



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIA COGNITIVA

**ESTUDIO FARMACOLÓGICO DEL MICROCIRCUITO ESTRIATAL
DISCINÉTICO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

VLADIMIR MELECIO CALDERÓN ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, agosto, 2022



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

A mi tutor, Dr. José Bargas y a la Dra. Elvira Galarraga, formadores de mis redes y ensamblajes neuronales actuales encargadas del pensamiento científico.

A mis padres, Leopoldo y Mercy por su esfuerzo, apoyo y amor incondicional. A mi hermano Pável por ser un referente de vida y a mi sobrina Helenita.

A mi esposa Jahayra, por su compañía en este viaje sin GPS llamado vida.

A mis compañeros autores, de laboratorio, de Instituto de Fisiología Celular y otras entidades por ser pares y maestros a la vez.

A los técnicos, Antonio Laville, Dagoberto Tapia, Claudia V. Rivera, Gabriela Xóchitl, Dra. Ariadna Aparicio Juárez, Ana María Escalante Gonzalbo, Francisco Pérez Eugenio por sus prontas sugerencias, soluciones y retroalimentación en distintos retos.

Al comité tutorial por su retroalimentación efectiva y mostrar las áreas de oportunidad.

Al Posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas, por la profesionalidad de su personal, su organización y la apertura a la multi- e interdisciplina

A la UNAM que desde mis épocas tardías de adolescencia, tempranas y ya no tan tempranas de mi vida adulta ha permitido una formación integral en un sistema de educación pública, inimaginable en otros Estados.

Al CONACyT por la beca 329872, así como los proyectos PAPIIT IN 202920, IN 203020 y de CONACyT F003-154039.

Todo éxito individual subyace de un esfuerzo colectivo.

Contenido

Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Introducción.....	1
Planteamiento del problema.....	5
Hipótesis.....	5
Objetivos.....	6
Materiales y métodos.....	6
Protocolo para inducir discinesias por L-DOPA.....	6
Rebanadas de cerebro para imagenología de calcio.....	9
Análisis de imagenología de calcio.....	10
Resultados.....	12
La conducta como indicador de hemiparkinsonismo y discinesias.....	12
Amantadina y clozapina reducen de manera similar las discinesias inducidas por L-DOPA.....	14
Efecto en la actividad del multirregistro estriatal durante el <i>on-state</i> después de la administración de amantadina y clozapina.....	15
Modulación de los ensambles neuronales estriatales durante el <i>on-state</i> después de la administración de amantadina y clozapina.....	18
Efecto en las conexiones funcionales de los ensambles neuronales estriatales durante el <i>on-state</i> después de la administración de amantadina y clozapina.....	20
Clasificación automática de datos de imagenología de calcio.....	22
Resumen de resultados.....	25
Discusión.....	26
Conclusiones.....	28
Anexo I.....	29
Referencias.....	36

Resumen

En este proyecto de investigación se desarrolló una metodología analítica basada en los ensambles neuronales para evaluar la acción de amantadina y clozapina en registro múltiple y simultáneo de neuronas *in vitro* con imagenología de calcio en un modelo animal de ratón hemiparkinsoniano con discinesias inducidas por L-DOPA (LID). El protocolo experimental reproduce los efectos antidiscinéticos de ambos fármacos conductualmente midiendo la escala de movimiento involuntarios anormales (MIA). Tanto amantadina como clozapina obtuvieron resultados similares conductualmente en reducir el pico de discinesias durante el *on-state*, o cuando es máxima la dosis de L-DOPA en plasma. Sin embargo, como tienen perfiles de afinidad e interacciones con múltiples sistemas de neurotransmisores muy distintos, nos preguntamos si su acción en la modulación de la actividad del núcleo estriado durante el *on-state* se puede distinguir.

Los resultados muestran efectos específicos de ambos fármacos en la actividad de docenas de neuronas estriatales durante el estado dosis máxima de L-DOPA. Primero, medimos los efectos directos sobre las rebanadas cerebrales respecto a la actividad espontánea discinética de forma cualitativa y con estadística descriptiva en diferentes conjuntos de características extraídas. Luego, para comparar y clasificar las acciones entre fármacos en el tejido cerebral se redujeron dimensiones y se entrenó un algoritmo de aprendizaje supervisado utilizando diferentes conjuntos de características. El conjunto de características relacionado con los ensambles neuronales y de red funcional obtuvieron la clasificación más precisa para reconocer entre tratamientos en los datos de imagenología de calcio. En contraste, utilizando los datos conductuales no es posible distinguir entre tratamientos. Estos resultados sugieren una posible sinergia entre amantadina y clozapina para aliviar discinesias y además sirven como prueba de concepto para fármacos novedosos o tratamientos con fármacos de múltiples blancos.

Abstract

In this research project we developed an analysis pipeline based on neuronal ensembles to assess amantadine and clozapine using simultaneous and multiple recording of neurons *in vitro* using calcium imaging in a hemiparkinsonian mouse with L-DOPA-induced dyskinesias (LID). The experimental protocol reproduced the antidyskinetic effects of both drugs behaviorally using the scale of abnormal involuntary movements (AIMs) score. Amantadine and clozapine reduced the peak of dyskinesias during the on-state, i.e., when L-DOPA concentration is maximum in plasma. However, both drugs have different binding profiles and interact with multiple and distinct neurotransmitters systems, thus we asked if their action in modulating the activity of nucleus striatum could be distinguished.

Our results show specific effects of both drugs in the activity of dozens of striatal neurons during the state in which L-DOPA is maximum. First, we measured direct effects on the brain slices respect to the spontaneous dyskinetic activity qualitatively and with descriptive statistics different sets of extracted features. Then, to compare and classify drug actions in brain tissue, we applied dimensional reduction and trained a supervised learning algorithm on several sets of features. The set of features related to neuronal ensembles and functional network obtained the highest accurate classification of the calcium imaging data between drugs. In contrast, using behavioral data, it was not possible to distinguish between treatments. These results suggest a possible synergy between amantadine and clozapine to alleviate dyskinesias as well as they will serve as proof of concept to test new drug or multitargets pharmacological strategies.

Introducción

Los movimientos involuntarios anormales (MIAs) presentes en el cuello, rostro, tronco y extremidades o discinesias inducidas por L-DOPA (DIL) afectan a la mayoría de los pacientes que han llevado un tratamiento tónico y pulsátil del precursor de dopamina (DA) levodopa (L-DOPA, L-3,4 dihidroxifenilalanina) para aliviar los síntomas motores de la Enfermedad de Parkinson [1]–[3]. Las opciones farmacológicas para tratar este desorden motor clínicamente son el antigripal amantadina [4], [5], aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) y el antipsicótico atípico clozapina [2], [6]. Los mecanismos de acción atribuidos para reducir las discinesias son el antagonismo a los receptores glutamatérgicos de NMDA por parte de amantadina [7], [8] y acción antagonista de los receptores de serotonina por parte de clozapina [9]–[11]. Sin embargo, ambos fármacos interactúan con más de un sistema de neurotransmisores, detalles en Tabla 1 para amantadina y Tabla 2 para clozapina.

Interacción	Mecanismo
Glutamatérgico NMDA Mediado por canales kir2	Antagonista [7], [12], [13] Bloqueador [14]
Gabaérgico Aumenta niveles	Agonista [15]
Dopaminérgico Aumenta liberación	Altas concentraciones [16]–[19]
Colinérgico Aumento de concentración mediada por receptores de NMDA Modula corrientes nicotínicas en hipocampo	Antagonista [20] En baja concentración antagoniza [21]

Tabla 1. Interacciones de amantadina.

Blanco	Mecanismo	Anti-LID
Serotonina		
5 HT1	Agonista [22], [23]	Si [13], [16], [26]–[29]
5 HT2	Antagonista [9], [22]–[24]	Si [1], [9], [30]
5 HT3	Antagonista [23], [24]	Si [31]–[33]
5 HT5	Antagonista [23], [25]	
5 HT6	Antagonista [9], [22], [23]	Si [9]
5 HT7	Antagonista [9], [22], [23]	Si [9]

Dopamina		
D1	Antagonista [22], [23], [34]	Si [35]–[38]
D2	Antagonista [22], [23], [34]	Si [35], [36], [39]
D3	Antagonista [22], [23], [34]	Si [35], [39]–[42]
D4	Antagonista [22]–[24], [34]	Si [1], [35], [43]
Acetilcolina		
M1	Agonista parcial [22], [44]	Parcial [48], [49]
M2	Agonista parcial [45]	
M3	Antagonista [22]	
M4	Agonista [45]	Si [48], [50]
M5	Afinidad [46]	
$\alpha 7$	Antagonista [47]	No [51], [52]
Adrenérgicos		
$\alpha 1$	Antagonista [22]	Si [10], [54], [55]
$\alpha 2$	Antagonista [22], [53]	Si [1]
$\beta 1$	Agonista [23]	No [56], [57]
Histamina		
H1	Agonista inverso [22], [58]	
H2	Agonista inverso [58]	Si [1], [59]
H3	Agonista [22], [58]	
H4	Agonista [22], [58]	
GABBA		
Gaba A	Antagonista débil [22]	No [1]
Gaba B	Interacción [23], [60]	Ninguna [1]
Glutamato		
NMDA	Débil agonista [22], [23], [61]	No [1], [62], [63]
Cannabinoide		
CB1	Interacción [23]	Agonistas reducen DIL [64], [65]

Tabla 2. Afinidades con múltiples receptores de clozapina y acción terapéutica para DIL del receptor.

Estudios en modelos animales de fisiopatología de DIL han encontrado una disfunción generalizada en los circuitos de los ganglios basales [9], [66]–[68]. Dentro de estas funciones desreguladas, el núcleo estriado tiene una relevancia ya que poblaciones específicas pueden modular las discinesias, como lo muestran experimentos con manipulación optogenética de neuronas específicas [69]–[71]. Además, se han identificado patrones característicos de DIL en registros eléctricos como el ritmo gamma [72], [73]. Estudios previos han mostrado que en roedores, los patrones de actividad neuronal que codifican conductas puede ser preservados *ex vivo* [74], y en registros de imagenología de calcio *in vitro* se puede diferenciar entre patologías [75], e *in vivo* [76]. La actividad del microcircuito estriatal sin ninguna lesión o inducción de patología se caracteriza por baja actividad

espontánea y cuya respuesta ante un estímulo fisiológico se activan grupos de neuronas o ensambles neuronas que describen secuencias cíclicas de los ensambles [75], [77], [78]. En contraste, los patrones de actividad en registros tejido discinético se caracterizan por hiperactividad espontánea, un ensamble altamente recurrente con una elevada alternancia con otros grupos de neuronas coactivas (o ensambles neuronales) y cuya secuencia temporal no es cíclica, así como pérdida de propiedades de red funcional durante el estado de máxima concentración de L-DOPA u *on-state* [75]. Con el registro simultáneo de múltiples neuronas se puede evaluar la acción directa de fármacos ante la heterogeneidad entre neurotransmisores, tipos neuronales y proyecciones del núcleo estriado [79]. A diferencia del registro individual, para el análisis y visualización múltiples neuronas utilizaremos una definición de trabajo de ensambles neuronales como unidad de análisis [78], [80]. Previamente, este marco teórico ha sido útil para revelar la acción farmacológica en tejido de diferentes fármacos en microcircuito estriatal [77], [79], [81], [82] y extraestriales [83]. Para esto, definimos un ensamble neuronal como un grupo de neuronas que se activan simultáneamente en repetidas ocasiones, cuyas sinapsis han sido potenciadas [84]–[86] y nuestra aproximación a esta conexión es la medida de actividad simultánea obtenido del multirregistro [75], [87] descrito en la Figura 1.

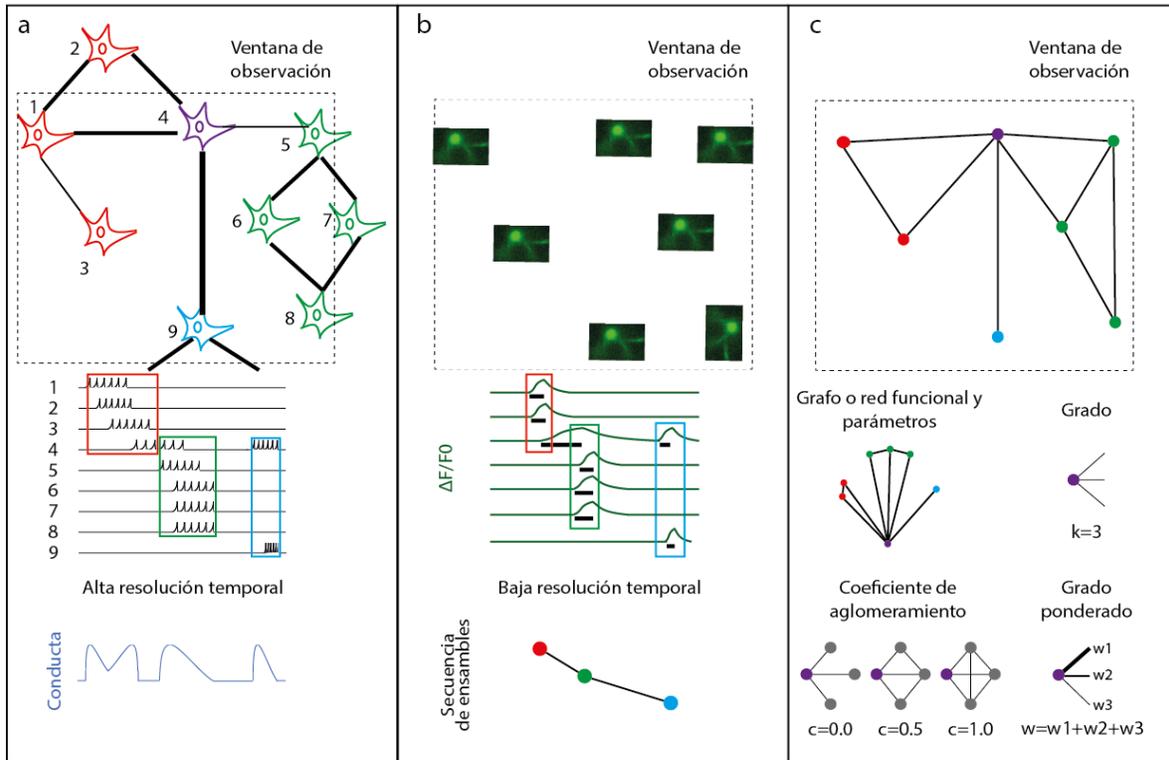


Figura 1. Ensamblas neuronales. (a) Organización hipotética de tres ensambles (color) y su registro eléctrico relacionado con acciones. En púrpura, una neurona que participa en todos los ensambles. (b) Muestreo espacial con imagenología de una región cuya actividad puede ser inferida de los cambios de fluorescencia, así como la identificación de neuronas coactivas como ensambles y su secuencia temporal. (c) Representación de neuronas como nodos y sus conexiones como actividad simultánea que puede ser reorganizada como un grafo y medirá distintos parámetros como lo es el grado o número de conexiones de un nodo, el coeficiente de aglomeramiento como medida de interconexión de nodos vecinos y el grado ponderado como la suma del peso de cada conexión.

