



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA  
TRANSCRANEAL DE ALTA FRECUENCIA Y BAJA  
INTENSIDAD APLICADA PREFERENTEMENTE  
SOBRE M1 EN LA ACTIVACIÓN DE ESTRUCTURAS  
DE LOS GANGLIOS BASALES EN RATAS.  
IMPLICACIONES PARA EL DISEÑO DE TERAPIAS NO  
INVASIVAS PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

**P R E S E N T A:**

**CINTHIA SUGHEY AGUILAR HERNÁNDEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

**SINODALES:**

DR. ANTONIO PAULINO ZAINOS ROSALES

DRA. LAURA ELISA RAMOS LANGUREN

DRA. ZEIDY VANESSA MUÑOZ TORRES

DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Agradecimientos

La autora de la presente tesis agradece a la Dra. Margarita Gómez Chavarín, al Dr. Jesús Ramírez Santos y al Dr. Miguel Tapia por el apoyo técnico y logístico brindado.

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biología de Sistemas encabezado por el Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, ubicado en el Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Ciudad Universitaria.

El trabajo fue financiado por fondos asignados al Laboratorio de Biología de Sistemas por la administración del IIB, UNAM.

La autora del trabajo recibió una beca de Actipulse Neuroscience México.

El presente manuscrito es la representación de las oportunas preguntas, comentarios, recomendaciones e interés que mi sínodo tuvo hacia el proyecto. En general, agradezco a la Dra. Zeidy, por nutrir al proyecto con preguntas que me permitieron cuestionarme y nutrir el texto; por recomendarme buscar información sobre el tamaño del efecto, lo cual, me hizo revisar nuevamente la estadística del proyecto. Al Dr. Pavel, por su amabilidad y generosidad, por sus puntuales comentarios, que me permitieron leer de manera más global al proyecto. A la Dra. Laura, por sus acertadas correcciones hacia el texto. Al Dr. Zainos, por hacerse el tiempo para charlar sobre el proyecto, por sus aportaciones intelectuales a la discusión de los antecedentes y de los resultados.

## Dedicatorias

*A Lulú y Antonio, por las enseñanzas que a partir de sus historias de vida decido tener. Por brindarme la oportunidad del estudio.*

*A mis hermanas, Vane, Fani y Yanet, por ser compañeras de escucha y charla. Por ser hombro en momentos difíciles, por su abrazo, por las reflexiones y los cambios.*

*Gabriel, por ser, valoro tu compañía y los caminos que escogemos transitar. Te amo.*

*A mis amigos: Eli, Pedro, Jenny, Candice, Cachita y Manuel, por las vivencias compartidas, por las reflexiones, el aliento, la apertura, por el crecimiento de cada uno.*

*A la Universidad, que me ha acogido desde la preparatoria, a la Facultad de Psicología, al Instituto de Investigaciones Biomédicas, a la Escuela Nacional de Lenguas, Lingüística y Traducción, porque son los lugares que en mi memoria guardan valiosos recuerdos de enseñanza académica y personal.*

*A mí, por la liberación.*

# Índice

Agradecimientos .....	2
Dedicatorias.....	3
Índice.....	4
<b>Resumen</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	7
<b>Antecedentes</b> .....	9
Fisiología del movimiento.....	9
Enfermedad de Parkinson: hipersincronización de la vía del movimiento voluntario en el ritmo $\beta$ . .....	11
Interrupción de la hipersincronía en la EP .....	13
Estimulación Magnética Transcraneal: una aproximación no invasiva para romper la hipersincronía.....	15
<b>Planteamiento del problema</b> .....	16
<b>Hipótesis</b> .....	17
<b>Objetivo general</b> .....	17
<b>Objetivo específico</b> .....	17
<b>Metodología</b> .....	17
Animales .....	17
Protocolo de habituación.....	18
Protocolo de estimulación .....	19
Manufactura del casco-bobina .....	20
Inmunocitoquímica .....	20
Morfometría .....	21
Análisis de datos .....	23
Tamaño del efecto .....	23
<b>Resultados</b> .....	25
<b>Discusión</b> .....	31
<b>Conclusión</b> .....	35
<b>Referencias</b> .....	36

## Resumen

El movimiento voluntario es el resultado de la activación secuenciada de ensambles de neuronas organizados somatotópicamente en múltiples estructuras cerebrales, entre ellas, las estructuras de los ganglios basales (GB). Cada ensamble, a lo largo de estas vías, está compuesto por un número discreto de neuronas cuya actividad se sincroniza transitoriamente durante la fase de movimiento que cada uno de los ensambles representa. La activación seriada de estos ensambles neuronales discretos, organizada espaciotemporalmente en función de la secuencia motriz requerida, subyace a la ejecución eficiente del movimiento planeado. Si este proceso se altera, aparecen los desórdenes del movimiento. Tal caso es observado en estadios avanzados de la Enfermedad de Parkinson (EP), en la que los ensambles oscilatorios discretos de neuronas sincronizadas se desdibujan como consecuencia de los déficits de dopamina (DA). La baja de DA da lugar a una activación oscilatoria amplia de grandes poblaciones neuronales conocida como hiper-sincronía. Se postula que la implementación de medidas que permitan fragmentar el estado de hiper-sincronía, en presencia o ausencia de DA, facilitarían la aparición de los ensambles osciladores discretos, mejorando así el movimiento en pacientes parkinsónicos. En este sentido, se ha mostrado que la estimulación cerebral profunda (ECP) en rangos mayores a los 100 Hz (banda gamma alta), aplicada en el Núcleo Subtalámico (NST) y/o en el Globo Pálido interno (GPi), ambos núcleos de los GB, tienden a normalizar la ejecución motriz en pacientes parkinsónicos. Infortunadamente, el implante de electrodos es una intervención invasiva que trae aparejados riesgos a corto, mediano y largo plazo. Es por ello que se requiere desarrollar métodos no invasivos que permitan obtener un efecto similar, pero a menor costo y con efectos colaterales limitados. En fechas recientes se ha planteado la posibilidad de utilizar la Estimulación Magnética Transcraneal (EMT) para mejorar el estado funcional motor en pacientes con EP. Hasta la fecha, los estudios de EMT que utilizan bajas frecuencias (1 Hz) con altas intensidades (>.5 T) muestran resultados ambiguos. Retomando los hallazgos favorecedores de la ECP, nosotros proponemos el uso EMT de frecuencias altas (135Hz) a baja intensidad (10mT) como un medio capaz de romper la hipersincronía de las vías afectadas en la EP. Dada la conectividad aferente que existe entre la corteza motora primaria (M1) y las estructuras

que conforman a los GB, es probable que la EMT aplicada preferentemente sobre M1, pueda activar grupos neuronales ubicados en los GB. Nuestro trabajo propone evaluar si la EMT de alta frecuencia y baja intensidad es una técnica idónea para activar al núcleo putamen (PUT), Globo Pálido (GP), Núcleo Subtalámico (NST) y Sustancia *nigra pars compacta* (SNc). Con este fin, colocamos sobre la cabeza de ratas macho en libre movimiento, una bobina que entregaba un campo electromagnético de 10mT de manera pulsada por 20 minutos. Para establecer si este protocolo de estimulación activa las regiones de interés, las ratas se anestesiaron y perfundieron con fijador. Los cerebros se extrajeron, y a partir de ellos se obtuvieron cortes sagitales que fueron teñidos por inmunocitoquímica para la detección de la proteína c-Fos. Se cuantificó el número de núcleos neuronales inmunomarcados por unidad de área. Estos datos se compararon con aquellos obtenidos en animales intactos y aquellos dotados con bobinas inactivas. Los resultados mostraron incrementos significativos en la densidad de núcleos celulares inmunoreactivos para c-Fos en la M1, en el núcleo PUT, en el GP, en el NST y en la SNc, apoyándose así la predicción que sostiene que la EMT de alta frecuencia y baja intensidad es una técnica capaz de estimular estructuras que conforman parte de los ganglios basales, y cuya disfunción caracteriza a la EP. Sin embargo, para conocer su utilidad para el tratamiento de ésta, se requiere aún de realizar estudios en unidades experimentales animales que modelen aspectos característicos de la EP.

## Introducción

Las etapas tardías de la EP tienen como sello histopatológico la pérdida de un alto porcentaje de las neuronas dopaminérgicas que residen en la SNc, núcleo que inerva a diversas estructuras de los GB (Surmeier et al., 2017). El diagnóstico clínico formal de la enfermedad se establece cuando los pacientes presentan acinesia (i.e., dificultad para el inicio de movimientos voluntarios), bradicinecia (i.e., lentitud en la ejecución del movimiento), espasticidad muscular, temblores en reposo y distonía (Bergman y Deuschl, 2002).

En condiciones fisiológicas normales, los GB funcionan como un sistema de relevos interconectados que segregan e integran información espacio-temporal en paralelo y en secuencia (Wichmann y DeLong en Leung, 2003; Lanciego et al., 2012). El cimiento operativo de los GB se fundamenta en la habilidad que tienen sus poblaciones neuronales para conformar transitoriamente, y de manera secuenciada, distintos ensambles encargados de representar fases diferentes pero complementarias de la secuencia de movimientos (Luczak et al., 2015; Bevan et al., 2006). Si bien los componentes neuronales de cada ensamble oscilan sincrónicamente, la actividad entre los distintos ensambles es asincrónica (Gatev et al., 2006; Hutchison et al., 2004). Es esta asincronía inter-ensamble, junto con la activación temporal secuenciada de los mismos, lo que facilita que el movimiento se manifieste de forma organizada, rítmica y fluida (Bevan et al., 2006). En contraste, en la EP, se presenta un estado de hiper-sincronía entre los ensambles, circunstancia que interfiere con la ejecución del movimiento debido a que evita la activación serial y con ello la formación de los diferentes ensambles encargados de organizar la secuencia de movimiento. Este fenómeno ocurre en todas las estructuras que conforman los GB (Dejean et al., 2008; Pérez-Ortega y Bargas, 2017; Belluscio et al., 2014). En el contexto descrito, se ha teorizado que la fragmentación de la hiper-sincronía en los circuitos neuronales involucrados en la generación y modulación del movimiento, pudiese aminorar los signos y sintomatología motora en pacientes afectados por la EP. En apoyo a esta idea, estudios llevados a cabo en pacientes parkinsonianos sujetos a estimulación cerebral profunda (ECP) de alta frecuencia (>100Hz; frecuencia gamma rápida pro-cinética) (Florin et al., 2013; Benabid, 2003; McIntyre y Hahn, 2010) o con ablación del NST o del GPi, han mostrado una mejora motora

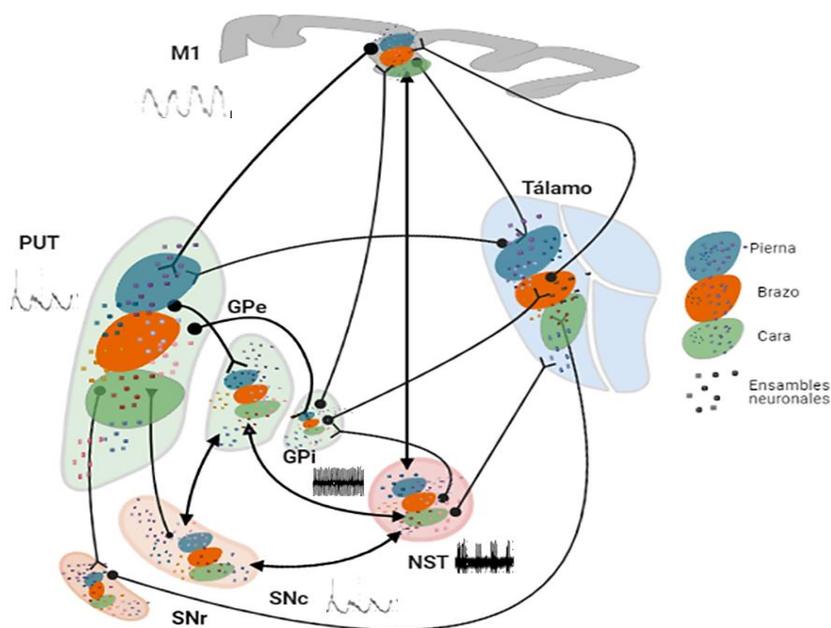
que se correlaciona con la suspensión la hiper-sincronía en los GB (Lozano et al., 2002; Ashkan et al., 2017). Sin embargo, el tratamiento ablativo, así como la instalación de un estimulador eléctrico subcortical, son procedimientos invasivos que representan riesgos para el paciente, por lo que se requiere el desarrollo de tecnologías no invasivas que sean capaces de replicar los resultados clínicos obtenidos con la estimulación cerebral profunda en los pacientes con EP.

La estimulación magnética transcraneal (EMT) constituye un procedimiento no invasivo a través del cual se podría proveer de estimulación a los GB a través de la corteza cerebral, aminorando así la sintomatología motora parkinsoniana. Sin embargo, aún no es claro si la EMT clásica (Mally et al., 2018; Kojovic, et al., 2015; Mally et al., 2004) es capaz de aminorar los signos y sintomatología motora, debido a que la potencia del campo magnético de los equipos convencionales es tan alta (0.5-2 teslas) que existe el riesgo de inducir actividad epileptogénica si se usan frecuencias mayores a los 50 Hz (Belmaker et al., 2003; Rossini et al., 2015). Por eso se ha empezado a considerar el uso de aparatos que generen intensidades más bajas (alrededor de 0.01 teslas) a frecuencias altas (> 50 Hz), los cuales producen un campo electro-magnético más pequeño (1V/m; Dufor, et al., 2019; Rohan et al., 2014). Pensamos que este tipo de tecnología permitiría a la EMT irrumpir la hiper-sincronía en los GB a través de la activación de las aferencias corticales que proyectan a estas estructuras. Esta posibilidad no ha sido aun experimentalmente puesta a prueba. Es por ello que la presente propuesta tuvo como objetivo establecer si la EMT (10 mT/135 Hz actividad gamma rápida) aplicada preferentemente sobre la M1 es capaz de activar neuronas en el PUT, GP, NST y SNc.

