



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES QUE SE PRESENTAN EN  
LA ACTIVIDAD DEL MICROCIRCUITO NEOESTRIATAL DE  
RATA, EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE  
PARKINSON**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN**

**INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

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

**OMAR PEDRO JÁIDAR BENAVIDES**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Para mis padres,  
porque el que está orgulloso  
de ustedes soy yo.

## **Agradecimientos**

A Yara, la gorda que cumple el papel de ser mi psicóloga a domicilio, gracias por estar TODO el tiempo.

A Valeria que, aunque no lo creas, en este escrito si me acuerdo de ti, gracias por preocuparte por mi, incluso creo que más que lo que yo me preocupo y darme tanto apoyo.

A Angélica, simplemente por estar, darme tu apoyo, poder soportar en mis peores momentos y más que nada por entregarme de forma incondicional todo tu cariño y amor.

Al m'ijo que gracias a su sutil o no tan sutil hostilidad tuvo la paciencia para enseñarme, lograr hacer que yo trabajara y volverse un gran amigo. En verdad ¡gracias!

A mis primates (por orden de aparición): Yuriria, Axbal, Arturo, Alfredo, Alberto, Leonardo, que aunque sea por distancia, ocupaciones, hijos o taxistas, siempre están ahí para mí.

A todos mis tíos por demostrarme que no importa que pase en la vida, los sobrinos siempre están primero.

Al Igor por demostrarme que estas y que te importan las cosas.

Al Sebas y al Víctor que si saben que son las amistades largas.

Al club quintito, que todos en algún momento y de alguna forma han sido mis maestros, los quiero.

A mis amigos, que por fortuna son muchos, ya que sin ustedes no sería como soy.

Al Dr. Arturo Hernández Cruz por atreverse a aceptarme en su laboratorio y ayudarme tanto dentro de mi formación laboral.

A los Drs. Gabriel Gutiérrez, Stephan Mihailescu, Adán Hernández, Fernando Peña, por su tiempo y dedicación en pro de este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio, que hacen el día rinda... gracias.

A los que se ofenden porque no los menciono aquí, un poquito de comprensión ¿no?

# Índice

<b>Abreviaturas</b>	1
<b>Resumen</b>	2
<b>Introducción</b>	3
Ganglios Basales	3
El Neoestriado	3
Organización funcional de los ganglios basales	6
Vías directa e indirecta	6
Vía Directa	9
Modulación de la dopamina en las neuronas de la vía directa	9
Vía indirecta	11
Modulación de la dopamina en las neuronas de la vía indirecta	12
Enfermedad de Parkinson y los circuitos de los ganglios basales	12
La Enfermedad de Parkinson	13
<b>Planteamiento del problema</b>	16
<b>Objetivo</b>	16
<b>Hipótesis</b>	16
<b>Metodología</b>	17
Lesión de la SNc en ratas jóvenes	17
Obtención de rebanadas de cerebro	19
Imagenología de calcio	19
Análisis de imágenes	20
Análisis estadístico	21
<b>Resultados</b>	22
<b>Discusión</b>	29
<b>Conclusiones</b>	32
<b>Perspectivas</b>	33
<b>Referencias</b>	34

## Abreviaturas

AP	Anteroposterior
CCD	Cooled digital camera
Cx	Corteza
DR	Disparo rápido
EP	Enfermedad de Parkinson
GB	Ganglios Basales
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
IP	Intraperitonealmente
L	Lateral
LTS	Low threshold spiking
NE	Neocortado
NEM	Neurona espinosa mediana
NST	Núcleo subtalámico
SNc	Sustancia negra parte compacta
SNr	Sustancia negra parte reticulada
SP	Sustancia P
T	Tálamo
V	Ventral

## RESUMEN

El neostriado es un núcleo neuronal que forma parte de los ganglios basales. Dichos núcleos están relacionados con la codificación de los movimientos, el aprendizaje asociativo y la memoria de procedimientos. El neostriado es el núcleo principal de entrada de los ganglios basales, recibe y procesa información proveniente de la corteza cerebral, de los núcleos intralaminares del tálamo, de la sustancia negra parte compacta, entre otras estructuras. La “información procesada” por el neostriado es enviada a los núcleos intermedios (el globo pálido externo y el núcleo subtalámico) y a los núcleos de salida (el globo pálido interno y la sustancia nigra pars reticulata). Los núcleos de salida, por medio de sus proyecciones hacia el tálamo y su regreso hacia la corteza motora o premotora, influyen en el comportamiento motor.

