depend on calcium activated potassium currents. *Front. Syst. Neurosci., 7*(63), 1-11. https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00063
- Arias-García, M., Tapia, D., Laville, J., et al. (2018). Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Struct Funct, 223*(1), 1229-1253. https://doi.org/10.1007/s00429-017-1536-6
- Ashley, C., Ridgway, E. (1968). Simultaneous Recording of Membrane Potential, Calcium Transient and Tension in Single Muscle Fibres. *Nature*, 219, 1168-1169. https://doi.org/10.1038/2191168a0
- Bargas, J., Ayala, X., Vilchis, J., et al. (1999). Ca²⁺- Activated outward currents in neostriatal neurons. *Neurosciencie*, *88*(2), 479-488. DOI: 10.1016/s0306-4522(98)00211-5

- Bartels, A. & Leenders, K. (2009). Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. Cortex. *Journal Devoted to the Study of the Nervous System and Behavior*, 45(8), 915–921. https://doi.org/10.1016/j.cortex.2008.11.010
- Bean, B. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience, 8*(1), 451-465. https://doi.org/10.1038/nrn2148
- Beitz, J. (2014). Parkinson's disease: a review. *Front Biosci (Schol Ed.), 6*(1), 65-74. DOI: 10.2741/s415.
- Berridge, M., Lipp, P., Bootman M. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *1*(1), 11-21. https://doi.org/10.1038/35036035
- Björklund, A., Dunnett, S. (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. *Journal of Parkinson's Disease*, *9*(1). doi: 10.3233/JPD-181525
- Blandini, F., Armentero, M., Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism and Related Disorders 14*(2), 124-129. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.015
- Blesa, J., Juri, C., García-Cabezas, M., et al. (2011). Inter-hemispheric asymmetry of nigrostriatal dopaminergic lesion: a possible compensatory mechanism in Parkinson's disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *5*(92), 1-7. https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00092.
- Booij, J., Tissingh, G., Boer, G., et al. (1997). [123I]FP-CIT SPECT shows a pronounced decline of striatal dopamine transporter labelling in early and advanced Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 62*(2), 133–140. https://doi.org/10.1136/jnnp.62.2.133.
- Bouyer, J., Park, D., Joh, T., et al. (1984) Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. Brain Res. 302, 267-275
- Calabresi, P., Centonze, D., Bernardi, G. (2000). Electrophysiology of dopamine in normal and clenervated striatal neurons. *Trends Neurosci* 23(10), 57-63. https://doi.org/10.1016/S1471-1931(00)00017-3
- Calabresi, P., Mercuri, N., Sancesario, G., et al. (1993) Electrophysiology of dopamine-denervated striatal neurons. Implications for Parkinson's disease. *Brain 116*(2), 433–452. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8096420/.
- Calabresi, P., Picconi, B, Tozzi, A., et al. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience, 17,* 1022-1030. https://doi.org/10.1038/nn.3743
- Calderón, V., Luna-Leal, A., Gómez-Paz, A., et al. (2022). Striatal Neuronal Ensembles Reveal Differential Actions of Amantadine and Clozapine to

Ameliorate Mice L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Neuroscience, 492*(1), 92-107. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.03.036

- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, f., Ibáñez-Sandoval, O., et al. (2009). Activation of the Cholinergic System Endows Compositional Properties to Striatal Cell Assemblies. *J Neurosci, 101*(2), 737-749. https://doi.org/10.1152/jn.90975.2008
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., et al. (2008). Encoding Network States by Striatal Cell Assemblies. *J Neurophysiol, 99*, 1435–1450. https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007
- Carter, M., Essner, R., Goldstein, N., et al. (2022). *Guide to Research Techniques in Neuroscience.* (3^a ed.). ACADEMIC PRESS.
- Chia, S., Tan, E., Chao, Y. (2020). Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci, 21*(7), 1-14. DOI: 10.3390/ijms21072464
- Choe, B., Park, J., Lee, K. (1998) Neuronal laterality in Parkinson's disease with unilateral symptom by in vivo 1H magnetic resonance spectroscopy. *Invest Radiol* 33(8), 450–455. DOI: 10.1097/00004424-199808000-00005
- Crutcher M., DeLong M. (1984) Single cell studies of the primate putamen. I. Functional organization. *Exp Brain Res,* 53(2), 233–243. https://doi.org/10.1007/BF00238153
- Day, M., Wang, Z., Ding, J., et al. (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci, 9*, 251–259. doi: 10.1038/nn1632
- DeLong, M. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*, 13(7), 281–285. doi: 10.1016/0166-2236(90)90110-v
- Douglas, S., Jayaraman, V., Looger, L., et al. (2014). Engineering Fluorescent Calcium Sensor Proteins for Imaging Neural Activity, Society for Neuroscience, 1(1), 11-19. https://neuronline.sfn.org/-/media/Project/Neuronline/PDFs/2015/Engineering-Fluorescent-Calcium-Sensor-Proteins-for-Imaging-Neural-Activity_with_logo.pdf
- Fieblinger, T., Graves, S., Sebel, L., et al. (2014). Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Commun.* 5(5316), 1-15. doi: 10.1038/ncomms6316
- Flores-Barrera, E., Laville, A., Plata, V., et al. (2009). Inhibitory Contribution to Suprathreshold Corticostriatal Responses: An Experimental and Modeling Study. *Cell Mol Neurobio*, 29(1), 719-731. https://doi.org/10.1007/s10571-009-9394-2
- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B., Bargas, J., et al. (2011). Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny

projection neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci., 5*(15), 1-6. https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00015

- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B., Tapia, D., et al. (2010). Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci., 4*(15), 1-14. https://doi.org/10.3389/fnsys.2010.00015
- Flores-Hernández, J., Galarraga, E., Bargas, J. (1997). Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse*, 25(2), 107-226. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199702)25:2<185::AID-SYN9>3.0.CO;2-8
- Freund, T.F. et al. (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. Neuroscience 13, 1189-1215
- Fucile, S. (2004). Ca2+ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35, 1–8. DOI: 10.1016/j.ceca.2003.08.006
- Galarraga, E., Bargas, J., Martínez-Fong, D., et al. (1987). Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. Neuroscience letters, *81*(3), 351-355. DOI: 10.1016/0304-3940(87)90409-5
- Galvan, A., Devergnas, A., Wichmann, T. (2015). Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. *Front. Neuroanat. 9*(5). 1-21. https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00005
- Gerfen, C. (1992). The neostriatal mosaic: Multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, *15*, 285–320. 10.1146/annurev.ne.15.030192.001441
- Gerfen, C. (2003). D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopaminedepleted striatum animal model of Parkinson's disease. *The Neuroscientist*, 9(1), 455–462. https://doi.org/10.1177/ 1073858403255839
- Gerfen, C. (2023). Segregation of D1 and D2 dopamine receptors in the striatal direct and indirect pathways: An historical perspective. *Frontiers, 14,* 01-23. DOI: 10.3389/fnsyn.2022.1002960
- Grienberger, C., Giovannucci, A., Zeiger, W., et al. (2022). Two-photon calcium imaging of neuronal activity. *Nat Rev Methods Primers, 2*(1), 1-52. DOI: 10.1038/s43586-022-00147-1
- Grienberger, C., Konnerth, A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, 73(5), 862-885. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011
- Grimshaw, G. (1998). Integration and Interference in the Cerebral Hemispheres: Relations with Hemispheric Specialization. *Brain and Cognition*, *36*(2), 108-127. https://doi.org/10.1006/brcg.1997.0949