## Antecedentes

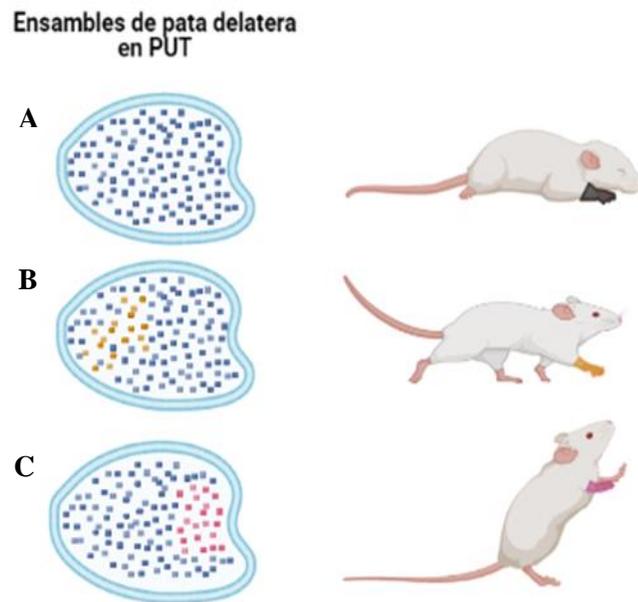
### Fisiología del movimiento

La vida es y requiere movimiento. En los vertebrados, el sustrato neurofisiológico de la motricidad lo constituye la actividad coordinada de ensambles de neuronas y la habilidad que tienen éstas para generar y combinar las representaciones del cuerpo y del ambiente circundante (Buzsáki, 2019). Específicamente, en los vertebrados mamíferos, la vía del movimiento voluntario está constituida por ensambles neuronales que mantienen la topografía somática a lo largo de la M1, el tálamo y los GB (Nambu, 2011; ver figura 1)



**Figura 1.** Descripción anatómica de la conectividad y organización somatotópica de la vía cortical-tálamo-ganglios basales. Se observa a la corteza motora primaria (M1), el putamen (PUT), la porción interna y externa del globo pálido (GPi y GPe, respectivamente), el núcleo subtalámico (NST), la sustancia nigra pars compacta (SNc) y la pars reticulata (SNr). En el modelo, la M1 manda eferencias directamente o a través del tálamo hacia el PUT. El PUT envía proyecciones a 1) GPi y a la SNr, estructuras encargadas de proyectar aferencias hacia tálamo y éste, hacia la M1. El GPi también envía proyecciones directas hacia M1, y 2) al GPe que se comunica bidireccionalmente con el NST, el cual regula la actividad tónica del GPi. Por otra parte, la M1 se comunica bidireccionalmente con el NST, y es capaz de modular la actividad tálamica. Este circuito es regulado de forma fásica por la DA liberada desde la SNc hacia el PUT, NST y GPe. El cimiento operativo de cada módulo se encuentra en la organización somatotópica de los ensambles neuronales y en las oscilaciones que éstos generan. (Figura modificada de McIntyre y Hahn, 2010; Nambu, 2011; Milardi et al., 2019); figura creada en BioRender.com.

Para operar de forma eficiente, estos ensambles neuronales generan una representación de la secuencia de movimiento. Las neuronas que representan, por ejemplo, la fase inicial de dicha secuencia, forman transitoriamente un ensamble en el que los elementos neuronales que lo componen oscilan sincrónicamente a cierta frecuencia (Gatev et al., 2006; Hutchison et al., 2004; Bronfeld y Bar-Gad, 2011). Se ha propuesto que este fenómeno se repite de manera seriada con los otros grupos de neuronas que representan las siguientes fases del movimiento. A lo largo del proceso, cada ensamble se conforma por un distinto número de neuronas que oscilan sincrónicamente a distintas frecuencias (Buzsáki, 2006; Pérez-Ortega y Bargas, 2017). Ver figura 2.



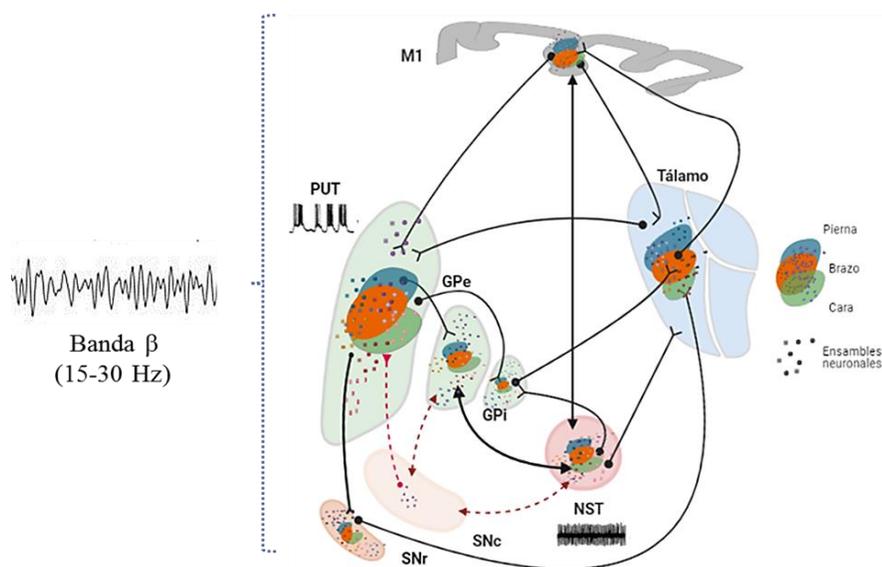
**Figura 2.** Representación esquemática de ensambles neuronales sincrónicos que representan de manera serial a distintas fases del movimiento de la pata delantera de la rata. A) El PUT presenta poca actividad espontánea en reposo (ensambles en azul silentes). B y C) Con el inicio del movimiento, la secuencia del mismo es representada espacio-temporalmente en el PUT por la activación seriada de ensambles neuronales discretos, organizados en función de la secuencia motriz requerida (ensambles naranja y rosado). Si bien los componentes neuronales de cada ensamble oscilan sincrónicamente, la actividad entre los distintos ensambles es asincrónica (población en azul). La asincronía inter-ensamble junto con la aparición temporal secuenciada de los ensambles es lo que facilita que el movimiento se manifieste de forma organizada, rítmica y fluida (Bronfeld y Bar-Gad, 2011). Figura creada en BioRender.com

La incorporación de cada neurona al ensamble depende de la frecuencia de oscilación intrínseca, de la frecuencia de oscilación del ensamble (a menor frecuencia mayor posibilidad de incorporación) y de la frecuencia de la estimulación que reciben (Buzsáki, 2006). Así, la dinámica oscilatoria de los distintos ensambles neuronales depende del proceso de incorporación/desincorporación neuronal en el tiempo, facilitado o impedido por propiedades internas y externas al sistema (Buzsáki, 2006). Específicamente, en condiciones de reposo, las neuronas del NST, GPe y GPi descargan a altas frecuencias en distintos patrones, sin correlación rítmica entre e intra estructuras (Bevan et al., 2006) y el PUT presenta poca actividad espontánea (Aparicio-Juárez et al, 2019; McCarthy et al, 2011), en cambio, durante el movimiento, éstos mismos núcleos exhiben patrones complejos de sincronización transitoria entre e intra estructuras a diversos rangos de oscilación (0.4-200Hz), en dependencia del comando motor (Hutchison et al., 2004; Buzsáki y Draguhn, 2004). A este respecto, se sabe que la oscilación transitoria en ritmos  $\beta$  y  $\alpha$  tiende a atenuarse antes del movimiento, para resincronizar a estas bandas de frecuencia cuando el movimiento culmina (Rubchinsky et al., 2012; Joundimet al., 2012). En cambio, el ritmo gamma (>60 Hz) aumenta y se mantiene de inicio a término del movimiento (Armstrong, et al., 2018). Por lo que se especula que los ritmos gamma procuran la sincronización y desincronización de las oscilaciones de los ensambles neuronales de la vía corteza-tálamo-ganglios-basales, procurando mayor transición en los estados de actividad de la red (Joundimet al., 2012; Dupre, et al., 2015). Cuando el proceso de adición/sustracción de elementos neuronales al ensamble se altera, sobrevienen las alteraciones de la motricidad (Pérez-Ortega y Bargas, 2017).

#### Enfermedad de Parkinson: hipersincronización de la vía del movimiento voluntario en el ritmo $\beta$ .

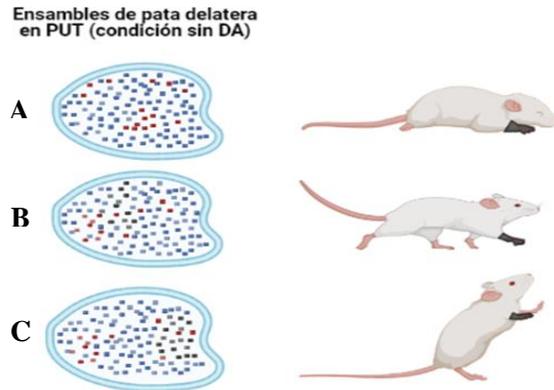
La EP es uno de desórdenes del movimiento más comunes en la población adulta (Yousif et al., 2020). Los síntomas motores clásicos incluyen acinesia, rigidez y temblor en reposo. Se presume que estos resultan de la caída de los niveles de DA en los GB, particularmente en el estriado (núcleo caudado y putamen), asociada con la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Brundin et al., 2008). Se presupone que la caída de la disponibilidad de DA disminuye el tono inhibitorio en el complejo estriatal,

lo que se traduce en un incremento en el número de neuronas que se suman a los ensambles y en la duración del estado de sincronización, al tiempo que disminuye la alternancia funcional de los ensambles implicados en el movimiento planeado (Lintas et al., 2012; Bronfeld y Bar-Gad, 2011; Pérez-Ortega y Bargas, 2017). Estas circunstancias conllevan a un estado de hiper-sincronía de un mega-ensamble neuronal producido en el estriado que parece ser reforzado por los altos niveles de actividad presentes en el asa-marcapaso NST y GPe, en un rango de actividad de los 15 a 30 Hz, conocido como ritmo  $\beta$  (Bevan et al., 2006; Holgado et al., 2010; Klaus et al., 2019; Figura 3). Sin embargo, el comportamiento de excesiva oscilación sincronizada ante la ausencia de DA, también se ha descrito entre la corteza y putamen, corteza y SNr, putamen y SNr (Dejean et al., 2008).



**Figura 3.** Hiper-sincronización de la vía del movimiento voluntario en el ritmo  $\beta$ . El PUT, el NST y el GPe pierden la regulación dopaminérgica proveniente de la SNc (señalado en las flechas rojas discontinuas). Los ensambles neuronales del PUT pasan de un estado silente (Figura 1) a uno sobre activado (Figura 3), probablemente al ser cooptados por las altas frecuencias de actividad cooperativa entre el NST y el GPe. Como resultado de ello, toda la vía queda atrapada en el ritmo  $\beta$ , y la alternancia funcional entre ensambles se imposibilita. Figura creada en BioRender.com

Como resultado de todo esto, la seriación funcional de las representaciones somatotópicas de las distintas fases del movimiento en los GB se pierde, conduciendo a una ejecución motora desordenada y poco fluida (Bronfeld et al., 2011; figura 4).



**Figura 4.** Esquema que ilustra los efectos de la ausencia de DA sobre la representación de los movimientos voluntarios en el PUT. Bajo estas condiciones, los ensambles neuronales quedan inmersos en un estado de sobreactivación que interrumpe el flujo de información. A) En reposo, el PUT presenta actividad dominante del ensamble rojo, en este ejemplo. B y C) Durante el movimiento, la actividad dominante del ensamble se mantiene y los ensambles negros, que en el ejemplo representan la secuencia de movimiento voluntario, pierden su organización espacio-temporal. Figura creada en BioRender.com

En favor de este modelo, se ha observado tanto en unidades experimentales animales que modelan algunos rasgos de la EP como en pacientes parkinsonianos, la existencia de un estado hiper-sincrónico que oscila en frecuencias  $\beta$  (Damodaran et al., 2015) en todos los relevos de la vía que controla el movimiento voluntario (Dejean et al., 2008) y un re-arreglo en los mapas topográficos del cuerpo (Tamburin et al., 2002; Peterson et al., 2010). Expuesto lo anterior, parece lógico pensar que la fragmentación del estado de hiper-sincronía oscilatoria de los GB, pudiese mejorar la disfunción motora en los pacientes parkinsonianos.

#### Interrupción de la hipersincronía en la EP

La EP ha sido objeto de investigación terapéutica por décadas sin que hasta ahora se haya logrado cancelar de forma permanente a la hipersincronización. En el corto plazo, la intervención con L-DOPA promueve una mejoría motora asociada con una clara disminución de la hipersincronía en la frecuencia  $\beta$  (Chung et al., 2018). Sin embargo, la administración de L-DOPA a largo plazo conduce a discinecias (Olanow et al., 2006). Una posible explicación es que, de forma fisiológica, la DA es entregada fásicamente hacia el PUT, ritmo que no se respeta en una situación de prescripción farmacológica.