La dopamina es un neuromodulador que participa en el procesamiento e integración de la información en el neostriado. Este neuromodulador es producido por las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra parte compacta, cuando más del 95% de las neuronas de este núcleo mueren, se genera rigidez, bradicinecia, acinesia, *congelamiento* y alteración en la postura, síntomas característicos de la Enfermedad de Parkinson.

Esta tesis describe el comportamiento de la actividad de la red neuronal del neostriado en un modelo animal de la Enfermedad de Parkinson; para esto nosotros generamos un modelo hemiparkinsoniano en ratas de 12-14 días de edad, lesionando las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta. Obtuvimos rebanadas corticoestriatales de las ratas hemiparkinsonianas y utilizando técnicas de epifluorescencia registramos el comportamiento de red en las neuronas estriatales. Los resultados obtenidos muestran un aumento en la actividad y sincronización espontánea de las neuronas neostriatales, contrastando con la actividad esporádica y desincronizada que se presenta en una rebanada corticoestriatal de una rata normal.

## INTRODUCCIÓN

### Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB) son un conjunto de núcleos neuronales ubicados en el cerebro medio y anterior de los mamíferos, aves, reptiles y peces pulmonados. Estos núcleos están relacionados con el control motor (Prescott et al., 2003) pues regulan las conductas voluntarias y el paso entre unas y otras (Redgrave et al., 1999). Los GB conformados por grupos neuronales denominados de entrada, como el neostriado (NE), intermedios como la sustancia negra parte compacta (SNc), el globo pálido externo (GPe) y el núcleo subtalámico (NST); y de salida como el globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra parte reticulada (SNr) (Witchmann, 1999). El NE recibe aferencias de toda la corteza (Cx) cerebral (sensorial, motora y de asociación), de los núcleos intralaminares del tálamo, de la SNc, entre otras estructuras. El NE integra dicha información y la envía a los núcleos intermedios: GPe y NST, o a los núcleos de salida: GPi y SNr que proyectan hacia el circuito tálamo-cortical influyendo en el comportamiento motor. Por lo anterior el NE es considerado el principal núcleo de procesamiento de la información en los GB.

### El Neostriado.

El NE es el núcleo neuronal más grande de los GB. Contiene dos grupos de poblaciones neuronales denominados principales e interneuronas (Bennett y Wilson, 2000). Las neuronas principales (90-95%), son las neuronas espinosas medianas (NEM), llamadas así debido a la gran cantidad de espinas dendríticas que poseen. Estas neuronas tienen un soma con un diámetro de 12 a 20  $\mu\text{m}$ , del cual surgen de 3 a 6 troncos dendríticos principales, cada uno de estos troncos a su vez se ramifica en dos procesos, que pueden volverse a ramificar una o dos veces más, llegando a abarcar un volumen de 300-500  $\mu\text{m}$  de diámetro. Como ya se mencionó antes, las dendritas están densamente cubiertas de espinas, mismas que contribuyen con cerca de la mitad de la superficie total de la célula (Wilson 1980; Bennett y Wilson, 2000; Difiglia et al., 1976).

Las NEM reciben entradas sinápticas glutamatérgicas provenientes de la Cx, la línea media y los núcleos intralaminares del tálamo (Divac et al., 1977; McGeer et al., 1977; Reubi y Cuenod, 1979; Godukhin et al., 1980; Hassler et al., 1982), entradas colinérgicas y GABAérgicas de diferentes interneuronas locales. Las NEM ejercen un poderoso efecto inhibitorio sobre sus células blanco, actuando a través de receptores GABA<sub>A</sub> en la SNr y en el GP, además, se inhiben unas a otras a través de colaterales axónicas. Por otro lado, estas neuronas reciben numerosas aferentes dopaminérgicas, debido a que son el blanco principal de las proyecciones de la SNc hacia el NE (Tepper y Plenz, 2005). Estudios realizados en monos y ratas han mostrado que las neuronas neostriatales, muy probablemente las NEM, aumentan su frecuencia de disparo durante la ejecución de algún movimiento voluntario o en presencia de alguna señal disparadora de movimientos (Wilson, 1993; Kiyatkin y Rebec, 1996; Cepeda y Levine, 1998; Nicola et al., 2000).