Planteamiento del problema

La amantadina y clozapina reducen el pico de discinesias inducidas por L-DOPA, sin embargo, tienen diferentes mecanismos que interactúan con múltiples sistemas de neurotransmisores. Además, la actividad neuronal del núcleo estriado se relaciona directamente con la aparición y magnitud de discinesias, por lo tanto, haciendo un registro simultáneo de múltiples neuronas estriatales con imagenología de calcio podríamos medir acciones específicas de ambos fármacos durante la concentración máxima de L-DOPA u *on-state*.

Asimismo, el microcircuito estriatal discinético preserva características específicas de la patología durante el *on-state* como la hiperactividad neuronal y la alta alternancia de ensambles neuronales, entre otras [75]. Estas características, reveladas por el análisis de ensambles neuronales, serán cuantificadas por el cambio producido por la administración directa de amantadina y clozapina en tejido cerebral, y surge la pregunta si ¿será posible distinguir la modulación de amantadina y clozapina en el estado *on-state* de discinesia en docenas de neuronas estriatales?

Hipótesis

Dados los diferentes perfiles farmacológicos de amantadina y clozapina, se sugiere que la modulación de la actividad neuronal a nivel de docenas de neuronas estriatales será distinguible entre las dos. Estas acciones podrían estar involucradas en la reducción de la hiperactividad neuronal espontánea, cambiar la alternancia de ensambles neuronales o modificar sus parámetros de red funcional.

Objetivos

Generales

- Diseñar un protocolo de inducción de discinesias que permita evaluar farmacológicamente las discinesias y registrar la actividad de múltiples neuronas durante el pico de dosis de L-DOPA en rebanadas de cerebro de ratón.
- Cuantificar los efectos de dos diferentes perfiles farmacológicos en el microcircuito estriatal durante el *on-state* en un modelo de ratón utilizando varios niveles de análisis.
- Clasificar las acciones de amantadina y clozapina en el microcircuito estriatal discinético.

Objetivos particulares

- Utilizar la escala de discinesias en roedores para medir los efectos de amantadina y clozapina conductualmente.
- Desarrollar una secuencia de análisis de los datos obtenidos con imagenología de calcio que permita:
 - inferir la actividad neuronal y detectar ensamblajes neuronales,
 - extraer características y medir cambios en la actividad neuronal estriatal debido a la administración de un fármaco y
 - clasificar la acción entre fármacos utilizando una estrategia de reducción de dimensiones y aprendizaje supervisado de diferentes conjuntos de características extraídas en los diferentes niveles de análisis..

Materiales y métodos

Protocolo para inducir discinesias por L-DOPA

Se utilizaron ratones C57BL/6 y CD1, machos y hembras con edad mínima de 24 días PN (postnatal) y un peso mínimo de 20 mg. La lesión hemiparkinsoniana se realizó con inyección de 6-OHDA (0.8 μ L de 6-hidroxidopamina) a una tasa de 0.2 μ L por minuto mediante cirugía estereotáxica en el haz del prosencéfalo medial en las coordenadas respecto a Bregma mediolateral (ML): -1.2; anteroposterior (AP): -

1.5 y dorsoventral (DV): -5.3. Posterior a su recuperación de una semana, se evaluó la conducta de giro contralateral inducida por apomorfina (0.5 mg/kg en vehículo de solución salina y ascorbato al 0.02%). Los ratones con al menos 100 giros contralaterales durante una hora se consideraron para la siguiente etapa.

Las cirugías estereotáxicas (lesión e inyección de virus) se realizaron con ketamina (85 mg/kg) y xilacina (85 mg/kg) como anestésico y con cuidados de temperatura y lágrimas artificiales. Y un cuidado riguroso de alimentación y temperatura postoperatorios.

La administración diaria de L-DOPA y benserazide para inducir movimientos involuntarios anormales se realizó mediante cuatro semanas, con dosis ascendente de L-DOPA de 6, 12, 24 y 24 mg/kg respectiva a cada semana con benserazide (15 mg/kg) para inducir discinesias severas y estables a largo plazo [88]. Los MIAs inducidos han sido descritos detalladamente [89], [90], los cuales consisten en, el desplazamiento de la extremidad delantera contralateral a la lesión con movimientos coreicos; la torsión sobre el eje axial compuesto por cuello, espalda y base de la cola; y movimientos en la boca y lengua (Figura 2).

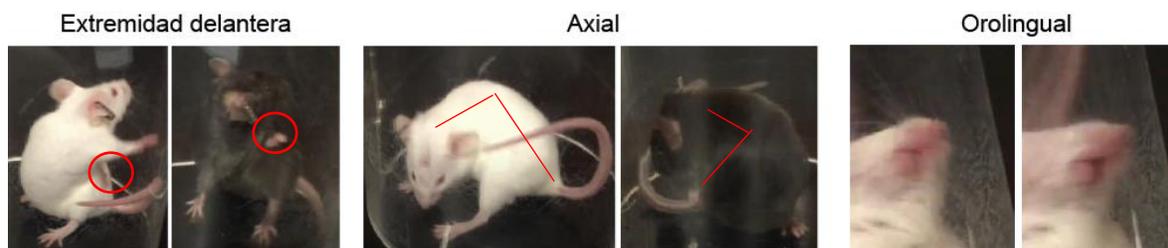


Figura 2. Movimientos involuntarios anormales en ratón. De izquierda a derecha en ratón CD1 y C57BL/6: posición de la extremidad izquierda (círculo rojo, contralateral a la lesión), torsión del eje axial (rojo) hacia el lado contralateral y movimientos masticatorios en dos momentos del mismo ratón CD1.

Las partes del cuerpo que son evaluadas son la extremidad delantera (Li), el eje axial (Ax) y orolingual (OI). En la Tabla 3 se muestra un segmento del formato de 9 evaluaciones cada 20 minutos utilizando una escala de 0 a 4 en la escala básica que mide la persistencia del movimiento y la escala de amplitud que mide el desplazamiento del movimiento. La evaluación conductual de expertos ayudados por videos se realizó mediante la escala de puntaje global de MIAs [35], el cual es

la suma de productos entre escala básica y amplitud de cada movimiento para cada minuto de evaluación. Estas anotaciones pueden ser manuscritas o usando la *app* para dispositivos Android disponible en <https://github.com/vladscript/plotAIM> (ver Fig. 3).

Puntaje	20 min.			...			180 min		
	Li	Ax	OI	Li	Ax	OI	Li	Ax	OI
Básico									
Amplitud									

Tabla 3. Formato de registro de puntaje para movimientos anormales involuntarios.

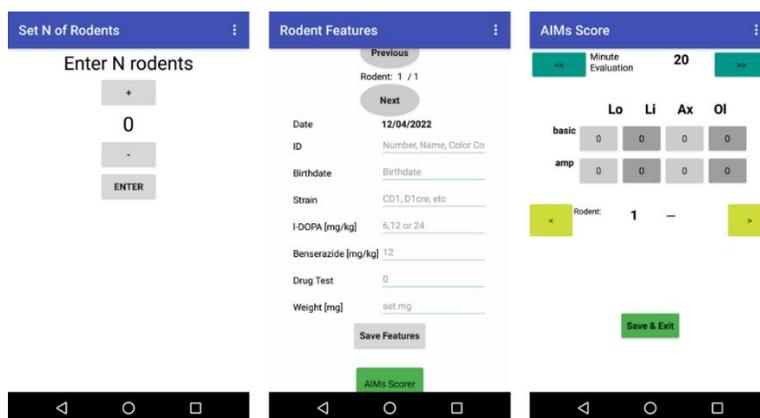


Figura 3. Capturas de pantalla de la aplicación para registrar puntajes de discinesias.

El protocolo fue validado [35] con la administración vía intraperitoneal (i.p.) de amantadina y clozapina con las siguientes especificaciones:

Fármaco	Dosis mg/kg	Laboratorio	Vehículo	Minutos antes de L-DOPA
Clorhidrato de benserazida	15	Sigma-Aldrich	Solución salina 0.9% NaCl	0
L-DOPA (3,4- Dihidroxi-Lfenilalanina éster etílico	24	Sigma-Aldrich	Solución salina 0.9% NaCl	0
Amantadina	40	Sigma-Aldrich	Solución salina 0.9% NaCl	100 [10], [19], [91]
Clozapina	5	Tocris Bioscience	DMSO diluido 4.8 mg/ml	5[35]

Tabla 4. Fármacos utilizados.

Después del periodo de inducción de discinesias, se evaluaron los vehículos de los fármacos una semana posterior y una semana después cada fármaco, ver detalles en [92].

Rebanadas de cerebro para imagenología de calcio

Después del periodo de inducción de discinesias, un subgrupo de ratones se utilizó para expresar el indicador genético de calcio GCaMP6f bajo el promotor de sinapsina (# 100837-AAV1; <http://n2t.net/addgene:100837>) en estriado dorsal con coordenadas respecto a Bregma en ML: -1.6, AP: +0.8 y DV: 2.8, un volumen de 0.5 μ L de vectores virales a una tasa de 0.1 μ L por minuto utilizando una aguja dental. Después de una semana de recuperación, se indujo con la dosis más alta de L-DOPA para reestablecer las discinesias durante una semana.

Para sacrificar se usó la misma preparación de anestésico antes mencionada y se perfundió con la solución de perfusión fría (4 °C) intracardiaca con sacarosa: (234 mM), NaHCO₃ (28 mM), dextrosa (7 mM), piruvato (4.54 mM), ácido ascórbico (0.28 mM), KCl (2.5 mM), MgCl₂ (7 mM), NaH₂PO₄ (1.44 mM) y CaCl₂ (0.4 mM). Posteriormente se extrajo el cerebro y se mantuvo en líquido cerebroespinal artificial: NaCl (126 mM), dextrosa (15 mM), NaHCO₃ (26 mM), tiourea (0.2 mM), ácido ascórbico (0.2 mM), KCl (2.5 mM), MgCl₂ (1.3 mM), NaH₂PO₄ (1.2 mM), CaCl₂ (2.0 mM); pH=7.4; 300 \pm 5 mOsm/L. Posteriormente con un vibratomo se obtuvieron rebanadas de 300 μ m de grosor para-horizontales del núcleo estriado del hemisferio derecho. Ambas soluciones, de perfusión intracardiaca y líquido cerebroespinal artificial, incluyeron L-DOPA (50 μ M) para mantener la condición *on-state* [1], [75]. El equipo de microscopía de epifluorescencia está constituido por un microscopio Olympus XLUMPLFLN, objetivo de 20X, una cámara CoolSnap K4 con filtro de emisión de fluorescencia 495–540 nm (Olympus, U-MGFPHQ), un láser para excitar el indicador de calcio con filtro de excitación BP460–480 y un sistema de perfusión con carbógeno constante. El software de adquisición fue Im-Patch© (<http://Impatch.ifc.unam.mx>). Las áreas de registro se escogieron cuando se apreciaba una zona enriquecida de somas con fluorescencia y se registraba al menos 5 minutos en cada condición. Primero actividad espontánea y posteriormente se administraba el fármaco Al final del registro se aplica una alta concentración de KCl para evocar una despolarización generalizada en la rebanada, previamente descrito en múltiples trabajos [75], [79]. Esto sirve como indicador de viabilidad de

la rebanada, ya que, en la ausencia de la despolarización, la actividad pudo haber sido por muerte neuronal y se descartaba el experimento.

Análisis de imagenología de calcio

La secuencia de análisis se implementó usando MATLAB cuyo código está disponible en <https://vladscript.github.io/FinderSpiker/> (ver Anexo I y [92]). En resumen, consta de las siguientes etapas:

1. Obtención de la señal de fluorescencia ($\Delta F/F_0$).
2. Inferencia de disparo neuronal o actividad de imagenología de calcio. Mediante un algoritmo de deconvolución se infieren los tiempos de disparo neuronal de las espigas o tasa de disparo inferido, las cuales constituye las filas de la matriz de actividad R.

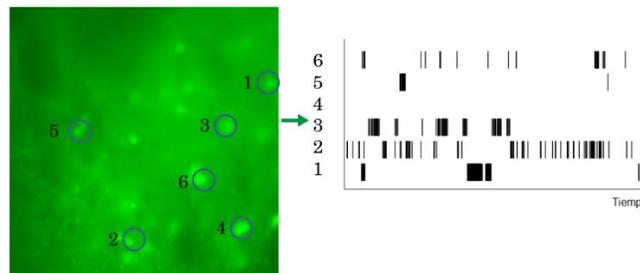


Figura 4. Matriz de actividad a partir de imagenología de calcio.

3. Detección de ensambles neuronales (EN).

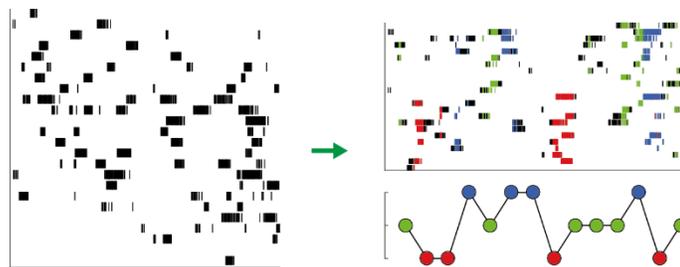


Figura 5. Detección de ensambles neuronales

4. Obtención de red funcional (RF).



Figura 6. Red funcional de ensambles neuronales

5. Clasificación de los experimentos mediante reducción de dimensiones y aprendizaje supervisado y evaluación de características en tres etapas de análisis: actividad neuronal (AN), ensambles neuronales (NE) y redes funcionales (RF).