La práctica de cirugías ablativas de las regiones motoras de las regiones NST, GPi y tálamo en pacientes con EP fármaco-resistente inició en los años 50's. Este abordaje terapéutico mostró ser relativamente efectivo para atenuar la sintomatología motora a corto y mediano plazo en respuesta a la remoción de las subdivisiones motoras del NST y GPi (Plotkin y Goldberg, 2019). Sin embargo, la extracción de estas regiones causaba efectos secundarios negativos por lo que esta técnica fue sustituida exitosamente por la estimulación cerebral profunda (ECP) del NST y GPi (Montgomery, et al., 2007). La ECP en el NST o GPi logra disminuir la hiper-sincronía en el rango  $\beta$ , aun si el paciente ya no responde a la administración de L-DOPA (Ashkan et al., 2017). Es interesante destacar que los efectos positivos de la ECP se asocian a frecuencias de estimulación mayores a los 100 Hz (gammas rápidas) y cuando se entrega estimulación menor a los 60 Hz la sintomatología empeora (Bevan et al, 2006). El mecanismo exacto por el cual la estimulación profunda a altas frecuencias suspende la hipersincronización en el ritmo  $\beta$  se desconoce. No obstante, debido a que la ablación y la estimulación de estructuras palidales tienen un efecto benéfico, se ha propuesto que las frecuencias gamma rápidas tienen un efecto de sobre estimulación que conlleva a las neuronas a mantenerse silenciadas, lo que bloquea que la información reverbera patológicamente (Singh et al, 2018). En favor de esta concepción, estudios de registro extracelular han mostrado que la estimulación de 130Hz induce un decremento en la actividad en el NST (Garcia et al, 2005). Por otra parte, se sabe que ensambles con actividad robusta son más difíciles de modular, por lo tanto, se requiere introducir eventos desincronizadores que sean potentes, situación lograda por el estímulo provisto a través del electrodo implantado (Park et al, 2010). Más recientemente, se ha observado que entregando estimulación en el rango gamma sobre la corteza motora en rebanadas de cerebros en condiciones de depletación de DA, favorece la transición entre ensambles en el PUT (Aparicio-Juárez et al., 2019). Estos antecedentes nos permiten proponer que el uso de estímulos exógenos con frecuencias mayores a los 100 Hz (frecuencias gamma alta) es necesario para desacoplar la actividad oscilatoria hipersincronizada de los ensambles neuronales ganglio-basales.

## Estimulación Magnética Transcraneal: una aproximación no invasiva para romper la hipersincronía

Como se enfatizó anteriormente, si bien la ECP parecería ser un procedimiento médico que pudiese ayudar al paciente parkinsoniano a mejorar su condición motriz, sus efectos colaterales, la relativa pérdida de su eficacia a largo plazo y su costo, la hacen una maniobra paliativa no indicada e inalcanzable para la mayor parte de los pacientes (sólo entre el 1.6 y el 4.5% de los pacientes con EP son candidatos; Morgante et al, 2007). Es por ello que el desarrollar y validar técnicas no invasivas basadas en los mismos principios neurobiológicos utilizados para soportar el diseño de la estimulación cerebral profunda se torna fundamental. Al respecto, la EMT constituye una tecnología no invasiva con potencial terapéutico para los pacientes con la EP. Esta técnica se ha utilizado con éxito para estudiar, mediante la activación o la inactivación de poblaciones neuronales, la fisiología cortical cerebral, como medida coadyuvante, para mejorar las condiciones anímicas en pacientes diagnosticados como depresivos (Fiñana y Leone, 2014) y como herramienta para manipular las oscilaciones cerebrales (Vernet, et al., 2019; Thut et al., 2011). Se ha propuesto que la EMT convencional pudiese aminorar la progresión de la EP en humanos, sin embargo, los resultados son ambiguos (Málly et al., 2004; Kojovic et al., 2015; Málly et al., 2018). A este respecto, los usuarios de la EMT tradicional consideran a estímulos menores a 1 Hz como de baja frecuencia y a los mayores a 1 Hz como alta frecuencia. Estas definiciones operativas se basan en la intensidad (1-2 T) con la que trabajan las bobinas de estimulación utilizadas clásicamente (Fiñana y Leone, 2014). Así, es posible que la inconsistencia de los resultados terapéuticos de la EMT en parte se deba a que la frecuencia de estimulación hasta ahora utilizada no es la adecuada. Con base en los antecedentes comentados, pensamos que deberían de usarse frecuencias mayores a 100 Hz para poder desestructurar la hipersincronía de los ensambles neuronales en los que se involucran los GB, procurando evitar comprometer al parénquima cerebral con las altas intensidades del campo magnético que hasta ahora han sido usadas (1-2 T). La investigación básica ha mostrado que la estimulación de alta frecuencia (>100 Hz) y baja intensidad (rango de  $\mu$ T- mT) es capaz de inducir activación neuronal documentada mediante el monitoreo de la proteína c-Fos en rebanadas de cerebro (Grehl et al., 2016). Sin embargo, debido a que es un estímulo con baja potencia despolarizante, que no resulta en evidencia motora de su aplicación, debido a que se requiere una intensidad

mínima de 0.5T para registrar actividad por arriba del umbral motor, (Ogiue-Ikeda y Ueno, 2003; Van De Ruit y Grey, 2016; Mimenza-Alvarado, et al., 2021), nuestro siguiente cuestionamiento es si la EMT de alta frecuencia y baja intensidad entregada *in vivo* preferentemente sobre la M1, activará a los núcleos PUT, GP, NST y SNc. Es por ello que en el presente trabajo realizaremos, en esta primera fase, una prueba de concepto en ratas normales en libre movimiento. Para ello, las ratas se equiparán con bobinas portátiles ligeras colocadas sobre sus cráneos procurando enfocar el haz electromagnético sobre la localización anatómica de la M1, región cuya actividad concertada con los GB y el músculo esquelético es esencial para la ejecución del movimiento voluntario (Rosin et al., 2011; Goldberg et al., 2002; DeLong y Wichmann, 2010 y Volkmann et al., 2010). Las bobinas emitirán un campo magnético bajo ( $\approx 0.01$  teslas) a una frecuencia alta ( $\approx 135\text{Hz}$ , frecuencia en el rango de las usadas en la ECP), que generan un campo eléctrico tan pequeño (1V/m) (Rohan, et al., 2014) que reduce significativamente el calentamiento de la bobina y las posibilidades de fenómenos epilépticos (Dufor et al., 2019). La EMT (135Hz / 10mT) suministrada fue aplicada por 20 minutos de forma discontinua a intervalos de un segundo sin pulso magnético y 4 segundos de estimulación. La estimulación a intervalos se definió en función de aquella considerada como óptima para activar la expresión de c-Fos a través de la EMT en las ratas (Dufor et al., 2019), al tiempo de evitar el calentamiento del sitio de exposición de la piel del cráneo sobre el cual se colocó la bobina (Lee et al., 2013). Además, este diseño temporal busca que las fluctuaciones de desincronización/sincronización en la banda  $\alpha$  y  $\beta$ , que ocurren durante los periodos pre y post movimientos respectivamente, tengan periodos de tiempo para ser generadas (Rhodes et al., 2018), y que la EMT potencie la tasa de transición de la actividad de los ensambles neuronales con la actividad gamma (Babiloni et al., 2016), sin eclipsar la generación de otros ritmos asincrónicos que participan en la producción del movimiento voluntario (Pfurtscheller et al., 2003; Szurhaj et al., 2003).

### **Planteamiento del problema**

La EMT, particularmente aquella aplicada en valores bajos de intensidad y altos en frecuencia, promete ser un método útil para fragmentar la hiper-sincronía observada en los circuitos de los GB de pacientes con EP. Este concepto, sin embargo, no ha sido validado experimentalmente, por lo que la presente propuesta se instrumenta como una primera fase

enfocada a corroborar uno de los requerimientos de la premisa planteada, utilizando como unidades experimentales ratas intactas en libre movimiento.

### **Hipótesis**

La EMT de alta frecuencia (135 Hz) y baja intensidad (10mT) preferentemente focalizada a M1 activará neuronas en los núcleos PUT, GP, NST y SNc.

### **Objetivo general**

Evaluar si la exposición a EMT de alta frecuencia y baja intensidad preferentemente focalizada sobre M1 es capaz de activar neuronas ubicadas en los núcleos PUT, GP, NST y SNc de ratas intactas en libre movimiento.

### **Objetivo específico**

Evaluar si la exposición a EMT de alta frecuencia y baja intensidad relativamente focalizada sobre M1 es capaz de activar neuronas ubicadas en los núcleos PUT, GP, NST y SNc en ratas intactas en libre movimiento, utilizando como monitor morfológico de activación neuronal a la proteína c-Fos.

### **Metodología**

#### **Animales**

Un total de 20 ratas macho adultas jóvenes de la cepa Wistar (8-9 semanas de edad; 380-420 gramos de peso corporal) se dividieron entre los grupos control (Ctrl; n=6), expuestos a bobinas inactivas (BI; n=7) y expuestos a bobinas activas (BA; n=7). Las ratas nacidas y criadas en las instalaciones de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, fueron alojadas en un cuarto mantenido a una temperatura promedio de 21°C, bajo un ciclo luz oscuridad invertido 12:12 (luces apagadas 7:00; luces encendidas 19:00), y teniendo libre acceso a agua y a alimento hasta el día del sacrificio. Las ratas fueron conjuntadas en número de tres en cada caja evitando entremezclar individuos de

diferentes grupos experimentales. Los protocolos relativos al manejo de animales fueron revisados y autorizados por la Comisión Institucional que vigila el uso de Animales de Experimentación en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (Registro No. 3297).

### Protocolo de habituación

En su primera semana de ingreso al bioterio, los animales se habituaron a la sala de ratas asignada a su estancia durante todo el curso del experimento. En la segunda semana, las ratas se habituaron al experimentador. Cada sesión individual (7 sesiones) tuvo una duración de 10 minutos y consistió en tomar a la rata con ambas manos, dejando como base las palmas de las manos, permitiendo que caminara y explorara en los brazos del experimentador. Antes de que la rata llegara a los hombros era regresada a la palma de la mano. Transcurrida esa segunda semana, las ratas BI y BA fueron habituadas gradualmente al casco-bobina (8 grs). Las 15 sesiones de habituación al casco-bobina fueron individualizadas y se programaron de la siguiente manera: las 3 primeras sesiones fueron de 5 minutos, las siguientes tres sesiones tuvieron una duración de 10 minutos, las 4 sesiones posteriores fueron de 15 minutos y las últimas cinco sesiones fueron de 20 minutos. Dichas sesiones se llevaron a cabo en un cilindro de acrílico de 60 cm de diámetro y 60 cm de altura, el cual también exploraron libremente los animales Ctrl, en el tiempo escalonado ya mencionado, durante los 15 días consecutivos de las sesiones. A los animales del grupo Ctrl se les tomaba de su caja y se les colocaba en el área cilíndrica durante los minutos correspondientes, posteriormente se les regresaba a su caja. A las ratas de los grupos BA y BI primero se les sostenía dejando despejada el área de la cabeza, se colocaba el casco y posteriormente se ajustaban y aseguraban los cinchos del casco para que éste no se moviera de su posición, incluso si la rata intentaba moverlo; posteriormente se colocaba a las ratas en la arena cilíndrica. Una vez transcurridos los minutos de habituación, el casco era retirado y la rata regresaba a su caja. Durante las sesiones de habituación a los cascos-bobina no se aplicaron pulsos magnéticos, si bien las ratas sí fueron expuestas al sonido de la bobina mediante el uso de grabaciones del mismo que corrieron de manera simultánea al desarrollo de la sesión desde su inicio hasta su final. Con esta maniobra, procuramos disminuir la saliencia del estímulo auditivo el día de la prueba. Las sesiones de habituación fueron llevadas a cabo en el cuarto de alojamiento durante la fase de actividad de las ratas entre las 10:00 y 14:00 horas del día.

## Protocolo de estimulación

El día de ejecución del experimento, cada rata fue colocada individualmente en la arena cilíndrica de prueba. Todos los ensayos se realizaron entre las 10 y las 14 horas, aleatorizando a los animales de los distintos grupos a lo largo de las pruebas ejecutadas cada día. Una vez introducida a la arena, cada rata exploró durante 5 minutos antes de dar inicio al periodo de observación (ratas Ctrl o BI) o estimulación/observación (ratas BA; Figura 5). Estudios preliminares (Aydin-Abidin, et al., 2008) y pruebas piloto en el laboratorio mostraron que la temperatura del sitio de exposición se mantiene relativamente constante, alrededor de los 37.3°C, en los primeros 20 minutos de trabajo. Durante el ensayo, las ratas se mantuvieron sin restricción alguna de sus movimientos. Transcurridos los 20 minutos, el casco-bobina fue apagado para el caso de las ratas BA, y removido en las ratas BI y BA. 70 minutos después de terminado el experimento, cada rata fue anestesiada con pentobarbital (40 mg/Kg de peso corporal) y transportada al laboratorio en una caja de aislamiento sensorial, para ser perfundida y su cerebro procesado siguiendo el protocolo instrumentado para la identificación histológica de la proteína c-Fos, una proteína de expresión temprana considerada como marcadora de activación neuronal ante estímulos novedosos (Chung, 2015) y frecuentemente utilizada también como trazador indirecto de vías neurales en el sistema nervioso central (Daval et al., 1989; Lu et al., 2019).