El otro tipo neuronal presente en el NE son las interneuronas (5-10%). Se han descrito 4 subtipos de interneuronas que se pueden dividir en dos categorías: las interneuronas gigantes colinérgicas y las interneuronas inhibitorias.

Las interneuronas gigantes colinérgicas forman el 2% de la población neuronal del neostriado, (Phelps et al., 1985, Izzo y Bolam, 1988). Tienen un soma que mide entre 20 y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, del cual surgen 2 a 4 troncos dendríticos primarios que se ramifican en varias dendritas de orden superior por varios milímetros. El axón presenta muchas ramificaciones y forma una arborización profusa que abarca una mayor área que la de las dendritas (Bennet y Wilson, 2000). Estas interneuronas inervan a las NEMs y a las interneuronas GABAérgicas inmunoreactivas a parvalbúmina (descritas más adelante) (Koós y Tepper, 2002). Las interneuronas colinérgicas reciben aferentes excitatorias provenientes del tálamo (Bolam y Smith, 1995), aferentes inhibitorias moduladas presinápticamente por receptores dopaminérgicos de la clase D<sub>2</sub> (Momiya, 2003) y entradas dopaminérgicas de la SNc (Bennet y Wilson, 2000).

Las interneuronas inmunoreactivas a parvoalbúmina son de naturaleza GABAérgica y constituyen el 1% de la población neuronal del NE. El diámetro de su soma es de 10 a 30  $\mu\text{m}$  (Rymar et al., 2004). Estas neuronas presentan dendritas lisas en las proximidades del soma y en las zonas distales al soma pueden presentar varicosidades (Tepper y Plenz, 2005). Existen interneuronas inmunoreactivas a parvoalbúmina más grandes que las anteriores, con un soma mayor a 50  $\mu\text{m}$  que presentan una arborización dendrítica del doble de volumen que las anteriores (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi et al., 1995; Koós y Tepper, 1999). Ambas neuronas presentan una arborización axonal profusa, con un volumen mayor que aquel de sus arborizaciones dendríticas. Dichas arborizaciones hacen contacto sináptico sobre los somas y las dendritas proximales de las NEMs. Las interneuronas inmunoreactivas a parvoalbúmina reciben aferencias glutamatérgicas de la neocorteza, así como aferentes de neuronas GABAérgicas del globo pálido (Bolam y Smith, 1995; Bevan et al., 1998; Kita y Kita, 2001) y por último reciben aferentes de la interneurona gigante colinérgica antes mencionada (Bolam y Smith, 1995; Kawaguchi et al., 1995; Koós y Tepper, 1999).

Las interneuronas parvoalbúmina positivas son denominadas de disparo rápido (DR), pues una vez estimuladas despolarizan en ráfagas con una frecuencia de hasta 300 Hz. En registros *in vivo* se ha visto que esta neurona presenta disparos espontáneos (Kita, 1993). También es posible inducir en rebanadas de cerebro el disparo en ráfagas bajo ciertas condiciones (Carrillo-Reid et al., 2008). Es interesante resaltar que las interneuronas DR tienen receptores nicotínicos y muscarínicos, mientras que las NEM sólo tienen receptores muscarínicos (Koós and Tepper, 2002). Otra característica importante de estas neuronas es que se encuentran acopladas eléctricamente lo que les permite tener un control global sobre las neuronas del NE (Nisenbaum y Berger, 1992; Kita et al., 1990; Koós y Tepper, 1999; Berke et al., 2004; Mallet et al., 2005).

Otro grupo de interneuronas GABAérgicas presentes en el NE son las que contienen somatostatina, neuropéptido Y y NADPH-d. Estas constituyen menos del 1% del total de la población neuronal del NE (Rymar et al., 2004), y son de tipo bipolar. Las dendritas de estas neuronas son menos ramificadas que las anteriores, además de ser más lisas. La arborización axonal es apenas mayor que la dendrítica. Estas interneuronas reciben aferentes monosinápticas glutamatérgicas de la corteza y del tálamo, así como GABAérgicas provenientes de las interneuronas DR y del globo pálido (Bolam y Smith, 1995). La característica electrofisiológica principal de estas interneuronas es que presentan espigas de calcio de bajo umbral (LTS, por sus siglas en inglés "low threshold spiking") y una despolarización sensible a cobalto que es más evidente en el cese de pulsos hiperpolarizantes (Kawaguchi, 1993; Koós y Tepper, 1999).