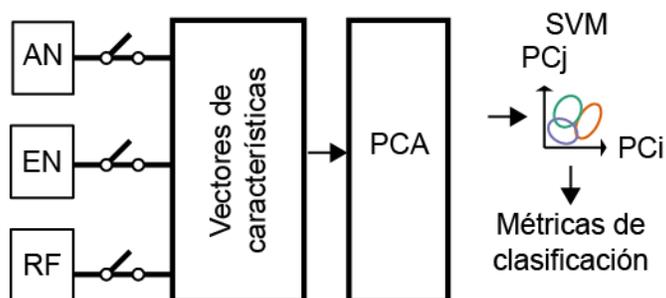


Figura 7. Esquema de clasificación para datos de imagenología de calcio

6. Las pruebas estadísticas descriptivas se especifican donde se requiere.

Resultados

La conducta como indicador de hemiparkinsonismo y discinesias

El número de giros completos contralaterales (media \pm error estándar), 232 ± 13 , a la lesión de 6-OHDA inducidos con apomorfina cuando la lesión fue efectiva (N = 26) son mayores que los giros ipsilaterales, 4 ± 3 , estadísticamente significativos. Esto no ocurre en ratones cuya lesión no fue efectiva (N = 49) con 12 ± 4 giros ipsilaterales y 20 ± 4 giros contralaterales. Este es un indicador de una disminución significativa de DA en núcleo estriado [88]. En la Figura 8 se muestra la cantidad de giros completos para los ratones que fueron seleccionados para este trabajo (izquierda) y los descartados (derecha).

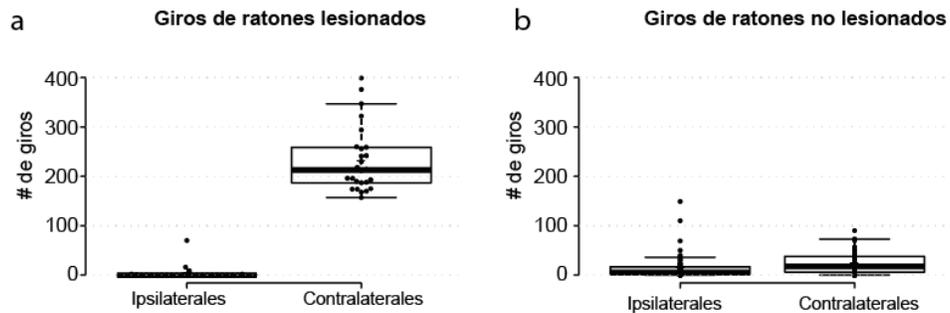


Figura 8. Número de giros ipsi- y contralaterales a la lesión de 6-OHDA. (a) Giros en ratones efectivamente lesionados ($P < 0.001$; prueba de rango con signo de Wilcoxon). (b) Giros de ratones con lesión no efectiva o descartados ($P = 0.063$; prueba de rango con signo de Wilcoxon).

Los requerimientos para la manifestación de MIAs son la escasa dopamina en estriado y el tratamiento crónico con L-DOPA [1], [93]. Por lo que los ratones que manifestaron MIAs fueron considerados exclusivamente para los siguientes estudios (ver video suplementario [92]).

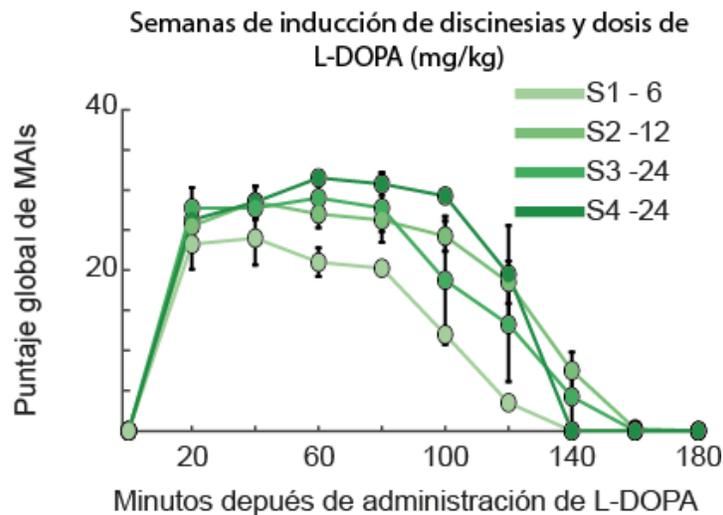


Figura 9. Ejemplo de inducción de discinesias durante las cuatro semanas en ratones en valores promedio y errores estándar del puntaje global de MAIs (N = 8). Podemos observar un aumento entre la S1 y la S2, en la severidad temporal de las discinesias ($P = 0.013$), cuyos puntajes totales (media y error estándar) son: 104 ± 17.6 y 157.75 ± 26.4 respectivamente. Entre la S2 y la S3 no hay aumento significativo ($P = 0.84$), pero aún hay variabilidad en el puntaje total de la S3: 148.5 ± 55.115 . A partir de la S3 y la S4 podemos observar que no hay diferencia ($P = 0.7$) y por lo tanto se ha alcanzó un grado estable y máximo de severidad con menor variabilidad en su puntaje total: 165.75 ± 12.0 . Prueba de Friedman para comparar efecto temporal entre pares de semanas.

El puntaje severo, sostenido y con menos variabilidad de los MIAs como se muestra en Figura 9 con las medias (círculos) y errores estándar (líneas verticales) de 8 de ratones que les indujeron discinesias en cuatro semanas (S1, S2, S3 y S4), por lo tomamos las discinesias severas como indicadores de que los procedimientos fueron efectivos.

Amantadina y clozapina reducen de manera similar las discinesias inducidas por L-DOPA

Se reprodujeron los efectos conductuales antidiscinéticos de amantadina (40 mg/kg) y clozapina (5 mg/kg) en un modelo de ratón con DIL. La dosis de clozapina utilizada en rata (8 mg/kg, [10]) resultó inmovilizante en ratones (datos no mostrados). Nótese que el efecto terapéutico consiste en la reducción de la severidad, es decir, el pico durante el *on-state* es menor cuando se coadministra amantadina o clozapina con L-DOPA. Los movimientos no desaparecen, sólo disminuyen en su puntaje global de MIAs un $56.1 \pm 8.6\%$ con amantadina y $53.7 \pm 6.2\%$ con clozapina (expresados como media y error estándar).

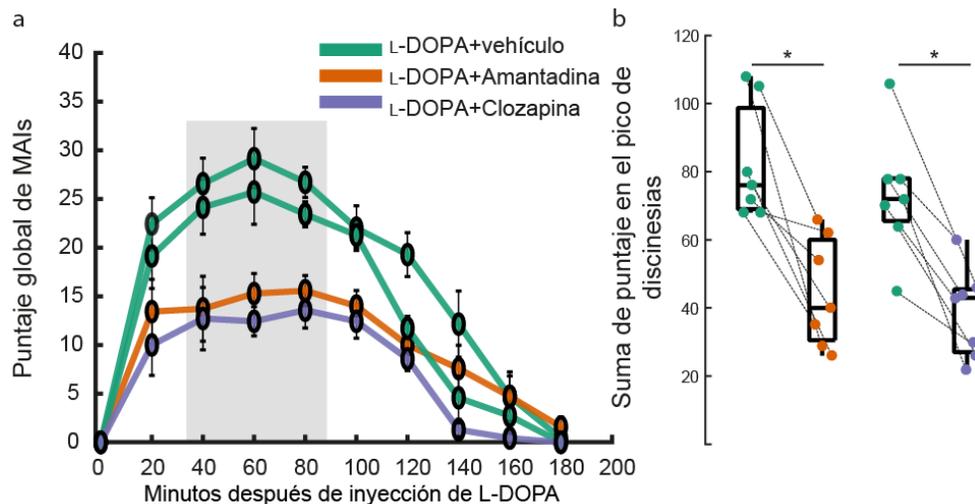


Figura 10. Amantadina y clozapina reducen el pico de discinesias en ratón. (a) Curso temporal con promedio y error estándar del puntaje global para dos grupos de L-DOPA+ vehículo y sus respectivos fármacos, amantadina ($P < 0.001$; prueba de Friedman) y clozapina ($P < 0.001$ prueba de Friedman). Pico de discinesias en gris entre minuto 40 y 80. (b) Boxplots Suma durante el pico de discinesias. Amantadina ($Z = 2.4$, $P < 0.05$) y clozapina ($Z = 2.4$, $P < 0.05$) reducen significativamente el pico de discinesias. Prueba de rango con signo de Wilcoxon.

Efecto en la actividad del multirregistro estriatal durante el *on-state* después de la administración de amantadina y clozapina.

En el registro por imagenología de calcio pudimos evaluar el efecto directo de ambos fármacos en el tejido. Tanto amantadina (30 μ M) y clozapina (15 μ M) redujeron el porcentaje de actividad (medido como la división de número de cuadros con actividad y el número de total de cuadros grabados) como se puede observar en Figura 11 en promedio y desviación estándar por experimento un 41 ± 18.7 % después de administrar amantadina y un 37.5 ± 41.4 % después de administrar clozapina.

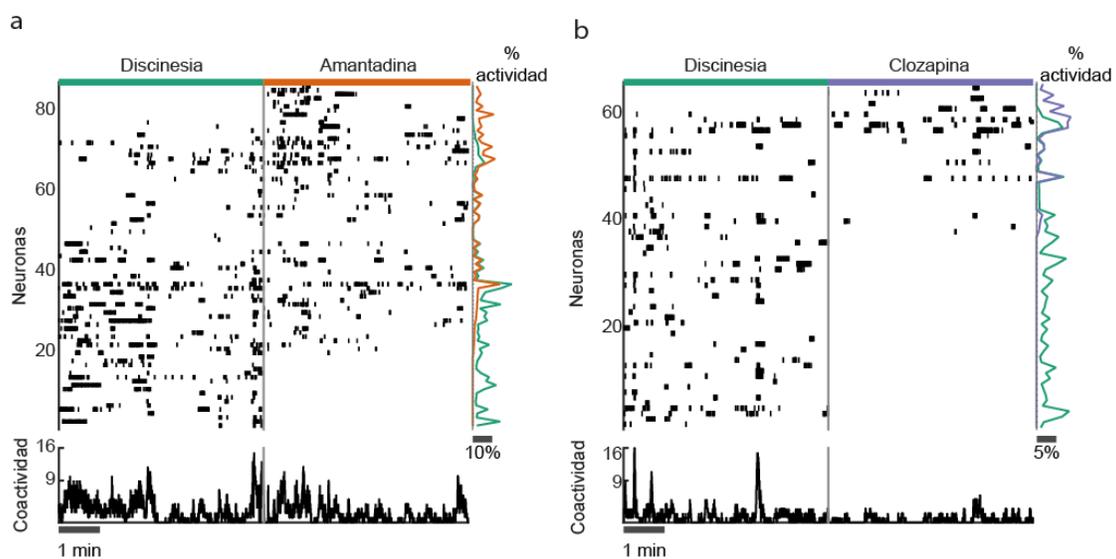


Figura 11. Ejemplos representativos de los efectos de amantadina y clozapina en la actividad estriatal. En (a) y (b) constan de 3 paneles: gráfico tipo *raster* que muestra la actividad antes y después del fármaco, grafica vertical con el porcentaje de actividad individual y en la parte inferior la coactividad en función del tiempo. (a) Actividad modificada por amantadina. (b) Actividad modificada por clozapina.

Sin embargo, identificando el efecto que tuvo cada fármaco en neuronas individuales, podemos dilucidar acciones específicas. Estos grupos (Figura 12) son neuronas deprimidas cuya actividad fue reducida, dentro de este conjunto, hay un subconjunto de neuronas inhibidas totalmente; las neuronas sin cambio, cuya actividad no cambió un 10% del máximo de cada experimento y neuronas facilitadas, aquellas cuya actividad incrementó y dentro de estas hubo un subconjunto de neuronas activadas o previamente silentes.

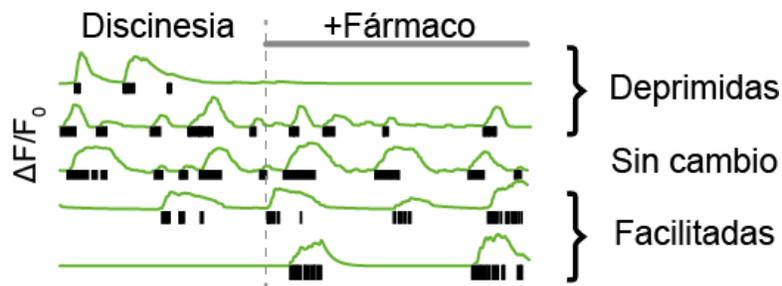


Figura 12 Efectos de fármaco en registros de imagenología de calcio

De acuerdo con esta clasificación podemos observar las filas de las gráficas tipo *raster* en Figura 6 el orden de arriba hacia abajo están las neuronas que fueron facilitadas, sin cambio y deprimidas identificando los cruces del % de actividad individual de las gráficas verticales. En los casos representativos podemos ver una mayor proporción de neuronas que fueron facilitadas por amantadina, mientras que el efecto de clozapina fue inhibir actividad observando los espacios blancos en las esquinas inferiores derechas de las gráficas tipo *raster*.

La diversidad experimental de este resultado se muestra en Figura 13, donde se compararon las proporciones de neuronas en cada rebanada según el efecto que tuvo el fármaco en diagramas de caja. Y obteniendo una diferencia entre fármacos estadísticamente significativo en la proporción de neuronas activadas.

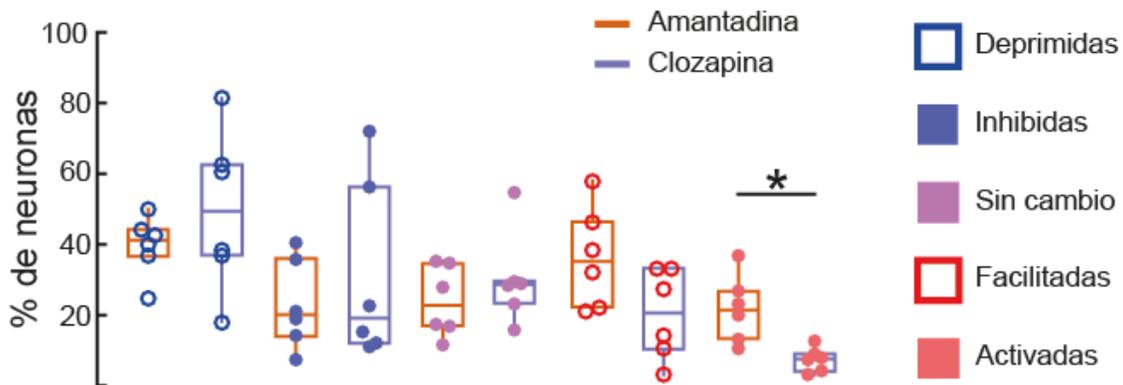


Figura 13 Proporción de neuronas por efecto farmacológico en cada rebanada. Los diagramas de caja muestran la proporción de neuronas de acuerdo con el efecto farmacológico en cada rebanada. Amantadina y clozapina difieren en su proporción e neuronas activadas (U test: 566, 6, $P \leq 0.01$). Prueba U de Mann-Whitney.