**Figura 5.** *Fotografía que ilustra un momento de la sesión de estimulación en una rata BA mientras recorría libremente la arena de experimentación.*

#### Manufactura del casco-bobina

El casco soporte de la bobina fue moldeado en una resina fotopolimerizable ( $\lambda 405\text{nm}$ ; Siraya Tech), impreso en 3D (Eleego Mars) con ayuda del programa Fusion 360 (Autodesk Inc) previo diseño basado en un modelo 3D del cráneo de la rata. El casco-bobina se ajustó mediante dos cinchos a la cabeza de la rata. Los pulsos magnéticos fueron generados por un dispositivo fabricado por Actipulse Neuroscience<sup>TM</sup> (Boston, EE. UU.). La bobina utilizada fue del tipo Helmholtz circular, procurando que el campo de mayor uniformidad quedara sobre yaciendo bilateralmente a la M1. La bobina consistió en un arreglo conformado de 50 vueltas de alambre de cobre a través del cual se transmitió una corriente 0.5 amperes. Este arreglo produjo una frecuencia de  $135\text{Hz}$  y una intensidad magnética máxima de  $10\text{mT}$ . El diámetro interno de la bobina fue de  $8.5\text{ mm}$  y el externo de  $18\text{ mm}$ . La distancia entre la bobina y la piel del cráneo fue de  $5\text{ mm}$ . Este dispositivo produce un campo magnético compuesto por dos fases. La fase de estimulación produce ráfagas de pulsos que duran 4 segundos a una frecuencia equivalente al rango de las oscilaciones gamma rápidas ( $135\text{Hz}$ ). La fase de reposo consiste en una pausa sin pulsos magnéticos que dura un segundo.

#### Inmunocitoquímica

Una vez en el laboratorio, las ratas fueron perfundidas por vía intracardiaca con una solución isotónica de cloruro de sodio (0.9%), seguida de una de paraformaldehído (4%) diluido en una solución tampón de fosfatos (PB;  $0.1\text{M}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ). Los cerebros se disecaron y post-fijaron en la misma solución fijadora durante 48 horas almacenadas a  $4^\circ\text{C}$ . Las muestras se crio-protegieron sumergiéndolas consecutivamente en soluciones de sacarosa tamponada al 15% y posteriormente al 30%. Una vez decantados, los cerebros fueron almacenados a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

El procedimiento de inmunocitoquímica fue realizado en cortes seriales sagitales ( $40\mu\text{m}$  de grosor) obtenidos en un criostato previa inclusión en Tissue-Tek II, y colectados en cajas de 12 pozos. Los cortes colectados fueron lavados en tres ocasiones (15 minutos en

cada ocasión) con PB, seguido de la incubación con peróxido de hidrógeno (10%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diluido con PB adicionado con tritón X-100 (0.3%; PBT), para luego ser incubados en ImmunoDNA Retriever Citrate (Bioscience) a 65°C durante 30 minutos. Acto seguido, los cortes se incubaron por 30 minutos en PBT, para continuar con un periodo de incubación en una solución de bloqueo (PBT adicionado con suero de caballo al 5%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agregó el anticuerpo primario policlonal obtenido en conejo y dirigido contra c-Fos humano (Abcam b190289) diluido 1:11000 en PBT durante 20 horas a temperatura ambiente. Al día siguiente, las secciones se lavaron tres veces con PB para luego ser incubadas con el anticuerpo secundario policlonal obtenido en burro, dirigidos contra IgG de conejo y conjugados con biotina (Merck-Millipore), durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes fueron lavados con PB tres veces y nuevamente incubados con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 90 minutos de acuerdo a las recomendaciones sugeridas por el proveedor (Vector Laboratories). La ubicación celular de los anticuerpos acoplados se llevó a cabo mediante el uso de una solución preparada con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (0.025%), NiNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> (0.0005%) y 0.01% de peróxido de hidrógeno en H<sub>2</sub>O milli-Q. La deposición del cromógeno se prolongó por 8 minutos. Posteriormente, los cortes fueron lavados generosamente en tres ocasiones lavados extensos. Finalmente, los cortes se colocaron sobre portaobjetos embebidos en gelatina (0.5% en PB), secados al aire libre y montados con Cytoseal (Fisher).

### Morfometría

En este estudio se estimó la densidad de núcleos neuronales inmuno-marcados para c-Fos normalizando el valor obtenido del conteo total de núcleos en cada región por corte a 0.25 mm<sup>2</sup>. El número de cortes consecutivos evaluados por área fue de 10 por rata para cada grupo. Las referencias anatómicas para procurar que los conteos fueran realizados en áreas equivalentes se llevaron a cabo con base en el atlas de Paxinos y Watson (2006). Los hemisferios de todos los animales fueron cortados en dirección medio-lateral entre las coordenadas 2.10 mm a 3.4 mm sobre el eje inter-aural. Las coordenadas utilizadas como referencia para ubicar el inicio de cada una de las estructuras fueron las siguientes:

M1: Coordenada Antero posterior (AP)= 1.7 a -2.3 mm, Coordenada Medio lateral (ML) = 2.1 mm, Coordenada DV= 0.2 a 1.8 mm

PUT: AP= 1.2 a -1.9, ML= 2.1 mm, DV= 3.0 a 6.2mm

GP: AP= -0.8 mm a 1.6, ML= 2.4 mm, DV= 5.4 a 7.7 mm

NST: AP= -3.8 a -4.8 mm, ML= 2.1 mm, DV= 7.8 a 8 mm

SNC: AP = -6.5 a -7 mm, ML = 2.1 mm, DV = 7.9 a 8.2 mm

Siendo las coordenadas que nos permitieron referenciar el final de cada estructura:

M1: AP= 3.7 a -0.4 mm, ML= 3.4 mm, DV= 1.0 a 3.6 mm

PUTAMEN: AP= 1.2 a -2.2, ML= 3.4 mm, DV= 3.2 a 7.6 mm

GP: AP= -1.1 mm a 1.8, ML= 3.4 mm, DV= 4.8 a 7.8 mm

NST: AP= -4.2 a -4.5 mm, ML= 3.18 mm, DV= 7.1 a 7.3 mm

SNC: AP = -4.3 a - 5.5 mm, ML = 2. 62 mm, DV = 7.1 a 7.3 mm

Adicionalmente, se tomaron fotografías de la corteza visual secundaria como medio de verificación sobre la precisión/extensión a la cual se entregó el estímulo magnético, ya que la expresión basal de c-Fos en esta área es muy baja (Kaczmarek y Chaudhuri, 1997) y una elevación en su expresión se podría atribuir a la EMT. A continuación se especifican coordenadas de inicio: V2: AP= -5.1 a -8.4 mm, ML= 2.1 mm, DV= 0 a 1.2 mm  
Coordenadas finales: V2: AP= -4.8 a -6.0 mm, ML= 3.4 mm, DV= 0.2 a 1.8 mm

Los conteos nucleares (Image J, NIH) se realizaron manualmente sobre imágenes digitalizadas (20X) obtenidas de cada región través de una cámara (HINOTEK-lab) acoplada a un microscopio Olympus CX21 operado por el programa ISCapture, V3.6.6., con el apoyo de una malla digital de conteo de 604 x 451  $\mu\text{m}$ . Para el proceso de conteo, se etiquetaron las células que tuvieran la marca en el núcleo, con una circularidad de 100 a 600 píxeles, excluyendo marca citoplasmática. Se utilizó la herramienta de multipunto que permite evitar dobles conteos al etiquetar con un número ascendente diferente cada elemento considerado, llevando una sumatoria independiente de número de objetos seleccionados.

## Análisis de datos

Los datos se analizaron y graficaron utilizando el programa Prism 6 (GraphPad Software Inc). Las pruebas de homogeneidad de varianza se realizaron con el estadístico de Levene, siendo que el supuesto de homogeneidad no se cumplió para los siguientes grupos: **M1**:  $F(2, 17) = 7.19, p = 0.06$ ; **PUT**:  $F(2, 17) = 5.054, p = 0.019$  y **GP**:  $F(2, 17) = 6.602, p = 0.008$ ; y se cumplió para los grupos siguientes: **NST**:  $F(2, 17) = 3.295, p = 0.062$  y **SNe**:  $F(2, 17) = 3.095, p = 0.071$ ; **V2**:  $F(2, 17) = 3.419, p = 0.056$  y **Peso**:  $F(2, 17) = 0.128, p = 0.881$ . Las pruebas de normalidad se realizaron con el estadístico de Shapiro-Wilk: para **M1**: Ctrl:  $W=0.8730, p=0.1439$ , BA:  $W=0.8821, p=0.2361$ , BI:  $W=0.8618, p=0.1572$ ; para **PUT**: Ctrl:  $W=0.8558, p=0.1386$ , BA:  $W=0.8792, p=0.2231$ , BI:  $W=0.8166, p=0.0595$ ; para **GP**: Ctrl:  $W=0.4530, p<0.0001$ , BA:  $W=0.7841, p=0.0284$ , BI:  $W=0.7496, p=0.0126$ ; para **NST**: BA:  $W=0.7887, p=0.0316$ , Ctrl y BI tuvieron cero marca en estas zonas; para **SNe**: BA:  $W=0.7434, p=0.0108$ , Ctrl y BI tuvieron cero marca en estas zonas; para **V2**: Ctrl:  $W=0.9752, p=0.9329$ , BA:  $W=0.9696, p=0.8959$ , BI:  $W=0.8820, p=0.2356$ ; para **Peso**: Ctrl:  $W=0.8824, p=0.2374$ , BA:  $W=0.9693, p=0.8936$ , BI:  $W=0.9457, p=0.6901$ . Las comparaciones estadísticas entre animales Ctrl, BI y BA se realizaron con la prueba ANOVA de un factor para los datos (**V2 y peso**) que pasaron la prueba de homogeneidad de varianza y con distribución normal, seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Los datos que no cumplieron la prueba de homogeneidad de varianzas (**M1, PUT, GP**) y/ o el supuesto de normalidad (**NST y SNe**) se compararon con la prueba Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn. Se consideraron como valores probabilísticos significativos aquellos iguales o menores a 0.05. La gráfica de barras de la figura 8 se realizó con el programa Excel (Microsoft Office, 2013).

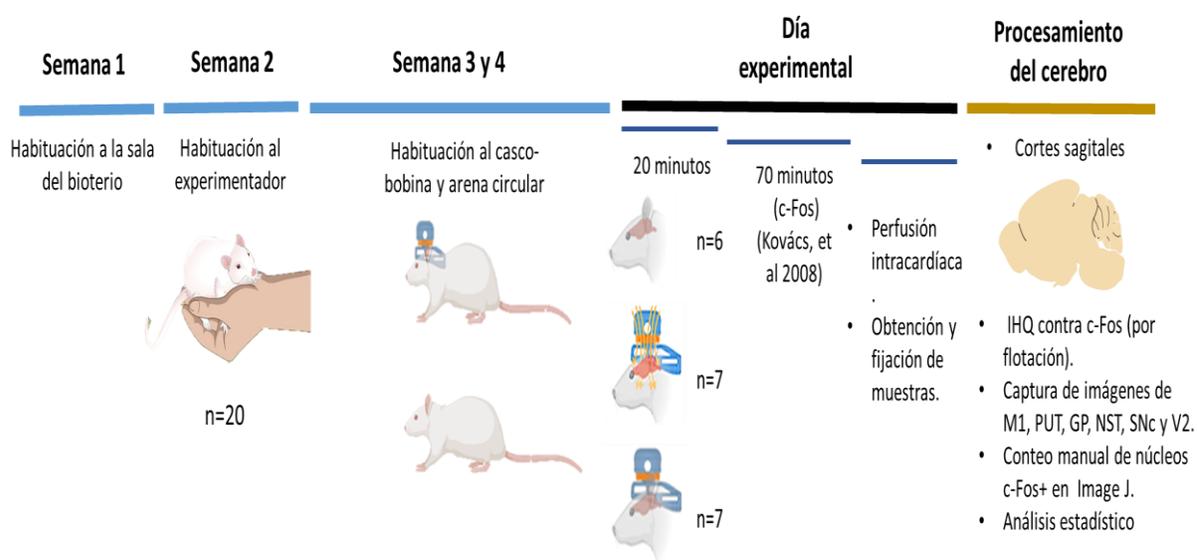
## Tamaño del efecto

El tamaño del efecto es la medida que representa la fuerza de la variable independiente. Aunque un valor  $p$  puede informar si existe un efecto, no revelará per se el tamaño del efecto, es decir, el nivel de significancia por sí solo no predice el tamaño del efecto global ni entre grupos. (Field et al., 2012). Debido a lo antes mencionado, y a que nuestros datos en el grupo de BA presentaban una gran variabilidad que podrían sesgar el resultado de significancia

estadística, decidimos reportar el tamaño del efecto por grupo y la comparación entre grupos para conocer la magnitud del efecto de la EMT de alta frecuencia y baja intensidad.

Para las comparaciones entre los grupos Ctrl, BA y BI en las diferentes estructuras muestreadas, se calculó la  $\eta^2$  (IBM SPSS Statistics 22) (Field et al., 2012). Los valores obtenidos para el tamaño del efecto total y para la comparación de la magnitud entre grupos se categorizan de la siguiente manera: valores de .10 (efecto pequeño), .30 (efecto medio) y .50 (efecto alto) (Field et al., 2012).