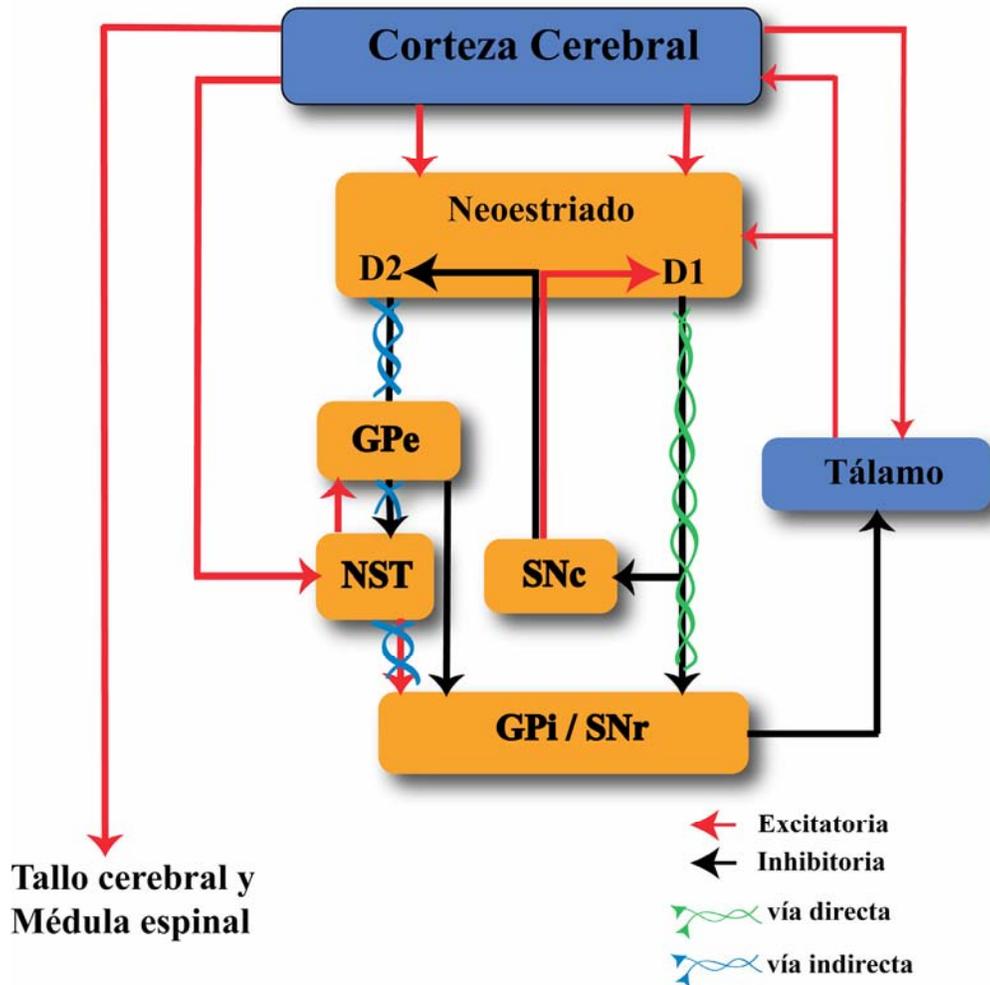
Por último existe un tercer tipo de interneurona GABAérgica presente en el NE. Esta se caracteriza por contener calretinina, una proteína amortiguadora de calcio celular. Estas neuronas constituyen el 0.5% de la población neuronal del NE y anatómicamente poseen pocas ramificaciones dendríticas (Bennet y Bolam, 1993). Hasta la fecha no existen reportes de registros electrofisiológicos de este tipo de interneurona por lo que su fenotipo electrofisiológico es aún desconocido (Tepper y Bolam, 2004).

