



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTIVIDAD NEURONAL DE LAS DIFERENTES POBLACIONES
DEL MICROCIRCUITO ESTRIATAL DE UN MODELO MURINO
DE LA ENFERMEDAD PARKINSON

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

JOSÉ OSWALDO SÁNCHEZ LOBATO

Bajo la tutoría de:

ASESOR: DRA. MARIANA DUHNE RAMÍREZ

CO-ASESOR: DRA. ESTHER LARA GONZÁLEZ

Puebla, Pue. 11/2020



Agradecimientos Académicos

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por ser mi hogar académico. Por ejercer una sólida y sistemática educación sobre mí, por brindarme la oportunidad de tener una profesión e inculcarme en la cultura, el arte, los deportes y sobre todo un lugar en la ciencia. Gracias por ser una institución pública y autónoma tan comprometida con la formación integral de profesionales y ciudadanos críticos y reflexivos abierta a todo tipo de personas.

A Facultad de Ciencias Biológicas, por ser mi alma mater. Por tener profesores tan capaces que construyen y fomentan el desarrollo de esta licenciatura, Por integrar año con año nuevas generaciones de estudiantes y consolidar con tus conocimientos a nuevos profesionistas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar académico. Gracias por los conocimientos descomunales que subyacen de grandes investigadores y científicos con los que me cruce en mi desarrollo tanto de mi licenciatura como de este proyecto de tesis. Gracias por ser una pieza clave para mi desarrollo profesional y personal.

Al Dr. José Bargas Díaz por todo el apoyo en el desarrollo de este proyecto y por su apoyo en mi formación académica. Le agradezco la oportunidad de estar en su laboratorio.

A la Dra. Mariana Duhne Ramírez y a la Dra. Esther Lara González. Les agradezco el poder incluirme en el desarrollo de esta investigación, su dedicación y los sacrificios hechos para para mi formación académica y personal.

Al Físico Juan Antonio Laville Conde por todo su apoyo en el desarrollo del proyecto y la solución de problemas técnicos.

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

A la unidad de cómputo del IFC, Ana María Escalante Gonzalbo y a Francisco Pérez Eugenio.

A los ingenieros del Taller de Mantenimiento del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Galván Lobato y el Ing. Manuel Ortíz Benavides por su apoyo y asesoría en el mantenimiento y operación de los equipos de Investigación del Laboratorio.

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

Al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la licenciatura en Biotecnología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Agradecimientos Personales

A mis padres, por brindarme la oportunidad de vivir, por ser un soporte emocional, por su rigurosa educación, por inculcarme de valores y las ganas de vivir cada día como el último, por guiarme cuando estoy perdido, por mostrarme que la vida está llena de posibilidades. Por pararse erguidos frente a las tormentas. Por su amor incondicional y su sacrificio.

A mis hermanos, porque son mi combustible cuando la noche es más oscura. Porque la familia es primero y como hermano mayor, necesito ser su modelo a seguir sin importar las adversidades. Son mis compañeros en esta complicada existencia. Sin ustedes no sería lo que soy ahora. Gracias por esos primeros momentos en los que soñamos con ser algo más y pensar que podríamos lograrlo. Y gracias por no desistir hasta ahora.

A los primeros amigos verdaderos de mi vida. Gracias Anny, por estar en un momento crucial en mi vida. Era víctima de mi destino. Y un día que no notaste, brillaste con tanta intensidad que aparte la mirada. Gracias por demostrarme que la vida es aceptable y hacerme entender que, aunque crezcas en la oscuridad, está en uno mismo luchar por tener la suficiente luz en su vida para seguir su propio camino, y forjar tu propio destino.

Gracias Dan, Armando y Ale. Por formar a Noble Team, gracias por su amistad, por los momentos divertidos que tenemos cada vez que nos reunimos. Han estado en tantas etapas de mi vida y he crecido a su lado como camaradas, como rivales, y como iguales. Son la clase de persona de nunca dejaría morir solo a un compañero, y la clase de amigos que nunca mentirían y nunca te abandonan. Sus valores son tan sólidos y sus intenciones tan puras... Y las aventuras son inigualables a su lado. Gracias Dan, por ir conmigo a escalar, a jugar, por tantas charlas que tuvimos y por tus consejos. Gracias Armando, porque a pesar de estar más ausente que los demás, tu amistad sigue perdurando con fuerza cuando nos reunimos cada vez. Y Ale, mi amiga de prepa y universidad, no hay persona tan increíble en este mundo que compita contra tu sinceridad y buenas intenciones. Siempre contare contigo, y no hay nada mejor que eso. Con ustedes entendí, que un verdadero amigo te hace sentir que, en el día más atemorizante, en la noche más oscura, manteniendo fuertes corazones y almas encendidas, cuando todo parece perdido en este mundo, se puede mirar a las estrellas porque la esperanza brilla incandescentemente y todo estará bien. Oly oly oxen free.

A mis amigos de la universidad. Ram, Eric, Jesús, Jael, Sam, Rigo, Jose Luis, Mariana, Rodrigo, Judith, Jorge y Diana. Con ustedes aprendí, que un corazón no está dentro de nuestro

cuerpo, sino que se crea un corazón entre las personas cuando se conocen por primera vez. Un vínculo que cobra vida entre los individuos. Una conexión sentimental. Cuando piensas en algo o alguien te importa... Ahí nace tu corazón. Son la luz que el mundo nunca pidió, pero sin duda necesita. Sus sonrisas se inmortalizaron en mi corazón. Gracias por ser mis amigos. Siempre agradeceré a Ram por cada momento escalando en los rocódromos y por siempre apoyarme, por ser un amigo que siempre estará ahí cuando te necesito y por estar en mis momentos de mayor debilidad, por nunca dejarme caer. A Eric por su camaradería inigualable, por vivir más que como roomies, como familia, por su apoyo emocional y por ser un modelo a seguir, nunca conocí a nadie tan dedicado y humilde, y agradezco haberte conocido y espero ser como tu algún día. A Sam, otro roomie que considero mi familia, eres la persona más valiente, divertida, honesta, trabajadora y quiero vivir más aventuras contigo, quiero aprender más de ti y gracias por estar en mi vida. A Jose Luis, quien tengo el honor de poder ser su amigo, y compartir cortos pero valiosos momentos de amistad, de convivencia, y de desafíos académicos, tenemos tanto en común que es increíble para mí tener a alguien que comparta tantos puntos de vista conmigo, te quiero mucho amigo. A Jesús por ser un modelo de valentía y determinación a seguir, una persona que nunca se rinde y aunque no hace grandes proezas, está ahí en esos pequeños momentos y hace esas pequeñas acciones para ayudar a sus amigos. A Jael, mi amiga más fuerte, decidida, capaz, sincera y la persona más pura que haya pisado la tierra, caracterizada por su corazón honesto dispuesto a ayudar a quien lo necesita. A Judith, por su sincera amistad, a Rodrigo, por ser otro amigo en el que confiar ciegamente. A Rigo por todo el tiempo que reímos juntos, a Jorge por ser otro amigo fiel y discreto, una persona que considero mi igual y mi rival. A Mariana Leal, por llegar con todos nosotros y ser una más, y compartir grandes momentos de nuestra amistad. A Julieta, por ser tan amable y una amiga muy divertida, con quien a veces me da pena tratar debido al desafortunado accidente de tu celular, pero que, si llegas a leer esto, aprovecho para decirte que te tengo mucha estima y quiero seguir siendo tu amigo. Y a Diana, una chica que es la presentación misma de que somos lo que hacemos repetidamente, por lo que la virtud no es un acto, sino un hábito, eres una persona que admiro y que a pesar de que no pasamos mucho tiempo como amigos, espero que nuestra amistad perdure trascendiendo el espacio y el tiempo.

A mis amigos del IFC. Gracias a Pepe, Montse, Marto y Ari. Sin todos ustedes no habría llegado tan lejos, los seminarios y las estancias no hubieran sido posible, y no hubieran sido las mejores. De todos he aprendido tantas cosas científicas, culturales y sociales. Contar con su experiencia y conocimientos es algo que nunca podré pagar, y su amistad es lo mejor que me pudo pasar. Gracias Pepe por las estancias en México, por tus consejos y enseñanzas, gracias, Marto por ilustrarme un poco en la programación, en Matlab, y cosas así. Gracias Montse por el apoyo en el laboratorio, por el apoyo académico en las neurociencias, y por convertirte en un amigo más. Y gracias, Ari, por apoyarnos en los seminarios.

A Mariana Duhne, mi tutora. Gracias por aceptarme en tu proyecto, por ser un maestro que le importa formar gente crítica, por tus enseñanzas, por tu confianza, tu dedicación, tu amistad y por tu apoyo. Gracias por todos esos seminarios y por ilustrarme en las neurociencias, por apoyarme cuando iba a hacer las pequeñas estancias y por todo el sacrificio que conllevo. Eres un pilar en mi formación académica y personal. Gracias por contagiarme tu pasión en la ciencia, por definir los siguientes pasos de mi futuro y por seguir guiándome hasta el momento. Gracias a ti, ahora sé que soy capaz de vencer lo que sea. Tú y Esther son otros haces de luz que el mundo necesita, el tipo de personas que serán clave para acabar con todo lo que está mal en el mundo. Si a ti junto a Esther las pusieran en un amanecer junto al sol, probablemente el universo explotaría por chocar tales enormes masas de luz. Las quiero infinitamente y sigan brillando por la eternidad.

A Esther, te agradezco todo lo que has hecho. Sin ti, no sé si tendría un objetivo tan claro y un sueño que cumplir. Solo tenía las ganas de darlo todo, pero no sabía que quería. Pero... ¿Qué pasa cuando una persona que tienes en una posición de admiración, o de héroe, te dice que cree en ti, y no siendo suficiente, te apoya y hace suficientes sacrificios porque lo vales? Jamás me había sentido tan feliz de estar vivo. Gracias por creer en mí. Ahora tengo un sueño. Gracias por ser mi mentor académico y mi maestro de vida. Gracias por ser mi amiga. Gracias por dejarme ser parte de tu equipo y de tu familia. Gracias por la confianza, y gracias porque me enseñaste lo que verdaderamente significa ser científico y ser humano. Cada pequeña enseñanza, cada pequeño obsequio, cada desvelo, cada gota de sudor, cada sonrisa y cada vez que te esforzaste por un chico desconocido con ganas de vivir para explotar su potencial, no fueron en vano. Porque me convertiré en un gran científico... Y prometo que cumpliré mis sueños.

ÍNDICE

Agradecimientos Académicos.....	I
Agradecimientos Personales	II
Resumen.....	1
1 Introducción	2
2 Antecedentes	3
2.1 <i>GANGLIOS BASALES</i>	3
2.2 <i>ENFERMEDAD DE PARKINSON</i>	4
2.3 <i>MICROCIRCUITO ESTRIATAL</i>	5
3 Planteamiento del problema	8
4 Justificación.....	8
5 Objetivos	9
5.1 <i>GENERAL</i>	9
5.2 <i>PARTICULARES</i>	9
6 Marco Conceptual	10
6.1 <i>IMAGENOLOGÍA DE CALCIO COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR AL MICROCIRCUITO ESTRIATAL</i>	11
7 Hipótesis.....	12
8 Diseño metodológico.....	12
8.1 <i>CIRUGÍA</i>	13
8.2 <i>INFECCIÓN VIRAL</i>	14
8.3 <i>MODELO 6-OHDA</i>	14
8.4 <i>ADQUISICIÓN DE DATOS</i>	15
8.5 <i>ANÁLISIS</i>	16
8.5.1 <i>OBTENCIÓN RASTERS</i>	16
8.5.2 <i>GRAFICAS DE ACTIVIDAD ACUMULADA</i>	16
8.5.3 <i>DISTRIBUCIÓN DE FUNCIÓN ACUMULADA</i>	16
9 Resultados	18
10 Discusión.....	25
10.1 <i>NEURONAS ESPINOSAS DE PROYECCIÓN DE LA VÍA DIRECTA</i>	26
10.2 <i>NEURONAS ESPINOSAS DE PROYECCIÓN DE LA VÍA INDIRECTA</i>	26
10.3 <i>INTERNEURONAS ESTRIATALES</i>	27
10.4 <i>CIRCUITO PARKINSONIANO</i>	28

	<i>10.5 DIFERENCIA ENTRE LA ACTIVIDAD DE TODAS LAS POBLACIONES NEURONALES DEL MICROCIRCUITO ESTRIATAL</i>	<i>30</i>
11	Conclusión.....	31
12	Bibliografía	32

Resumen

Los Ganglios Basales son un grupo de núcleos subcorticales responsables del control motor; el principal núcleo de entrada a los Ganglios Basales es el estriado; la información motora fluye a través de este, por medio de dos poblaciones de neuronas de proyección distintas, unas asociadas a la aparición del movimiento llamadas de la vía directa y otras a la inhibición de estas denominadas de la vía indirecta, estas neuronas de proyección son moduladas por interneuronas, es decir, neuronas que no proyectan fuera del estriado y todas ellas son moduladas por dopamina; la disfunción de los ganglios basales se asocia a varios trastornos de movimiento como la enfermedad de Parkinson, esta enfermedad presenta distintos síntomas motores y se produce por la muerte de neuronas dopaminérgicas. El objetivo del presente trabajo fue describir los cambios en la actividad neuronal de diferentes poblaciones neuronales del estriado en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson, generado por la inyección de 6-hydroxidopamina, mediante imagenología de calcio la cual es una técnica de multirregistro que hace uso de herramientas biotecnológicas como son los ratones transgénicos e infecciones virales, además de utilizar herramientas computacionales y matemáticas para el análisis de los datos. Esta técnica permitió analizar la actividad de las neuronas de proyección de la vía directa e indirecta, así como de interneuronas que expresan la proteína Parvalbúmina (PV) y Cholinacetil-transferasa (ChAT) en rebanadas de cerebro de ratón; comparando la actividad en ratones sanos y del modelo de la enfermedad de Parkinson para evidenciar el mecanismo fisiopatológico a nivel celular. Tras la adquisición de datos, se comparó la actividad total e individual de cada tipo neuronal, y los resultados revelaron primero que cada población neuronal tiene un patrón de actividad distinto y característico, además, que la distribución de actividad acumulada es significativamente diferente en la población de neuronas de proyección de la vía directa en condiciones parkinsonianas respecto a su estado control, en el caso de las interneuronas, la actividad de neuronas ChAT aumentó significativamente en el tejido parkinsoniano respecto al estado control y no se encontraron diferencias significativas para las neuronas de la vía indirecta ni las interneuronas PV. Podemos concluir que la población de neuronas ChAT tiene el mayor cambio en actividad espontánea sugiriendo que en condiciones patológicas esta población tiene mayores alteraciones. Sin embargo, es necesario evaluar la actividad en un estado

activado y la respuesta a agonistas dopaminérgicos. Así como el uso de otras técnicas con mejor resolución temporal.