Utilizando el registro completo de todas las células registradas obtuvimos la función de distribución acumulativa (FDA) del porcentaje de actividad en las condiciones: discinesia (N = 426), amantadina (N = 286) y clozapina (N = 243) de las 12

rebanadas, en la cual podemos constatar una mayor inhibición después de la administración de clozapina (Figura 14).

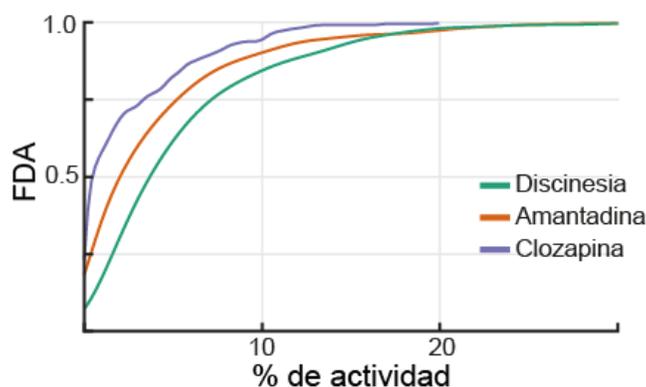


Figura 14. Función de distribución acumulativa.

Observamos un desplazamiento a la izquierda de las curvas correspondientes a amantadina (naranja) y clozapina (púrpura) respecto a la actividad discinética (verde), lo cual en este tipo de gráficas significa una reducción. Mediante la prueba estadística Kolmogorov–Smirnov para dos muestras cuantificamos la diferencia estadística de la Fig. 14 entre el porcentaje de actividad poblacional acumulada después de amantadina ($P \leq 0.001$) y después de clozapina ($P \leq 0.001$) respecto a la actividad discinética y cuyas medianas se desplazaron a la izquierda 1.19 % y 3.4% respectivamente. Así como clozapina respecto a amantadina ($P \leq 0.001$), esto es 1.5 % de desplazamiento de la mediana. Prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección para múltiples comparaciones de Bonferroni.

Modulación de los ensambles neuronales estriatales durante el *on-state* después de la administración de amantadina y clozapina.

Cada condición fue analizada para detectar ensambles neuronales (ver Materiales y Métodos, Anexo I y [92]).

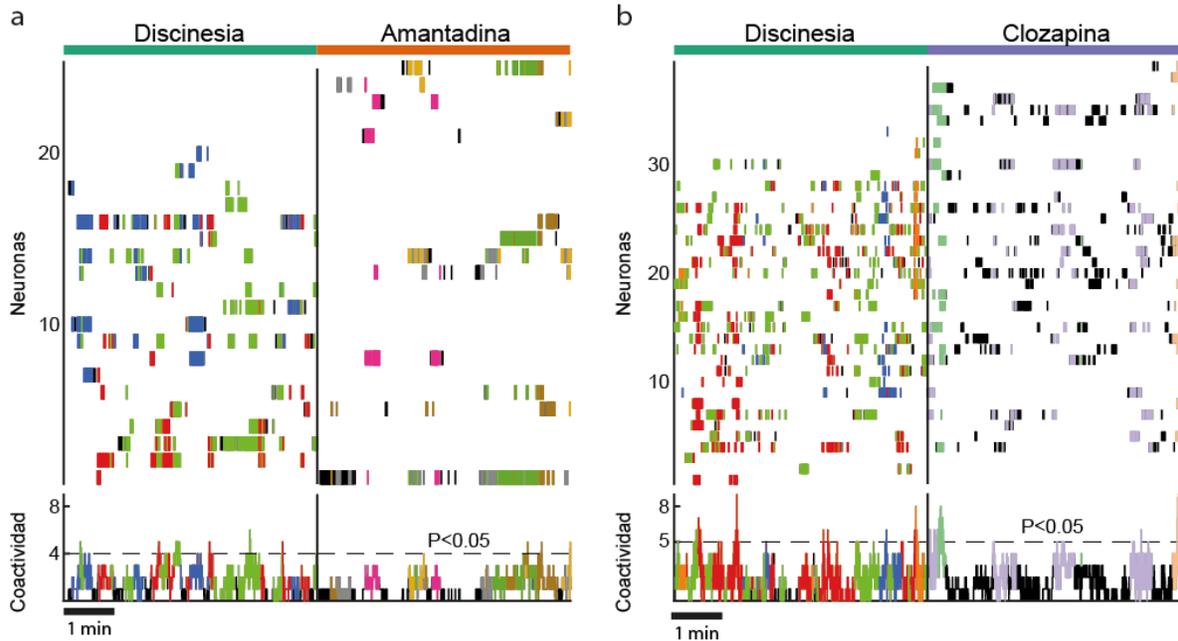


Figura 15. Ejemplos representativos de la modulación de ensambles neuronales de la discinesia después de la aplicación del fármaco. En (a) y en (b) se muestran gráficas tipo *raster* cuyas columnas muestran el resultado del agrupamiento de columnas similares con colores que identifican los ensambles neuronales. En la parte inferior se muestra la coactividad donde se pueden reconocer los intervalos y duraciones de los ensambles, así como el umbral de coactividad poco frecuente ($P < 0.05$) debido al azar (Monte Carlo, $N = 1000$). (a) La acción de amantadina en la misma rebanada. (b) La acción de clozapina en la misma rebanada.

Ambos fármacos producen que diferentes ensambles de neuronas entren en acción después de su administración como lo muestran las diferentes columnas de colores en Fig. 15, donde cada color indica un ensamble neuronal. La gráfica de coactividad tiene el umbral con línea segmentada que muestra los picos de coactividades o ensambles significativos con los intervalos correspondientes a cada color, estos fueron reducidos en cantidad por clozapina.

Del multirregistro podemos pasar a una secuencia representativa del experimento ilustrada como una serie de ensambles neuronales. En esta secuencia podemos analizar la alternancia o probabilidad de ensambles consecutivos diferentes en la Figura 16.

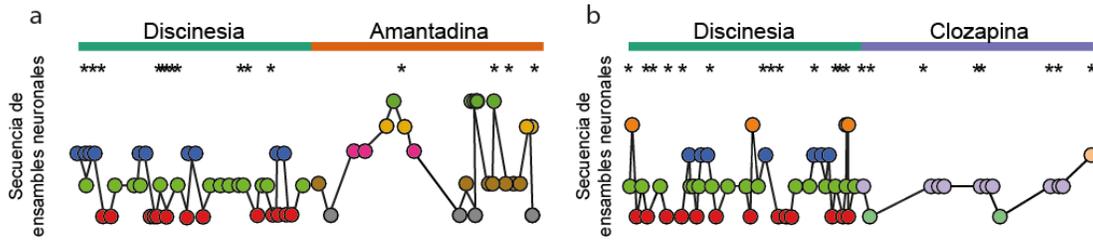


Figura 16. Secuencias de ensamblajes neuronales. Los asteriscos indican coactividad superior al umbral de coactividad significativa. (a) Secuencia de ensamblajes (N = 3) modificada por amantadina (N = 5). (b) Secuencia de ensamblajes (N = 4) modificada por clozapina (N = 3).

La diversidad experimental muestra cambios significativos en la cantidad de picos significativos por clozapina (Figs. 16b y 17a), y un aumento en la diversidad de la secuencia por amantadina (Figs. 16a y 17b). Mientras que ambos fármacos disminuyen las neuronas participantes en los ensamblajes (coactividad en Fig. 15 y Fig. 17c), cuando hay en promedio 4.2 neuronas activas en los ensamblajes durante discinesia, en amantadina hay 3.6 y con clozapina 2.9 (variabilidad y estadística en Fig. 17c).

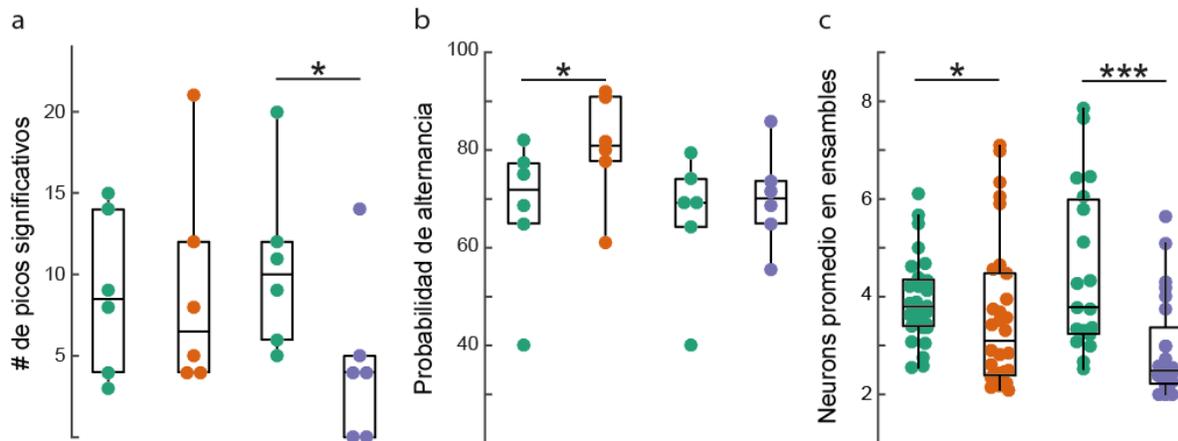


Figura 17 Parámetros de ensamblajes neuronales específicos de los fármacos antidiscinéticos. (a) Diagramas de caja del número de picos significativos Clozapina reduce la cantidad de picos significativos ($Z = 1.7$, $P < 0.05$). (b) Probabilidad de alternancia. Amantadina aumenta la diversidad en la secuencia de ensamblajes neuronales ($Z = -1.9$, $P < 0.05$). (c) Promedio de neuronas en la coactividad de cada ensamble detectado amantadina ($U:1007_{29,304}$, $P \leq 0.05$) y clozapina ($U:572_{19,24}$, $P \leq 0.001$). Prueba de rangos con signo de Wilcoxon unilateral para (a) y (b) y Prueba U de Mann-Whitney para (c).

Efecto en las conexiones funcionales de los ensambles neuronales estriatales durante el *on-state* después de la administración de amantadina y clozapina.

De las neuronas participantes en los ensambles neuronales, se exportaron nodos como neuronas y enlaces como actividad simultánea para visualizar y analizar en el programa de interfaz gráfica para analizar redes Gephi [94]. Obteniendo cambios cualitativos (Figs. 18 y 19) en forma de arquitectura circular y cuantitativos (descritos en Fig. 1c y mostrados en Figs. 20 y 21).

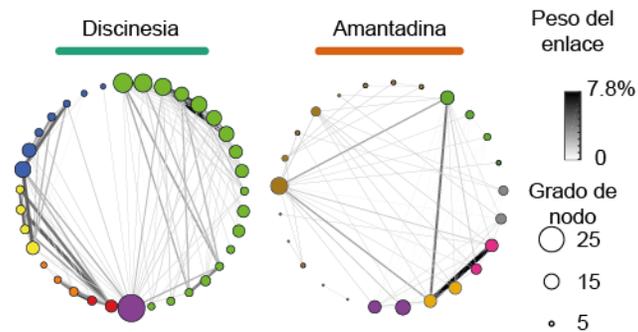


Figura 18. Cambios en la conectividad funcional debido a amantadina (derecha) a la red discinética (izquierda). Los colores indican el ensamble en el que participaba cada nodo, el grosor de los enlaces el peso de la conexión y el tamaño de nodo es proporcional a su grado.

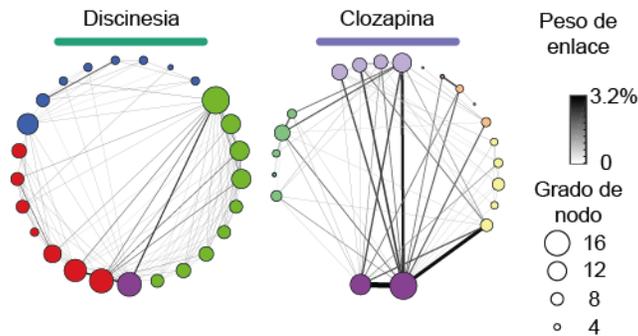


Figura 19. De forma análoga a Fig. 18, se muestran los cambios inducidos de clozapina (derecha) en la red discinética (izquierda).

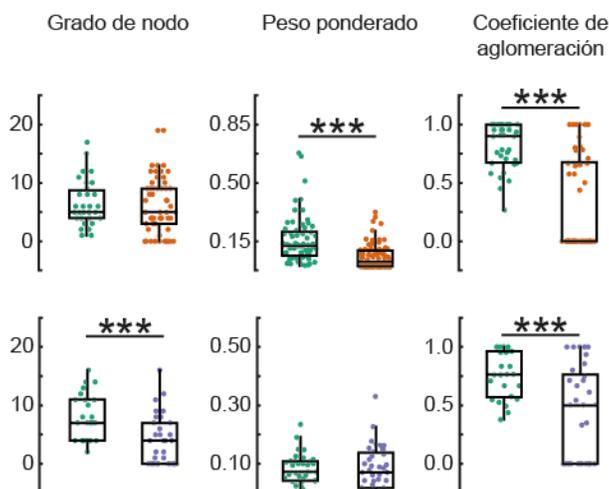


Figura 20. Ejemplos representativos de diagramas de caja con tres parámetros de redes: grado de nodo, peso ponderado y coeficiente de aglomeración donde cada punto representa un nodo de red. En la primera fila se muestran los cambios debido a amantadina y la segunda fila los cambios en los parámetros debido a clozapina. Amantadina disminuye el peso ponderado (U: 6675.5_{68, 81} P ≤ 0.001), mientras que clozapina redujo el grado de nodo (U: 951.5_{25, 33}, P ≤ 0.001). Ambas disminuyen la interconectividad (amantadina, U: 2037_{35, 49} P ≤ 0.001; clozapina, 933.5_{25,33}, P ≤ 0.001). Prueba U de Mann-Whitney.