## Organización funcional de los Ganglios Basales

### Vías directa e indirecta

Las NEMs del NE se han clasificado en 2 grupos, en base a los núcleos a los que dirigen sus proyecciones (Germen y Young, 1988; Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Alexander, 1995). El primer grupo de NEMs constituye la vía denominada indirecta. Estas neuronas envían sus proyecciones GABAérgicas/enkefalínérgicas hacia el GPe.

El segundo grupo forma parte de la vía directa. Estas NEMs envían sus proyecciones hacia el GPI y la SNr, estas neuronas además de GABA sintetizan sustancia P (SP) (Albin et al., 1989; Wilson, 1988; Gerfen y Young, 1988; De Long, 1990). (Figura 1)



**Figura1.** Diagrama simplificado de los GB donde se muestran sus principales componentes (rectángulos anaranjados: neostriado, globo pálido externo e interno, sustancia nigra reticulata y compacta, núcleo subtalámico, núcleo acumbens) así como las conexiones de la vía directa (líneas verdes) y la indirecta (líneas azules); las flechas rojas representan una sinapsis excitatorias y las negras las inhibitorias.

Como ya se mencionó antes el GPI y la SNr, son los núcleos de salida e inervan a los núcleos ventro basales del tálamo (T). De estos núcleos surge el circuito tálamo-cortical que modifica la actividad de salida de las cortezas motora y premotora. De esta forma el circuito que comenzó en la corteza se cierra en la misma corteza.

La información que salió originalmente de la corteza es contrastada con las entradas sensoriales y transformada por las vías directa e indirecta de los GB. Hasta el momento no se ha logrado entender del todo que es lo que hacen los GB con los comandos motores de la corteza pero se han generado diferentes hipótesis. Una postula que los GB ayudan a separar funcionalmente a las poblaciones neuronales que activan los músculos agonistas de las que activan los antagonistas (Mink, 1996). Esta separación tiene que ocurrir en una sucesión rápida ya que dentro de un programa motor las secuencias activan y desactivan a los grupos musculares involucrados siguiendo un patrón temporal definido; Además grupos musculares antagonistas para un programa motor pueden ser agonistas para otros programas. Por lo mismo el aprendizaje de un programa motor sólo se logra después de muchas repeticiones. De esta forma se cree que los GB se encuentran involucrados en el condicionamiento, la memoria y el aprendizaje de procedimientos (Schultz, 1998).

Los núcleos de salida de los GB, el GPi y la SNr, tienen proyecciones GABAérgicas inhibitorias hacia el circuito tálamo-cortical. De esta forma, la actividad tónica de estos núcleos de salida, que disparan potenciales de acción constantemente con una frecuencia entre 20 y 50 Hz, mantiene inhibido este circuito. El GPi y la SNr tienen una representación topográfica de todos los músculos del cuerpo. La constante actividad de estos núcleos mantiene inhibidos a grandes grupos musculares, oponiéndose a la activación muscular generalizada, creada por la formación reticular del tallo cerebral. Para efectuar algún movimiento voluntario es necesario inhibir selectivamente a algunas neuronas de los núcleos de salida y así eliminar temporalmente su actividad tónica y por lo tanto activar un grupo muscular específico (Alexander, 1995; Mink, 1993, Wilson, 1993).

Entonces podríamos decir que una de las funciones del neostriado es “dejar” salir los movimientos al desinhibir a los circuitos tálamo-corticales.

## Vía directa

La vía directa permite la activación focalizada del circuito tálamo-cortical mediante la inhibición de los núcleos de salida de los GB. Esto ocurre cuando las neuronas del GPi y la SNr reciben ráfagas de potenciales de acción GABAérgicos enviados por las NEMs del NE. Las ráfagas de potenciales de acción de las NEMs son comandadas por la corteza cerebral por medio de proyecciones glutamatérgicas hacia el NE (Wilson, 1998). De esta forma dos grupos neuronales inhibitorios en serie, uno del NE y el otro del GPi/SNr, permiten la desinhibición del circuito tálamo-cortical (Alexander, 1995).

## Modulación de la dopamina en las neuronas de la vía directa.

La dopamina es un neurotransmisor liberado por las neuronas de la SNc que inervan el NE. Ésta activa, dentro de la vía directa, a los receptores de la familia D1 de las NEMs (Albin et al., 1989; Gerfen et al., 1990). La activación de este receptor en las NEMs hace que aumente la excitación producida por la activación cortical, aumentándose el efecto de desinhibición de los circuitos tálamo-corticales permitiendo el movimiento muscular (Alexander, 1995).