1 Introducción

Los Ganglios Basales son un grupo de núcleos subcorticales responsables del control motor; el modelo clásico expone que los comandos motores fluyen a través de los ganglios basales por medio de dos vías con efectos opuestos para la ejecución de movimientos (Lanciego, Luquin, & Obeso, 2012). La información proveniente de Corteza llega al Estriado, el principal núcleo de entrada, y a partir de este la información se transmite por dos vías de proyección estriatofugales: la primera es la vía directa que está asociada con la aparición de una acción; y la segunda es la vía indirecta que se asocia con la interrupción del movimiento (Gerfen et al., 1990), estas vías se originan de dos poblaciones de neuronas de proyección distintas que encontramos en el estriado; adicional a las neuronas de proyección el estriado tiene neuronas que no proyectan fuera del mismo, las interneuronas. La disfunción de los ganglios basales se asocia a varios trastornos de movimiento como la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson, en esta investigación nos centraremos en la enfermedad de Parkinson, la cual se produce por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* (SNc), y por lo tanto hay pérdida de la innervación dopaminérgica en los ganglios basales; esta enfermedad se caracteriza por déficit en la iniciación del movimiento, rigidez, acinesia/bradicinesia y temblor en reposo (DeLong, 1990), para entender esta patología se han hecho muchos experimentos a distintas escalas desde la conducta hasta un nivel genético. Una de las escalas menos exploradas es la escala histológica en la que se analiza la actividad de docenas de neuronas simultáneamente, ya que aún no sabemos cómo actúan juntas en un grupo de neuronas; la imagenología de calcio permite analizar la actividad de neuronas en preparaciones de rebanadas de cerebro de ratón *in vitro* en ratones sanos y un modelo de la enfermedad de Parkinson que consiste en la inyección de 6-hidroxidopamina en la SNc para provocar la muerte de las neuronas dopaminérgicas y privar de dopamina al estriado. La actividad espontánea de las neuronas del estriado deficiente de dopamina es fundamentalmente diferente de la observada en los cortes estriatales de ratones control con dopamina, en condiciones control la actividad neuronal espontánea del estriado es escasa, pero en el tejido privado de dopamina se encontró un exceso de actividad neuronal (Jáidar et al., 2010), aunque se ha descrito la actividad

neuronal cuando se ha quitado la dopamina, aún no sabemos los tipos neuronales que subyacen a esta actividad aberrante encontrada en el modelo murino de la enfermedad de Parkinson.

Para comprender los cambios en la actividad neuronal es importante analizarla sobre cada una de las poblaciones neuronales del estriado de manera independiente en condiciones control y en ausencia de dopamina, de esta forma se puede aspirar a una mejor comprensión de la patología.

2 Antecedentes

2.1 GANGLIOS BASALES

Los núcleos de Ganglios Basales (GB) son una serie de núcleos subcorticales encargados del control del movimiento, sus funciones incluyen el aprendizaje motor, funciones ejecutivas y de conducta. Se dividen funcionalmente en: (1) **Núcleos de entrada**, aquellos que reciben información procedente de otras partes del cerebro principalmente corteza y tálamo, estos son: *núcleo caudado* (CN), *Putamen* (Put) y el *núcleo accumbens* (Acb). (2) **Núcleos de salida**, los que envían información fuera de los ganglios basales y consisten en: el *segmento interno del globo pálido* (GPi) y en la *substancia nigra pars reticulata* (SNr). Y (3) **núcleos intrínsecos**, se localizan entre los núcleos de entrada y de salida en la ruta de información, estos son: el *segmento externo del globo pálido* (GPe), el *núcleo subtalámico* (STN) y la *substancia nigra pars compacta* (SNc) (Lanciego et al., 2012). La información proveniente de corteza y tálamo se transmite al estriado (CN, Put y Acb) para ser procesada, de ahí, la vía indirecta transmite a los núcleos intrínsecos y estos junto con la vía directa a los núcleos de salida (GPi y SNr) que proyectan a los núcleos ventrales del tálamo y el tallo que, a su vez, proyectan de nuevo a corteza. La división funcional ayuda en la descripción del esquema organizativo canónico general de los ganglios basales, el cual incluye los mecanismos de la vía directa e indirecta de los ganglios basales, tal como se muestra en la Figura 1 (Gerfen & Surmeier, 2011).

Circuito de los Ganglios Basales

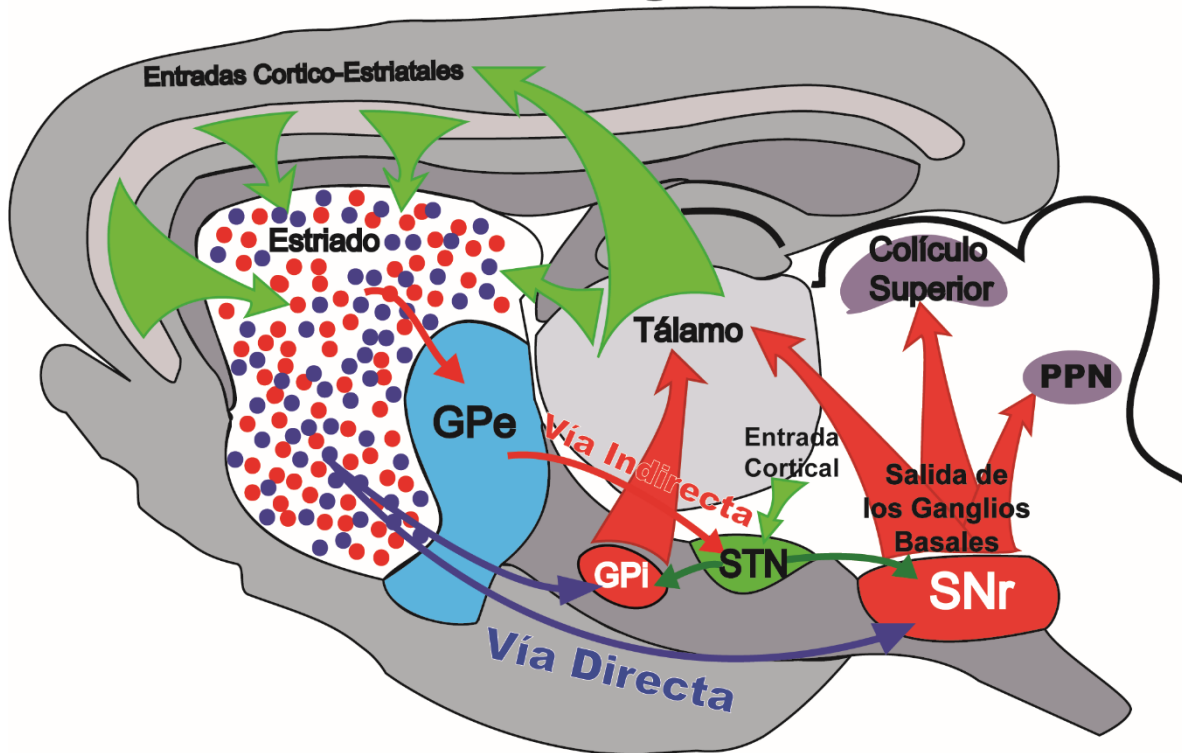


Figura 1. **Diagrama de circuitos de ganglios basales.** El estriado recibe entradas excitadoras corticales y talámicas. Las salidas de los ganglios basales surgen del GPI y del SNr, que se dirigen al tálamo, al colículo superior y al núcleo pedúnculo pontino (PPN). El estriado tiene dos vías de salida. La *vía directa* está formada por neuronas espinosas de proyección que expresan el receptor de dopamina D1 (SPNs D1) que se proyectan a los núcleos de salida de GPI y SNr, representada con flechas rojas. La *vía indirecta* que está formada por SPN que expresan el receptor D2 (SPNs A2A) que se proyectan solo a la GPe, que junto con el STN se conecta a los núcleos de salida, esta vía está representada por flechas azules. Las vías directa e indirecta proporcionan una regulación contraria de la interfaz de salida de los ganglios basales. Fuente de: Gerfen, C., & Surmeier, D., 2011. *Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. Annual Review Of Neuroscience, 34(1), 441-466 (Gerfen & Surmeier, 2011).*

2.2 ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad degenerativa más común del sistema nervioso después de la enfermedad de Alzheimer, y fue descrita por James Parkinson en 1817, se caracteriza por temblor en reposo, lentitud de movimientos (bradicinesia), rigidez de las extremidades y el cuello y mínimas expresiones faciales (Darden & Przedborski, 2003); caminar implica pasos cortos, una postura encorvada y una escasez de movimientos asociados, como mover el brazo.

Los defectos en la función motora se deben a la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SNc, las cuales inervan a todos los núcleos de los ganglios basales, especialmente el estriado. La hipótesis prevalente que explica la fisiopatología de la

enfermedad del Parkinson es el "modelo de patrón de disparo"; en los pacientes con enfermedad de Parkinson y modelos animales de la misma se observa con frecuencia actividad oscilatoria y/o sincronizada en los Ganglios Basales y se cree que esto puede causar la alteración del procesamiento de la información en los Ganglios Basales (Nambu & Tachibana, 2014). Hay estudios enfocados a los cambios en la actividad neuronal, con el objetivo de explicar la sincronización anormal en el microcircuito del estriado o cualquier otra red local de los Ganglios Basales bajo agotamiento de dopamina, y se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que la activación espontánea y la actividad sináptica de las neuronas del estriado aumentan con respecto a la condición de control después del agotamiento de dopamina (Galarraga, Bargas, Martínez-Fong, & Aceves, 1987; Tang, Low, Grandy, & Lovinger, 2001); la actividad potenciada se caracteriza por disparo en ráfagas (bursting) recurrentes acompañados por numerosos períodos de sincronización espontánea que no se ven en animales control (Tseng, 2009).

En 1970, se estableció el modelo murino de la enfermedad de Parkinson, consiste en la destrucción unilateral de las neuronas dopaminérgicas con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el mesencéfalo de los roedores, que induce hipocinesia unilateral, postura desviada y comportamiento de giro espontáneo hacia el lado de la lesión (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970), este es un modelo animal experimental de la enfermedad de Parkinson y fue inicialmente útil en estudios farmacológicos y sigue siendo útil en la caracterización de la función de las salidas de los ganglios basales (Greco et al., 2008). En este modelo se han reportado alteraciones en la integración sináptica de los comandos cortico-estriatales, como las diferencias en la excitabilidad neuronal, integración sináptica cortico-estriatal distinta, cambios en las subunidades del receptor NMDA, respuestas alteradas a los insumos somatosensoriales, cambios en la plasticidad a largo plazo y cambios en la actividad conjunta neuronal (Aparicio-Juárez et al., 2018; Jáidar et al., 2010). Este último tipo de alteraciones en escala histológica, es decir, docenas de neuronas actuando de manera simultánea es en lo que se centra esta investigación, en otras palabras, la escala de los microcircuitos neuronales.

2.3 MICROCIRCUITO ESTRIATAL

Un microcircuito es definido como un conjunto de neuronas, o módulo, que interaccionan entre sí de manera funcional, presentando actividad sincrónica, generando patrones espacio-

temporales de actividad de manera espontánea o en respuesta de algún tipo de estímulo (Jáidar et al., 2010), para caracterizar el microcircuito estriatal es necesario describir las poblaciones neuronales que la conforman, estas son, las neuronas de proyección y las interneuronas. Histológicamente, el 97% de las neuronas en el estriado son de proyección, caracterizadas por tener espinas dendríticas, de ahí su nombre *neuronas espinosas de proyección* (SPNs, por sus siglas en inglés). El 3% restante son interneuronas, GABAérgicas y colinérgicas. Los principales aferentes del estriado son glutamatérgicos, que se derivan de la corteza y el tálamo (Shepherd & Grillner, 2010).

Las SPNs son neuronas GABAérgicas, multipolares con dendritas orientadas radialmente cubiertas por espinas dendríticas. Las SPNs se dividen según sus objetivos de proyección:

- A. Las SPNs que inervan el núcleo GPe, es decir de la vía indirecta; expresan el subtipo 2 del receptor de dopamina D₂R y receptor a adenosina tipo A_{2A}, denominadas como SPNs A2A.
- B. Las SPNs estriatales que proyectan directamente a GPi y SNr es decir de la vía directa, expresan receptores del subtipo 1 del receptor de dopamina D₁R, denominadas como SPNs D1.

Las interneuronas generalmente se clasifican en 4 grupos dependiendo de sus perfiles neuroquímicos y características electrofisiológicas:

- I. *Neuronas colinérgicas* que liberan acetilcolina. Electrofisiológicamente tienen un disparo tónico, por ello también son llamadas neuronas tónicamente activas (TANs). Además, expresan la proteína Acetilcolin transferasa, por lo que son también conocidas como neuronas ChAT.
- II. Interneuronas GABAérgicas que contienen la proteína de unión a calcio Parvalbúmina, por lo que son también conocidas como neuronas PV. Por su huella electrofisiológica se denomina *Interneuronas Fast-Spiking* (FSIs; Interneuronas de disparo rápido).
- III. Interneuronas GABAérgicas que expresan calretinina (CR), proteína de unión a calcio. Presentan disparo rápido, pero no a frecuencias tan altas como las FSIs.

- IV. Interneurona GABAérgicas nitrérgicas, liberan GABA y óxido nítrico. Muestran disparo de bajo umbral por lo que se denomina LTS (Low threshold spiking). Expresan la enzima óxido nítrico sintasa (NO) y el péptido somatostatina (SST).

Las interneuronas modulan la actividad de las SPNs, reciben aferentes corticales y talámicas y están a su vez bajo un control dopaminérgico, formando un complejo microcircuito intra-estriatal (Lanciego et al., 2012).

El estriado se encarga de la selección de acciones a través de la activación de SPNs que a su vez modifican el disparo de las neuronas de salida de los ganglios basales. Los aspectos esenciales por investigar de los microcircuitos del estriado son básicamente:

- En condiciones de reposo, las SPNs se encuentran hiperpolarizadas relativamente inactivas; al recibir una entrada excitadora de corteza y/o tálamo, grupos de SPNs se activan.
- La respuesta de las SPNs a la entrada excitadora de la corteza y el tálamo es modificada por los colaterales locales de otras SPNs y la actividad de las interneuronas GABAérgicas.
- La plasticidad a corto y largo plazo de toda la transmisión es modulada por la dopamina proveniente de la SNc y la acetilcolina de las interneuronas colinérgicas.