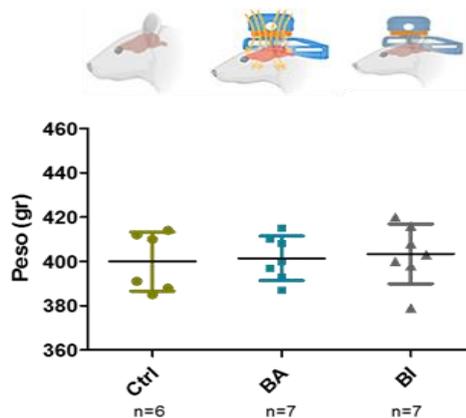
El proceso metodológico descrito se resume en la Figura 6.



**Figura 6.** Esquema representativo de la metodología descrita

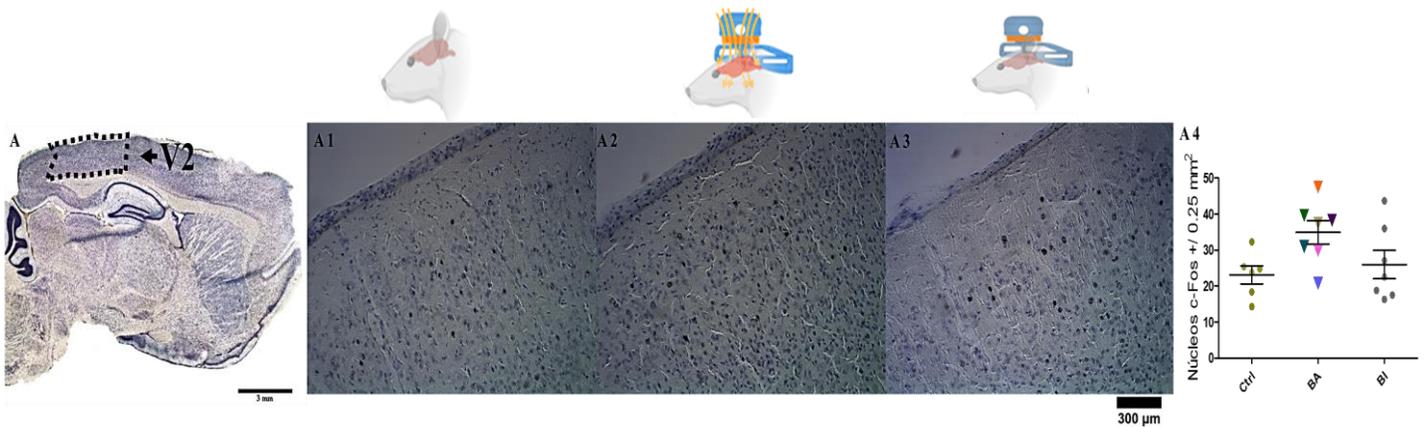
## Resultados

Con el objetivo de identificar si las sesiones de habituación impusieron condiciones que hubiesen podido ser apreciadas como estresantes por las ratas, estimamos la condición corporal de las mismas utilizando como parámetro de referencia el peso corporal. Como se muestra en la figura 7, el rango de los pesos de los animales asignados a los distintos grupos fue similar. La comparación se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía ( $F(2, 17) = 0.1276, p = 0.8811$ )



**Figura 7.** El peso corporal de los animales que fueron asignados a los grupos control (Ctrl), sujetos a estimulación (BA) y no sujetos a estimulación que están equipados con cascos-bobina (BI) no varía significativamente después de los procedimientos de habituación. Gráfica que muestra el promedio ( $\pm$  desviación estándar) los pesos corporales de los veinte animales asignados a los grupos Ctrl, Ba y BI. ANOVA de una vía ( $F(2, 17) = 0.1276, p = 0.8811$ )

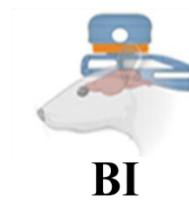
Para verificar la precisión a la cual se entregó la EMT, se tomaron fotografías de la extensión cortical que corresponde a la corteza visual secundaria (V2) en los grupos Ctrl, BA y BI (Figura 8A1-A3). Las comparaciones estadísticas obtenidas mediante una ANOVA de una vía ( $F(2, 17) = 3.359, p = 0.5380$ ) arrojaron que no existen diferencias significativas entre grupos Ctrl, BA y BI (Figura 8A4). Se considera que la presencia de c-Fos en V2 en los tres grupos refleja los niveles basales de expresión de la proteína en esa área (Herdegen, et al., 1995; Kaczmarek y Chaudhuri, 1997). Por lo tanto, no hay un efecto extendido de la EMT.



**Figura 8. El número de núcleos positivos a c-Fos no varía significativamente después del procedimiento de EMT en la V2** A) Corte histológico sagital ilustrando la localización de V2. A1-A3) Microfotografías representativas de cortes sagitales inmunomarcados con c-Fos en V2 del grupo Ctrl A1), del grupo con BA A2) y del grupo con la BI A3). A4) Gráfica que muestra la cuantificación de la densidad de núcleos c-Fos positivos por unidad de área (0.25mm<sup>2</sup>). No se encontraron diferencias significativas entre grupos. ANOVA de una vía (F (2, 17)= 3.359,  $p=0.5380$ ). Gráfica muestra el promedio ( $\pm$  desviación estándar). Escala de microfotografías= 300 $\mu$ m

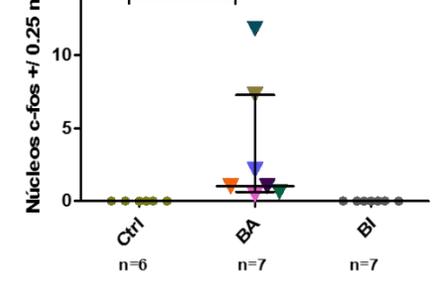
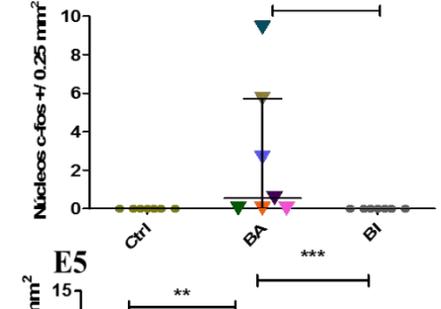
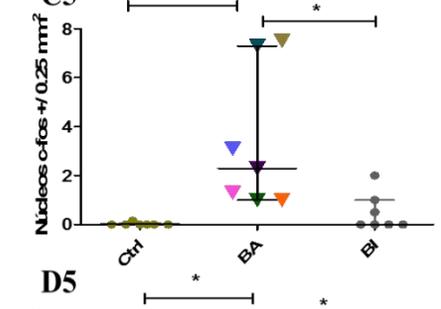
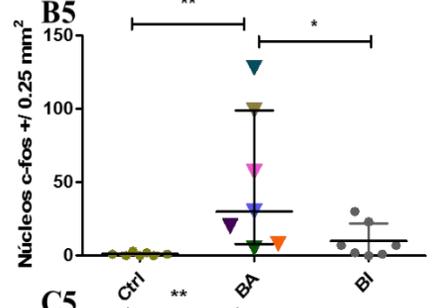
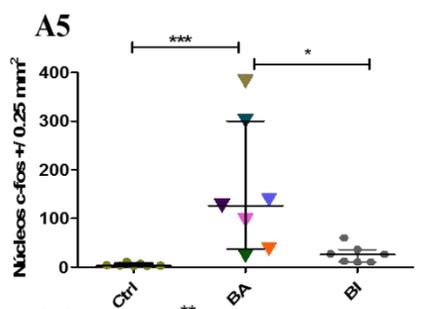
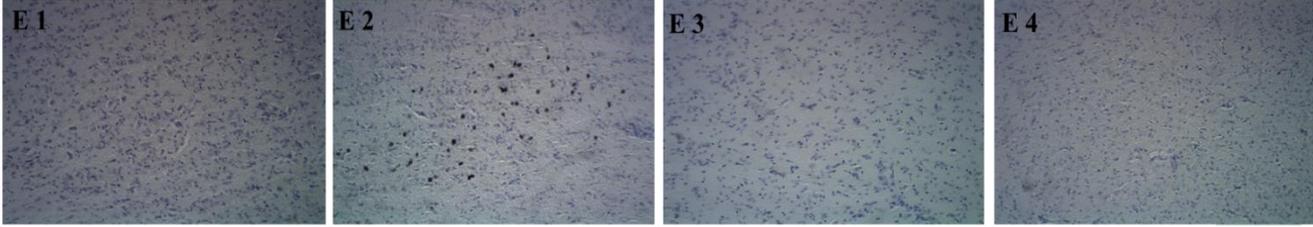
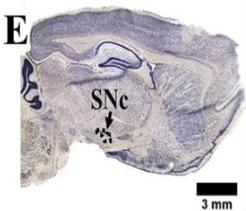
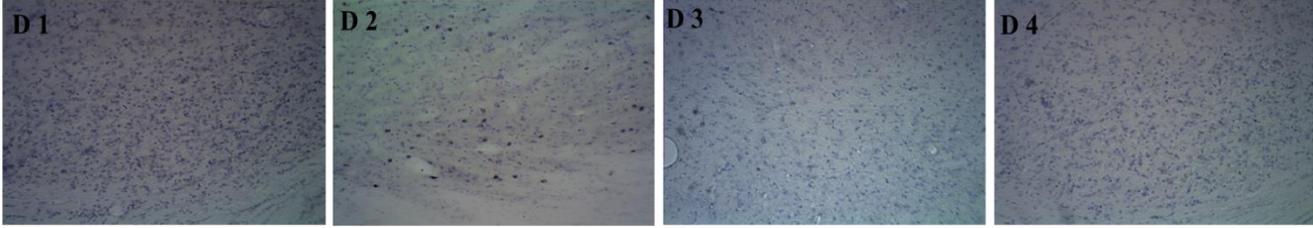
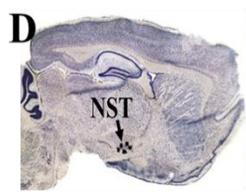
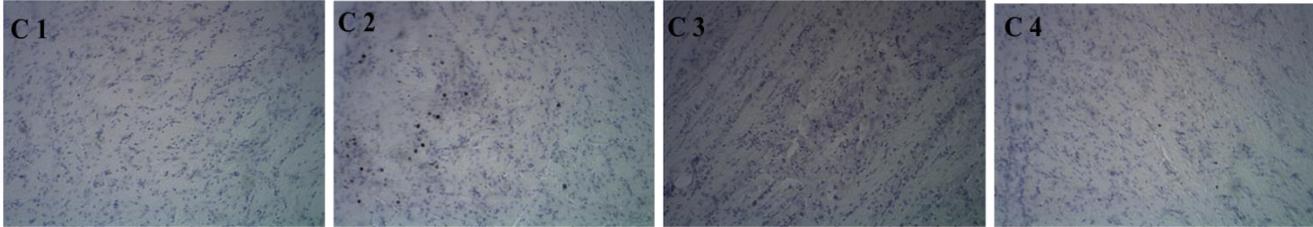
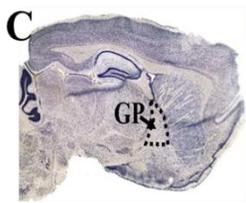
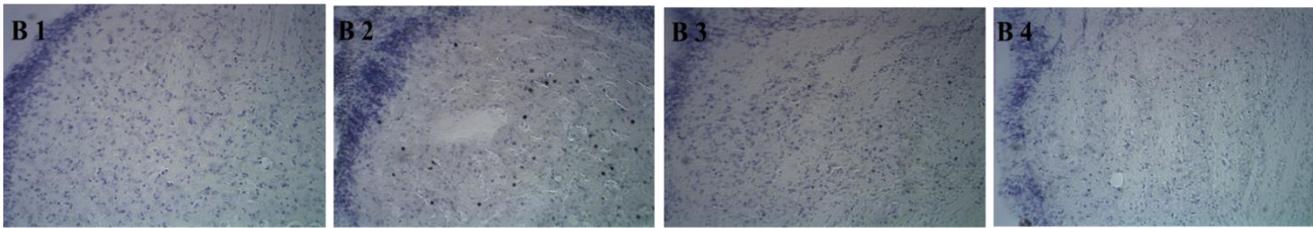
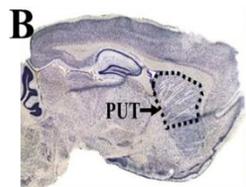
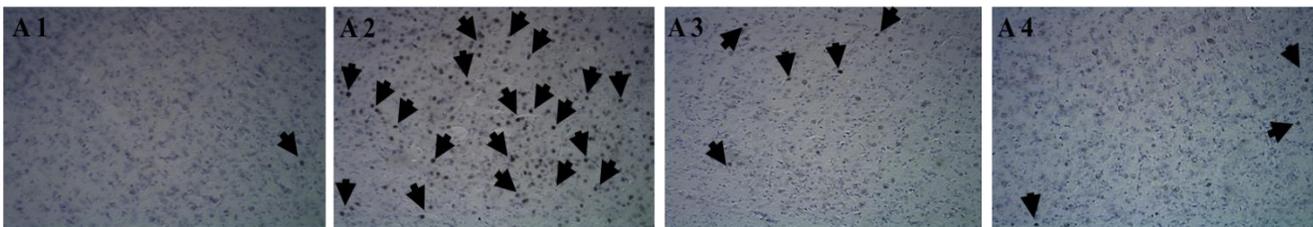
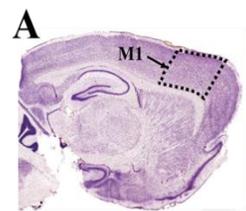
Con el objeto de evaluar si la EMT aplicada preferentemente sobre la M1 activa grupos neuronales localizados en PUT, GP, NST y SNc, se obtuvieron rebanadas de tejido cerebral de las ratas Ctrl, BA y BI (Fig. 9A1-E4). Estas rebanadas fueron utilizadas para estimar la densidad de núcleos neuronales inmuno-marcados para la proteína c-Fos (Fig. 9A1-E4), un marcador molecular de activación neuronal. Los resultados obtenidos para cada grupo se muestran graficados en las figuras 9 (A5-E5) y 10. En general, en todas las regiones, la densidad de núcleos neuronales inmuno-teñidos para c-Fos tendió a ser significativamente mayor en el grupo BA al ser comparadas con el grupo Ctrl y BI (Fig. 9 A5-E5). No obstante ello, la respuesta de activación neuronal para cada región en las ratas BA fue muy heterogénea tanto a nivel regional como individual (Fig. 9A2-8E3), con algunas ratas BA siendo muy responsivas (57%) (Fig. 9A2-E2, bajo el subtítulo Rr (ratas responsivas)) y otras poco responsivas (43%) (Fig. 9A3-E3, bajo el subtítulo Rpr (ratas poco responsivas)) al estímulo aplicado. Esta clasificación está basada en el número de células positivas a c-Fos en M1, siendo las ratas altamente responsivas aquellas que tenían más de 1024 células reclutadas y las de baja respuesta aquellas con menos de 1024 células reclutadas (Figura 10; observar línea punteada). Interesante fue el hecho de que en general, en las ratas BA, todas las regiones