El aumento en la excitación de las NEMs se debe a la facilitación de las corrientes de calcio en estas neuronas (Surmeier et al., 1995, Hernández-Lopez, 1997) y a la facilitación de las corrientes sinápticas de tipo NMDA (Cepeda y Levine, 1998). Esta facilitación, efectuada por la dopamina sólo tiene lugar cuando las NEMs están recibiendo simultáneamente comandos corticales, esto quiere decir que sólo se presenta esta facilitación cuando se alcanza un voltaje despolarizado para que puedan abrirse los canales NMDA y el canal de calcio tipo L. De lo contrario en ausencia de entradas logísticas activadoras la dopamina, en lugar de tener un efecto excitador, tendría un efecto inhibitorio aumentando el umbral de disparo cuando la neurona se encuentra en reposo o inhibida (Hernández-Lopez et al., 1997). Esto se debe a que la dopamina en

potenciales cercanos al potencial de reposo (potenciales de membrana negativos, -90 mV), promueve la activación de canales de potasio rectificadores de entrada (Pacheco-Cano et al., 1996). Por lo tanto la dopamina actúa como un neuromodulador, modificando la actividad de varios tipos de canales simultáneamente ocasionando cambios en la excitabilidad celular, cuyos efectos netos que dependen del potencial de membrana.

El efecto modulador ejercido por la dopamina sobre las NEMs crea una mejor separación entre las neuronas que activan a los músculos agonistas y las que activan a los músculos antagonistas, ocasionando la activación de secuencias musculares adecuadas con una temporalización correcta. Aunado a esto, las colaterales axónicas de las NEMs de la vía directa e indirecta generan un mecanismo de inhibición lateral entre ellas (Tunstall et al., 2002; Czubayko y Plenz, 2002), que les permite seleccionar los comandos corticales que serán ejecutados y los que serán suprimidos. Esto se refleja en un movimiento voluntario normal. Por otro lado, cuando la separación entre la activación de secuencias musculares no es adecuada, se presentan co-activaciones de músculos agonistas y antagonistas; lo que genera rigidez y otros padecimientos característicos de la Enfermedad de Parkinson.

Debido al efecto inhibitorio de la dopamina y de las colaterales axónicas entre las NEMs, un comando cortical tiene que sobrepasar un nivel de intensidad suficiente para activar el “filtro” del NE. Esto ocurre cuando varias neuronas piramidales de la corteza se activan sincrónicamente para activar a las NEMs. Cuando esto ocurre, y se genera un tren de disparos en las NEMs, la dopamina facilita y prolonga la respuesta de estas neuronas debido a las acciones modulatórias sobre los canales de calcio tipo L y NMDA. Se ha demostrado que la acción moduladora de la dopamina una vez que se supera el filtro inhibitorio del NE, no deja que esa señal disminuya sino que la amplifica. Teniendo como resultado final un aumento en la tasa señal/ruido del comando cortical.

## Vía indirecta

La vía indirecta tiene un efecto contrario al de la vía directa, de forma tal que se aumenta la actividad de los núcleos de salida produciéndose una sobreinhibición del circuito tálamo-cortical impidiendo la generación de movimientos voluntarios. ¿Cómo sucede esto? Esta vía al igual que la vía directa contiene dos grupos de neuronas inhibitorias en serie, las NEMs de esta vía, al recibir un comando cortical, mandan sus proyecciones GABAérgicas hacia el GPe, núcleo que continuamente esta inhibiendo al NST. De esta forma la función principal de las NEMs de la vía indirecta es aumentar la actividad del NST. El NST tiene un disparo tónico glutamatérgico, que al desinhibirse activa a los núcleos de salida (SNr/GPi) de los GB (Rinvik et al., 1993; Hammond et al., 1978; Alexander 1995; Smith et al., 1998). De esta forma, un comando cortical que activa la vía indirecta aumenta la actividad de la SNr y el GPi produciendo una sobreinhibición del sistema tálamo-cortical y por lo tanto inhibiendo la ejecución de movimientos.