Se desconoce cómo es que se da esta modulación y las reglas de interacción entre los diferentes tipos neuronales; es importante destacar que el disparo sincrónico de todas estas neuronas (tanto SPNs como interneuronas) en condiciones normales resulta ser un mecanismo para generar funciones cognitivas, programas motores, entre otros (Uhlhaas et al., 2009), y también se ha propuesto que la actividad correlacionada de diferentes neuronas entre la corteza y los ganglios basales sigue los circuitos de reentrada cuya actividad cíclica codifica el movimiento, las memorias de procedimiento y la formación de hábitos. Además de que los patrones espacio-temporales de actividad correlacionada se han estudiado en el estriado (Carrillo-Reid et al., 2008) y en estados patológicos como la enfermedad de Parkinson, las neuronas de los ganglios basales cambian su comportamiento exhibiendo una sincronización potenciada y anormal (Walter & Bergstrom, 2009). En particular las neuronas del estriado exhiben una actividad espontánea alta y una sincronización elevada (Jáidar et al., 2010).

3 Planteamiento del problema

Las alteraciones en la actividad de células estriatales, su plasticidad y la posible relación con la conducta en la enfermedad de Parkinson han sido ampliamente investigadas. Pero muy pocos trabajos son capaces de describir la dinámica de módulos o microcircuitos neuronales, ninguno ha elucidado cómo funcionan un grupo de neuronas ni han revelado su identidad, esto debido a las limitantes tecnológicas que solo nos han permitido hacer estudios de células únicas o de animales enteros. Sin embargo, es necesario registrar de forma simultánea grupos de neuronas para empezar a entender la fisiopatología de la enfermedad, porque las células no actúan de forma individual, sino que se conectan unas con otras en el cerebro a través de “sinapsis” formando redes de neuronas. Estas redes están conformadas por distintos tipos de neuronas, es un error pensar que todas las neuronas son idénticas. Anatómicamente sabemos que el estriado incluye diferentes tipos de neuronas, y al analizar las redes que forma en condiciones control hemos encontrado una dinámica que se pierde cuando se ha quitado la dopamina del estriado en un modelo de la enfermedad de Parkinson. Lo que nos lleva a preguntarnos ¿Cuál es la población neuronal del estriado que modifica su actividad en condiciones patológicas? ¿Será que algún tipo neuronal este más afectado que otro? Además, queremos saber cómo se modifica su interacción espaciotemporal, es decir, la dinámica de la red neuronal, específicamente la actividad de las diferentes poblaciones de interneuronas y ambos tipos de SPNs.

4 Justificación

La prevalencia reportada de la enfermedad de Parkinson es de 8-18 casos por cada 100,000 habitantes en Estados Unidos; en México se estima una prevalencia de 83,000 a 166,600 pacientes. La terapia indicada es la sustitución de dopamina mediante la administración del fármaco precursor Levo-DOPA, sin embargo, el uso prolongado de este tratamiento genera discinesia, razón por la que se siguen buscando alternativas para mejorar o reemplazar el tratamiento; uno de los problemas es que no conocemos la fisiopatología celular de la enfermedad de Parkinson ni el mecanismo por el cual actúan los fármacos como la L-DOPA. Nuestro grupo de investigación ha caracterizado la actividad de los grupos de neuronas del núcleo estriado en condiciones normales y en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson, y aunque hemos encontrado diferencias evidentes en la actividad neuronal en

ambas condiciones, el mecanismo que subyace a dichas diferencias se desconoce, por lo que es importante revelar la identidad de las neuronas que son moduladas por la dopamina de forma diferencial. Entender la función diferencial de cada una de las interneuronas podría permitir proponer nuevos blancos terapéuticos y entender los mecanismos finos de acción de los existentes. La descripción de la actividad se realizará específicamente por medio de la técnica de imagenología de calcio *in vitro* en el modelo murino de la enfermedad de Parkinson de 6-OHDA y se compara con sujetos equivalentes, como control, para evidenciar el mecanismo fisiopatológico a nivel celular y validar los ensayos farmacológicos conductuales.

Para estudiar la fisiopatología celular de la enfermedad de Parkinson utilizamos técnicas de multirregistro que pertenecen al estado del arte de las neurociencias, toma herramientas biotecnológicas como los ratones transgénicos y herramientas matemáticas novedosas para el análisis de los datos como la teoría de redes. Esto implica llevar trabajos realizados en el Estado de Puebla a un nivel tecnológicamente competente a nivel mundial. Nuestra meta final es tener un bioensayo funcional fundamentado en el registro de actividad poblacional que nos sirva para poner a prueba tratamientos noveles para la enfermedad de Parkinson.

5 Objetivos

5.1 GENERAL

Caracterizar la actividad espontánea *in vitro* de diferentes poblaciones neuronales por medio de imagenología en un microcircuito estriatal control y privado de dopamina.

5.2 PARTICULARES

Caracterizar la actividad espontánea *in vitro* de las SPNs D1 por medio de imagenología en un microcircuito control y privado de dopamina.

Caracterizar la actividad espontánea *in vitro* de las SPNs A2A por medio de imagenología en un microcircuito control y privado de dopamina.

Caracterizar la actividad espontánea *in vitro* de las interneuronas ChAT por medio de imagenología en un microcircuito control y privado de dopamina.

Caracterizar la actividad espontánea *in vitro* de las interneuronas PV por medio de imagenología en un microcircuito control y privado de dopamina.

6 Marco Conceptual

El estudio actual de las neurociencias no se centra en el registro de neuronas individuales sino en grupos de ellas para tratar de entender los mecanismos de comunicación y las propiedades que emergen a partir de dicha comunicación, la teoría que subyace a esta idea es la de microcircuitos. En principio se plantea la idea de una organización modular, el módulo más simple es un ensamble celular, propuesto por Donald Hebb en 1949 (Morris, 1999) que postuló que la plasticidad sináptica a largo plazo es la etapa inicial de una serie de procesos que almacenan información configurando la conectividad de los microcircuitos cerebrales en los ensambles celulares (CAs, por sus siglas en inglés, *Cell Assemblies*) y definió un ensamble celular como un grupo de neuronas interconectadas dedicadas a codificar procesos motores o para almacenar y mantener representaciones neuronales.

Demostrar la existencia de CAs en el tejido vivo no ha sido trivial, la evidencia actual de la existencia de CAs es indirecta y se basa en la suposición de que la coactivación en los disparos neuronales reflejan la formación de CAs, como ejemplos, la existencia de patrones recurrentes de actividad en una población de neuronas en respuesta a una sola entrada estereotipada, ya que se cree que esta actividad recurrente está formada por la plasticidad sináptica a largo plazo (Harris, 2005) y la sincronización, puesto que en muchos núcleos se han observado picos sincronizados entre las neuronas (Carrillo-Reid et al., 2008). Se deduce que la correlación de los picos surge de la actividad que está siendo propagada a través de la red de una manera particular y con patrón, que está determinada por los elementos en la red y la fuerza de las conexiones sinápticas entre ellas.

La red estriatal tiene muchas de las características canónicas requeridas para generar este tipo de actividad de ensambles celulares, como: 1) que las conexiones sinápticas dentro del estriado son capaces de experimentar cambios en la fuerza a largo plazo, como lo requiere un ensamble celular Hebbiano, 2) el circuito estriado expone la existencia de conexiones colaterales recurrentes entre las SPNs, siendo un tipo de conexión necesaria para establecer grupos neuronales cuya actividad síncrona subyace a los estados de la red (Grillner, 2006),

demostrándose tal hecho en un trabajo reciente que muestra que el bloqueo de dichas conexiones suprime la reverberación (o los patrones de actividad repetitiva) de los estados de la red en el estriado (Carrillo-Reid et al., 2008); 3) el estriado posee mecanismos de retroalimentación canónicas que involucran interneuronas, cuya actividad en varios estados de la red parece que tienen la capacidad de sincronizar SPNs (Grillner, 2006); 4) el estriado posee interneuronas marcapasos tónicamente activas, que tienen la posibilidad de establecer una actividad recurrente de CAs. Por ejemplo, tanto las interneuronas colinérgicas como las interneuronas LTS son marcapasos autónomos y dadas las conexiones recíprocas entre los grupos de interneuronas colinérgicas y GABAérgicas podrían crear una actividad de red sostenida y actuar como “hubs” o neuronas que comandan la actividad; por lo tanto, el estriado tiene los elementos de circuito necesarios para sostener la actividad de la red autónoma. La actividad recurrente autónoma también puede ser generada por redes de conexiones innatas o “adquiridas” a través de la plasticidad sináptica dependiente de la experiencia (Harris, 2005). El realizar este tipo de estudios requiere ocupar técnicas como la imagenología de calcio.

6.1 IMAGENOLOGÍA DE CALCIO COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR AL MICROCIRCUITO ESTRIATAL

Actualmente existen diversas técnicas para estudiar la dinámica de los microcircuitos neuronales, entre ellos están los registros de campo y registro extracelulares con multielectrodos, que a pesar de permitir el análisis simultáneo de muchas células con una alta resolución temporal, no suelen permitir una resolución de célula única, ni la identificación del tipo neuronal registrado, otra de las técnicas que permiten hacer registro de grupos de neuronas es la imagenología de calcio, permite la medición directa del flujo dinámico de calcio dentro de las neuronas y el tejido neuronal, y estos registros ópticos de poblaciones neuronales permiten el registro simultáneo de docenas de neuronas en un enfoque poco invasivo (Cossart, Ikegaya, & Yuste, 2005). En el presente estudio, la imagenología de calcio es la técnica mediante la cual el trabajo sustenta y recaba sus datos.

La actividad neuronal causa cambios rápidos en el calcio libre intracelular, la imagenología de calcio toma ventaja de esto para rastrear la actividad de poblaciones neuronales y sondear la excitación de neuronas individuales. De manera clásica se realizaba esta técnica utilizando moléculas sintéticas que emiten fluorescencia cuando se encuentran unidas a calcio, sin

embargo, la ingeniería genética ha permitido que esta técnica evolucione en los últimos años con la generación de sensores de calcio genéticamente codificados (Tian et al., 2009) que consisten en proteínas quiméricas, fusiones entre calmodulinas y proteínas fluorescentes para permitir fluorescencia en función de la concentración de calcio intracelular, la familia se llama GCaMP (siglas dadas al indicador de Ca^{2+} modificado genéticamente que consisten en proteína verde fluorescente permutada circularmente (cpGFP), la proteína de unión al calcio calmodulina (CaM) y el péptido M13 que interactúa con CaM; el complejo CaM/M13 está cerca del cromóforo dentro del barril β de cpGFP y los cambios conformacionales dependientes del calcio en CaM/M13 causan un aumento del brillo con la unión del calcio) y la versión que se utiliza es GCaMP6f, indicador fluorescente de Ca^{2+} codificado genéticamente que muestra una alta sensibilidad y una cinética de rápida descomposición. Para la expresión de una proteína exógena primero es necesario introducir la secuencia de ADN mediante el uso de ratones transgénicos y virus adenoasociados modificados los cuales introducen su genoma al hospedero. Si se combinan ambas herramientas, se logra la expresión de proteínas exógenas como los sensores de calcio en una ventana temporal específica en tipos celulares de interés. Ya que se utilizan ratones transgénicos que expresan a la proteína cre-recombinasa, en función de un promotor específico que marca a un tipo neuronal, a estos animales se les inyecta intracranealmente un vector viral que contiene un constructo con la secuencia de GCaMP6f pero que solo se traducirá si hay expresión de la cre-recombinasa.

7 Hipótesis

Todas las poblaciones neuronales del estriado muestran diferentes patrones y distribuciones de actividad celular en condiciones control, y la hiperactividad observada en el microcircuito estriatal privado de dopamina es causada por los diferentes tipos neuronales que tienen alteraciones respecto a su dinámica control.

8 Diseño metodológico

Para realizar el trabajo experimental, el esquema básico se muestra en la figura 2, y consiste en la selección de animales transgénicos de los diferentes tipos neuronales, que se dividirán en grupos control y aquellos que se utilizarán para el modelo de la enfermedad de Parkinson,

los cuales se les administrará la toxina 6-OHDA. Después, a ambos se les hará la inyección de los vectores virales con cirugía estereotáxica. Pasando un periodo de al menos 2 semanas se hará la obtención de tejido para el registro de la actividad neuronal con imagenología de calcio *in vitro*, y finalmente el análisis de datos. Cada uno de estos pasos se explica a continuación.

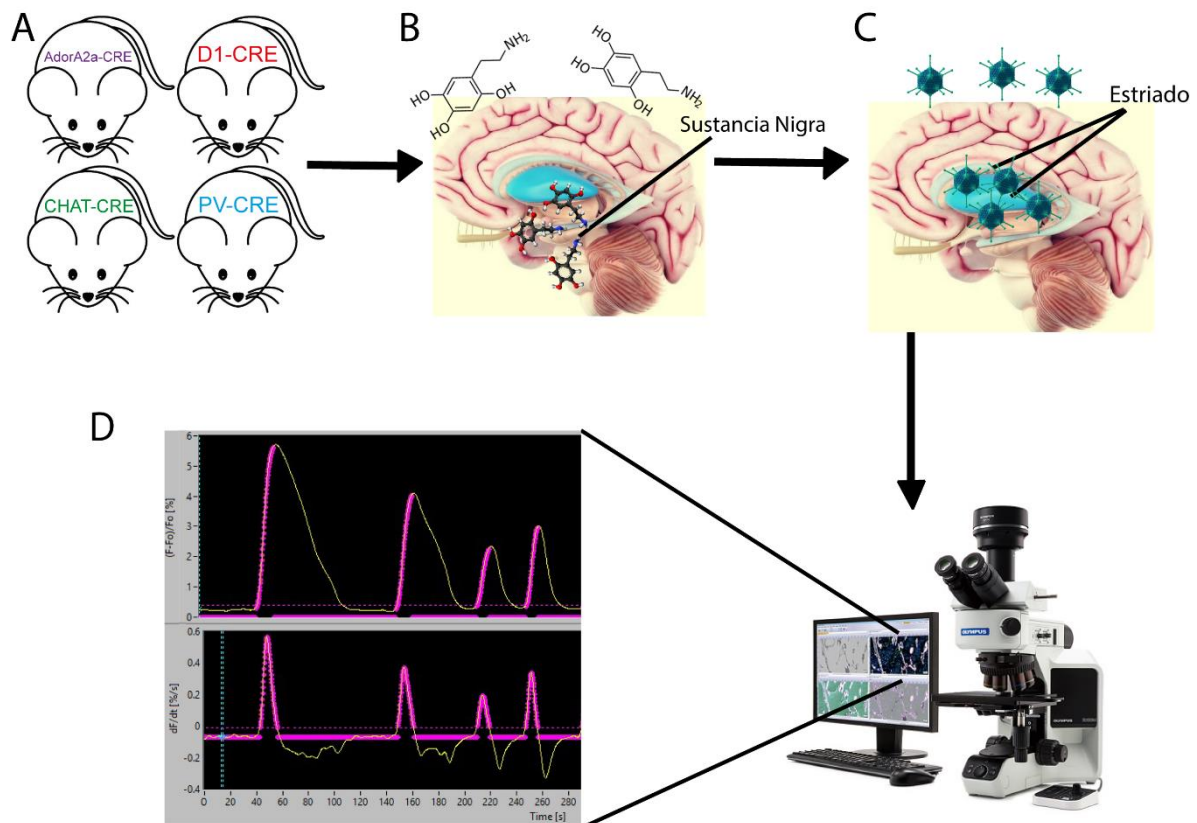


Figura 2. **Esquema del diseño experimental.** A) Selección de líneas de ratón. B) Cirugía con neurotoxina 6-OHDA para destruir neuronas de la SNc y obtener un modelo murino de la enfermedad del Parkinson. C) Transfección con virus adenoasociado que inserte el gen de GCaMP6f. D) Extracción de tejido cerebral, adquisición de datos con imagenología de calcio *in vitro* en un ordenador y análisis de datos.