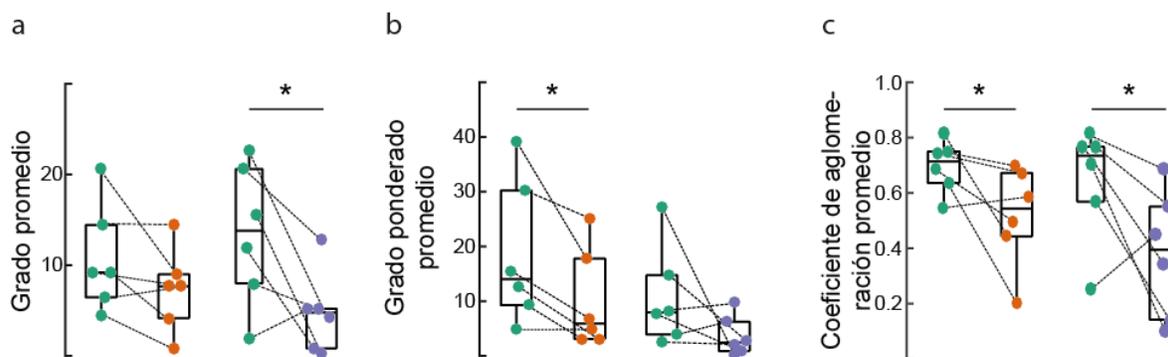


Figura 21. Valores promedio de las redes de cada experimento. (a) El grado promedio de los experimentos es reducido por clozapina en puntos púrpura respecto a discinesia puntos en verde (Z = 1.7, P < 0.05). (b) El grado promedio ponderado promedio es reducido por amantadina, puntos en naranja (Z = 1.9, P < 0.05). (c) Coeficiente de aglomeramiento promedio de todos los experimentos fue reducido por amantadina (Z = 1.9, P < 0.05) y clozapina (Z = 1.7, P < 0.05). Prueba de rango con signo de Wilcoxon unilateral.

Clasificación automática de datos de imagenología de calcio

De las etapas anteriormente descritas, se obtuvieron una lista de características específicas para cada etapa descritas en la Tabla 5.

Conjunto de características extraídas de imagenología de calcio		Tipo
Actividad neuronal (AN)	Porcentaje de cuadros activos por neurona	Distribución real
	Intervalo inter-espigas en segundos	Distribución real
	Duración de ráfagas de espigas en segundos	Distribución real
	Ráfagas por minuto por neurona	Distribución real
	Coactividad	Distribución entera
	Coefficiente de autocorrelación de la coactividad	Escalar real
	Porcentaje de tiempo con coactividad mayor a cero	Escalar real
Ensamblajes neuronales (EN)	Duración de los ensambles en segundos	Distribución real
	Intervalo inter-ensambles en segundos	Distribución real
	Umbral de coactividad	Escalar entero
	Número de ensambles	Escalar entero
	Ensamblajes por minuto	Escalar real
	Número de ciclos (camino euleriano) por minuto	Escalar real
	Error promedio de validación cruzada	Escalar real
	Distancia de Hamming máxima entre ensambles	Escalar real
	Tamaño de intersección de todos los ensambles	Escalar real
	Índice de Dunn	Escalar real
	Probabilidad de alternancia	Escalar real
Redes funcionales (RF)	Grado de nodos	Distribución de enteros
	Coefficiente de aglomeración	Distribución real
	Grado ponderado	Distribución real
	Número de triángulos ()	Distribución de enteros

Tabla 5. Características extraídas de imagenología de calcio. En cada etapa de análisis se extrajeron los parámetros enlistados. De los parámetros que son distribuciones se calculó media, varianza, simetría y curtosis numéricamente.

Siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos, Anexo I y [92], obtuvimos los siguientes rendimientos de clasificación utilizando todas las combinaciones de bloques de características en Tabla 5 y adicionalmente los datos conductuales del puntaje global de MAIs durante el pico de discinesias.

Por medio de validación cruzada dejando uno fuera o LOOCV por sus siglas en inglés (*leave-one-out cross-validation*) se midió la precisión promedio en diferentes inicializaciones de los hiperparámetros del algoritmo de máquinas de vector soporte, SVM por sus siglas en inglés (*support vector machine*).

Bloque de características	N	N experimentos			PCA	Kernel SVM	Precisión LOOCV
		Discinesia	Amantadina	Clozapina			
MAIs	3	14	7	7	1	gaussiano	45.89 (2.90) %
AN	22	12	6	6	2	lineal	53.75 (4.25) %
EN	17	12	6	6	4	gaussiano	62.50 (3.82) %
RF	16	12	6	6	4	gaussiano	55.21 (2.66) %
AN & EN	39	12	6	6	3	polinomial	53.13 (2.98) %
AN & RF	38	12	6	6	3	gaussiano	37.71 (3.70) %
EN & RF	33	12	6	6	6	gaussiano	58.96 (4.93) %
AN & EN & RF	55	12	6	6	4	polinomial	46.67 (4.19) %

Tabla 6. Rendimiento de clasificación automática. En las columnas se enlista: la combinación de características, número de características, número de experimentos o clases, número de componentes principales con más del 95 % de la varianza explicada, la función Kernel utilizada en SVM y precisión media y desviación estándar utilizando LOOCV. En fuente negrita el rendimiento de los datos conductuales (MAIs) menores a utilizar ensambles neuronas y redes funcionales.

De Tabla 6 podemos ver que usando datos el análisis en imagenología es posible clasificar los datos con mejor precisión que con los datos conductuales. Sin embargo, al tratarse de una base de datos desbalanceada, se exploraron métricas por clase para medir la tasa de verdaderos positivos y de falsos positivos, entre otras para decidir cuál combinación de parámetros separa mejor los datos, obteniendo los siguientes resultados utilizando todos los experimentos para entrenar la SVM.

Bloque de características	Tasa de verdaderos positivos			Tasa de falsos positivos		
	Disc.	Aman.	Clz.	Disc.	Aman.	Clz.
MAIs	0.87 (0.03)	0.59 (0.38)	0.37 (0.41)	0.06 (0.02)	0.23 (0.13)	0.16 (0.12)
AN	0.92 (0.00)	0.00 (0.00)	0.83 (0.00)	0.56 (0.04)	0.00 (0.00)	0.07 (0.02)
EN	1.00 (0.00)	0.83 (0.04)	0.73 (0.20)	0.21 (0.07)	0.01 (0.03)	0.00 (0.01)
RF	1.00 (0.00)	0.83 (0.04)	0.36 (0.29)	0.41 (0.15)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
AN & EN	1.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.67 (0.00)	0.67 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
AN & RF	1.00 (0.00)	0.32 (0.36)	0.62 (0.24)	0.53 (0.22)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
EN & RF	1.00 (0.00)	0.97 (0.06)	1.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)
AN & EN & RF	0.95 (0.06)	0.04 (0.13)	0.81 (0.08)	0.58 (0.08)	0.00 (0.01)	0.03 (0.04)

Tabla 7. Rendimiento de clasificación multiclase de diferentes bloques de características. Se muestra la tasa de verdaderos positivos y falsos positivos para cada clase como media y desviación estándar.

En Tabla 7 se nota como EN y RF tienen mejor desempeño que EN en cuanto a tasa de falsos positivos. Por lo tanto, la combinación de características de ensamblajes neuronales y redes funcionales ayudan a separar mejor los datos. Nótese que utilizar todas las características no mejora el desempeño de clasificación.

Finalmente, para ilustrar e interpretar los resultados mostramos la proyección de los datos en el dominio PCA y se trazaron regiones de probabilidad de clasificación dados por SVM. Se comparó el resultado de utilizar características conductuales y del análisis propuesto en este trabajo. Utilizando características de ensamblajes neuronales y de las redes funcionales es posible diferencia entre fármacos con alta precisión en Figura 22.

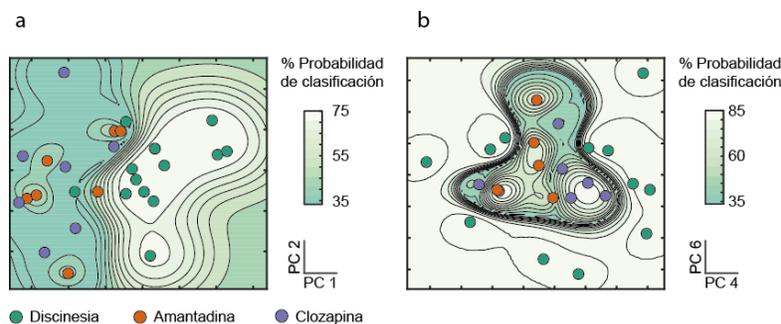


Figura 22. Regiones de clasificación obtenidas con PCA y SVM. (a) Regiones de probabilidad utilizando datos conductuales. (b) Regiones de probabilidad utilizando ensambles neuronales (NE) y redes funcionales (RF).

Mientras conductualmente es posible diferenciar entre animales tratados y no tratados (regiones verde y blanca de Fig. 22a), los puntos que representan a los tratamientos farmacológicos (puntos naranja y púrpura de la Fig. 22a) se confunden entre sí en la región verde de baja probabilidad de clasificación. En el análisis de los datos provenientes de imagenología de calcio es posible encontrar regiones con alta probabilidad de clasificación específicas para amantadina y clozapina (regiones blancas en Fig. 22b). Por lo tanto, utilizando estos conjuntos parámetros, NE y RF, es posible diferenciar distintas acciones farmacológicas en el tejido cerebral.

Resumen de resultados

- La amantadina (40 mg/kg) y la clozapina (5 mg/kg) reducen los MIAs en ratón (Fig. 10).
- La actividad del estriado durante el *on-state* es disminuido por amantadina (30 μ M) y en mayor medida por clozapina (15 μ M, Fig. 14).
- Distinta modulación de ensambles neuronales, la amantadina amplía la variabilidad con neuronas (Fig. 15a) y su secuencia (Figs. 16a y 17b), mientras que la clozapina (Fig. 15b) disminuye la cantidad de picos significativos de coactividad (Fig. 16b y 17a) y ambos evocan ensambles con menos neuronas participantes (Fig. 17b).
- La Clozapina disminuye el grado de los nodos (Figs. 19, 20 y 21a) y la amantadina reduce el peso de las conexiones (Figs. 18, 20 y 21b). Ambas disminuyen la interconectividad (Figs. 20 y 21c).
- Usando las características de ensambles neuronales (NE) y redes funcionales (FN) se obtuvo un mayor desempeño al entrena un algoritmo de aprendizaje supervisado y PCA distinguiendo efectos entre fármacos (Fig. 22).

Discusión

Utilizando la metodología descrita en este trabajo se contribuyó evidencia sobre los mecanismos antidiscinéticos de fármacos distintos administrados directamente en tejido cerebral durante el *on-state* de DIL en ratón. La secuencia de análisis, basada en la teoría de los ensamblajes neuronales, logró clasificar efectos diferenciados en datos utilizando imagenología de calcio. De esta forma se busca incluir nuevas estrategias para el hallazgo de tratamientos farmacológicos [11], además de la conducta, registros de célula única para que haya menor dependencia en el descubrimiento accidental de fármacos [95].

Los resultados publicados de este trabajo [92], podrían tener correlación con estudios electrofisiológicos previos. Por ejemplo, se ha reportado que el ritmo gamma (oscilaciones entre 60 y 80 Hz) como una característica distintiva durante la manifestación de las discinesias en múltiples núcleos cerebrales incluyendo el estriado [72], [73], [96], así como patrones de disparo que son específicos a las neuronas que componen la vía directa y que correlacionan con las discinesias [97]. Farmacológicamente, se ha reportado la atenuación de este ritmo por acción de la amantadina [72], [96], mientras que aún se desconoce si clozapina tiene el mismo efecto en discinesias. Sin embargo, la clozapina si reduce el ritmo gamma en un modelo animal de esquizofrenia [98]. Entonces, encontrando relaciones entre registros de imagenología de calcio y eléctricos [83], [99] se podría dilucidar si los ritmos gamma subyacen a los ensamblajes neuronales y profundizar sus implicaciones computacionales en otras condiciones y con otros ritmos [100]–[102].

Las dosis sistémicas utilizadas obtuvieron resultados similares a estudios previos. En el caso de amantadina (40 mg/kg) se han publicado en cuanto a la reducción de discinesias y en múltiples especies [8], [10], [15], [35]. En el caso de clozapina (5 mg/kg) utilizamos una dosis menor de la usada en ratas [10], pero con resultados equivalentes a amantadina, dosis altas pueden provocar inmovilidad [103].

Los posibles mecanismos *in vitro* de amantadina (30 μ M) descritos en Tablas 1 podrían actuar en sinergia con clozapina. Además, se puede intuir que la alta alternancia en la secuencia de ensamblajes (Figs. 16a y 17b) y la reducción del peso de las conexiones funcionales obtenida en los ensamblajes (Figs. 18, 20 y 21b)

podrían tener relación con la reducción de las sinapsis potenciadas en las discinesias [104], [105].

De manera similar, la dosis de clozapina (15 μM) cuyos mecanismos, descritos en Tabla 2, podrían ser principalmente inhibitorios en el núcleo estriado ya que, en general, su efecto fue inhibitorio, esto es, actividad reducida (Fig. 14), ensambles con menos recurrencia (Fig. 16b y 17a) y redes funcionales con menos nodos (Figs. 19, 20 y 21a). Ambas dosis se encuentran en rangos terapéuticamente relevantes. En amantadina se han reportado concentraciones en 4 y 100 μM [5], [8], [14]. Y en clozapina un rango entre 0.96 y 2.8 μM [106] en sangre, sin embargo esta se acumula en mayor concentración, entre 15 y 24 veces, en tejido cerebral [107], [108].

Se han sentado las bases para la búsqueda de fármacos novedosos con esta metodología capaz de diferenciar acciones farmacológicas específicas. A esto se le puede mejorar con detecciones más amplias la conducta utilizando la información de los videos [109], [110] y así también mejorar la resolución de cambios motores que correlacionen con la dinámica de los ensambles neuronales.

Conclusiones

- Amantadina y clozapina tienen efectos análogos en la conducta de acuerdo con la escala de movimientos involuntarios anormales. Sin embargo, sus acciones se pueden diferenciar en los ensambles observados en el microcircuito estriatal durante el *on-state* de las discinesias.
- Estos fueron hallados gracias a la secuencia de análisis basada en la teoría de ensambles neuronales, basados en la teoría Hebbiana.
- La modulación diferenciable de amantadina y clozapina sugieren un posible uso simultáneo para ello se tiene que evaluar a diferentes dosis para medir su posible sinergia
- Futuros estudios explorarán fármacos novedosos siguiendo esta metodología.

Anexo I

Descripción de los algoritmos implementados en **FinderSpiker**: <https://vladscript.github.io/FinderSpiker/> para la detección de los tiempos transitorios de calcio, ensamblajes neuronales y redes funcionales. Código: <https://github.com/vladscript/FinderSpiker>. Parte de este anexo incluye figuras en inglés como parte de la documentación y publicación original del método en .

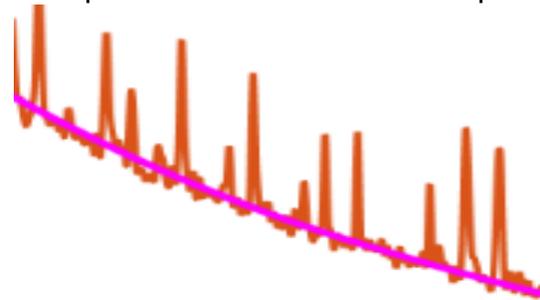
Detección de actividad neuronal

Objetivo: detectar los tiempos de subida de los transitorios de calcio en las señales de fluorescencia semiautomáticamente. La obtención de la señal de fluorescencia se hace mediante el promedio espacial dentro de la zona de interés seleccionada correspondiente al soma de la célula para cada cuadro o tiempo muestreado (trazo naranja).