- Gubellini, P., Picconi, B., Bari, M., et al. (2002) Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci, 22*(16), 6900–6907.
- Guzmán, J., Hernández, A., Galarraga, E. (2003). Dopaminergic Modulation of Axon Collaterals Interconnecting Spiny Neurons of the Rat Striatum. *J Neurosci,* 23(26), 8931-8940. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-26-08931.2003.
- He, J., Kleyman, M., Chen, J., et al. (2021). Transcriptional and anatomical diversity of medium spiny neurons in the primate striatum. *Curr Biol.* 31(24), 5473-5486. DOI: 10.1016/j.cub.2021.10.015
- Helassa, N., Xiao-hua, Z., Conte, I. (2015). Fast-Response Calmodulin-Based Fluorescent Indicators Reveal Rapid Intracellular Calcium Dynamics. *Sci Rep, 5*(15978), 1-15. DOI: 10.1038/srep15978
- Hernández-López, S., Bargas J., Surmeier, J., et al. (1997). D1 Receptor Activation Enhances Evoked Discharge in Neostriatal Medium Spiny Neurons by Modulating an L-Type Ca21 Conductance. *J. Neurosci.* 17(9), 3334-3342. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-09-03334.1997
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Pérez-García, E. (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca2+ currents and excitability via a novel PLC[beta]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci, 20*(24), 8987-8995. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-24-08987.2000
- Higley, M., Sabatini, B. (2008). Calcium signaling in dendrites and spines: practical and functional considerations. *Neuron* 59(6), 902–913. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.08.020
- INAPAM. (11 de abril de 2019). Parkinson, segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en personas mayores de 50 años. https://www.gob.mx/inapam/articulos/parkinson-segunda-enfermedadneurodegenerativa-mas-frecuente-en-personas-mayores-de-50anos?idiom=es.
- Ingham, C., Hood, H., Arbuthnott, G. (1989). Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res.* 503(2), 334–338. doi: 10.1016/0006-8993(89)91686-7
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., et al. (2010) Dynamics of the parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J Neurosci, 30*(34), 11326-11326. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1380-10.2010
- Jiang, Z., North, R. (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, *443*(1), 533–553. DOI: 10.1113/jphysiol.1991.sp018850.

- Kawaguchi, Y., Wilson, C., Augood, S., et al. (1995). Striatal interneurones: Chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, *18*(12), 527–535. DOI: 10.1016/0166-2236(95)98374-8
- Kimura, M. (1990). Behaviorally contingent property of movement-related activity of the primate putamen. *J Neurophysiol*, *63*(6), 1277-1296. DOI: 10.1152/jn.1990.63.6.1277
- Kimura, M. (1992). Behavioral modulation of sensory responses of primate putamen neurons. *Brain Res,* 578(1–2), 204–214. https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90249-9
- Kita, H., Kitai, S. (1988). Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: Their morphological types and populations. *Brain Research*, *447*(2), 346–352. DOI: 10.1016/0006-8993(88)91138-9
- Kita, T., Kita, H., & Kitai, S. (1984). Passive electrical membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Research*, 300(1), 129–139. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431
- Klaus, A., Plenz, D. (2016). A Low-Correlation Resting State of the Striatum during Cortical Avalanches and Its Role in Movement Suppression. *PLoS Biol, 14*(12), 1-30. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002582
- Kozlowski, D., Miljan E., Bremer E., et al. (2004) Quantitative analyses of GFRalpha-1 and GFRalpha-2 mRNAs and tyrosine hydroxylase protein in the nigrostriatal system reveal bilateral compensatory changes following unilateral 6-OHDA lesions in the rat. *Brain Res* 1016(2):170–181. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.003
- Lara-González, E., Duhne, M., Ávila-Cascajares, F., et al. (2019). Comparison of Actions between L-DOPA and Different Dopamine Agonists in Striatal DA-Depleted Microcircuits In Vitro: Pre-Clinical Insights. *Neuroscience, 410*(2019), 76-96. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.058
- Lemaire, N., Hernandez, L., Hu, D., et al. (2012) Effects of dopamine depletion on LFP oscillations in striatum are task- and learning-dependent and selectively reversed by LDOPA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(44), 18126-18131. https://doi.org/10.1073/pnas.1216403109
- Liang, L., DeLong, M., Papa, S. (2008) Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci*, 28(30), 7537-7547. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-08.2008.
- López-Huerta, V., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., et al. (2013). The Balance of Striatal Feedback Transmission Is Disrupted in a Model of Parkinsonism. J *Neurosci,* 33(11), 4964-4975. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4721-12.2013