8.1 CIRUGÍA

Los ratones que se utilizaron se criaron en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Se mantuvieron en instalaciones que cumplen con lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; además de tener condiciones de aire, temperatura y humedad relativa controlada y ciclos de luz-oscuridad con libre acceso a comida y agua. Los ratones que ayudaron a facilitar la localización de las SPNs D1 en el

estriado, fueron ratones **D1-CRE** (con nombre stock B6.Cg-*Tg(Drd1a-cre)*^{217Gsat/Mmucd}). Con respecto a las SPNs A2A, se usaron ratones **AdorA2a-CRE** (con nombre stock B6.FVB8(Cg)-*Tg(Adora2a-cre)*^{KG139Gsat/Mmucd}). Los ratones usados para visualizar las neuronas colinérgicas fueron **CHAT-CRE** (con nombre stock B6;129S6-*Chat*^{tm2(cre)Lowl/J}) y los ratones usados para observar el disparo de las interneuronas que expresan parvalbúmina fueron **PV-CRE** (con nombre stock B6.129P2-*Pvalb*^{tm1(cre)Arbr/J}).

Antes de la infección viral y la lesión con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) los ratones se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina (85 mg/kg)-xilacina (15 mg/kg) para cirugía esterotáxica, y fueron colocados en un aparato esterotáxico (Stoelting CoTM).

8.2 INFECCIÓN VIRAL

Para la infección viral de las cepas de ratones D1-CRE, AdorA2a-CRE, CHAT-CRE y PV-CRE, se inyectaron 0.5µL del vector AAV1.Syn.Flex.GCaMP6f.WPRE.SV40 en las coordenadas a partir de bregma: Anteroposterior +0.8 mm, lateromedial -1.2 mm, y dorsoventral -3 mm. Después de 8 minutos de difusión, cada ratón se saturo y mantuvo en el vivarium con comida, calefacción y agua *ad libitum*.

Tras la infección viral, se expresará la proteína GCaMP6f en las neuronas del estriado que expresará la proteína CRE recombinasa, la expresión de esta proteína está regulada por un promotor (ya sea D1, AdorA2a, CHAT o PV) para seleccionar una población en cada tipo de animal transgénico.

8.3 MODELO 6-OHDA

En cuanto al modelo Parkinsoniano se realizó una lesión unilateral derecha con 0.8µL de 6-OHDA (0.1mg/ml) en la sustancia nigra pars compacta a una velocidad de 0.2µL/min en las coordenadas a partir de bregma: Anteroposterior -2.6 mm, lateromedial -1.5 mm, y dorsoventral -4.7 mm. Después, cada ratón se saturo y mantuvo en el vivarium con comida, calefacción (37 °C) y agua *ad libitum*. Pasado un período de recuperación de 15–30 días, se midió el agotamiento de dopamina (DA como abreviación) mediante una prueba de comportamiento rotacional, durante este período los ratones recibieron pastillas de chocolate *ad libitum* y se administraron 100 µl de glucosa subcutánea al 2% en solución salina. Para evaluar el modelo parkinsoniano 6-OHDA se siguieron las rotaciones ipsilateral y contralateral al sitio de la lesión y se contaron con el programa RotaCount 2.0 (OmniTech,

Sioux Falls SD) durante al menos 50 minutos. La cuantificación de los giros se llevó a cabo sujetando a los ratones, a los cuales se les había administrado apomorfina vía subcutánea (0.5mg/kg en un vehículo salino con 0.02% de ascorbato), a un arnés conectado al contador controlado por el software RotaCount 2.0. Cada vez que los ratones presentaban más rotaciones contralaterales que las rotaciones ipsilaterales (relación ≥ 2) y las rotaciones contralaterales totales eran al menos 50 (1 por minuto) los ratones se consideraron exitosamente privado por dopamina. El hemisferio lesionado utilizado para los experimentos *in vitro* se denomina privado de dopamina (deficiente en dopamina).

8.4 ADQUISICIÓN DE DATOS

Para poder observar la actividad de las neuronas del microcircuito estriado *in vitro* en un microscopio óptico, se obtuvieron rebanadas de cerebro. Para ello, los sujetos control y agotados en DA se anestesiaron intraperitonealmente con ketamina-xilacina (85 mg/kg-15 mg/kg) y se perfundieron intracardialmente con solución de sacarosa fría (que contiene 234 mM de sacarosa, 28 mM de NaHCO₃, 7 mM de dextrosa, 4.54 mM de piruvato, 0.28 mM de ácido ascórbico, 2,5 mM de KCl, 7 mM de MgCl₂, 1.44 mM de NaH₂PO₄, 0.4 mM de CaCl₂, a 4°C). Luego se realizó la extracción del cerebro y se obtuvieron rebanadas para-horizontales utilizando un vibratomo Tissue slicer PELCO easiSlicer®. Las rebanadas generadas fueron de un espesor de 250-300 μm y fueron transferidas a solución saturada con 95% de O₂ y 5% de CO₂; pH:7.4, osmolaridad de 300 ± 5 mOs/L (que contiene: 126 mM NaCl; 11mM dextrosa; 26 mM NaHCO₃; 0.2mM tiourea; 0.2 mM de ácido ascórbico; 3 mM KCl; 1mM MgCl₂ y 2mM CaCl₂) donde se dejaron reposar por media hora a temperatura ambiente antes de continuar. Posteriormente se transfirieron al microscopio con una cámara de perfusión, equipado con un objetivo de inmersión en agua 20x (Olympus, Objetivo XLUMPLFLN, 1.00 NA, 2.0 mm WD) acoplado a una cámara Retiga (CoolSnap, Photometrics). Para visualizar la actividad, se utilizó el software Im-Patch (software libre diseñado en LabView, disponible en www.im-patch.com) controla el sistema de adquisición Los registros se obtuvieron en rebanadas de estriado dorsolateral, en todos los casos. Los videos tenían una longitud de 720–2160 cuadros y la tasa de adquisición fue de 6 cuadros/s. Para cubrir largos períodos, se tomaron de 3 a 5 videos por experimento, lo que representa hasta 30 minutos de registro por experimento.

8.5 ANÁLISIS

8.5.1 OBTENCIÓN DE GRÁFICAS TIPO RASTERS

Se realiza la selección manual de las neuronas activas, con el programa Im-Patch. Se mide la fluorescencia de cada neurona en función del tiempo, es decir potenciales de acción o actividad celular. Im-Patch calcula la derivada de la fluorescencia con respecto al tiempo (dF/dt), y se considera un cuadro activo (o *frame* activo) si el valor obtenido sobrepasa 2.5 desviaciones estándar de la señal de todas las células. Esto genera una matriz binaria de *células* \times *número de imágenes en un vídeo*, en las que se asigna un valor de 1 para un cuadro activo por célula y 0 inactivo. Finalmente se realiza el análisis numérico posterior en MATLAB. Se puede observar el procedimiento en la Fig. 3.

8.5.2 GRÁFICAS DE ACTIVIDAD ACUMULADA

Para cuantificar la cantidad de actividad de las diferentes poblaciones neuronales se midió la actividad acumulada en función del tiempo, que se construyeron agregando actividad individual a lo largo del tiempo. De ahí, se aproxima un ajuste lineal a los gráficos de actividad acumulada. Las pendientes de estos que denotan la actividad poblacional por unidad de tiempo se comparan con estadística no paramétrica discerniendo la actividad neuronal tanto en condiciones control y sin dopamina.

8.5.3 DISTRIBUCIÓN DE FUNCIÓN ACUMULADA

Para analizar la actividad neuronal individual se construyeron funciones de distribución acumulada (CDFs, por sus siglas en inglés) de la actividad de cada neurona, definida como la probabilidad acumulada de un valor dado de un valor x a medir (en este caso, actividad celular o frames activos). Las CDFs se utilizan para comparar la actividad de neuronas individuales en ambas poblaciones, y esto se logra al determinar la probabilidad de que una observación aleatoria que se toma de la población (la actividad control de las poblaciones neuronales) sea menor que o igual a cierto valor (la actividad parkinsoniana de las poblaciones neuronales).

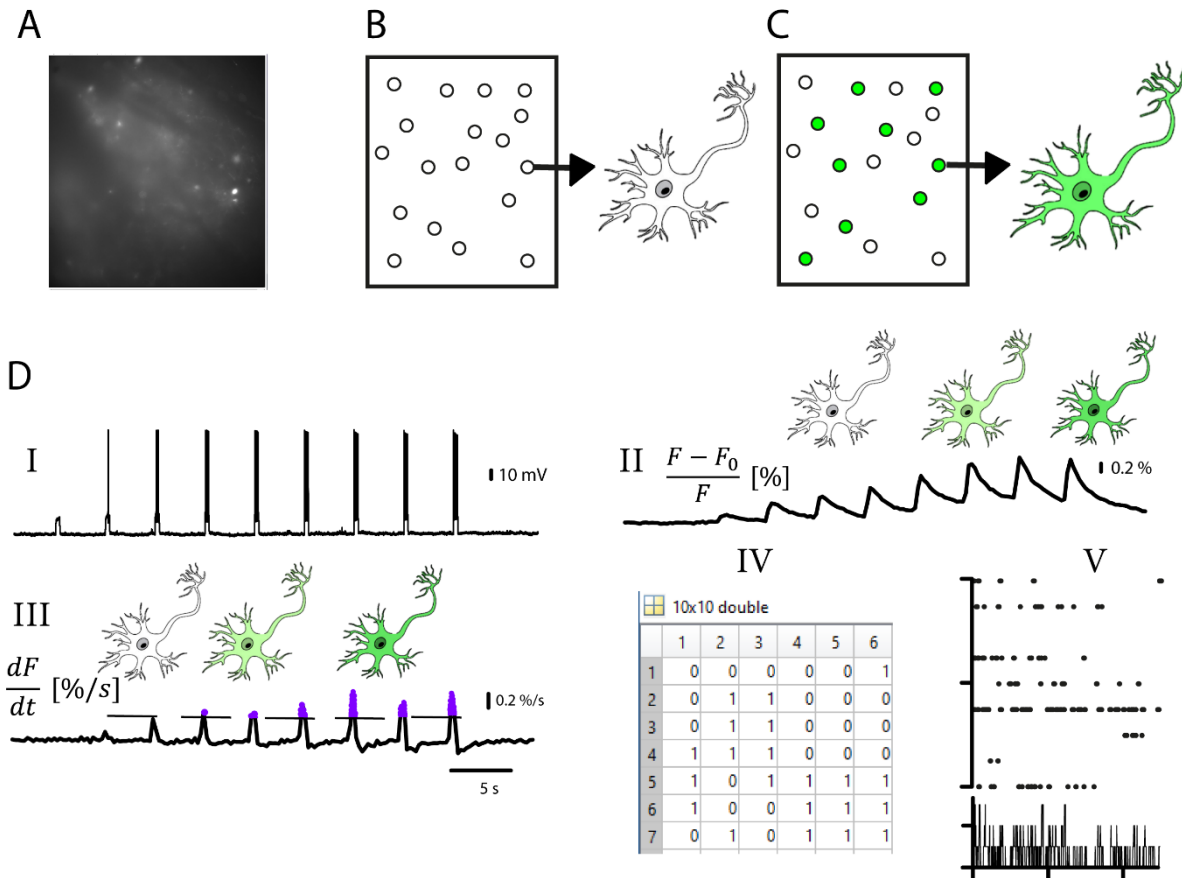


Figura 3. **Análisis de Datos.** **A)** Selección manual de neuronas con programa ImPatch. **B)** Selección de neuronas genéticamente modificadas mostradas en un tiempo de inactividad. **C)** Selección de neuronas genéticamente modificadas mostradas en un tiempo de actividad. **D)** Procesamiento de datos: **I.** Actividad electrofisiológica de una neurona. **II.** Cálculo de la fluorescencia de las neuronas con el programa ImPatch. **III.** Cálculo de la derivada de la fluorescencia respecto al tiempo, para observar la actividad y el tiempo de esta correlacionada a potenciales de acción electrofisiológicos. **IV.** Obtención de matriz binaria de actividad con MATLAB. **V.** Obtención de Rasters.

Los CDFs, se construyen a partir del histograma de actividad neuronal. La actividad de cada célula es la suma de los frames activos de cada célula a lo largo del tiempo dividida entre el número total de frames para expresarlo como probabilidad de actividad. Se realizó la medición para todas las células de todos los experimentos en estado control y en condiciones parkinsonianas. Los CDFs se compararon con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, para evaluar los cambios en la distribución de actividad individual.

9 Resultados

Tras la realización del trabajo experimental, el registro con imagenología de calcio y el análisis de la actividad de las cuatro diferentes poblaciones neuronales del microcircuito estriado en condiciones control y en condiciones patológicas con el programa Im Patch, se procedió a obtener graficas tipo raster de la actividad de las neuronas espinosas de proyección y de las interneuronas, como se muestra en la figura 4 y en la figura 5 respectivamente, con sus correspondientes histogramas de coactividad celular en función del tiempo.