En resumen, se siguen los siguientes pasos.

1. Substracción de la tendencia.

La estimación se hace mediante un filtrado de la componente lenta de fluorescencia mediante el método suavizado 'RLOESS' el cual hace una regresión de mínimos cuadrados lineales ponderados asignando un peso menor a valores atípicos (cambios fásicos), esto es, una ponderación de cero a los datos fuera de seis desviaciones absolutas de la media. En la figura de la derecha se observa los registros originales (naranja) y el filtrado RLOESS (magenta).

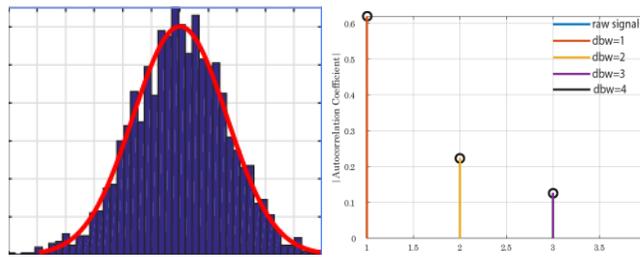


2. Substracción del ruido.

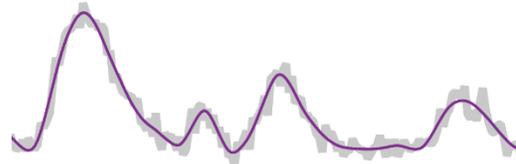
Para obtener un umbral de amplitud se estima el ruido, el cual se asume gaussiano e independiente e idénticamente distribuido. Se utiliza la función de escalamiento 'sym8' (izquierda) debido a su similitud con una respuesta típica de fluorescencia al disparo neuronal. La versión filtrada se substraer de la señal original obteniendo una estimación del ruido:



Y se calcula la distribución (abajo izquierda) y coeficiente de autocorrelación del ruido (abajo derecha):

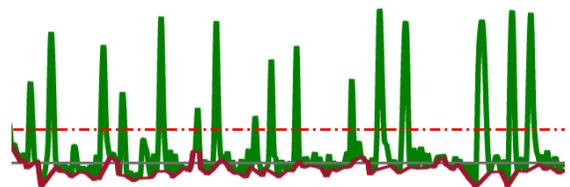


A través de la descomposición por filtrado de *wavelet* se busca que el coeficiente de autocorrelación del ruido encuentre un mínimo en función del factor de escalamiento. Obteniendo la mejor versión sin ruido (señal púrpura) y se obtiene la desviación estándar del ruido que servirá de umbral.

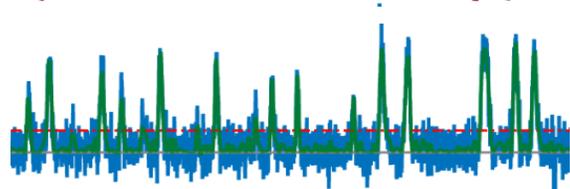


3. Señal estrictamente no negativa ($\Delta F/F_0$).

Se obtienen una componente de picos y valles por debajo de una desviación estándar (línea segmentada roja) del ruido (trazo violeta)



Señal no negativa, original con ruido (azul), sin ruido (verde), línea cero (gris), umbral de ruido (rojo):



4. Deconvolución: LASSO

Se modelan los datos de acuerdo a un modelo de convolución:

$$\Delta F = d * r + w$$

Donde

ΔF : señal no negativa sin componente de tendencia (con ruido) de fluorescencia

d : espigas o tasa de disparo (variable incógnita)

r : respuesta canónica del indicador de calcio. Se estima como un proceso autorregresivo (AR) de orden 3 mediante la solución de la ecuación de Yule-Walker con el algoritmo Levinson-Durbin.

Posteriormente se ajusta a un modelo biexponencial y **R** es la matriz Toeplitz del vector **r** :

$$r(t) = g(e^{-(t/\tau_2)} - e^{-(t/\tau_1)})$$

w : ruido como variable normal de media cero y desviación estándar $N(0, \sigma)$

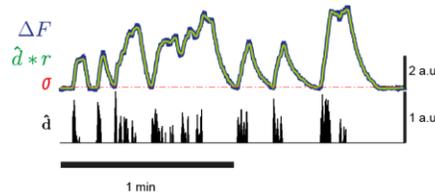
Notación vectorial para N muestras:

$$f_{N \times 1} = R_{N \times N} \cdot d_{N \times 1} + w_{N \times 1}$$

De la cual se desea estimar d , estableciendo un problema tipo LASSO:

$$\hat{d} = \arg \min_d \left(\frac{1}{2} \|f - R \cdot d\|_2^2 + \lambda \|d\|_1 \right)$$

Mediante el algoritmo SparSA, ajustando el parámetro λ que ajuste solamente los picos arriba del umbral de ruido:

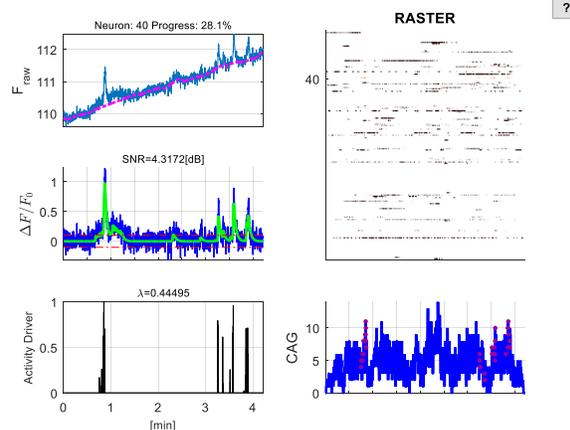


De esta forma es posible estimar los transitorios de calcio sobrepuestos. Los tiempos o cuadros donde $d > 0$ son indicados con '1' en las filas de la matriz binaria de actividad que representa el multirregistro de cada condición experimental

5. Inspección visual: artefactos y movimiento

Además, se implementó una interfaz gráfica para discriminar manualmente fluorescencia por movimiento o artefactos que se puedan confundir con transitorios de calcio.

En la interfaz se muestran 5 paneles en dos columnas. En la columna izquierda, el primer panel muestra la señal de fluorescencia original, indicando el número de neurona (o célula) y porcentaje de progreso revisado (título) y la componente de tendencia lenta (línea magenta). El segundo panel la señal no negativa o sin tendencia, así como el umbral de ruido y la relación señal a ruido (*Signal Noise Ratio*, SNR) estimada. El tercer panel, muestra la actividad estimada de acuerdo al parámetro λ que se puede aumentar (más disperso) o disminuir (más espigas). En la columna derecha el registro poblacional en un *raster plot* en el primer panel donde se indica la fila (número de neurona) y el segundo panel la gráfica de coactividad (CAG) o suma vertical de la matriz de actividad resaltando lo tiempos de actividad en los que participa la neurona mostrada en la columna izquierda. Una guía de usuario en:

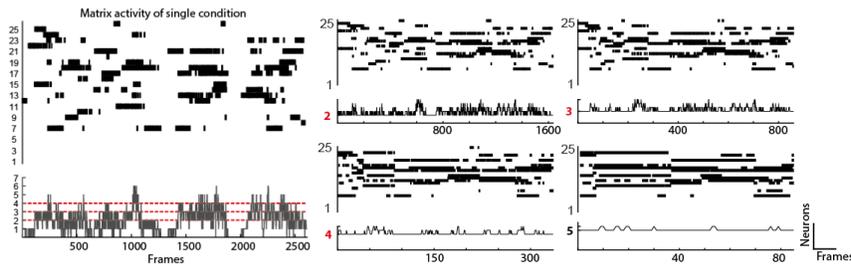


http://htmlpreview.github.io/?https://github.com/vladscript/FinderSpiker/blob/master/html/USER_GUIDE.html

Detección de ensambles neuronales:

Objetivo: detectar de manera automática los grupos de neuronas coactivas, o ensambles neuronales, que mejor clasifiquen el multirregistro simultáneo de actividad neuronal.

1. Determinar umbrales de coactividad que absorban el 75% de las células registradas:



A la derecha la matriz de actividad obtenida del proceso de detección de actividad neuronal y abajo el histograma de actividad. Las líneas rojas indican los umbrales de actividad. A la derecha las submatrices después de filtrar con el umbral. En rojo los umbrales que tienen al menos 75% de las neuronas registradas (2,3 y 4). En el caso de 5 hay muy pocas células, por lo que se descarta.

2. Se encuentra el agrupamiento que mejor predice la actividad:

a. Para cada submatriz

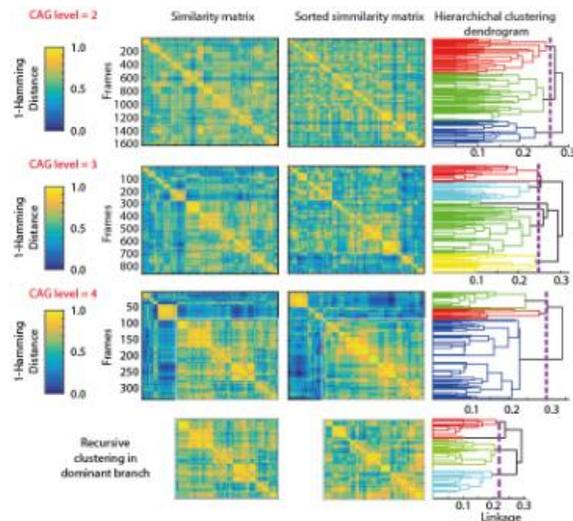
i. Se obtiene la matriz de similitud mediante la distancia de Hamming entre columnas (vectores de población neuronal)

ii. Se determina el método de enlace que sea más consistente y se obtiene el árbol dendrítico con el algoritmo de agrupamiento jerárquico.

iii. El número de *cluster* o grupos crece iterativamente hasta que se encuentren grupos redundantes, esto es, que un par de grupos tenga una intersección del 75% de neuronas.

b. Entonces, las columnas son utilizadas para entrenar un clasificador *Naïve Bayes*, cada columna con la etiqueta dada por el método de agrupamiento.

c. Se realiza un método de validación cruzada de 10 iteraciones (*k-fold cross-validation*), se promedia la precisión del agrupamiento.

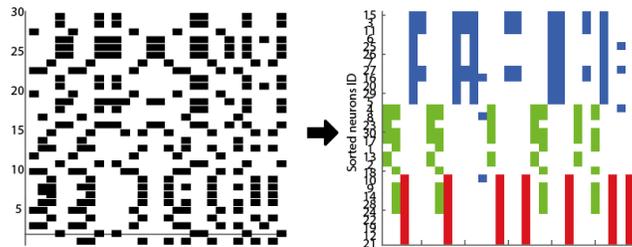


3. Se pondera el promedio de precisión con el número de columnas con actividad y el número de ensambles para prevenir sesgos porque puede haber precisiones

altas debido a un bajo número de cuadros (o columnas) y/o un reducido número de ensambles.

4. Se elige el promedio ponderado de mejor precisión. Este agrupamiento predice, en promedio, la actividad registrada.

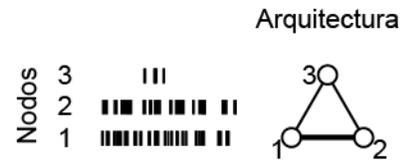
En resumen, este algoritmo soluciona el ordenamiento de filas en la matriz de actividad de acuerdo a columnas similares como se muestra en este ejemplo artificial:



De la matriz binaria (izquierda) se reordenan las filas de acuerdo con columnas similares, en este caso tres grupos (verde, rojo y azul). Cada color representa los ensambles de columnas similares que obtuvieron la mejor precisión al entrenar un algoritmo de clasificación con este agrupamiento. Gráficamente se puede a simple vista que las filas pueden revelar conjuntos de patrones similares, con intersecciones y que se alternan durante el tiempo.

Red funcional

Objetivo: A partir de la matriz de actividad y el análisis de ensamblajes neuronales, construir la red funcional donde los nodos representan neuronas y los enlaces el disparo simultáneo. El peso de cada enlace está dado por el porcentaje de disparo simultáneo de los nodos. El color de los nodos por el ensamble en el que participan o la combinación de ellos. Si participan en todos los ensambles detectados se distingue en púrpura.



Enlaces: actividad simultánea

1. Exportar datos a Gephi 0.9.1: se generan dos archivos CSV (ver documentación de Gephi)
 - A. Para cada par de neuronas de la matriz de actividad, i y j , se obtiene el % de actividad simultánea, enlistando cada enlace o aristas:

Origen	Destino	Tipo	Id	Weight
12	16	No dirigida	0	0.002339
12	18	No dirigida	1	0.002339
12	19	No dirigida	2	0.003509
12	20	No dirigida	3	0.008187
17	17	Auto excitación	4	0.000114

- B. Y una lista de nodos con atributos como coordenadas y color de ensamble, entre otros

Id	Label	Interval	Latitude	Longitud	Color
13	6		134	488	27,158,119
34	6		311	180	27,158,119
30	6,8		249	241	27,158,119
32	6,9		365	109	231,41,138
17	6,12		372	331	166,118,29
51	6,12		115	194	27,158,119

2. Se generan tablas de datos con el cálculo de parámetros deseados que se pueden exportar como archivos de texto para reincorporar en MATLAB.