de los ganglios basales consideradas en el estudio mostraron una elevación del número de células marcadas para c-Fos (Fig. 10) y congruentemente, los resultados del tamaño del efecto, atribuible a la EMT, muestran un alto efecto en la magnitud de diferencia entre los grupos Ctrl vs BA y BA vs BI en las áreas M1, PUT, GP y SNc, mientras que en el NST, la comparación Ctrl vs BA y BA vs BI reflejó un efecto medio. (Tabla 1). Estos resultados no fueron observados en las ratas BI, ni siquiera aquellas que mostraron un cierto grado de reclutamiento neuronal en la M1 y PUT en ausencia del estímulo magnético (Fig. 10), resultado que se replicó con la baja o nula diferenciación entre los grupos Ctrl vs BI, midiendo el tamaño del efecto (Tabla 1). Por otro lado, en las ratas BA poco responsivas al estímulo magnético, todas las regiones estudiadas mostraron un número bajo de núcleos neuronales marcados para c-Fos (Fig. 10). Finalmente, vale la pena destacar que el 42% de las ratas BI, mostraron un incremento moderado en la densidad núcleos inmuno-marcados para c-Fos en M1, PUT y GP (Fig. 10). Este incremento fue significativamente menor que el observado en la mayor parte de las ratas BA (Fig. 9A5-E5).



**Rr**

**Rpr**



**Figura 9. Efecto de la EMT de alta frecuencia y baja intensidad sobre M1, PUT, GP, NST y SNc.**

A) Corte histológico sagital ilustrando la localización de M1. A1-A4) Microfotografías representativas de cortes sagitales inmunomarcados con c-Fos en M1 del grupo Ctlr A1), del grupo con BA con abundante marca (Rr) A2) y con escasa marca (Rpr) A3) y del grupo con la BI A4). A5) Gráfica que muestra la cuantificación de la densidad de núcleos c-Fos positivos por unidad de área ( $0.25\text{mm}^2$ ).

B) Corte histológico sagital ilustrando la localización de PUT. B1-B4) Microfotografías representativas de cortes sagitales inmunomarcados con c-Fos en el PUT del grupo Ctlr B1), del grupo con BA con abundante marca (Rr) B2) y con escasa marca (Rpr) B3) y del grupo con la BI B4). B5) Gráfica que muestra la cuantificación de la densidad de núcleos c-Fos positivos por unidad de área ( $0.25\text{mm}^2$ ).

C) Corte histológico sagital ilustrando la localización de GP. C1-C4) Microfotografías representativas de cortes sagitales inmunomarcados con c-Fos en el GP del grupo Ctlr C1), del grupo con BA con abundante marca (Rr) C2) y con escasa marca (Rpr) C3) y del grupo con la BI C4). C5) Gráfica que muestra la cuantificación de la densidad de núcleos c-Fos positivos por unidad de área ( $0.25\text{mm}^2$ ).

D) Corte histológico sagital ilustrando la localización del NST. D1-D4) Microfotografías representativas de cortes sagitales inmunomarcados con c-Fos en el NST del grupo Ctlr D1), del grupo con BA con abundante marca (Rr) D2) y con escasa marca (Rpr) D3) y del grupo con la BI D4). D5) Gráfica que muestra la cuantificación de la densidad de núcleos c-Fos positivos por unidad de área ( $0.25\text{mm}^2$ ).

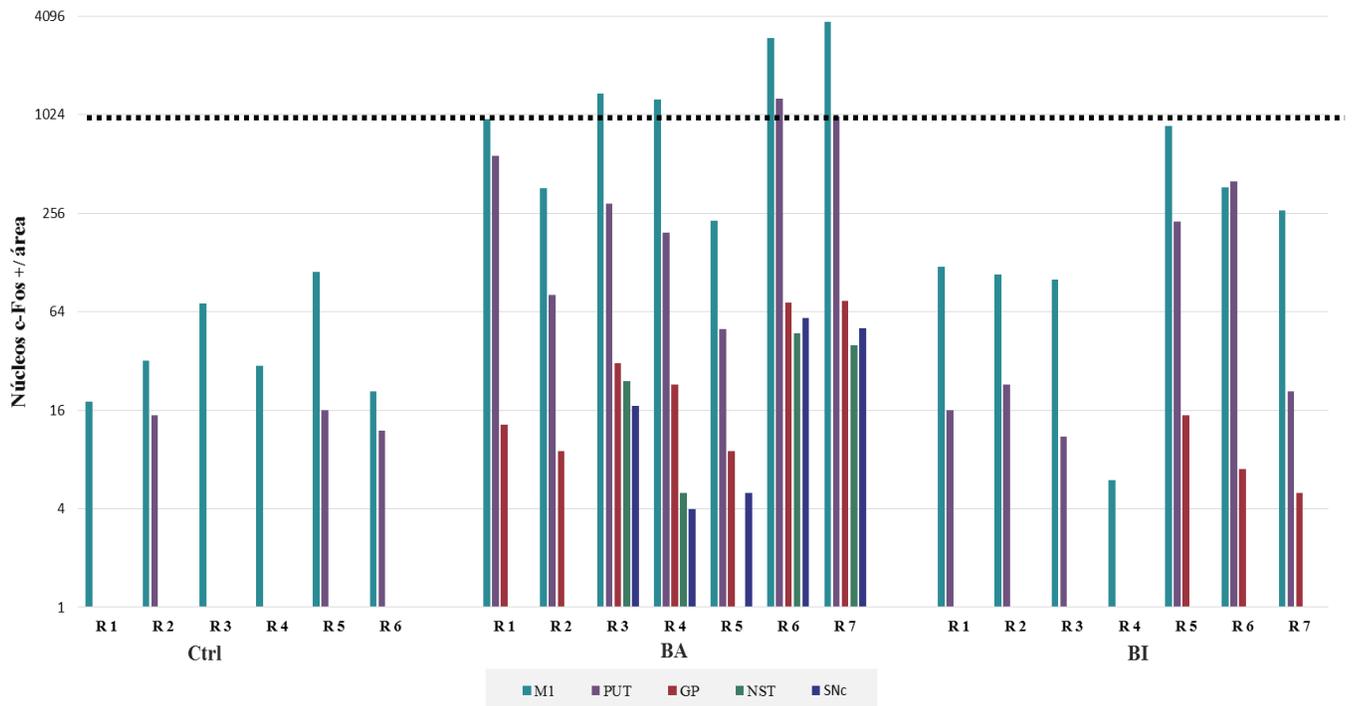
E) Corte histológico sagital ilustrando la localización de la SNc. E1-E4) Microfotografías representativas de cortes sagitales inmunomarcados con c-Fos en la SNc del grupo Ctlr E1), del grupo con BA con abundante marca (Rr) E2) y con escasa marca (Rpr) E3) y del grupo con la BI E4). E5) Gráfica que muestra la cuantificación de la densidad de núcleos c-Fos positivos por unidad de área ( $0.25\text{mm}^2$ ).

**Notas: Abreviaturas:** Control: Ctlr; Bobina Activa: BA; Bobina Inactiva: BI; Ratas responsivas: Rr; Ratas poco responsivas: Rpr; Corteza Motora Primaria: M1; Putamen: PUT; Globo Pálido: GP; Núcleo Subtalámico: NST; Substancia nigra, *pars compacta*: SNc. **Escala de microfotografías**=  $300\mu\text{m}$ . **Estadística:** M1, PUT, GP, NST y SNc no cumplieron el supuesto de homogeneidad de varianza y/o de normalidad por lo que se compararon con la prueba Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn:

\* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

Las puntas de flecha muestran ejemplos de núcleos positivos a c-Fos

Gráficas muestran la mediana ( $\pm$  rango intercuartilar)



**Figura 10.** La densidad estimada de núcleos neuronales inmunoteñidos para c-Fos en la corteza motora y en las distintas áreas ganglio-basales estudiadas fue mayor en las ratas estimuladas (BA), que en aquellas consideradas control (Ctrl) o no estimuladas equipadas con cascos-bobina (BI). La gráfica muestra que los animales del grupo BA reclutaron un mayor número de neuronas en la corteza motora primaria (M1), putamen (PUT), globo pálido (GP), núcleo subtálmico (NST) y sustancia nigra, pars compacta (SNc) que el reclutamiento observado en las ratas Ctrl y BI. Para las ratas BA, el reclutamiento fue mayor en la M1 y decayó a lo largo de los circuitos ganglio-basales. Adicionalmente, la mitad de las ratas BI mostraron un grado relativamente bajo de reclutamiento neuronal en M1 y PUT. El resto de los animales y de las estructuras ganglio-basales en el grupo de ratas BI mostraron valores basales de marcaje (similares a Ctrl) incluso en M1 y en PUT. Finalmente, las ratas Ctrl no mostraron evidencia de reclutamiento neuronal más allá de los valores basales (expresión de c-Fos en el cerebro en ausencia de estimulación novedosa (Chung, 2015)) en ninguna de las estructuras ganglio-basales estudiadas. La línea negra discontinua representa un umbral que al ser rebasado por el número de células reclutadas en M1, puede predecir que haya actividad en el resto de las estructuras.

		Área				
		M1	PUT	GP	NST	SNe
<b>Comparación entre → grupos</b>	<b>Tamaño del efecto total →</b>	0.6849	0.7467	0.64	0.4	0.6029
	Ctrl vs BA	0.6321	0.6887	0.73	0.38	0.5223
	BA vs BI	0.5349	0.584	0.58	0.3862	0.5223
	Ctrl vs BI	0.1182	0.1276	0.0427	0	0

**Tabla 1. Tamaño del efecto y magnitud de diferencia entre grupos adjudicado a la EMT de alta frecuencia y baja intensidad.** Se muestra el valor del tamaño del efecto total de la EMT de alta frecuencia y baja intensidad en cada área y la comparación entre grupos por la presencia de la variable independiente. Para una mejor visualización, las celdas se iluminaron de acuerdo al puntaje que categoriza el tamaño del efecto: 0.10 (efecto pequeño: rojo), 0.30 (efecto medio: amarillo) y 0.50 (efecto alto: verde) (Field et al., 2012). Siendo que, en términos generales, las diferencias entre los grupos Ctrl vs BA y BA vs BI pueden ser atribuibles al alto efecto de la presencia de la variable independiente (EMT de alta frecuencia y baja intensidad). Interesantemente, en las comparaciones de los grupos Ctrl vs BI, en los que la EMT de alta frecuencia y baja intensidad no estuvo presente, se distinguen tamaños del efecto de bajo a nulo.

 Alto Medio Bajo

## Discusión

Las alteraciones motoras observadas en la EP son el resultado de un proceso de hipersincronía de la actividad en la frecuencia  $\beta$  de los ensambles de neuronas localizados en las estructuras de los GB del cerebro, que se instaura en ausencia de DA (Dejean et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2017). La fragmentación de esta hipersincronía en los ensambles ganglio-basales mediante la aplicación de estímulos en frecuencias gamma altas atenúa significativamente las manifestaciones motoras de la EP, incluso en ausencia de DA (Muthuraman et al., 2020). Infortunadamente, hasta el momento, esta forma de terapia solo puede ser provista a un número selecto de personas mediante la implantación quirúrgica de electrodos de estimulación profunda, situación que pone en riesgo la salud y limita el acceso

de los pacientes a la terapia debido a sus altos costos. Así, el desarrollo de procedimientos y equipos no invasivos, portátiles y de bajo costo podrían contribuir a establecer una condición de bienestar al paciente con EP.