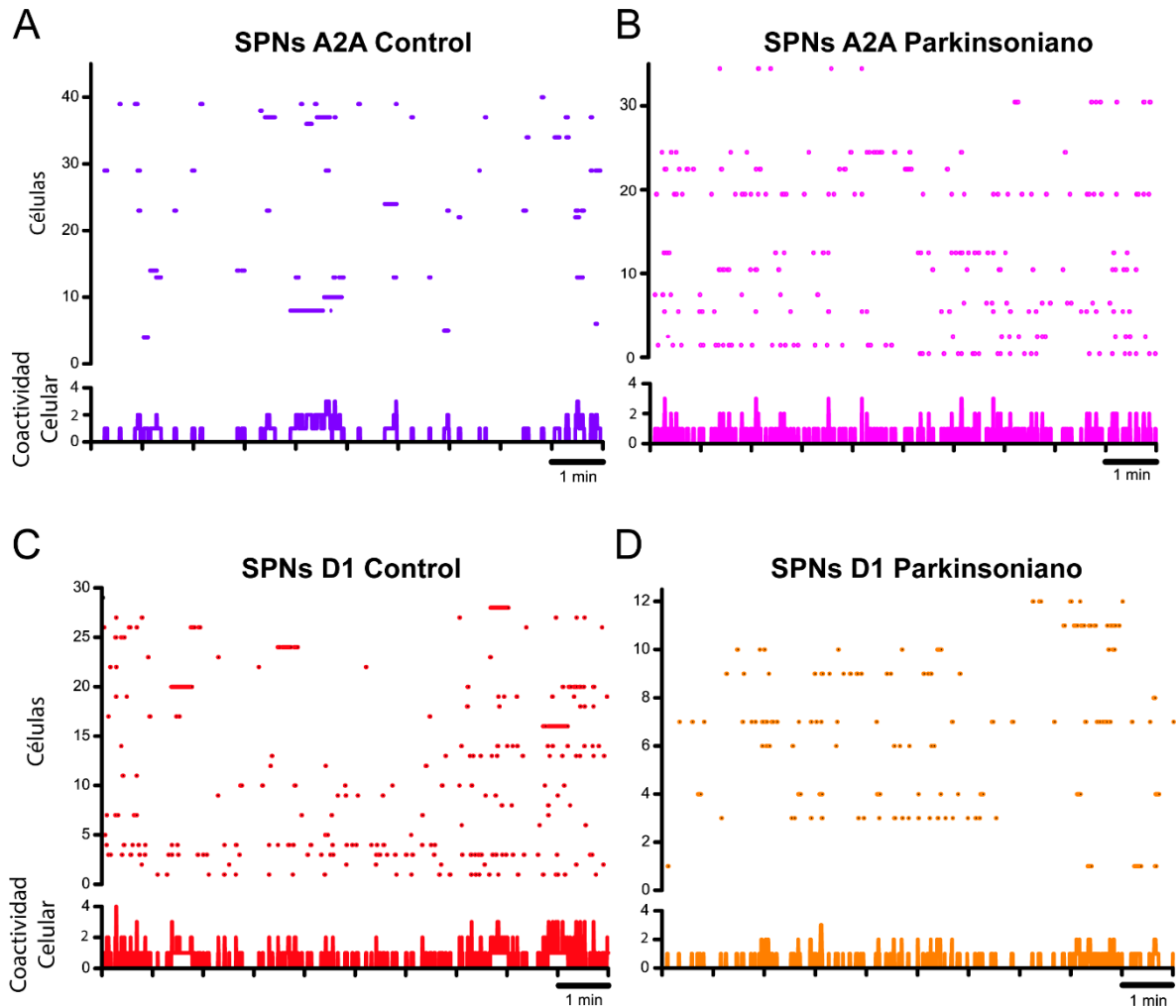


Figura 4. **Actividad de neuronas espinosas de proyección.** **A)** Gráfica tipo raster de la actividad de SPNs que expresan el receptor de adenosina tipo A_{2A} (SPNs A2A) en condiciones control. Cada fila representa la actividad de una neurona en función del tiempo. Cuando la neurona tuvo actividad en un momento se representa con un punto •. En la parte inferior el histograma de coactividad celular en función del tiempo. **B)** Gráfica tipo raster e histograma de coactividad de la actividad de SPNs A2A en un circuito privado de dopamina. **C)** Gráfica tipo raster e histograma de coactividad de la actividad de SPNs que expresan el receptor de dopamina D₁ (SPNs D1) en condiciones control. **D)** Gráfica tipo raster e histograma de coactividad de la actividad de SPNs D1 en un circuito privado de dopamina.

Estas graficas se desarrollaron con el propósito de visualizar la dinámica celular como una matriz de píxeles (puntos de colores) y cada grafica tipo ráster hace una comparación de la dinámica en dos estados diferentes (control y parkinsoniano) a lo largo del tiempo.

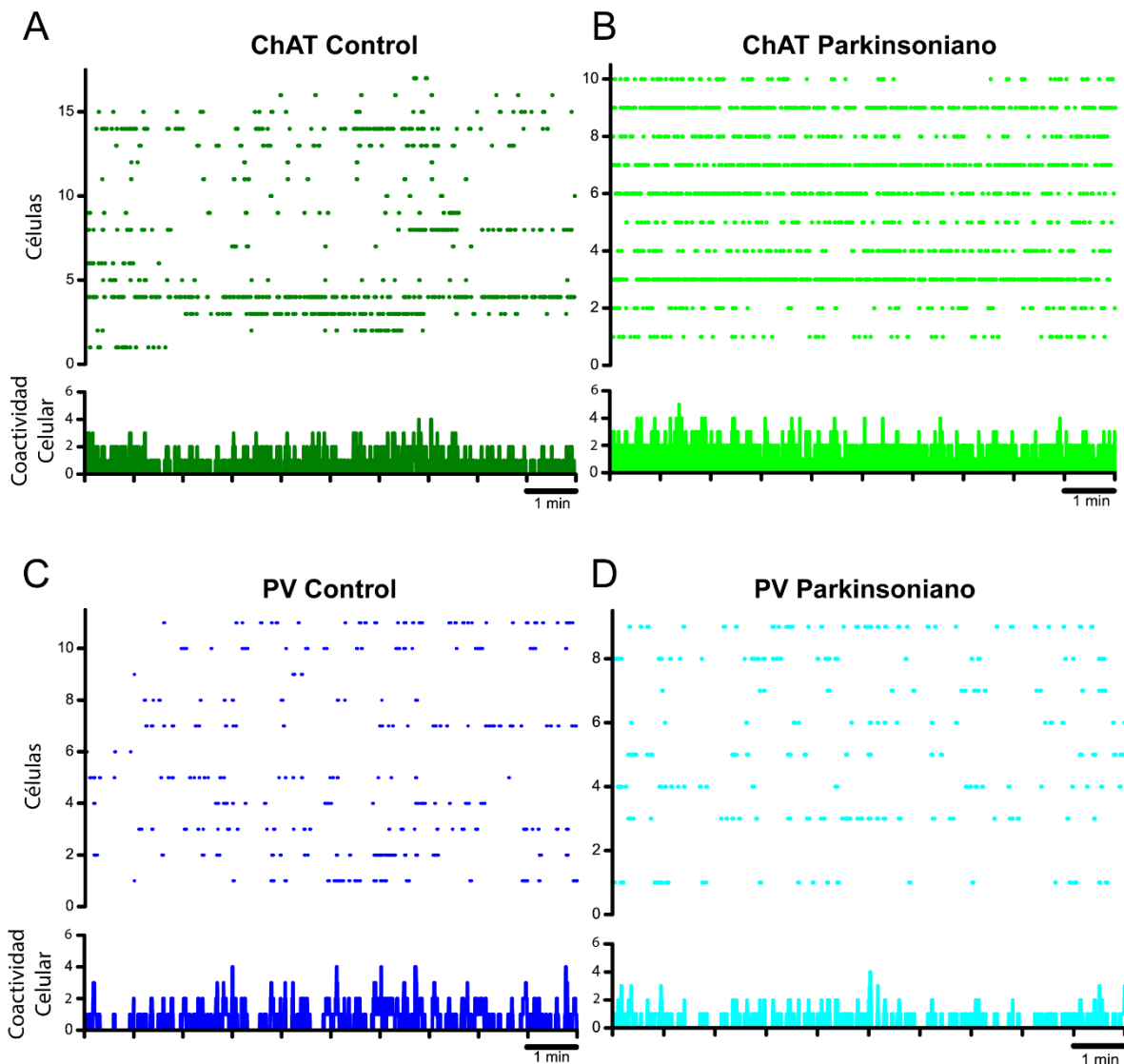


Figura 5. **Actividad de interneuronas.** **A)** Gráfica tipo raster de la actividad de neuronas colinérgicas que liberan acetilcolina (interneuronas ChAT) en condiciones control. Cada fila representa la actividad de una neurona en función del tiempo. Cuando la neurona tuvo actividad en un momento se representa con un punto •. En la parte inferior el histograma de coactividad celular en función del tiempo. **B)** Gráfica tipo raster e histograma de coactividad de la actividad de interneuronas ChAT en un circuito privado de dopamina. **C)** Gráfica tipo raster e histograma de coactividad de la actividad de interneuronas GABAérgicas que contienen la proteína de unión a calcio parvalbúmina (PV) en condiciones control. **D)** Gráfica tipo raster e histograma de coactividad de la actividad de interneuronas PV en un circuito privado de dopamina.

Por ejemplo, la Fig. 4 A-B, muestra a la población de neuronas A2A, en condiciones control y en condiciones parkinsonianas respectivamente, mostrando cualitativamente una actividad

más potenciada de neuronas A2A en condiciones patológicas (Fig. 4B), a pesar de tener menos neuronas que en su condición control (Fig. 4A). En el eje horizontal, muestra el tiempo en minutos, y el histograma de tiempo que subyace a la gráfica tipo ráster de las Figuras 4 y 5, son grupos de neuronas que se prenden juntas en un instante de tiempo. En cuanto a la Fig. 4 C-D, muestra a la población de neuronas D1, en condiciones control y en condiciones parkinsonianas respectivamente, mostrando cualitativamente una actividad más potenciada de neuronas D1 en condiciones control (Fig. 4C), a pesar de tener menos neuronas que en su condición patológica (Fig. 4D).

Lo mismo se muestra en Fig. 5 A-B, mostrando interneuronas ChAT en control y condiciones parkinsonianas, exponiendo más actividad en Fig. 5B (condiciones patológicas) respecto a la Fig. 5A, su estado control; cabe destacar que la comparación de interneuronas PV de la Fig. 5C-D, no parece mostrar diferencia en su actividad.

Una vez obtenidos los gráficos tipo ráster de las diferentes poblaciones de neuronas SPNs A2A, SPNs D1, ChAT y PV en condiciones control y condiciones patológicas, se realizó una comparación estadística de la actividad neuronal mediante la construcción de histogramas y gráficas de *Distribución de Función Acumulada*.

Los histogramas de la actividad neuronal de cada población se muestran en Fig. 6A (SPNs D1 control vs SPNs D1 parkinsoniano), Fig. 6C (SPNs A2A control vs SPNs A2A parkinsoniano), Fig. 7A (ChAT control vs ChAT parkinsoniano) y Fig. 7C (PV control vs PV parkinsoniano). Los histogramas son una representación gráfica de actividad neuronal en forma de barras, donde la superficie de cada barra es proporcional a la frecuencia de la actividad en frames representada. Se notan diferencias en Fig. 6C y Fig. 7A.

Se construyeron las gráficas *Distribución de Función Acumulada* que se muestran en la Fig. 6B (SPNs D1 control vs SPNs D1 parkinsoniano), Fig. 6D (SPNs A2A control vs SPNs A2A parkinsoniano), Fig. 7B (ChAT control vs ChAT parkinsoniano) y Fig. 7D (PV control vs PV parkinsoniano). Las gráficas CDFs se construyeron a partir de los histogramas, y se notan diferencias en Fig. 6D y Fig. 7B.

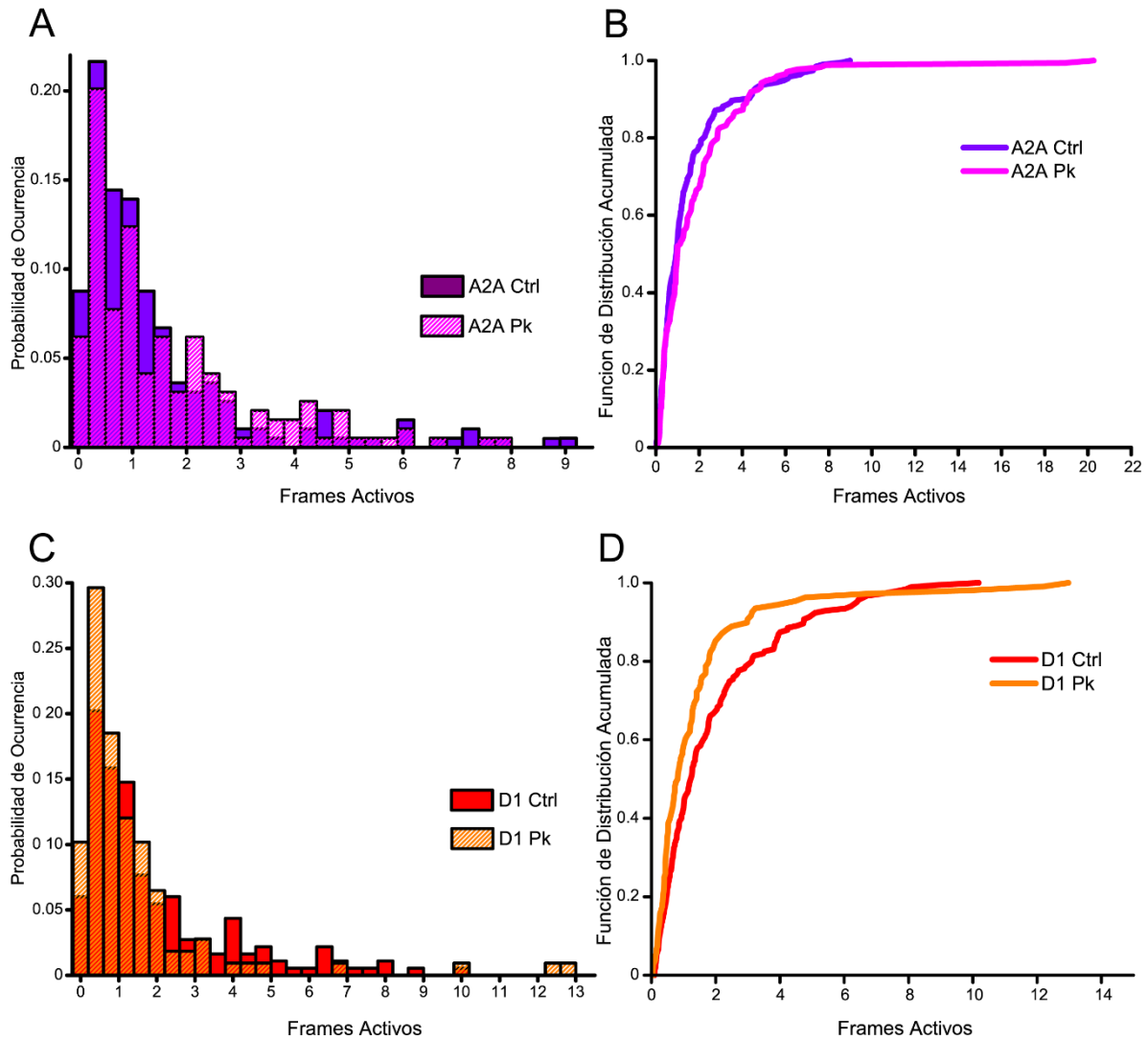


Figura 6. **Actividad control y parkinsoniana de SPNs.** **A)** Histogramas de actividad, muestran la comparación entre la actividad normalizada de cada SPNs A2A en condiciones control (color violeta) y en condiciones parkinsonianas (color lila) de todos los experimentos. **B)** Distribuciones de Función Acumulada que expone la actividad normalizada de SPNs A2A de todos los experimentos obtenidos de poblaciones en condiciones control (de color violeta) contra condiciones parkinsonianas (color lila) no encontramos una diferencia significativa (Kolmogorov-Smirnov $p = 0.1381$). **C)** Histogramas de actividad, muestran la comparación entre la actividad normalizada de cada SPNs D1 en condiciones control (color rojo) y en condiciones parkinsonianas (color naranja) de todos los experimentos. **D)** Distribuciones de Función Acumulada que expone la actividad normalizada de SPNs D1 de todos los experimentos obtenidos de poblaciones en condiciones control (de color rojo) contra condiciones parkinsonianas (color naranja) encontramos una diferencia significativa (Kolmogorov-Smirnov $p = 0.0163$).