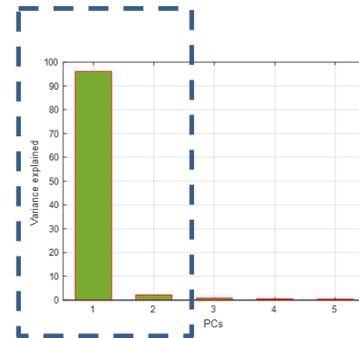
Estadísticas ×		Grado	Grado con pesos	Clustering Coefficient
Configuración		2	0.01462	1.0
Visión general de la red		3	0.02807	0.666667
Grado medio		4	0.019298	1.0
6.035	Ejecutar ⓘ	2	0.011111	1.0
Grado medio con pesos		4	0.050292	1.0
0.04	Ejecutar ⓘ	6	0.054386	0.466667
Diámetro de la red		12	0.08655	0.227273
	Ejecutar ●	13	0.122222	0.410256

Regiones de probabilidad de clasificación:

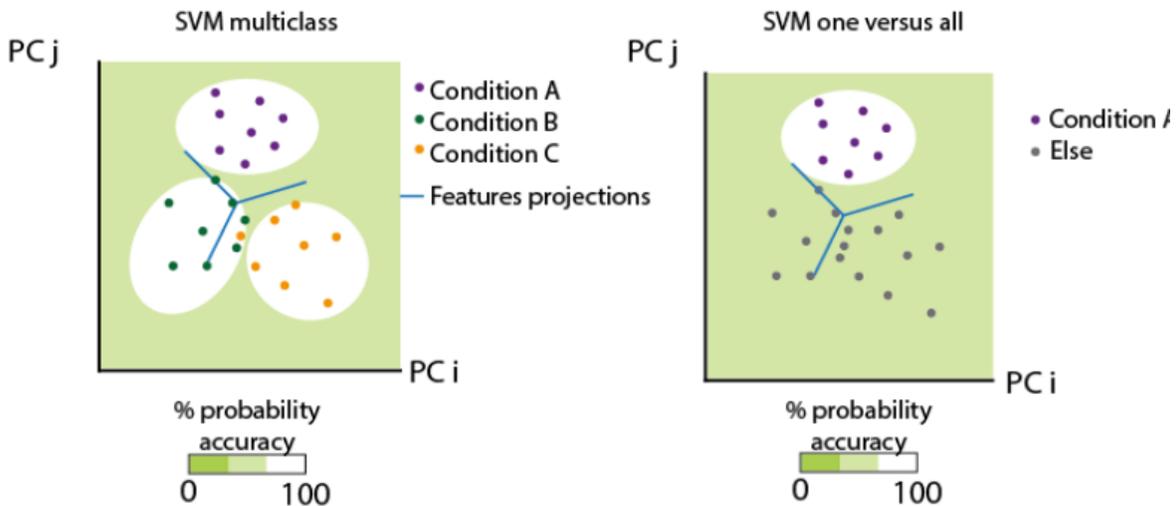
Objetivo: obtener regiones de probabilidad en un plano utilizando reducción de dimensiones y un método de aprendizaje supervisado que ilustre fronteras entre condiciones experimentales en los datos de imagenología de calcio.

De las etapas anteriores se obtienen las siguientes características, las cuales constituyen un mayor número que observaciones (condiciones experimentales). Para esto elegimos la siguiente estrategia:

1. Se aplica el método de análisis de componentes principales (PCA) con el método de descomposición en valores singulares (SVD), las características fueron previamente ponderados por la varianza inversa y seleccionamos las componentes que contengan al menos el 90% de varianza explicada



2. Se entrenó el algoritmo de máquinas de vectores soporte (por sus siglas en inglés, *Support Vector Machine*, SVM). Mediante un búsqueda exhaustiva buscamos la función *kernel* y las componentes principales con mejor precisión para clasificar los datos. Esto se hizo para múltiples clases y el caso binario o una contra todas (*one-versus-all*)



3. Selección de características. Lo pasos anteriores se repitieron para todas las combinaciones de bloques de características y se utilizaron las métricas de tasa de verdaderos positivos y tasa de falsos positivos, entre otras, para determinar cuál combinación tuvo mejor desempeño:

Referencias

- [1] P. Huot, T. H. Johnston, J. B. Koprach, S. H. Fox, and J. M. Brotchie, "The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease," *Pharmacol. Rev.*, vol. 65, no. 1, pp. 171–222, 2013.
- [2] S. H. Fox *et al.*, "International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease," *Mov. Disord.*, vol. 33, no. 8, pp. 1248–1266, Aug. 2018.
- [3] A. Barbeau, "Long-Term Side-Effects of Levodopa," *The Lancet*, vol. 297, no. 7695. Elsevier, p. 395, 20-Feb-1971.
- [4] O. Rascol, M. Fabbri, and W. Poewe, "Amantadine in the treatment of Parkinson's disease and other movement disorders," *Lancet Neurol.*, 2021.
- [5] L. V. Metman, P. Del Dotto, P. Van Den Munckhof, J. Fang, M. M. Mouradian, and T. N. Chase, "Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease," *Neurology*, vol. 50, no. 5, pp. 1323–1326, May 1998.
- [6] F. Durif *et al.*, "Clozapine improves dyskinesias in Parkinson disease A double-blind, placebo-controlled study," *Neurology*, vol. 62, no. 3, pp. 381–388, Feb. 2004.
- [7] J. Kornhuber, J. Bormann, M. Hübers, K. Rusche, and P. Riederer, "Effects of the 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel: a human postmortem brain study," *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.*, vol. 206, no. 4, pp. 297–300, Apr. 1991.
- [8] E. F. Brigham *et al.*, "Pharmacokinetic/Pharmacodynamic correlation analysis of amantadine for levodopa-induced dyskinesia," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 367, no. 2, pp. 373–381, 2018.
- [9] M. A. Cenci and A. R. Crossman, "Animal models of l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease," *Mov. Disord.*, vol. 33, no. 6, pp. 889–899, 2018.
- [10] M. Lundblad, M. Andersson, C. Winkler, D. Kirik, N. Wierup, and M. A. Cenci Nilsson, "Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 15, no. 1, pp. 120–132, 2002.
- [11] T. H. Johnston, A. M. B. Lacoste, N. P. Visanji, A. E. Lang, S. H. Fox, and J. M. Brotchie, "Repurposing drugs to treat L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease," *Neuropharmacology*, vol. 147, pp. 11–27, 2019.
- [12] C. G. Parsons, V. A. Panchenko, V. O. Pinchenko, A. Y. Tsyndrenko, and O. A. Krishtal, "Comparative patch-clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal neurons on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantine," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 8, no. 3, pp. 446–454, Mar. 1996.

- [13] M. A. Paquette *et al.*, "Anti-dyskinetic mechanisms of amantadine and dextromethorphan in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease: Role of NMDA vs. 5-HT1A receptors," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 36, no. 9, pp. 3224–3234, 2012.
- [14] W. Shen *et al.*, "Striatal Kir2 K⁺ channel inhibition mediates the antidyskinetic effects of amantadine," *J. Clin. Invest.*, vol. 130, no. 5, pp. 2593–2601, Apr. 2020.
- [15] S. Bido, M. Marti, and M. Morari, "Amantadine attenuates levodopa-induced dyskinesia in mice and rats preventing the accompanying rise in nigral GABA levels," *J. Neurochem.*, vol. 118, no. 6, pp. 1043–1055, 2011.
- [16] A. Arai, K. Kannari, H. Shen, T. Maeda, T. Suda, and M. Matsunaga, "Amantadine increases L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats," *Brain Res.*, vol. 972, no. 1–2, pp. 229–234, 2003.
- [17] R. E. Heikkila and G. Cohen, "Evaluation of amantadine as a releasing agent or uptake blocker for H₃-dopamine in rat brain slices," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 20, no. 2, pp. 156–160, 1972.
- [18] N. B. Mercuri, F. Stratta, P. Calabresi, and G. Bernardi, "Nomifensine but not amantadine increases dopamine-induced responses on rat substantia nigra zona compacta neurons," *Neurosci. Lett.*, vol. 131, no. 2, pp. 145–148, 1991.
- [19] M. K. Menon, W. G. Clark, and R. M. Fleming, "Blockade of the central effects of d-amphetamine sulfate by amantadine hydrochloride," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 21, no. 3, pp. 311–317, Mar. 1973.
- [20] A. Lupp, C. H. Lucking, R. Koch, R. Jackisch, and T. J. Feuerstein, "Inhibitory effects of the antiparkinsonian drugs memantine and amantadine on N-methyl-D-aspartate-evoked acetylcholine release in the rabbit caudate nucleus in vitro," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 263, no. 2, pp. 717–724, 1992.
- [21] H. Matsubayashi, K. L. Swanson, and E. X. Albuquerque, "Amantadine inhibits nicotinic acetylcholine receptor function in hippocampal neurons," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 281, no. 2, pp. 834–844, 1997.
- [22] S. Sifakis, D. Tzachanis, M. Samara, and G. Papazisis, "Antipsychotic Drugs: From Receptor-binding Profiles to Metabolic Side Effects," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 16, no. 8, pp. 1210–1223, 2017.
- [23] M. S. Farrell *et al.*, "In vitro and in vivo characterization of the alkaloid nuciferine," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, pp. 1–27, 2016.
- [24] B. Hermann, C. H. R. Wetzel, E. Pestel, W. Zieglgänsberger, F. Holsboer, and R. Rupprecht, "Functional antagonistic properties of clozapine at the 5-HT₃ receptor," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 225, no. 3, pp. 957–960, Aug. 1996.
- [25] C. J. Wenthur and C. W. Lindsley, "Classics in chemical neuroscience:

- Clozapine,” *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 4, no. 7, pp. 1018–1025, 2013.
- [26] H. Iderberg, A. C. McCreary, M. A. Varney, M. A. Cenci, and A. Newman-Tancredi, “Activity of serotonin 5-HT_{1A} receptor ‘biased agonists’ in rat models of Parkinson’s disease and L-DOPA-induced dyskinesia,” *Neuropharmacology*, vol. 93, pp. 52–67, 2015.
- [27] M. Carta, T. Carlsson, D. Kirik, and A. Björklund, “Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats,” *Brain*, vol. 130, no. 7, pp. 1819–1833, 2007.
- [28] A. Nahimi *et al.*, “Serotonergic modulation of receptor occupancy in rats treated with L-DOPA after unilateral 6-OHDA lesioning,” *J. Neurochem.*, vol. 120, no. 5, pp. 806–817, Mar. 2012.
- [29] A. Muñoz *et al.*, “Combined 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia,” *Brain*, vol. 131, no. 12, pp. 3380–3394, Dec. 2008.
- [30] A. Hamadjida *et al.*, “The highly selective 5-HT_{2A} antagonist EMD-281,014 reduces dyskinesia and psychosis in the L-DOPA-treated parkinsonian marmoset,” *Neuropharmacology*, vol. 139, pp. 61–67, Sep. 2018.
- [31] P. Sirota, T. Mosheva, H. Shabtay, N. Giladi, and A. D. Korczyn, “Use of the selective serotonin 3 receptor antagonist ondansetron in the treatment of neuroleptic-induced tardive dyskinesia,” *Am. J. Psychiatry*, vol. 157, no. 2, pp. 287–289, Feb. 2000.
- [32] C. Kwan, I. Frouni, D. Bédard, A. Hamadjida, and P. Huot, “Ondansetron, a highly selective 5-HT₃ receptor antagonist, reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson’s disease,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 871, p. 172914, Mar. 2020.
- [33] M. G. Palfreyman *et al.*, “Electrophysiological, biochemical and behavioral evidence for 5-HT₂ and 5-HT₃ mediated control of dopaminergic function,” *Psychopharmacol. 1993 1121*, vol. 112, no. 1, pp. S60–S67, Mar. 1993.
- [34] F. C. Nucifora, M. Mihaljevic, B. J. Lee, and A. Sawa, “Clozapine as a Model for Antipsychotic Development,” *Neurother. 2017 143*, vol. 14, no. 3, pp. 750–761, Jun. 2017.
- [35] I. Sebastianutto, N. Maslava, C. R. Hopkins, and M. A. Cenci, “Validation of an improved scale for rating L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse and effects of specific dopamine receptor antagonists,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 96, pp. 156–170, 2016.
- [36] H. S. Lindgren, K. E. Ohlin, and M. A. Cenci, “Differential Involvement of D1 and D2 Dopamine Receptors in L-DOPA-Induced Angiogenic Activity in a Rat Model of Parkinson’s Disease,” *Neuropsychopharmacol. 2009 3412*, vol. 34, no. 12, pp. 2477–2488, Jul. 2009.
- [37] “#55 Neuropsychology, Illusions & Bending Reality, with Dominique Makowski,” *Learn. Bayesian Stat.*

- [38] R. Grondin, V. D. Doan, L. Grégoire, and P. J. Bédard, "D1 receptor blockade improves l-dopa-induced dyskinesia but worsens parkinsonism in MPTP monkeys," *Neurology*, vol. 52, no. 4, pp. 771–771, Mar. 1999.
- [39] R. Kumar *et al.*, "Evaluation of D2 and D3 dopamine receptor selective compounds on l-dopa-dependent abnormal involuntary movements in rats," *Neuropharmacology*, vol. 56, no. 6–7, pp. 956–969, May 2009.
- [40] O. Solís, J. R. Garcia-Montes, A. González-Granillo, M. Xu, and R. Moratalla, "Dopamine D3 receptor Modulates l-DOPA-Induced Dyskinesia by Targeting D1 Receptor-Mediated Striatal Signaling," *Cereb. Cortex*, vol. 27, no. 1, pp. 435–446, Jan. 2017.
- [41] N. P. Visanji, S. H. Fox, T. Johnston, G. Reyes, M. J. Millan, and J. M. Brotchie, "Dopamine D3 receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease," *Neurobiol. Dis.*, vol. 35, no. 2, pp. 184–192, Aug. 2009.
- [42] F. Mela, M. J. Millan, M. Brocco, and M. Morari, "The selective D3 receptor antagonist, S33084, improves parkinsonian-like motor dysfunction but does not affect l-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine hemi-lesioned rats," *Neuropharmacology*, vol. 58, no. 2, pp. 528–536, Feb. 2010.
- [43] A. H. Tahar, N. Bélanger, E. Bangassoro, L. Grégoire, and P. J. Bédard, "Antidyskinetic effect of JL-18, a clozapine analog, in parkinsonian monkeys," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 399, no. 2–3, pp. 183–186, Jul. 2000.
- [44] J. Arnt and T. Skarsfeldt, "Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence," *Neuropsychopharmacology*, vol. 18, no. 2, pp. 63–101, 1998.
- [45] P. Michal, M. Lysíková, E. E. El-Fakahany, and S. Tuček, "Clozapine interaction with the M2 and M4 subtypes of muscarinic receptors," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 376, no. 1–2, pp. 119–125, Jul. 1999.
- [46] D. De Berardis *et al.*, "Safety of antipsychotics for the treatment of schizophrenia: a focus on the adverse effects of clozapine:," <https://doi.org/10.1177/2042098618756261>, vol. 9, no. 5, pp. 237–256, Feb. 2018.
- [47] S. K. Singhal, L. Zhang, M. Morales, and M. Oz, "Antipsychotic clozapine inhibits the function of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors," *Neuropharmacology*, vol. 52, no. 2, pp. 387–394, Feb. 2007.
- [48] N. E. Chambers *et al.*, "Effects of Muscarinic Acetylcholine m1 and m4 Receptor Blockade on Dyskinesia in the Hemi-Parkinsonian Rat," *Neuroscience*, vol. 409, pp. 180–194, 2019.
- [49] Y. Ding, L. Won, J. P. Britt, S. A. O. Lim, D. S. McGehee, and U. J. Kang, "Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 2, pp. 840–845, Jan. 2011.