- Mahon, S, Deniau, J., Charpier, S. (2001). Relationship between EEG potentials and intracellular activity of striatal and cortico-striatal neurons: an in vivo study under different anesthetics. *Cereb Cortex*, *11*(4),360-373. doi: 10.1093/cercor/11.4.360. PMID: 11278199.
- Mahon, S., Vautrelle, N., Pezard, L. et al. (2006). Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep–wake cycle. *Journal of Neuroscience*, 26(48), 12587–12595. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3987-06.2006
- Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C., et al. (2006). Cortical inputs and gaba interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *Journal of Neuroscience*, 26(14), 3875–3884. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4439-05.2006
- Masuo, Y., Kanazawa, I. (1988). Effects of the unilateral striatal lesion on neurotransmitter markers in the contralateral striatum and both substantia nigrae of the rat. <u>Neuroscience</u>, 27(3), 827-836. https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90186-8.
- Matamales, M., Bertran-Gonzalez, Salomon, L., et al. (2009). Striatal Medium-Sized Spiny Neurons: Identification by Nuclear Staining and Study of Neuronal Subpopulations in BAC Transgenic Mice. *PLoS ONE*, 4(3), e4770. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004770.
- Mermelstein, P., Song, W., Tkatch, T., et al. (1998). Inwardly Rectifying Potassium (IRK) Currents Are Correlated with IRK Subunit Expression in Rat Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons. *J Neurosci, 18*(17), 6650-6661. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-17-06650.1998
- Mink, J. (2003). The Basal Ganglia: Focused selection and inhibition of competing motor programs. Progress in Neurobiology, 50(4), 381-425. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00042-1
- Molochnikov, I., Cohen, D. (2014). Hemispheric differences in the mesostriatal dopaminergic system. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8(110), 1-14. https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00110
- Nauta, W., Mehler, W. (1966). Projections of the lentiform nucleus in the monkey. *Brain Res, 1*(1), 3-42. DOI: 10.1016/0006-8993(66)90103-x
- Nieoullon, A., Cheramy, A., Glowinski, J. (1977). Interdependence of the nigrostriatal dopaminergic systems on the two sides of the brain in the cat. *Science 198*(4315), 416–418. DOI: 10.1126/science.910137
- Nova, S., Serrano, C. (2023). Cráneo. Kenhub. https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/craneo
- OMS. (09 de agosto de 2023). *Enfermedad de Parkinson.* https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease

- Pacheco-Cano, M., Bargas, J., Hernández-López, S., et al. (1966). Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs⁺-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res, 110*(2), 205-211. DOI: 10.1007/BF00228552
- Padilla-Orozco, M., Duhne, M., Fuentes-Serrano, A. et al. (2022). Synaptic determinants of cholinergic interneurons hyperactivity during parkinsonism. *Frontiers in Synaptic Neuroscience, 14*(1), 1-24. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.945816
- Parker, J., Marshall, J., Ahanonu, B., et al. (2018). Fast-spiking interneurons supply feedforward control of bursting, calcium, and plasticity for efficient learning. *Cell*, *172*(4), 683-695. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.005.
- Pérez-Burgos, A., Pérez-Roselló, T., Salgado, H., et al. (2008). Muscarinic M(1) modulation of N and L types of calcium channels is mediated by protein kinase C in neostriatal neurons. *Neuroscience*, *155*(4), 1079-1097. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.047
- Pérez-Ortega, J., Duhne, М., Lara-González, E., et al. (2016). • Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. Neurobiol Dis, 91(1), 347-361. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.023.
- Pérez-Ramírez, M., Laville, A., Tapia, D. et al. (2015). K_V7 Channels Regulate Firing during Synaptic Integration in GABAergic Striatal Neurons. *Neural Plasticity, 2015*(1), 1-18. http://dx.doi.org/10.1155/2015/472676
- Pérez-Roselló, T., Figueroa, A., Salgado, H., et al. (2005). Cholinergic Control of Firing Pattern and Neurotransmission in Rat Neostriatal Projection Neurons: Role of Cav2.1 and Cav2.2 Ca²⁺ Channels. *J Neurosci, 93*(5), 2507-2519. https://doi.org/10.1152/jn.00853.2004
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J., et al. (2013). Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of parkinsonian tissue in vitro. *Biomed Res Int, 2013*(1), 1-7. https://doi.org/10.1155/2013/519184
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D. (2001). *Neuroscience.* (2^a ed). Oxford.
- Ramsey, I., Delling, M., Clapham, D. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol. 68,* 619–647. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431
- Robinson, T., Whishaw, I. (1988). Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra: A microdialysis study in freely moving rats. *Brain Research*, 450(1), 209–224. https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91560-0.

- Ropper, H., Samuels, A., Klein, P. (2014). Degenerative diseases of the nervous system. Adam and Victor's principles of neurology (pp. 1060–1132) McGrawHill.
- Samii, A., Nutt, J., Ransom, B. (2004). Parkinson's disease. *Seminar. 363*, 1783-1793. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16305-8
- Schultz, W., Tremblay, L., Hollerman, J. (2003). Changes in behavior-related neuronal activity in the striatum during learning. *Trends Neurosci, 26*(6), 321-328. DOI: 10.1016/S0166-2236(03)00122-X
- Secretaría de Salud. (11 de abril de 2024). Tratamiento integral mejora calidad de vida de las personas con enfermedad de Parkinson. Gobierno de México. https://www.gob.mx/salud/prensa/145-tratamiento-integral-mejora-calidad-de-vida-de-las-personas-con-enfermedad-de-parkinson?idiom=es#:~:text=Subray%C3%B3%20que%20los%20primeros %20signos,habitantes%2C%20sobre%20todo%2C%20hombres.
- Shepherd, G. (2004). The Synaptic Organization of the Brain. OXFORD UNIVERSITY PRESS.
- Shimomura, O., Johnson, F., Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 59*(3), 223-239. https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302
- Simon, D., Tanner, C., Brundin, P. (2019). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med, 36*(1), 1-12. DOI: 10.1016/j.cger.2019.08.002
- Simonyan, K. (2019). Recent advances in undestanding the role of the basal ganglia. *Faculty Rev.* 8(122), 1-9. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6354324/pdf/f1000research-8-18060.pdf
- Smith, M., Cass, W. (2008). Oxidative stress and dopamine depletion in an intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, *144*(3), 1057-1066. Doi:10.1016/j.neuroscience.2006.10.004
- Smith, Y., Villalba, R. (2013). Dendrite spines plasticity in brain disorders. *Neuroscience*, *251*(1). doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.045
- Stephens, B., Mueller, A., Shering, A., et al. (2005). Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* 132(3), 741–754. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.007
- Straub, C., Saulnier, J., Begue, A., et al. (2016). Principles of Synaptic Organization of GABAergic Interneurons in the Striatum. *Neuron, 92*(1), 84-92. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.09.007
- Surmeier, D., Bargas, J., Hemmings, H. (1995). Modulation of Calcium Currents by a D1 Dopaminergic Protein Kinase/Phosphatase Cascade in Rat

Neostriatal Neurons. *Neuron, 14*(2), 385-397. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90294-5