Encontramos una diferencia significativa en la distribución de la actividad de SPNs D1 control contra SPNs D1 parkinsoniano, ($p=0.0163$, Fig. 6D) y de las interneuronas ChAT control contra interneuronas ChAT parkinsoniano, ($p=0.0062$, Fig. 7B), no encontramos una diferencia significativa en la distribución de actividad de SPNs A2A control contra SPNs A2A parkinsoniano, ($p=0.1381$, Fig. 6B), ni en interneuronas PV ($p=0.2246$, Fig. 7D).

También se expone una comparación de las actividades del microcircuito entre las diferentes poblaciones neuronales de SPNs e interneuronas, en las mismas condiciones, en control o en condiciones Parkinsonianas, como se observa en la Fig. 8.

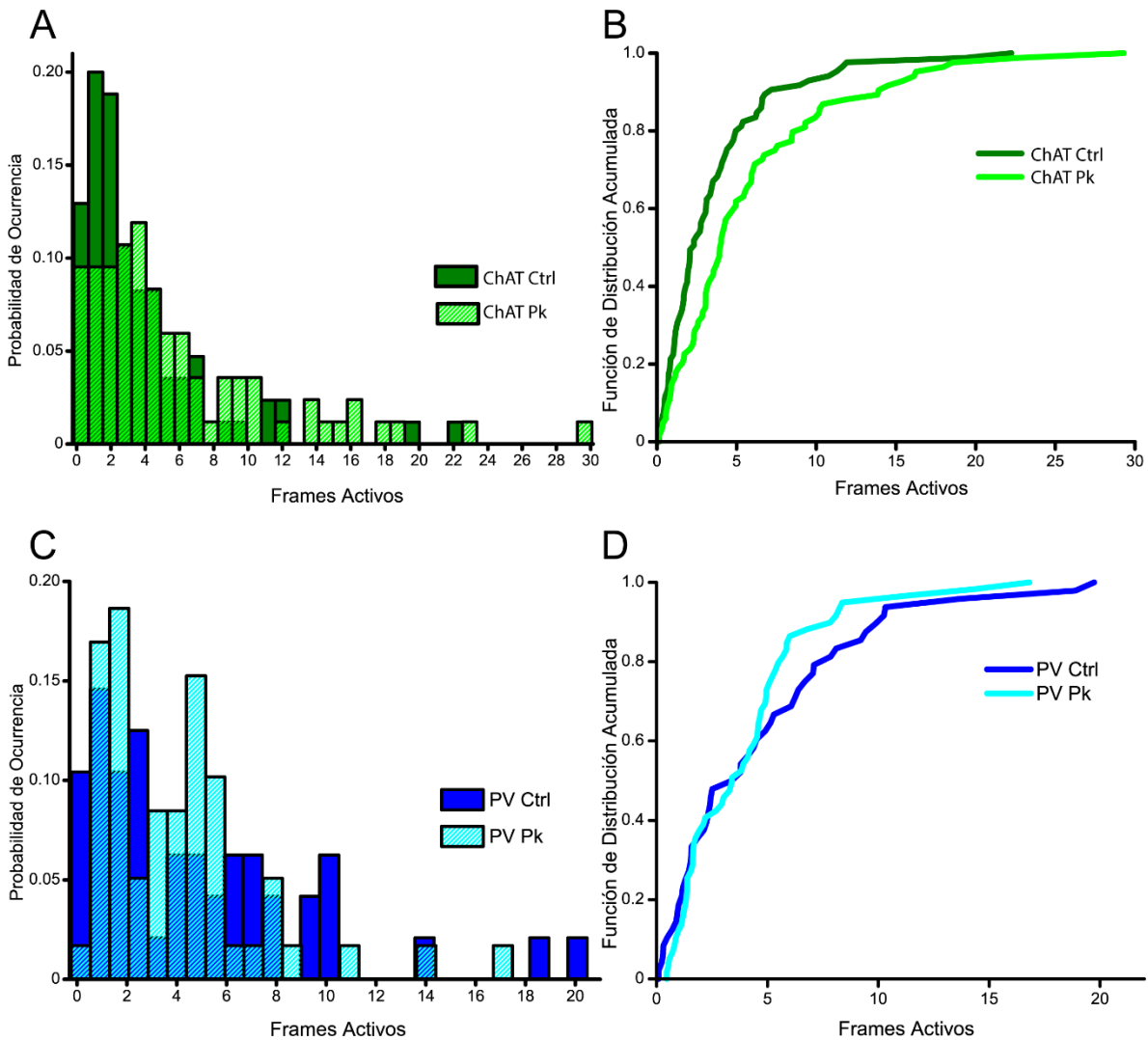


Figura 7. **Actividad control y parkinsoniana de Interneuronas.** **A)** Histogramas de actividad, muestran la comparación entre la actividad normalizada de cada SPNs A2A en condiciones control (color verde oscuro) y en condiciones parkinsonianas (color verde brillante) de todos los experimentos. **B)** Distribuciones de Función Acumulada que expone la actividad normalizada de interneuronas ChAT de todos los experimentos obtenidos de poblaciones en condiciones control (de color verde oscuro) contra condiciones parkinsonianas (color verde brillante) encontramos una diferencia significativa (Kolmogorov-Smirnov $p = 0.0062$). **C)** Histogramas de actividad, muestran la comparación entre la actividad normalizada de cada interneurona PV en condiciones control (color azul oscuro) y en condiciones parkinsonianas (color azul claro) de todos los experimentos. **D)** Distribuciones de Función Acumulada que expone la actividad normalizada de interneuronas PV de todos los experimentos obtenidos de poblaciones en condiciones control (de color azul oscuro) contra condiciones parkinsonianas (color azul claro) no encontramos una diferencia significativa (Kolmogorov-Smirnov $p = 0.2246$).

Se destaca tanto en la Fig. 8A como en la Tabla 1, que en condiciones control, todas las distribuciones son diferentes excepto la distribución de la actividad entre las interneuronas ChAT y PV, con $p=0.2246$.

Tabla 1. Diferencias entre las distribuciones de las poblaciones neuronales control.

POBLACIONES CONTROL	P VALUE
SNPs A2A vs SNPs D1	$p=0.0299$
SNPs A2A vs Interneuronas ChAT	$p=1.5311e-08$
SNPs A2A vs Interneuronas PV	$p=3.5537e-07$
SNPs D1 vs Interneuronas ChAT	$p=5.3515e-04$
SNPs D1 vs Interneuronas PV	$p=2.6178e-04$
Interneuronas ChAT vs Interneuronas PV	$p=0.2246$

En cuanto a la comparación de la actividad del microcircuito entre las diferentes poblaciones neuronales en condiciones parkinsonianas, de igual manera, todas las distribuciones son diferentes excepto la distribución de la actividad entre las interneuronas ChAT y PV, teniendo un $p=0.1345$, mostrado en Fig. 8B y la Tabla 2.

Tabla 2. Diferencias entre las distribuciones de las poblaciones neuronales parkinsonianas.

POBLACIONES PARKINSONIANAS	P VALUE
SNPs A2A vs SNPs D1	$p=0.0218$
SNPs A2A vs Interneuronas ChAT	$p=6.0422e-13$
SNPs A2A vs Interneuronas PV	$p=7.3992e-07$
SNPs D1 vs Interneuronas ChAT	$p=1.7314e-17$
SNPs D1 vs Interneuronas PV	$p=2.6152e-09$
Interneuronas ChAT vs Interneuronas PV	$p=0.1345$

Finalmente se construyeron otras graficas de Actividad Acumulada para observar las diferencias de la actividad total celular en el tiempo, como se muestra en la Fig. 9.

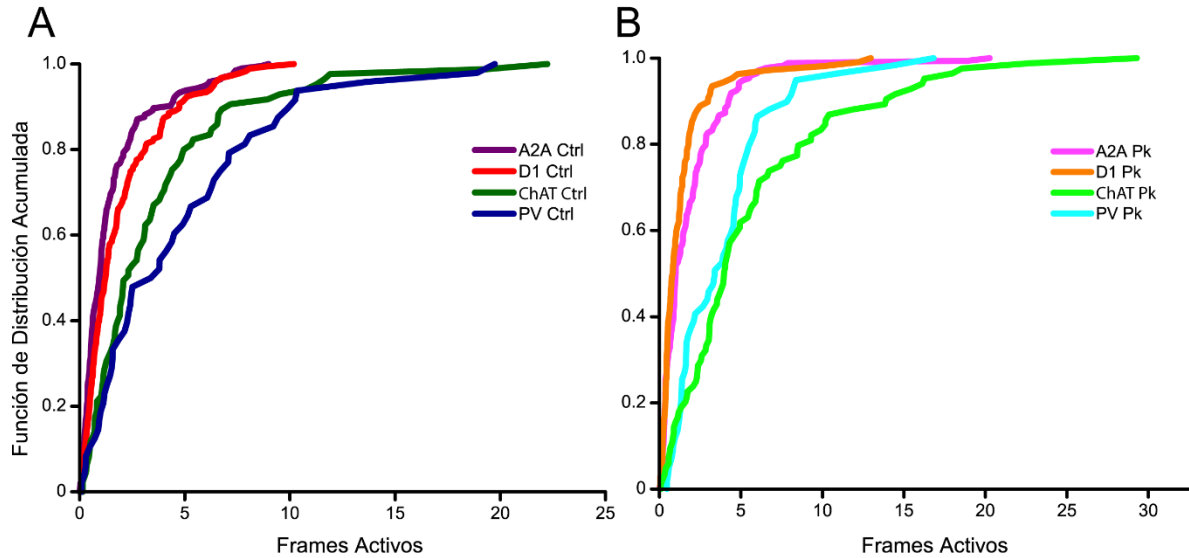


Figura 8. **Actividad control y parkinsoniana entre las diferentes poblaciones neuronales.** **A)** Distribuciones de Función Acumulada que expone la actividad normalizada todas las poblaciones SPNs e Interneuronas en condiciones control. Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras, entre la actividad SPNs A2A y SPNs D1 se muestra un valor $p = 0.0299$ y hay diferencia significativa; entre la actividad SPNs A2A e interneuronas ChAT, se muestra un valor $p = 1.5311e-08$ y hay diferencia significativa; entre la actividad SPNs A2A e interneuronas PV, se muestra un valor asintótico $p = 3.5537e-07$ y hay diferencia significativa; entre la actividad SPNs D1 e interneuronas ChAT, se muestra un valor $p = 5.3515e-04$ y hay diferencia significativa; entre la actividad SPNs D1 e interneuronas PV, se muestra un valor $p = 2.6178e-04$ y hay diferencia significativa; entre la actividad de interneuronas ChAT y PV, las distribuciones no son diferentes, se muestra un valor $p = 0.2246$ y no hay diferencia significativa. **B)** Distribuciones de Función Acumulada que expone la actividad normalizada todas las poblaciones SPNs e Interneuronas en condiciones parkinsonianas. Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras, entre la actividad SPNs A2A y SPNs D1, se muestra un valor $p = 0.0218$ y hay diferencia significativa; entre la actividad SPNs A2A e interneuronas ChAT, se muestra un valor $p = 6.0422e-13$ y hay diferencia significativa; entre la actividad SPNs A2A e interneuronas PV, se muestra un valor $p = 7.3992e-07$ y hay diferencia significativa; entre la actividad SPNs D1 e interneuronas ChAT, se muestra un valor $p = 1.7314e-17$ y hay diferencia significativa; entre la actividad SPNs D1 e interneuronas PV, se muestra un valor $p = 2.6152e-09$ y hay diferencia significativa; entre la actividad de interneuronas ChAT y PV, las distribuciones no son diferentes, se muestra un valor $p = 0.1348$ y no hay diferencia significativa.

Se muestran en la Fig. 9A, B, C y D, las pendientes de actividad total acumulada por población para cada una de las condiciones, una mayor inclinación representa una mayor actividad total con respecto al tiempo. Se observa una diferencia significativa en la Fig. 9E, en las gráficas de caja de actividad total acumulada de los diferentes experimentos de SPNs A2a (Kruskal-Wallis $p=0.0152$) y las interneuronas ChAT (Kruskal-Wallis $p=0.0161$) control vs parkinsoniano. Al comparar a las distintas poblaciones en la misma condición, en control solo existe una diferencia significativa entre las SPNs A2A y SPNs D1 con las interneuronas PV ($p=0.0229$ y $p=0.0371$ respectivamente). En la condición parkinsoniana únicamente encontramos una diferencia significativa entre las SPNs A2A y D1 con las interneuronas ChAT ($p=0.0445$ y $p=0.00153$, respectivamente).