- [50] W. Shen *et al.*, "M4 Muscarinic Receptor Signaling Ameliorates Striatal Plasticity Deficits in Models of L-DOPA-Induced Dyskinesia," *Neuron*, vol. 88, no. 4, pp. 762–773, 2015.
- [51] M. Quik, C. Campos, and S. R. Grady, "Multiple CNS nicotinic receptors mediate L-dopa-induced dyskinesias: Studies with parkinsonian nicotinic receptor knockout mice," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 86, no. 8, pp. 1153–1162, 2013.
- [52] D. Zhang *et al.*, "α7 nicotinic receptor agonists reduce levodopa-induced dyskinesias with severe nigrostriatal damage," *Mov. Disord.*, vol. 30, no. 14, pp. 1901–1911, Dec. 2015.
- [53] H. O. Kalkman and E. Loetscher, "α2C-Adrenoceptor blockade by clozapine and other antipsychotic drugs," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 462, no. 1–3, pp. 33–40, Feb. 2003.
- [54] K. Buck and B. Ferger, "The selective α1 adrenoceptor antagonist HEAT reduces L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease," *Synapse*, vol. 64, no. 2, pp. 117–126, Feb. 2010.
- [55] N. P. Visanji, S. H. Fox, T. H. Johnston, M. J. Millan, and J. M. Brotchie, "α1-Adrenoceptors Mediate Dihydroxyphenylalanine-Induced Activity in 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Lesioned Macaques," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 328, no. 1, pp. 276–283, Jan. 2009.
- [56] E. P. M. Prinssen, B. A. Ellenbroek, and A. R. Cools, "Peripheral and central adrenoceptor modulation of the behavioural effects of clozapine in the paw test," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 112, no. 3, pp. 769–774, Jul. 1994.
- [57] N. Bhide, D. Lindenbach, C. J. Barnum, J. A. George, M. A. Surrena, and C. Bishop, "Effects of the beta-adrenergic receptor antagonist Propranolol on dyskinesia and L-DOPA-induced striatal DA efflux in the hemi-parkinsonian rat," *J. Neurochem.*, vol. 134, no. 2, pp. 222–232, Jul. 2015.
- [58] M. Humbert-Claude, E. Davenas, F. Gbahou, L. Vincent, and J. M. Arrang, "Involvement of histamine receptors in the atypical antipsychotic profile of clozapine: a reassessment in vitro and in vivo," *Psychopharmacol. 2011 2201*, vol. 220, no. 1, pp. 225–241, Sep. 2011.
- [59] S. A. O. Lim *et al.*, "Enhanced histamine H2 excitation of striatal cholinergic interneurons in L-DOPA-induced dyskinesia," *Neurobiol. Dis.*, vol. 76, pp. 67–76, Apr. 2015.
- [60] Y. Wu *et al.*, "Evidence that clozapine directly interacts on the GABAB receptor," *Neuroreport*, vol. 22, no. 13, pp. 637–641, Sep. 2011.
- [61] L. Schwieler, K. R. Linderholm, L. K. Nilsson-Todd, S. Erhardt, and G. Engberg, "Clozapine interacts with the glycine site of the NMDA receptor: Electrophysiological studies of dopamine neurons in the rat ventral tegmental area," *Life Sci.*, vol. 83, no. 5–6, pp. 170–175, Aug. 2008.
- [62] M. A. Paquette, A. M. Anderson, J. R. Lewis, C. K. Meshul, S. W. Johnson,

and S. Paul Berger, “MK-801 inhibits L-DOPA-induced abnormal involuntary movements only at doses that worsen parkinsonism,” *Neuropharmacology*, vol. 58, no. 7, pp. 1002–1008, 2010.

- [63] A. J. Flores *et al.*, “Differential effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 on dopamine receptor D1- and D2-induced abnormal involuntary movements in a preclinical model,” *Neurosci. Lett.*, vol. 564, pp. 48–52, Apr. 2014.
- [64] Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, R. Mechoulam, and D. Offen, “The CB1 Cannabinoid Receptor Agonist, HU-210, Reduces Levodopa-Induced Rotations in 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rats,” *Pharmacol. Toxicol.*, vol. 93, no. 2, pp. 66–70, Aug. 2003.
- [65] M. G. Morgese, T. Cassano, V. Cuomo, and A. Giuffrida, “Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson’s disease: Role of CB1 and TRPV1 receptors,” *Exp. Neurol.*, vol. 208, no. 1, pp. 110–119, Nov. 2007.
- [66] M. A. Cenci, H. Jörntell, and P. Petersson, “On the neuronal circuitry mediating L-DOPA-induced dyskinesia,” *Journal of Neural Transmission*, vol. 125, no. 8, pp. 1157–1169, 2018.
- [67] I. D. Wahyu, S. Chiken, T. Hasegawa, H. Sano, and A. Nambu, “Abnormal cortico-basal ganglia neurotransmission in a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia,” *J. Neurosci.*, vol. 41, no. 12, pp. 2668–2683, 2021.
- [68] K. Yang, X. Zhao, C. Wang, C. Zeng, Y. Luo, and T. Sun, “Circuit Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia (LID),” *Front. Neurosci.*, vol. 15, 2021.
- [69] A. E. Girasole *et al.*, “A Subpopulation of Striatal Neurons Mediates Levodopa-Induced Dyskinesia,” *Neuron*, vol. 97, no. 4, pp. 787-795.e6, 2018.
- [70] X. A. Perez, D. Zhang, T. Bordia, and M. Quik, “Striatal D1 medium spiny neuron activation induces dyskinesias in parkinsonian mice,” *Mov. Disord.*, vol. 32, no. 4, pp. 538–548, 2017.
- [71] T. Bordia, X. A. Perez, J. E. Heiss, D. Zhang, and M. Quik, “Optogenetic activation of striatal cholinergic interneurons regulates L-dopa-induced dyskinesias,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 91, pp. 47–58, 2016.
- [72] M. Tamtè, I. Brys, U. Richter, N. Ivica, P. Halje, and P. Petersson, “Systems-level neurophysiological state characteristics for drug evaluation in an animal model of levodopa-induced dyskinesia,” *J. Neurophysiol.*, vol. 115, no. 3, pp. 1713–1729, 2016.
- [73] J. J. Belić, P. Halje, U. Richter, P. Petersson, and J. Hellgren Kotaleski, “Untangling Cortico-Striatal Connectivity and Cross-Frequency Coupling in L-DOPA-Induced Dyskinesia,” *Front. Syst. Neurosci.*, vol. 10, no. March, p. 26, 2016.

- [74] S. Ghosh and A. M. Zador, "Corticostriatal Plasticity Established by Initial Learning Persists After Behavioral Reversal," *eneuro*, vol. 8, no. 2, p. ENEURO.0209-20.2021, Feb. 2021.
- [75] J. Pérez-Ortega *et al.*, "Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits," *Neurobiol. Dis.*, vol. 91, pp. 347–361, 2016.
- [76] J. G. Parker *et al.*, "Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states," *Nature*, vol. 557, no. 7704, pp. 177–182, 2018.
- [77] A. Aparicio-Juárez *et al.*, "Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 49, no. 6, pp. 834–848, Mar. 2019.
- [78] L. Carrillo-Reid *et al.*, "Encoding network states by striatal cell assemblies," *J. Neurophysiol.*, vol. 99, no. 3, pp. 1435–1450, 2008.
- [79] E. Lara-González, M. Duhne, F. Ávila-Cascajares, S. Cruz, and J. Bargas, "Comparison of Actions between L-DOPA and Different Dopamine Agonists in Striatal DA-Depleted Microcircuits In Vitro: Pre-Clinical Insights," *Neuroscience*, vol. 410, no. May, pp. 76–96, 2019.
- [80] L. Carrillo-Reid, J. -e. K. Miller, J. P. Hamm, J. Jackson, and R. Yuste, "Endogenous Sequential Cortical Activity Evoked by Visual Stimuli," *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 23, pp. 8813–8828, 2015.
- [81] V. Plata, M. Duhne, J. E. Pérez-Ortega, J. Barroso-Flores, E. Galarraga, and J. Bargas, "Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of parkinsonian tissue in vitro," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013.
- [82] V. Plata *et al.*, "Global actions of nicotine on the striatal microcircuit," *Front. Syst. Neurosci.*, vol. 7, no. November, pp. 1–13, 2013.
- [83] M. Serrano-Reyes *et al.*, "Spontaneous Activity of Neuronal Ensembles in Mouse Motor Cortex: Changes after GABAergic Blockade," *Neuroscience*, vol. 446, pp. 304–322, Oct. 2020.
- [84] L. Carrillo-Reid and R. Yuste, "What Is a Neuronal Ensemble?," in *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience*, Oxford University Press, 2020.
- [85] T. Lagache, A. Hanson, J. E. Pérez-Ortega, A. Fairhall, and R. Yuste, "Tracking calcium dynamics from individual neurons in behaving animals," *PLOS Comput. Biol.*, vol. 17, no. 10, p. e1009432, Oct. 2021.
- [86] J. Pérez-Ortega, T. Alejandro-García, and R. Yuste, "Long-term stability of cortical ensembles," *Elife*, vol. 10, Jul. 2021.
- [87] C. J. Shatz, "The developing brain," *Sci. Am.*, vol. 267, no. 3, pp. 61–67, 1992.
- [88] G. A. Smith, A. Heuer, S. B. Dunnett, and E. L. Lane, "Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: Predicting l-DOPA-induced dyskinesia," *Behav. Brain Res.*, vol. 226, no. 1, pp. 281–292, Jan. 2012.

- [89] M. A. Cenci and M. Lundblad, "Ratings of l-dopa-induced dyskinesia in the unilateral 6-ohda lesion model of parkinson's disease in rats and mice," *Curr. Protoc. Neurosci.*, vol. 41, no. 1, pp. 9.25.1-9.25.23, 2007.
- [90] M. Lundblad, A. Usiello, M. Carta, K. Håkansson, G. Fisone, and M. A. Cenci, "Pharmacological validation of a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia," *Exp. Neurol.*, vol. 194, no. 1, pp. 66–75, 2005.
- [91] W. E. Bleidner, J. B. Harmon, W. E. Hewes, T. E. Lynes, and E. C. Hermann, "ABSORPTION, DISTRIBUTION AND EXCRETION OF AMANTADINE HYDROCHLORIDE," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 150, no. 3, 1965.
- [92] V. M. Calderón *et al.*, "Striatal neuronal ensembles reveal differential actions of amantadine and clozapine to ameliorate mice L-DOPA-induced dyskinesia," *Neuroscience*, Mar. 2022.
- [93] M. A. Cenci, A. R. Crossman, E. Tronci, and V. Francardo, "Animal models of l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease," *Mov. Disord.*, vol. 33, no. 6, pp. 889–899, 2018.
- [94] M. Bastian, S. Heymann, and M. Jacomy, "Gephi: An open source software for exploring and manipulating networks. BT - International AAAI Conference on Weblogs and Social," *Int. AAAI Conf. Weblogs Soc. Media*, pp. 361–362, 2009.
- [95] G. Hubsher, M. Haider, and M. S. Okun, "Amantadine: The journey from fighting flu to treating Parkinson disease," *Neurology*, vol. 78, no. 14, pp. 1096–1099, 2012.
- [96] C. Zheng *et al.*, "Distinct anti-dyskinetic effects of amantadine and group II metabotropic glutamate receptor agonist LY354740 in a rodent model: An electrophysiological perspective," *Neurobiol. Dis.*, vol. 139, no. October 2019, p. 104807, 2020.
- [97] M. B. Ryan, C. Bair-Marshall, and A. B. Nelson, "Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia," *Cell Rep.*, vol. 23, no. 12, pp. 3438–3446, 2018.
- [98] M. R. Hudson, G. Rind, T. J. O'brien, and N. C. Jones, "Reversal of evoked gamma oscillation deficits is predictive of antipsychotic activity with a unique profile for clozapine," *Transl. Psychiatry*, vol. 6, no. 4, pp. 18–20, 2016.
- [99] M. B. Ahrens, M. B. Orger, D. N. Robson, J. M. Li, and P. J. Keller, "Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy," *Nat. Methods*, vol. 10, no. 5, pp. 413–420, May 2013.
- [100] O. Jensen and L. L. Colgin, "Cross-frequency coupling between neuronal oscillations," *Trends Cogn. Sci.*, vol. 11, no. 7, pp. 267–269, 2007.
- [101] K. J. Friston, T. Shiner, T. Fitzgerald, J. M. Galea, and R. Adams, "Dopamine, Affordance and Active Inference," *PLoS Comput Biol*, vol. 8, no. 1, p. 1002327, 2012.

- [102] K. J. Friston, A. M. Bastos, D. Pinotsis, and V. Litvak, "LFP and oscillations-what do they tell us?," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 31, pp. 1–6, 2015.
- [103] K. J. Aitchison *et al.*, "Clozapine pharmacokinetics and pharmacodynamics studied with CYP1A2-null mice," *J. Psychopharmacol.*, vol. 14, no. 4, pp. 353–359, 2000.
- [104] B. Picconi *et al.*, "Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia," *Nat. Neurosci.*, vol. 6, no. 5, pp. 501–506, 2003.
- [105] V. Ghiglieri, V. Bagetta, V. Pendolino, B. Picconi, and P. Calabresi, "Corticostriatal plastic changes in experimental L-DOPA-induced dyskinesia," *Parkinsons. Dis.*, vol. 2012, 2012.
- [106] K. Fukuyama, R. Kato, M. Murata, T. Shiroyama, and M. Okada, "Clozapine normalizes a glutamatergic transmission abnormality induced by an impaired NMDA receptor in the thalamocortical pathway via the activation of a group iii metabotropic glutamate receptor," *Biomolecules*, vol. 9, no. 6, pp. 1–18, 2019.
- [107] H. Weigmann, S. Härtter, V. Fischer, N. Dahmen, and C. Hiemke, "Distribution of clozapine and desmethylclozapine between blood and brain in rats," *Eur. Neuropsychopharmacol.*, vol. 9, no. 3, pp. 253–256, 1999.
- [108] R. J. Baldessarini, F. Centorrino, D. Huston Lyons, B. M. Cohen, J. G. Flood, and S. A. Volpicelli, "Tissue concentrations of clozapine and its metabolites in the rat," *Neuropsychopharmacology*, vol. 9, no. 2, pp. 117–124, 1993.
- [109] A. Mathis *et al.*, "DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning," *Nat. Neurosci.*, vol. 21, no. 9, pp. 1281–1289, 2018.
- [110] L. Andreoli, M. Abbaszadeh, X. Cao, and M. A. Cenci, "Distinct patterns of dyskinetic and dystonic features following D1 or D2 receptor stimulation in a mouse model of parkinsonism," *Neurobiol. Dis.*, vol. 157, p. 105429, Sep. 2021.