- Taverna, S., Llijic, E., Surmeier, D. (2008). Recurrent Collateral Connections of Striatal Medium Spiny Neurons Are Disrupted in Models of Parkinson's Disease. J Neurosci, 28(21), 5504-5512. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5493-07.2008.
- Tecuapetla, F., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., et al. (2007). Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(24), 10258-10263. DOI: 10.1073/pnas.0703813104
- Tecuapetla, F., Patel, J., Xenias, H., et al. (2010). Glutamatergic signaling by mesolimbic dopamine neurons in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, *30*(20), 7105–7110. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0265-10.2010
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, 20(5), 385-397. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00030-2.
- Torres, A. (2023). Tálamo. *Kenhub.* https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/talamo
- Tortora, G., Derrickson, B. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Tritsch, N., Ding, J., Sabatini, B. (2012). Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature*, *490*(7419), 262-266. DOI: 10.1038/nature11466
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol, 5*(1), 107-110. DOI: 10.1016/0014-2999(68)90164-7.
- Ungerstedt, U. (1971). Postsynaptic supersensitivity after 6hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum, 367, 69–93. DOI: 10.1111/j.1365-201x.1971.tb11000.x
- Vergara-Aragón, P., Gonzalez, C., Wishaw, I. (2003). A Novel Skilled-Reaching Impairment in Paw Supination on the "Good" Side of the Hemi-Parkinson Rat Improved with Rehabilitation. *J Neurosci, 23*(2), 579-586. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00579.2003
- Villalba, R., Lee, H., Smith, Y. (2009). Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Exp. Neurol.*, 215(2), 220– 227. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.09.025
- Vizcarra-Chacón, B., Arias-García, M., Pérez-Ramírez, M., et al. (2013). Contribution of different classes of glutamate receptors in the corticostriatal

polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neurosci, 14*(60), 1-17. DOI: 10.1186/1471-2202-14-60

- Waldvogel, H., Faull, R. (2015). The Diversity of GABA_A Receptor Subunit Distribution in the Normal and Huntington's Disease Human Brain. En Uwe Rudolph, *Diversity and Functions of GABA Receptors: A Tribute to Hanns Möhler, Part B* (pp. 223-264). ACADEMIC PRESS. https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.11.010
- Walker, M., Dinelle, K., Kornelsen, R., et al. (2013). Measuring dopaminergic function in the 6-OHDA-lesioned rat: a comparison of PET and microdialysis. *EJNMMI Research, 3*(69), 1-11. doi: 10.1186/2191-219X-3-69.
- Wang, J., Yang, Q., Sun, X. et al. (2015). MRI evaluation of asymmetry of nigrostriatal damage in the early stage of early-onset Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders, 21*(6), 590–596. https://doi.org/ 10.1016/j.parkreldis.2015.03.012
- Williams, D., & Litvan, I. (2013). Parkinsonian Syndromes. Lifelong Learning in Neurology, 19, 1189–1212. https://doi.org/10.1212/01.con.0000436152.24038.e0
- Wilson, C. (1993) The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res, 99*, 277–297. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61352-7
- Wilson, C. J., & Groves, P. M. (1981). Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Research*, 220(1), 67–80. DOI: 10.1016/0006-8993(81)90211-0
- Wilson, C., & Kawaguchi, Y. (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *Journal of Neuroscience*, *16*(7), 2397–2410. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-07-02397.1996.
- Yin, H. (2024). The Integrative Fuctions of the Basal Ganglia. CRC Press.
- Young, C., Reddy, V., Sonne, J. (2023). *Neuroanatomy, Basal Ganglia*. StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537141/
- Yu, C., Tianlun, T., Shoemaker, C., et al. (2022). Striatal mechanisms of turning behavior following unilateral dopamine depletion in mice. Eur J Neurosci., *56*(5), 4529-4545. DOI: 10.1111/ejn.15764.
- Zaja-Milatovic, S., Milatovic, D., Schantz, A. et al. (2005). Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology*, 64(3), 545–547. doi: 10.1212/01.wnl.0000150591.33787.a4.
- Zucker, R. (1999). Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology, 9*(3), 305-313. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80045-2.