El NST además de recibir entradas inhibitorias del GPe, también recibe entradas directas de la corteza motora. Este núcleo tiene que hacer un balance entre las aferentes glutamatérgicas de la corteza motora y las aferentes GABAérgicas del GPe (Bevan et al., 1995; Hartmann-von et al., 1978; Kita y Deniau, 1981). La facilitación de las entradas corticales sólo se presenta cuando el NE lo permite, es decir cuando las NEMs inhiben al GPe; generando una fuerte inhibición de algunos grupos neuronales del circuito tálamo-cortical y así evitando el movimiento para ciertos grupos musculares. A diferencia del NE, que recibe aferencias de toda la corteza, las aferentes corticales que llegan al NST sólo provienen de la corteza motora (Bevan et al., 1995; Hatmann-von et al., 1978; Künzle, 1978; Nambu et al., 1996). Entonces se podría decir que el NST, se encarga de equilibrar la actividad de diferentes poblaciones corticales; unas se inhiben focalmente, mientras que otras mantienen un tono excitador.

## Modulación de la dopamina sobre la vía indirecta

La dopamina también tiene efectos moduladores en las NEMs de la vía indirecta. Estas neuronas expresan preferentemente receptores dopaminérgicos de la familia D<sub>2</sub>. La activación de estos receptores reduce la corriente de calcio tipo-L (Hernández-Lopez et al., 2000), desfavoreciendo la excitación cortical. Por lo tanto la dopamina facilita el disparo de las NEMs de la vía directa activando los movimientos y deprime el disparo de las NEMs de la vía indirecta inhibiendo el movimiento. El resultado final de la acción dopaminérgica dentro de los núcleos de salida es favorecer la activación del circuito tálamo-cortical. Se puede decir entonces que el grado de equilibrio entre la vía directa e indirecta depende de la dopamina. También se sabe que los receptores de la familia D<sub>2</sub> tienen una mayor afinidad por la DA que los receptores del tipo D<sub>1</sub>, de esta forma tal que los receptores D<sub>2</sub> se encuentran parcialmente activados por la liberación basal de DA (Schultz, 1998); mientras que los receptores D<sub>1</sub> se activan sólo por elevaciones fásicas, mayores de la concentración de DA (Gonon, 1997; Hernández-Lopez et al., 1997). Esto da pauta a suponer que la inhibición continua de la activación muscular se encuentra modulada por los receptores D<sub>2</sub> en la vía indirecta, mientras que la actividad fásica de la DA se modula por medio de los receptores D<sub>1</sub> en la vía directa, la cual selecciona a las poblaciones neuronales que se activarán durante los movimientos (Mink, 1996). Entonces, la vía indirecta tendría la función de hacer más evidente el contraste entre las neuronas activadas y las no activadas.

## Enfermedad de Parkinson y los circuitos de los ganglios basales

Durante la Enfermedad de Parkinson los niveles de dopamina en el NE disminuyen drásticamente, lo cual genera un cambio en el patrón de actividad en las neuronas neostriatales. Algunas teorías sobre la Enfermedad de Parkinson sugieren que la pérdida de dopamina genera una sincronía excesiva en distintos núcleos de los GB (Beiser et al., 1997). Sin embargo, las dinámicas de red y el

papel de los mecanismos intrínsecos y extrínsecos involucrados en dicha sincronización anormal en el estriado no han sido estudiados. Estos son algunos de los principales objetivos en esta tesis.

## La Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP), descrita por James Parkinson en 1817, es un padecimiento neurodegenerativo que afecta al ~2% de la población mundial, aumentando su incidencia después de los 65 años de edad. Muchas regiones dentro del cerebro muestran alteraciones durante la EP, sin embargo los síntomas motores de esta enfermedad están claramente relacionados con la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc.

Durante esta enfermedad se genera la muerte de más del 95% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (Foix y Nicolesco, 1925), lo cual da como resultado la disminución drástica de los niveles de dopamina en el neostriado por la ausencia de las proyecciones SNc-NE (Ehringer y Hornykiewicz, 1960).

Por qué las neuronas dopaminérgicas se pierden durante esta enfermedad aún no está claro. Una de las teorías más aceptadas de la muerte neuronal dentro de la SNc, sugiere que la causa sea ocasionada por la propia dopamina. Evidencias recientes sugieren que la oxidación de la dopamina citosólica y de sus metabolitos, generan la liberación de radicales libres que dañan a las células de las SNc provocando su muerte (Greenamyre et al., 2004).