En este trabajo planteamos la posibilidad de regular la hipersincronía a través de modular corticalmente a la red utilizando a la EMT de alta frecuencia (135 Hz) y baja intensidad (10mT) preferentemente sobre la M1, área cortical que en condiciones naturales promueve la generación de oscilaciones gamma en la circuitería ganglio-basal (Arnulfo et al., 2020). En un primer paso, quisimos evaluar si el estímulo comentado y aplicado a la M1 activaría en verdad grupos neuronales en la circuitería ganglio-basal de ratas intactas. Los resultados presentados sugieren que esto es así (Tabla 1). Las ratas BA mostraron un aumento de la densidad de núcleos marcados para c-Fos en el PUT, GP, NST y SNc en respuesta a la aplicación de EMT sobre la M1 al ser comparadas con ratas Ctrl y BI (Figura 9). El reclutamiento neuronal fue mayor en la M1 y decayó de proximal a distal conforme la información recorrió las vías neuronales de los GB (Fig. 10). La respuesta observada fue idiosincrática, con el 57% ratas BA siendo muy responsivas y el 43% siendo menos responsivas (Figura 10, observar línea puntuada). Aunque desconocemos las causas de la variación interindividual de las respuestas, una de las posibilidades es que dependan del estado previo de los circuitos que reciben el estímulo (Hannah et al., 2016). Una posible solución sería combinar el uso de EMT con el registro de electroencefalograma (EEG) para cronometrar con precisión la entrega de EMT de acuerdo con los diferentes estados de la excitabilidad cortical (Hannah et al., 2016). Se sabe que la excitabilidad de M1 depende de la fase de actividad oscilatoria en curso y de las propias dinámicas corticales (Luczak et al., 2015). Por lo que, probablemente, los pulsos de EMT administrados al azar estimulan poblaciones de neuronas en diferentes estados funcionales (Hannah et al., 2016). A este respecto, y siguiendo las premisas del modelo sobre los ritmos que subyacen al movimiento, la sugerencia para obtener respuestas más uniformes entre individuos sería que los pulsos de la EMT deberían entregarse cuando la mayoría de los ensambles están en la transición de la desincronización  $\beta$  (pre movimiento) hacia la sincronización gamma (durante el movimiento) y/o cuando el ritmo gamma ya se esté instalado, de forma que, la EMT sólo potencie la transición entre ensambles (Armstrong et al., 2018; Pfurtscheller et al., 2003; Szurhaj et al., 2003), con lo cual se tendría que coordinar el tiempo de estimulación/silencios de la EMT

con la operación *in vivo* de los ensambles. En cuanto a nuestros datos, especulamos que los resultados de las ratas que respondieron con mayor reclutamiento celular se debieron a que la EMT se entregó primordialmente cuando los ensambles se encontraban en la culminación de la fase de desincronización  $\beta$  e inicio del ritmo gamma; en cambio, a las ratas con menor reclutamiento celular se les entregó el pulso de EMT en los periodos con mayor número de ensambles en la sincronización  $\beta$  y/o al inicio de la desincronización  $\beta$ , dificultando el enganche entre el ritmo proveído exógenamente y el endógeno (Joundimet et al., 2012; Hannah et al., 2016). También ayudará el monitorear cuidadosamente y cuantificar el desempeño de las ratas en alguna tarea motora, antes y durante la prueba para ver si existe una relación entre las características de la conducta locomotriz (e.g., conducta exploratoria) y el reclutamiento neuronal que tiene lugar en respuesta a la EMT a lo largo de los circuitos ganglio-basales estudiados.

Un factor más a tomar en cuenta es que las dinámicas corticales están embebidas en circuitos reverberantes que están siendo constantemente influenciadas por las oscilaciones que el tálamo genera per se o influenciado por las oscilaciones que le convergen provenientes de estructuras de los GB y otras áreas corticales sensoriales (Lanciego et al., 2012), como es el caso del solapamiento de algunas regiones de la M1 y la corteza somatosensorial primaria (S1) (Halley, et al., 2020). Adicionalmente, las conexiones entre tálamo y corteza son heterogéneas y no recíprocas en localización, siendo regularmente asincrónicas en vigilia, con actividad sincrónica transitiva muy puntual (Wichmann y DeLong, 1999), por lo que las terminales talámicas tienen una influencia compleja sobre las oscilaciones espacio-temporales de los ensambles corticales (Haber y Calzavara, 2009). Sin embargo, aún se desconoce con precisión las dinámicas de estas oscilaciones por lo que se requiere de registro *in vivo* para el posterior modelaje matemático que coadyuve a la creación de protocolos de estimulación ad hoc (Brittain, y Brown, 2020).

De cualquier forma, nuestros resultados son compatibles con los reportados para animales Ctrl no estimulados en los que se observó una traducción basal de c-Fos a lo largo de los circuitos ganglio-basales (Chung, 2015), y con aquellos reportados por Hinder (2014) y Hannah et al (2016) quienes coinciden en concluir que las diferencias individuales de las

respuestas dadas a un protocolo de EMT pueden alcanzar un rango de entre 40 y el 60 por ciento, por lo que enfatizan la importancia de dar un seguimiento individualizado.

Una observación intrigante hecha en el presente trabajo fue aquella que muestra que el 42% de las ratas BI mostraron una activación y reclutamiento moderados en M1 y en PUT, que aunque no resultó significativo con respecto a las ratas Ctrl, en algunos de los casos alcanzó valores semejantes a los observados para estas estructuras en dos de las ratas BA. Este resultado pudiese ser atribuido a que el hábito de portar la bobina en estas ratas BI no se alcanzó totalmente con dos semanas de habituación, lo cual se ve reflejado en una elevación discreta en la actividad del circuito M1-PUT, estructuras relacionadas a aprendizajes de hábitos (Pérez-Ortega y Bargas, 2017), sin afectar el resto de las estructuras neurales estudiadas. En apoyo a esta posibilidad está la observación que documenta que el resto de las ratas BI muestran densidades de neuronas positivas a c-Fos muy similares a las observadas en los niveles de activación de las ratas Ctrl, es decir, expresión basal de c-Fos en ausencia de estimulación novedosa (Chung, 2015) por lo que se podría especular que la habituación fue exitosa en estas ratas. Adicionalmente, si la habituación no fue exitosa para algunas ratas del grupo BI e incluso de las ratas de BA, es posible que el solapamiento funcional de las regiones de M1 y S1 que representan las patas delanteras y traseras de las ratas (Halley, et al., 2020) tuvieran un efecto sobre la actividad de PUT y GP. Por lo que, futuros estudios, deberían enfocarse en realizar un registro previo, con el propósito de localizar los circuitos a estimular. También es posible que la remoción del casco-bobina al final del periodo experimental pudiese haber inducido una respuesta motora menor. Experimentos dirigidos a explorar los efectos de la habituación por periodos más largos o no habituadas o bien anestesiadas infundiendo anestésicos a través de catéteres femorales hacia el final de la sesión experimental y previo a la remoción del casco-bobina, ayudarán a resolver en parte esta incógnita.

Finalmente, dado el estado acotado de la presente investigación, es ineludible el comentar sobre las perspectivas y direcciones del presente trabajo. Es obvio que, como primera medida, se requiere fortalecer el poder estadístico del mismo a través de incrementar el tamaño muestral de los grupos aquí considerados. Un segundo punto sería el de introducir un cuarto grupo conformado por ratas trabajadas de la misma manera que las BA, pero

sometidas a anestesia durante el periodo de estimulación. Esto nos ayudaría a establecer la especificidad de la respuesta. Tercero, hacer evaluaciones de la densidad de núcleos marcados para c-Fos en las subregiones del tálamo en los grupos Ctrl, BA y BI, nos permitiría establecer la selectividad de la respuesta observada. Un cuarto punto sería que debido a que el estado oscilatorio de la red en M1 influye en la respuesta motora (Luczak et al., 2015), sería idóneo el poder sincronizar el estímulo aplicado con la actividad desplegada por los ensambles neuronales en M1, con el objeto de intentar incrementar la posibilidad de inducir reclutamiento celular a estos, dándole así un mayor peso sináptico a la salida de M1 en dirección a los ganglios basales. Algo similar podría considerarse con relación a la posibilidad de incidir con mayor eficacia sobre las oscilaciones propias de los circuitos ganglio-basales. Finalmente, en un futuro inmediato, se deberán realizar experimentos equivalentes en ratas que modelen elementos centrales de la EP. Una potencial unidad experimental serían roedores a los que se les inyecte rotenona, un pesticida que elimina las células DAérgicas de la SNc, y que replica en la rata muchas características conductuales, funcionales, morfológicas, bioquímicas, celulares y moleculares tanto a nivel central como periférico que desarrollan los fenotipos parkinsónicos en el ser humano (Greenamyre et al., 2010). Adicionalmente, este modelo nos ayudará a evaluar conductualmente las repercusiones funcionales de la EMT de alta frecuencia y baja intensidad sobre el fenotipo motor de las ratas, aspecto que en condiciones normales no es sencillo evaluar porque este tipo de estimulación no es suficientemente potente para generar una respuesta por arriba del umbral motor (Ogiue-Ikeda y Ueno, 2003; Van De Ruit y Grey, 2016), pero que si es susceptible a evaluar indirectamente en pruebas conductuales pre y post estimulación, en el modelo animal de EP (Gómez-Chavarín, et al., 2019).

## **Conclusión**

La EMT de alta frecuencia y baja intensidad aplicada preferentemente sobre M1 es una herramienta que parece promover la activación y el reclutamiento neuronal en estructuras encefálicas profundas de los ganglios basales. Sin embargo, estudios futuros deberán confirmar y ampliar los resultados reportados en este trabajo.

## Referencias

- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., y Bargas, J. (2019). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 49(6), 834-848.
- Armstrong, S., Sale, M. V. y Cunnington, R. (2018). Neural oscillations and the initiation of voluntary movement. *Frontiers in psychology*, 9, 2509.
- Arnulfo, G., Wang, S. H., Myrov, V., Toselli, B., Hirvonen, J., Fato, M. M., y Palva, J. M. (2020). Long-range phase synchronization of high-frequency oscillations in human cortex. *Nature communications*, 11(1), 1-15.
- Ashkan, K., Rogers, P., Bergman, H. y Ughratdar, I. (2017). Insights into the mechanisms of deep brain stimulation. *Nature Reviews Neurology*, 13(9), 548.
- Aydin-Abidin, S., Trippe, J., Funke, K., Eysel, U. T., y Benali, A. (2008). High-and low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation differentially activates c-Fos and zif268 protein expression in the rat brain. *Experimental brain research*, 188(2), 249-261.
- Babiloni, C., Del Percio, C., Vecchio, F., Sebastiano, F., Di Gennaro, G., Quarato, P. P., y Mirabella, G. (2016). Alpha, beta and gamma electrocorticographic rhythms in somatosensory, motor, premotor and prefrontal cortical areas differ in movement execution and observation in humans. *Clinical Neurophysiology*, 127(1), 641-654.
- Belluscio, M. A., Escande, M. V., Keifman, E., Riquelme, L. A., Murer, M. G. y Zold, C. L. (2014). Oscillations in the basal ganglia in Parkinson's disease: Role of the striatum. *Basal Ganglia*, 3(4), 203-212.
- Belmaker, B., Fitzgerald, P., George, M. S., Lisanby, S. H., Pascual-Leone, A., Schlaepfer, T. E., y Wassermann, E. (2003). Managing the risks of repetitive transcranial stimulation. *CNS Spectr*, 8(7), 489.
- Benabid, A. L. (2003). Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Current opinion in neurobiology*, 13(6), 696-706.
- Bergman, H. y Deuschl, G. (2002). Pathophysiology of Parkinson's disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 17(S3), S28-S40.
- Bevan, M. D., Atherton, J. F. y Baufreton, J. (2006). Cellular principles underlying normal and pathological activity in the subthalamic nucleus. *Current opinion in neurobiology*, 16(6), 621-628.

- Brittain, J. S., y Brown, P. (2020). Oscillations and the basal ganglia: motor control and beyond. *Neuroimage*, 85, 637-647.
- Bronfeld, M. y Bar-Gad, I. (2011). Loss of specificity in basal ganglia related movement disorders. *Frontiers in systems neuroscience*, 5, 38.
- Brundin, P., Li, J. Y., Holton, J. L., Lindvall, O. y Revesz, T. (2008). Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(10), 741-745.
- Buzsaki, G. (2006). *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press.
- Buzsaki, G. (2019). *The brain from inside out*. Oxford University Press.
- Buzsáki, G., y Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, 304(5679), 1926-1929.
- Chung, L. (2015). A brief introduction to the transduction of neural activity into Fos signal. *Development & reproduction*, 19(2), 61.
- Chung, J. W., Burciu, R. G., Ofori, E., Coombes, S. A., Christou, E. A., Okun, M. S., y Vaillancourt, D. E. (2018). Beta-band oscillations in the supplementary motor cortex are modulated by levodopa and associated with functional activity in the basal ganglia. *NeuroImage: clinical*, 19, 559-571.
- Damodaran, S., Cressman, J. R., Jedrzejewski-Szmek, Z. y Blackwell, K. T. (2015). Desynchronization of fast-spiking interneurons reduces  $\beta$ -band oscillations and imbalance in firing in the dopamine-depleted striatum. *Journal of Neuroscience*, 35(3), 1149-1159.
- Daval, J. L., Nakajima, T., Gleiter, C. H., Post, R. M., y Marangos, P. J. (1989). Mouse brain c-fos mRNA distribution following a single electroconvulsive shock. *Journal of neurochemistry*, 52(6), 1954-1957.
- Dejean, C., Gross, C. E., Bioulac, B. y Boraud, T. (2008). Dynamic changes in the cortex-basal ganglia network after dopamine depletion in the rat. *Journal of neurophysiology*, 100(1), 385-396.
- DeLong, M., y Wichmann, T. (2010). Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders. *Clinical EEG and neuroscience*, 41(2), 61-67.
- Dufor, T., Grehl, S., Tang, A. D., Doulazmi, M., Traoré, M., Debray, N. y Sherrard, R. M. (2019). Neural circuit repair by low-intensity magnetic stimulation requires cellular magnetoreceptors and specific stimulation patterns. *Science advances*, 5(10), 9847.
- Dupre, K. B., Cruz, A. V., McCoy, A. J., Delaville, C., Gerber, C. M., Eyring, K. W. y Walters, J. R. (2016). Effects of L-dopa priming on cortical high beta and high

gamma oscillatory activity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 86, 1-15.