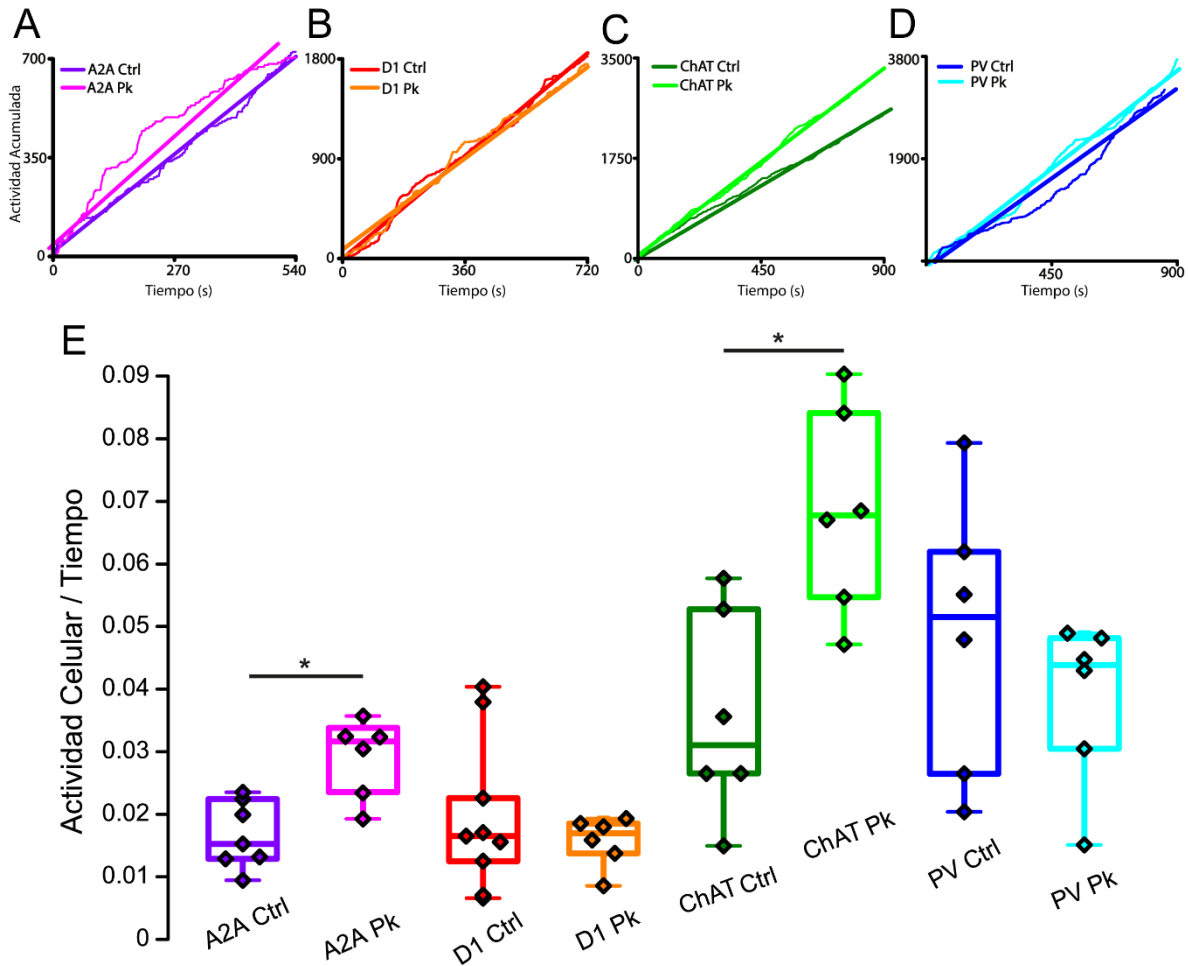


Figura 9. **Graficas de Actividad Acumulada.** A) Graficas de pendientes de SNPs A2A control y SNPs A2A parkinsoniano que compara la actividad acumulada de SNPs A2A en ambas condiciones. B) Graficas de pendientes de SNPs D1 control y SNPs D1 parkinsoniano que compara la actividad acumulada de SNPs D1 en ambas condiciones. C) Graficas de pendientes de Interneuronas ChAT control e Interneuronas ChAT parkinsoniano que compara la actividad acumulada de Interneuronas ChAT en ambas condiciones, y se observa una diferencia significativa. D) Graficas de pendientes de Interneuronas PV control e Interneuronas PV parkinsoniano que compara la actividad acumulada de Interneuronas PV en ambas condiciones. E) Graficas de cajas que compara el conjunto de pendientes de la actividad acumulada en función del tiempo de las condiciones control y parkinsonianas de cada experimento realizado a cada población neuronal. Mediante la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis se comparan los experimentos realizados estadísticamente, mostrándose una diferencia significativa entre los grupos A2ACtrl vs A2A Pk ($p=0.0152$) y ChaT Ctrl vs ChAT Pk ($p=0.0161$), A2A Ctrl vs PV Ctrl ($p=0.0229$), D1 Ctrl vs PV Ctrl ($p=0.0371$), A2A Pk vs ChAT Pk ($p=0.0445$) y D1 Pk vs ChAT Pk ($p=0.00153$).

10 Discusión

En este trabajo se demuestra que la actividad de las distintas poblaciones neuronales estriatales es distinta entre ellas tanto en condiciones control como en el tejido Parkinsoniano. Encontramos diferencias significativas en la distribución de actividad individual en las SPNs D1, en la actividad total acumulada en las SPNs A2A y en ambas medidas para las interneuronas ChAT.

10.1 NEURONAS ESPINOSAS DE PROYECCIÓN DE LA VÍA DIRECTA

En las SPNs de la vía directa expresan receptor a dopamina tipo D1, un incremento en la concentración de dopamina incrementa la excitabilidad de estas (Hernández-López, Bargas, Surmeier, Reyes, & Galarraga, 1997), por lo que en la enfermedad de Parkinson uno esperaría una reducción en la excitabilidad de estas. El resultado obtenido es consistente con esta hipótesis ya que encontramos una diferencia significativa en la CDF de actividad celular individual (Figura 6D), la distribución en el tejido parkinsoniano se encuentra a la izquierda del control lo que indica una menor actividad individual en función del tiempo. Un resultado que a simple vista puede resultar contradictorio es que no encontramos una diferencia significativa en la actividad acumulada total a lo largo de los diferentes experimentos (Figura 9E), pues refleja que, a pesar de que las neuronas son menos excitables como lo muestra la distribución, parece haber más neuronas activas y esto, puede deberse a los efectos de la dopamina en otros elementos del circuito, el primero puede ser un incremento en la excitabilidad cortical (Arbuthnott & Garcia-Munoz, 2016), lo que generaría una mayor cantidad de entradas sinápticas y a su vez más neuronas activas compensando el efecto de la CDF. El segundo elemento que puede ser la pérdida de inhibición colateral (Burke, Rotstein, & Alvarez, 2017; López-Huerta et al., 2013; Taverna, Ilijic, & Surmeier, 2008), al perderse la inhibición colateral se pueden activar más neuronas en respuesta a una entrada cortical. Finalmente puede deberse al incremento de excitabilidad por estimulación de los receptores muscarínicos M4, los cuales incrementan la excitabilidad de las mismas (Hernández-Flores et al., 2015), esto debido a que vemos un incremento en la actividad de las interneuronas ChAT y además existen reportes previos de hipercolinérgia en la enfermedad de Parkinson (Barbeau, 1962).

10.2 NEURONAS ESPINOSAS DE PROYECCIÓN DE LA VÍA INDIRECTA

Las neuronas de la vía indirecta expresan receptor a dopamina tipo D2, y la actividad de este receptor disminuye la excitabilidad de estas neuronas (Hernández-López et al., 2000), por lo que en un tejido parkinsoniano esperaríamos encontrar un incremento en la actividad (Chan et al., 2012), de manera consistente encontramos un incremento significativo en la actividad total en función del tiempo (Figura 9E), sin embargo, no encontramos diferencia significativa en la CDF de actividad neuronal individual (Figura 6B), este efecto puede deberse a que las neuronas de la vía indirecta presentan potenciales autoregenerativos de calcio (Flores-

Barrera, Vizcarra-Chacón, Tapia, Bargas, & Galarraga, 2010), y esta característica hace que las respuestas en estas neuronas se vuelvan binarias es decir todo o nada y ante un incremento en estimulación o excitabilidad no se encuentra diferencia (García-Vilchis et al., 2019) en la distribución de la actividad individual. También se ha reportado un incremento en la inhibición proveniente de interneuronas PV (Gittis et al., 2011), además la pérdida de colaterales (Burke et al., 2017; López-Huerta et al., 2013; Taverna et al., 2008), incremento de excitabilidad cortical (Arbuthnott & Garcia-Munoz, 2016) e hipercolinérgia (Barbeau, 1962) también tiene un efecto sobre esta población como en las SPNs D1.

Se puede observar el desequilibrio de las vías directa e indirecta de las pendientes de actividad acumulada de la Fig. 9A-B, donde se muestra una clara diferencia entre la actividad de SPNs A2A en condiciones patológicas siendo mayor que en control y la de SPNs D1 permaneciendo sin cambios en ambas condiciones, y esto concuerda con lo reportado *in vivo*, donde se expone que tras el agotamiento agudo y extendido de dopamina, los conjuntos SPNs A2A, pero no SPNs D1, experimentaron cambios pronunciados en la forma en que su dinámica espacio-temporal codificaba la locomoción (Parker et al., 2018), siendo que SPNs A2A, tenía un aumento de actividad espontánea pero una especificidad de codificación reducida, y las tasas de actividad de SPNs D1 permanecieron consistentemente deprimidas pero aún aumentaron al inicio del movimiento y retuvieron la coordinación espacial, concluyendo en que las SPNs A2A y las SPNs D1 participan conjuntamente en la selección del movimiento a través de la activación sincronizada en grupos de células intercaladas. Los presentes hallazgos se ajustan y son coherentes con el modelo de predicciones sobre cómo cambian las tasas espontáneas de actividad de SPNs en la enfermedad de Parkinson.

10.3 INTERNEURONAS ESTRIATALES

En las interneuronas PV no encontramos una diferencia significativa en ninguna de las medidas empleadas (Figura 7D y 9E); este resultado puede deberse a que no hay un cambio significativo a esta población o a que la técnica utilizada es insuficiente para detectar cambios en la actividad de estas neuronas ya que presentan disparo a altas frecuencias (Duhne et al., 2020), aunque también puede deberse a que existen muchas aferencias corticales en interneuronas PV+ (Arias-García et al., 2018), y no se vea tan afectada esa población dada la ausencia de DA en el estriado.

En el caso de las interneuronas ChAT, encontramos diferencias significativas en la CDF (Figura 7B) y en la actividad total acumulada (Figura 9E), estas diferencias son consistentes con los cambios reportados para las interneuronas colinérgicas (Plotkin & Goldberg, 2019; Tubert & Murer, 2020), sin embargo, es necesario mencionar que esta diferencia implica cambios en el patrón de disparo pero no necesariamente en la actividad total ya que al igual que en el caso de las interneuronas PV hay reportes de que la imagenología de calcio no puede reportar de manera confiable su disparo (Rehani et al., 2019) y puede ser que la relativamente baja actividad que encontramos en condiciones control se deba a disparo tónico (Apicella, 2017; Tan & Bullock, 2008) que no se refleja con imagenología de calcio. Las interneuronas ChAT en condiciones control son inhibidas por dopamina debido a que expresan receptores de dopamina tipo 2 (D₂R) (Deng, Zhang, & Xu, 2007), por lo que en la enfermedad de Parkinson, al escasear la DA aumenta la actividad en interneuronas ChAT; las interneuronas ChAT proyectan a varias neuronas estriatales vecinas y las afectan al liberar ACh, que se une a los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos presentes en las neuronas postsinápticas, los receptores muscarínicos se expresan ampliamente en las SPNs (Galarraga et al., 1999) y los nicotínicos están presentes en las interneuronas GABAérgicas estriatales y en los terminales axónicos de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Franklin & Frank, 2015) y, al haber más ACh para los receptores muscarínicos y nicotínicos de SNPs y de otras interneuronas, como PV, la actividad y la selectividad para los movimientos futuros estaría compensada a la falta de dopamina.

10.4 CIRCUITO PARKINSONIANO

Reportes previos con la misma preparación de rebanadas de cerebro corticostriatales de modelos murinos con de la enfermedad de Parkinson, mencionan la presencia de hiperactividad del circuito (Jáidar et al., 2010), sin embargo, la pregunta de qué población era responsable de esta hiperactividad quedaba sin resolver. Este trabajo permite revelar que la población clave son las interneuronas ChAT, la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson comienza con la falta de DA en el estriado y se sabe que conduce a un aumento de las oscilaciones en los núcleos de salida, el globo pálido y la SNr, especialmente en el rango de 8 a 30 Hz, también conocida como banda β (Brown & Williams, 2005) y también se conduce a un desequilibrio en la activación de las vías directas e indirectas; los estudios informan sincronía y oscilaciones y son consistentes con la hipótesis de que el estriado es la

fuerza de la actividad aberrante; además, se ha informado que el tono acetilcolinérgico potenciado en el estriado permite la generación de actividad oscilatoria tanto en la corteza como en el estriado (McCarthy et al., 2011), por lo que nuestro estudio permite explicar ciertos de estos fenómenos, empezando con: **1)** que el aumento drástico en la actividad de ChAT podría explicar la generación de la actividad oscilatoria en el estriado **2)** el desequilibrio en la activación de las vías se debe a la falta de DA, los receptores D₂ de las SPNs A2A pueden también modular corrientes iónicas, en particular las activadas por voltaje, inhibiendo canales de Ca²⁺ (efecto presumiblemente mediado por proteínas G_{αo}) o facilitando la apertura de canales de K⁺ mediante proteínas G_{i3}, por lo que parecen tener un rol en la sincronía y las oscilaciones antes mencionadas (Bahena-Trujillo, Flores, & Arias-Montaña, 2000). **3)** En la enfermedad de Parkinson el agotamiento de la dopamina conduce a una mayor sincronía en la red de ganglios basales, y debido a que las interneuronas GABAérgicas regulan la actividad de las SPNs y promueven la sincronía neuronal, y a pesar de que no se observó en los experimentos diferencias significativas en la actividad de interneuronas PV, de acuerdo con Gittis (2011), tras el agotamiento de la dopamina, las células PV individuales duplican su conectividad a los SPNs A2A, mientras que las conexiones a los SPNs D1 se mantienen sin cambios y tales aumentos en la innervación de interneuronas PV son efectivos para mejorar la sincronía dentro de las poblaciones SPNs A2A, por lo que esos datos sugieren que después del agotamiento de la dopamina, la organización rápida de microcircuitos específicos en el estriado puede conducir a una mayor sincronía de SPNs A2A que contribuye a las oscilaciones patológicas de la red y los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson.

Estos resultados son consistentes también respecto al existente equilibrio de DA/ACh en el estriado y como este es esencial en la capacidad de movimiento en pacientes con enfermedad de Parkinson; los niveles de DA en las vías de señalización dentro del estriado aumenta la excitabilidad de SPNs D1, e induce la inhibición de SPNs A2A e interneuronas ChAT debido a que tienen D_{2R}. Por tanto, dado que las interneuronas ChAT ahora menos inhibidas en un microcircuito patológico, hay una abundancia relativa de ACh, por lo tanto si la DA permite el comienzo de la ejecución de movimientos en respuesta a las señales de la corteza, y ACh actúa como un modulador para evitar una respuesta excesiva y facilitar la detención y la selección de patrones de acción alternativos (Hoebel, Avena, & Rada, 2007). Estudios

recientes muestran a L-DOPA como la mejor terapia de reemplazo de DA para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson a largo plazo, aunque su uso genera efectos secundarios motores; de acuerdo con Lara-González (2019), se encuentra una eficacia diferente de los agonistas de DA para revertir la dinámica de la red patológica de la enfermedad de Parkinson durante la dinámica del microcircuito, mostrando una jerarquía en el rendimiento de los agonistas: L-DOPA > agonistas selectivos de la clase D₂ > agonistas menos selectivos de la clase D_{1,2}, mostrando una gran relevancia del papel que tienen las neuronas que codifican los receptores dopaminérgicos D₂R. Por lo que, tras estos hallazgos de la presente tesis, se pueden proponer bioensayos parecidos con el uso de antimuscarínicos para mantener el equilibrio DA/ACh debido a la gran relevancia de interneuronas ChAT en la dinámica patológica del estriado con el fin de probar combinaciones de terapias adyuvantes y nuevos fármacos.

10.5 DIFERENCIA ENTRE LA ACTIVIDAD DE TODAS LAS POBLACIONES NEURONALES DEL MICROCIRCUITO ESTRIATAL

Finalmente tenemos una comparación respecto a si existen diferencias entre las CDFs de todas las poblaciones dentro de una condición específica, ya sea en control o en condiciones parkinsonianas, como se muestra en la Fig. 8; lo que se muestra tanto en la Fig. 8A como en la Tabla 1, es que en condiciones control, todas las distribuciones son diferentes excepto la distribución de la actividad entre las interneuronas ChAT y PV, y curiosamente, ocurre lo mismo en la Fig. 8B y la Tabla 2 pues la comparación de la actividad del microcircuito en condiciones patológicas, muestra que todas las distribuciones son diferentes excepto la distribución de la actividad entre las interneuronas ChAT y PV. También se puede observar que las CDFs de estas interneuronas, están más hacia la derecha, lo que implica que la probabilidad de la actividad acumulada de SPNs A2A y D1 en condiciones control y en condiciones patológicas en un instante de tiempo aleatorio es inferior a la actividad acumulada de interneuronas ChAT y PV, lo que expone que mucha de la actividad espontánea en el microcircuito estriatal suele ser por estas interneuronas. Esto es consistente con lo reportado por Duhne (2020), respecto a que la participación de las neuronas PV+ en el microcircuito era entre el 5%-11% con valores atípicos que se acercan al 20%, mostrando una actividad más alta que las neuronas PV- como las SPNs. Esta es una revelación sorprendente, pues a pesar de constituir menos del 1% de la población neuronal local que

constituye al núcleo estriado, es la que más actividad tiene a lo largo del tiempo y la que más espontaneidad de actividad muestra en condiciones patológicas y se refuerza la hipótesis dada respecto a que, después del agotamiento de la DA, las interneuronas en el estriado pueden conducir a una mayor sincronía que contribuye a las oscilaciones patológicas de la red y los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson, dada la actividad potenciada de ChAT y el posible aumento de inervación de PV sobre SPNs A2A.

Aunque se ha documentado una subestimación de la actividad mediante imagenología de calcio para las interneuronas (Rehani et al., 2019) debido a la baja resolución temporal, la técnica es efectiva para registrar varias neuronas de estriado diferencial y simultáneamente durante breves períodos de tiempo y poder observar la participación de las interneuronas en el microcircuito.

11 Conclusión

En conclusión, mediante el uso de imágenes de calcio con resolución de una sola célula y el registro de docenas de células simultáneamente, encontramos que las poblaciones neuronales del estriado exponen diferentes actividades y distribuciones en condiciones control respecto al modelo de la enfermedad de Parkinson, siendo las principales diferencias: 1) La dopamina disminuye la excitabilidad individual de SPNs D1 pero no hay diferencia significativa con la actividad acumulada a lo largo de los experimentos, por lo que en Parkinson parece haber más neuronas activas pero menos excitables. 2) La dopamina tiene un efecto contrario en SPNs A2A, exhibiendo un aumento en la actividad acumulada a lo largo de los experimentos, pero no muestra un aumento en la excitabilidad de neuronas individuales en el modelo de Parkinson. 3) La actividad total acumulada y la excitabilidad individual de las interneuronas ChAT aumenta significativamente en condiciones patológicas. 4) La actividad total acumulada y la excitabilidad individual de las interneuronas PV permanece sin cambios entre las condiciones control y patológicas. 5) Y la hiperactividad observada en el microcircuito estriatal privado de dopamina es causada en mayor medida por las interneuronas ChAT y PV que tienen alteraciones respecto a su dinámica control. Estos hallazgos son la pauta para posteriores estudios clínicos, de comportamiento y celulares para comprender las acciones subyacentes de las poblaciones neuronales dedicadas a la codificación locomotora y entender

la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad del Parkinson.

12 Bibliografía

- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila- Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., & Bargas, J. (2018). Cortical stimulation relieves Parkinsonian pathological activity in vitro. *European Journal of Neuroscience*, *49*(6), 838–848. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Apicella, P. (2017). The role of the intrinsic cholinergic system of the striatum: What have we learned from TAN recordings in behaving animals? *Neuroscience*, *360*, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.060>
- Arbuthnott, G. W., & Garcia-Munoz, M. (2016). Are the Symptoms of Parkinsonism Cortical in Origin? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *15*, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.10.006>
- Arias-García, M. A., Tapia, D., Laville, J. A., Calderón, V. M., Ramiro-Cortés, Y., Bargas, J., & Galarraga, E. (2018). Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Structure and Function*, *223*(3), 1229–1253. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1536-6>
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaño, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, *11*(1), 39–60. Retrieved from <http://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/218%0Ahttp://revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/218/230>
- Barbeau, A. (1962). The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Canadian Medical Association Journal*, *87*(15), 802–807.
- Brown, P., & Williams, D. (2005). Basal ganglia local field potential activity: Character and functional significance in the human. *Clinical Neurophysiology*, *116*(11), 2510–2519. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2005.05.009>
- Burke, D. A., Rotstein, H. G., & Alvarez, V. A. (2017). Striatal Local Circuitry: A New Framework for Lateral Inhibition. *Neuron*, *96*(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.019>
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., & Bargas, J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *Journal of Neurophysiology*, *99*(3), 1435–1450. <https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>
- Chan, C. S., Peterson, J. D., Gertler, T. S., Glajch, K. E., Quintana, R. E., Cui, Q., ... James Surmeier, D. (2012). Strain-specific regulation of striatal phenotype in *Drd2*-eGFP BAC transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, *32*(27), 9124–9132. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0229-12.2012>
- Cossart, R., Ikegaya, Y., & Yuste, R. (2005). Calcium imaging of cortical networks dynamics. *Cell Calcium*, *37*(5 SPEC. ISS.), 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.01.013>
- Darden, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and models. *Neuron*, *39*(6), 889–909. <https://doi.org/10.1017/CCOL9780521851282.008>
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, *13*(7), 281–285. [32](https://doi.org/10.1016/0166-</p></div><div data-bbox=)

2236(90)90110-V

- Deng, P., Zhang, Y., & Xu, Z. C. (2007). Involvement of Ih in dopamine modulation of tonic firing in striatal cholinergic interneurons. *Journal of Neuroscience*, *27*(12), 3148–3156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5535-06.2007>
- Duhne, M., Lara-González, E., Laville, A., Padilla-Orozco, M., Ávila-Cascajares, F., Arias-García, M., ... Bargas, J. (2020). Activation of parvalbumin-expressing neurons reconfigures neuronal ensembles in murine striatal microcircuits. *European Journal of Neuroscience*, (September 2019), 1–16. <https://doi.org/10.1111/ejn.14670>
- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B. J., Tapia, D., Bargas, J., & Galarraga, E. (2010). Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *4*(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2010.00015>
- Franklin, N. T., & Frank, M. J. (2015). A cholinergic feedback circuit to regulate striatal population uncertainty and optimize reinforcement learning. *ELife*, *4*(DECEMBER2015), 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.12029>
- Galarraga, E., Bargas, J., Martínez-Fong, D., & Aceves, J. (1987). Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neuroscience Letters*, *81*(3), 351–355. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90409-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90409-5)
- Galarraga, E., Hernández-López, S., Reyes, A., Miranda, I., Bermudez-Rattoni, F., Vilchis, C., & Bargas, J. (1999). Cholinergic modulation of neostriatal output: A functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *Journal of Neuroscience*, *19*(9), 3629–3638. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-09-03629.1999>
- García-Vilchis, B., Suárez, P., Serrano-Reyes, M., Arias-García, M., Tapia, D., Duhne, M., ... Galarraga, E. (2019). Differences in synaptic integration between direct and indirect striatal projection neurons: Role of CaV 3 channels. *Synapse*, *73*(4), e22079. <https://doi.org/10.1002/syn.22079>
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, *250*(1986), 1429–1432. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1126/science.2147780>
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, *34*(1), 441–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>
- Gittis, A. H., Hang, G. B., LaDow, E. S., Shoenfeld, L. R., Atallah, B. V., Finkbeiner, S., & Kreitzer, A. C. (2011). Rapid target-specific remodeling of fast-spiking inhibitory circuits after loss of dopamine. *Neuron*, *71*(5), 858–868. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.035>
- Greco, R., Tassorelli, C., Armentero, M. T., Sandrini, G., Nappi, G., & Blandini, F. (2008). Role of central dopaminergic circuitry in pain processing and nitroglycerin-induced hyperalgesia. *Brain Research*, *1238*, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.022>
- Grillner, S. (2006). Biological Pattern Generation: The Cellular and Computational Logic of Networks in Motion. *Neuron*, *52*(5), 751–766. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.008>
- Harris, K. D. (2005). Neural signatures of cell assembly organization. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(May), 399–407.
- Hernández-Flores, T., Hernández-González, O., Pérez-Ramírez, M. B., Lara-González, E.,

- Arias-García, M. A., Duhne, M., ... Bargas, J. (2015). Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M4-type receptors. *Neuropharmacology*, 89, 232–244. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.028>
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., & Galarraga, E. (1997). D1 Receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *Journal of Neuroscience*, 17(9), 3334–3342. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-09-03334.1997>
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., & Surmeier, D. J. (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLCβ1-IP3-Calcineurin-signaling cascade. *Journal of Neuroscience*, 20(24), 8987–8995. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-24-08987.2000>
- Hoebel, B. G., Avena, N. M., & Rada, P. (2007). Accumbens dopamine-acetylcholine balance in approach and avoidance. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(6), 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.10.014>
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., & Hernández-Cruz, A. (2010). Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: Entrainment into a dominant network state. *Journal of Neuroscience*, 30(34), 11326–11336. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1380-10.2010>
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), a009621–a009621. [https://doi.org/10.1016/S0193-953X\(05\)70340-3](https://doi.org/10.1016/S0193-953X(05)70340-3)
- Lara-González, E., Duhne, M., Ávila-Cascajares, F., Cruz, S., & Bargas, J. (2019). Comparison of Actions between L-DOPA and Different Dopamine Agonists in Striatal DA-Depleted Microcircuits In Vitro: Pre-Clinical Insights. *Neuroscience*, 410, 76–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.058>
- López-Huerta, V. G., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Fiordelisio, T., Drucker-Colin, R., & Bargas, J. (2013). The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of parkinsonism. *Journal of Neuroscience*, 33(11), 4964–4975. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4721-12.2013>
- McCarthy, M. M., Moore-Kochlacs, C., Gu, X., Boyden, E. S., Han, X., & Kopell, N. (2011). Striatal origin of the pathologic beta oscillations in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11620–11625. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107748108>
- Morris, R. G. M. (1999). D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Research Bulletin*, 50(5–6), 437. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00182-3](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00182-3)
- Nambu, A., & Tachibana, Y. (2014). Mechanism of parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia: Some considerations based on our recent work. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8(MAY), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00074>
- Parker, J. G., Marshall, J. D., Ahanonu, B., Wu, Y. W., Kim, T. H., Grewe, B. F., ... Schnitzer, M. J. (2018). Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. In *Nature* (Vol. 557). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0090-6>
- Plotkin, J. L., & Goldberg, J. A. (2019). Thinking Outside the Box (and Arrow): Current Themes in Striatal Dysfunction in Movement Disorders. *Neuroscientist*, 25(4), 359–379. <https://doi.org/10.1177/1073858418807887>
- Rehani, R., Atamna, Y., Tiroshi, L., Chiu, W. H., Aceves Buendía, J. D. J., Martins, G. J., ...

- Goldberg, J. A. (2019). Activity patterns in the neuropil of striatal cholinergic interneurons in freely moving mice represent their collective spiking dynamics. *ENeuro*, 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0351-18.2018>
- Shepherd, G. M., & Grillner, S. (2010). *Handbook of Brain Microcircuits* (1st ed.; G. M. Shepherd & S. Grillner, eds.). New York: Oxford University Press, Inc.
- Tan, C. O., & Bullock, D. (2008). A dopamine-acetylcholine cascade: Simulating learned and lesion-induced behavior of striatal cholinergic interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 100(4), 2409–2421. <https://doi.org/10.1152/jn.90486.2008>
- Tang, K. C., Low, M. J., Grandy, D. K., & Lovinger, D. M. (2001). Dopamine-dependent synaptic plasticity in striatum during in vivo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 1255–1260. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1255>
- Taverna, S., Ilijic, E., & Surmeier, D. J. (2008). Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 28(21), 5504–5512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5493-07.2008>
- Tian, L., Hires, S. A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M. E., Chalasani, S. H., ... Looger, L. L. (2009). Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods*, 6(12), 875–881. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1398>
- Tseng, K.-Y. (2009). *Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson's Disease* (1st ed.; K.-Y. Tseng, ed.). New York: Humana Press.
- Tubert, C., & Murer, M. G. (2020). What's wrong with the striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease? Focus on intrinsic excitability. *European Journal of Neuroscience*, (April), 1–17. <https://doi.org/10.1111/ejn.14742>
- Uhlhaas, P. J., Pipa, G., Lima, B., Melloni, L., Neuenschwander, S., Nikolić, D., & Singer, W. (2009). Neural synchrony in cortical networks: History, concept and current status. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 3(JUL), 1–19. <https://doi.org/10.3389/neuro.07.017.2009>
- Ungerstedt, U., & Arbuthnott, G. W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research*, 24(3), 485–493. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90187-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90187-3)
- Walter, J. R., & Bergstrom, D. A. (2009). Basal ganglia network synchronization in animal models of Parkinson's disease. In K.-Y. Tseng (Ed.), *Cortico-subcortical dynamics in Parkinson disease* (1st ed., pp. 117–142). New York: Humana Press.