- Field, A., Miles, J. y Field, Z. (2012). *Discovering statistics using R*. Sage publications.
- Fiñana, I. T., y Leone, Á. P. (2014). *Estimulación magnética transcraneal y neuromodulación*. Elsevier.
- Garcia, L., d'Alessandro, G., Bioulac, B., y Hammond, C. (2005). High-frequency stimulation in Parkinson's disease: more or less? *Trends in neurosciences*, 28(4), 209-216.
- Gatev, P., Darbin, O. y Wichmann, T. (2006). Oscillations in the basal ganglia under normal conditions and in movement disorders. *Movement disorders*, 21(10), 1566-1577.
- Goldberg, J. A., Boraud, T., Maraton, S., Haber, S. N., Vaadia, E. y Bergman, H. (2002). Enhanced synchrony among primary motor cortex neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine primate model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 22(11), 4639-4653.
- Gómez-Chavarín, M., Prado-Prone, G., Padilla, P., Ramírez Santos, J., Gutiérrez-Ospina, G., y García-Macedo, J. A. (2019). Dopamine Released from TiO<sub>2</sub> Semicrystalline Lattice Implants Attenuates Motor Symptoms in Rats Treated with 6-Hydroxydopamine. *ACS omega*, 4(5), 7953-7962.
- Grehl, S., Martina, D., Goyenvalle, C., Deng, Z. D., Rodger, J. y Sherrard, R. M. (2016). In vitro magnetic stimulation: A simple stimulation device to deliver defined low intensity electromagnetic fields. *Frontiers in neural circuits*, 10, 85.
- Greenamyre, J.T., Cannon, J.R., Drolet, R., y Mastroberardino P.G. (2010) Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 31(4): 141–142.
- Haber, S. N., y Calzavara, R. (2009). The cortico-basal ganglia integrative network: the role of the thalamus. *Brain research bulletin*, 78(2-3), 69-74.
- Halley, A. C., Baldwin, M. K., Cooke, D. F., Englund, M., y Krubitzer, L. (2020). Distributed motor control of limb movements in rat motor and somatosensory cortex: the sensorimotor amalgam revisited. *Cerebral Cortex*, 30(12), 6296-6312.
- Hannah, R., Rocchi, L., Tremblay, S. y Rothwell, J. C. (2016). Controllable pulse parameter TMS and TMS-EEG as novel approaches to improve neural targeting with rTMS in human cerebral cortex. *Frontiers in neural circuits*, 10, 97.
- Herdegen, T., Kovary, K., Buhl, A., Bravo, R., Zimmermann, M., y Gass, P. (1995). Basal expression of the inducible transcription factors c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB,

- and Krox-24 in the adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 354(1), 39-56.
- Hinder, M. R., Goss, E. L., Fujiyama, H., Canty, A. J., Garry, M. I., Rodger, J., y Summers, J. J. (2014). Inter-and intra-individual variability following intermittent theta burst stimulation: implications for rehabilitation and recovery. *Brain stimulation*, 7(3), 365-371.
- Holgado, A. J. N., Terry, J. R. y Bogacz, R. (2010). Conditions for the generation of beta oscillations in the subthalamic nucleus–globus pallidus network. *Journal of Neuroscience*, 30(37), 12340-12352.
- Hutchison, W. D., Dostrovsky, J. O., Walters, J. R., Courtemanche, R., Boraud, T., Goldberg, J. y Brown, P. (2004). Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9240-9243.
- Joundi, R. A., Jenkinson, N., Brittain, J. S., Aziz, T. Z., y Brown, P. (2012). Driving oscillatory activity in the human cortex enhances motor performance. *Current Biology*, 22(5), 403-407.
- Kaczmarek, L., y Chaudhuri, A. (1997). Sensory regulation of immediate–early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Research Reviews*, 23(3), 237-256.
- Klaus, A., Alves da Silva, J. y Costa, R. M. (2019). What, if, and when to move: basal ganglia circuits and self-paced action initiation. *Annual review of neuroscience*, 42, 459-483.
- Kraus, D., Naros, G., Bauer, R., Khademi, F., Leão, M. T., Ziemann, U., y Gharabaghi, A. (2016). Brain state-dependent transcranial magnetic closed-loop stimulation controlled by sensorimotor desynchronization induces robust increase of corticospinal excitability. *Brain Stimulation*, 9(3), 415-424.
- Lanciego, J. L., Luquin, N. y Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12), a009621.
- Lee, J. Y., Kim, S. H., Ko, A. R., Lee, J. S., Yu, J. H., Seo, J. H. y Cho, S. R. (2013). Therapeutic effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in an animal model of Parkinson's disease. *Brain research*, 1537, 290-302.
- Lintas, A., Silkis, I. G., Albéri, L. y Villa, A. E. (2012). Dopamine deficiency increases synchronized activity in the rat subthalamic nucleus. *Brain research*, 1434, 142-151.

- Lozano, A. M., Dostrovsky, J., Chen, R., y Ashby, P. (2002). Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption. *The Lancet Neurology*, 1(4), 225-231.
- Lu, H., Meng, Q., Peng, K., Cermak, S., Stein, E., Yang, Y., y Choa, F. (2019). Focal transcranial magnetic stimulation (TMS) of the rat brain: coil design, c-fos mapping and electrophysiology. *Brain Stimulation*, 12(2).
- Luczak, A., McNaughton, B. L. y Harris, K. D. (2015). Packet-based communication in the cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(12), 745-755.
- Málly, J., Farkas, R., Tothfalusi, L. y Stone, T. W. (2004). Long-term follow-up study with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in Parkinson's disease. *Brain research bulletin*, 64(3), 259-263.
- Málly, J., Stone, T. W., Sinkó, G., Geisz, N., y Dinya, E. (2018). Long term follow-up study of non-invasive brain stimulation (NBS) (rTMS and tDCS) in Parkinson's disease (PD). Strong age-dependency in the effect of NBS. *Brain Research Bulletin*, 142, 78-87.
- McCarthy, M. M., Moore-Kochlacs, C., Gu, X., Boyden, E. S., Han, X., y Kopell, N. (2011). Striatal origin of the pathologic beta oscillations in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11620-11625.
- McIntyre, C. C. y Hahn, P. J. (2010). Network perspectives on the mechanisms of deep brain stimulation. *Neurobiology of disease*, 38(3), 329-337.
- Milardi, D., Quartarone, A., Bramanti, A., Anastasi, G., Bertino, S., Basile, G. A. y Cacciola, A. (2019). The cortico-basal ganglia-cerebellar network: past, present and future perspectives. *Frontiers in systems neuroscience*, 13, 61.
- Mimenza-Alvarado, A. J., Aguilar-Navarro, S. G., Martinez-Carrillo, F. M., Ríos-Ponce, A. E., y Villafuerte, G. (2021). Use of Fast Gamma Magnetic Stimulation Over the Left Prefrontal Dorsolateral Cortex for the Treatment of MCI and Mild Alzheimer's Disease: A Double-Blind, Randomized, Sham-Controlled, Pilot Study. *Frontiers in neurology*, 1543.
- Montgomery Jr, E. B. y Gale, J. T. (2008). Mechanisms of action of deep brain stimulation (DBS). *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(3), 388-407.
- Morgante, L., Morgante, F., Moro, E., Epifanio, A., Girlanda, P., Ragonese, P. y Savettieri, G. (2007). How many parkinsonian patients are suitable candidates for deep brain stimulation of subthalamic nucleus? Results of a questionnaire. *Parkinsonism & related disorders*, 13(8), 528-531.

- Muthuraman, M., Bange, M., Koirala, N., Ciolac, D., Pinteá, B., Glaser, M. y Groppa, S. (2020). Cross-frequency coupling between gamma oscillations and deep brain stimulation frequency in Parkinson's disease. *Brain*, 143(11), 3393-3407.
- Nambu, A. (2011). Somatotopic organization of the primate basal ganglia. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 26.
- Ogiue-Ikeda, M., Kawato, S., y Ueno, S. (2003). The effect of transcranial magnetic stimulation on long-term potentiation in rat hippocampus. *IEEE transactions on magnetics*, 39(5), 3390-3392.
- Olanow, C. W., Obeso, J. A., y Stocchi, F. (2006). Drug insight: continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Nature clinical practice Neurology*, 2(7), 382-392.
- Paxinos, G., y Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier
- Park, C., Worth, R. M. y Rubchinsky, L. L. (2010). Fine temporal structure of beta oscillations synchronization in subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Journal of neurophysiology*, 103(5), 2707-2716.
- Pérez-Ortega, J., y Bargas, J. (2017). Changes in the Striatal Network Connectivity in Parkinsonian and Dyskinetic Rodent Models. In *Pathophysiology-Altered Physiological States*. IntechOpen.
- Peterson, D. A., Sejnowski, T. J., y Poizner, H. (2010). Convergent evidence for abnormal striatal synaptic plasticity in dystonia. *Neurobiology of disease*, 37(3), 558-573.
- Plotkin, J. L., y Goldberg, J. A. (2019). Thinking outside the box (and arrow): current themes in striatal dysfunction in movement disorders. *The Neuroscientist*, 25(4), 359-379.
- Pfurtscheller, G., Graimann, B., Huggins, J. E., Levine, S. P., y Schuh, L. A. (2003). Spatiotemporal patterns of beta desynchronization and gamma synchronization in corticographic data during self-paced movement. *Clinical neurophysiology*, 114(7), 1226-1236.
- Rhodes, E., Gaetz, W. C., Marsden, J., y Hall, S. D. (2018). Transient alpha and beta synchrony underlies preparatory recruitment of directional motor networks. *Journal of cognitive neuroscience*, 30(6), 867-875.
- Rohan, M. L., Yamamoto, R. T., Ravichandran, C. T., Cayetano, K. R., Morales, O. G., Olson, D. P., y Cohen, B. M. (2014). Rapid mood-elevating effects of low field magnetic stimulation in depression. *Biological psychiatry*, 76(3), 186-193.

- Rosin, B., Slovik, M., Mitelman, R., Rivlin-Etzion, M., Haber, S. N., Israel, Z., y Bergman, H. (2011). Closed-loop deep brain stimulation is superior in ameliorating parkinsonism. *Neuron*, 72(2), 370-384.
- Rossini, P. M., Burke, D., Chen, R., Cohen, L. G., Daskalakis, Z., Di Iorio, R. y Ziemann, U. (2015). Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an IFCN Committee. *Clinical neurophysiology*, 126(6), 1071-1107.
- Rubchinsky, L. L., Park, C., y Worth, R. M. (2012). Intermittent neural synchronization in Parkinson's disease. *Nonlinear dynamics*, 68(3), 329-346.
- Singh, A. (2018). Oscillatory activity in the cortico-basal ganglia-thalamic neural circuits in Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 48(8), 2869-2878.
- Surmeier, D. J., Obeso, J. A. y Halliday, G. M. (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(2), 101.
- Szurhaj, W., Derambure, P., Labyt, E., Cassim, F., Bourriez, J. L., Isnard, J., y Mauguière, F. (2003). Basic mechanisms of central rhythms reactivity to preparation and execution of a voluntary movement: a stereoelectroencephalographic study. *Clinical neurophysiology*, 114(1), 107-119.
- Tamburin, S., Manganotti, P., Marzi, C. A., Fiaschi, A., y Zanette, G. (2002). Abnormal somatotopic arrangement of sensorimotor interactions in dystonic patients. *Brain*, 125(12), 2719-2730.
- Thut, G., Veniero, D., Romei, V., Miniussi, C., Schyns, P., y Gross, J. (2011). Rhythmic TMS causes local entrainment of natural oscillatory signatures. *Current biology*, 21(14), 1176-1185.
- Van De Ruit, M., y Grey, M. J. (2016). The TMS map scales with increased stimulation intensity and muscle activation. *Brain Topography*, 29(1), 56-66.
- Vernet, M., Stengel, C., Quentin, R., Amengual, J. L., y Valero-Cabré, A. (2019). Entrainment of local synchrony reveals a causal role for high-beta right frontal oscillations in human visual consciousness. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.
- Volkman, J., Daniels, C., y Witt, K. (2010). Neuropsychiatric effects of subthalamic neurostimulation in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(9), 487-498.
- Wichmann, T. y DeLong, M. R. (1999). Oscillations in the basal ganglia. *Nature*, 400(6745), 621-622.

- Wichmann, T. y DeLong M. R, (2003) Neurocircuitry of Parkinson's disease. En Leung, C. M. *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress. Hong Kong Journal of Psychiatry*, 13(3), 31-37.
- Yousif, N., Bain, P. G., Nandi, D., y Borisjuk, R. (2020). A population model of deep brain stimulation in movement disorders from circuits to cells. *Frontiers in human neuroscience*, 14, 55.