La ausencia de dopamina en el NE afecta el funcionamiento “normal” o sano de este núcleo, cambiando la actividad de red y como consecuencia, genera disfunciones motoras características tales como las acinesias, el *freezing*, la dificultad para iniciar movimientos, etc. (Fahn y Przedborski, 2000). Uno de los tratamientos farmacológicos más usados en las últimas décadas ha

sido la levodopa, un precursor de la dopamina. Este fármaco restaura los niveles dopaminérgicos basales dentro del NE mejorando temporalmente los síntomas motores de la enfermedad (Cotzias et al., 1969; Hornykiewicz, 1973). La restauración de los niveles dopaminérgicos de la vía nigroestriatal, mediante el tratamiento con L-Dopa no cura, ni detiene la progresión de la enfermedad e incluso a la larga la empeoran, ya que se presentan complicaciones motoras graves en un porcentaje alto de los pacientes (80%), volviendo esta enfermedad aún más difícil de controlar.

Los agentes antiparkinsonianos que hasta la fecha se han empleado para la restauración del funcionamiento adecuado del NE, se pueden dividir de la siguiente manera:

1. Agentes que aumentan la síntesis de dopamina:

- L-DOPA: precursor natural de la dopamina, se puede utilizar junto con carbidopa (inhibidor de descarboxilasa de aminoácidos aromáticos).
- Amantadine: facilita la liberación de dopamina en terminales intactas.

2. Agentes que reducen el metabolismo de la dopamina:

- Selegiline: inhibe a la monoaminoxidasa B, evitando la degradación de la dopamina.

3. Agentes que activan los receptores dopaminérgicos:

- Bromocriptine: Agonista de receptores D2.
- Pergolide: Agonista de receptores D1 y D2.

4. Agentes anticolinérgicos.

Trihexyphenidyl: Antagonista de los receptores colinérgicos

Aunque estos agentes se han empleado con resultados más o menos alentadores, ninguno ha logrado tener mejores resultados que el tratamiento con L-DOPA. Esto se debe principalmente a que estas sustancias generalmente intervienen con los procesos metabólicos de otros neurotransmisores, no son sustancias muy específicas, ya que tienen más de un blanco donde ejercen su efecto y finalmente no se conocen los mecanismos de acción de algunos de estos agentes.

Por otro lado, dichos agentes han sido probados en células aisladas o en modelos *in vivo* de la Enfermedad de Parkinson, sin embargo aún se desconoce su efecto sobre la actividad global en la red neostriatal.

En estudios recientes se ha podido registrar la actividad de la red estriatal en rebanadas cortico-estriales de cerebro de rata *in vitro* (Carrillo-Reid et al., 2008). Con esta metodología es posible estudiar el correlato neuronal de los programas motores *in vitro*. *La aplicación de esta metodología en modelos de animales hemiparkinsonianos, nos permitirá estudiar y comparar la actividad de red del microcircuito neostriatal normal con la actividad de un circuito alterado en un modelo animal de la EP.*

Nosotros hemos podido implementar este modelo lesionando ratas jóvenes de 12-14 días de nacidas, y obteniendo rebanadas de cerebro cortico-estriales. Con el uso de epifluorescencia registramos la actividad en red espontánea del NE. Estos experimentos nos han permitido analizar la actividad del microcircuito estriatal en un modelo de la EP, mostrándonos la diferencia entre la actividad espontánea de la red estriatal en presencia y ausencia de dopamina *in vitro*.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Durante la Enfermedad de Parkinson los niveles dopaminérgicos disminuyen drásticamente en el NE (Foix y Nicolesco, 1925). Por lo tanto este neurotransmisor no lleva a cabo su función moduladora, lo cual genera un cambio de la actividad de red en este núcleo. Esto nos sugirió la siguiente pregunta: ¿Cómo se afecta la actividad global del núcleo estriado en ausencia de dopamina?

## **OBJETIVO**

Analizar con técnicas ópticas la actividad de la red neostriatal de rata, en un modelo de la Enfermedad de Parkinson.

## **HIPÓTESIS**

Se ha demostrado en modelos animales y pacientes de la EP que la denervación dopaminérgica del NE genera un incremento en la entrada sináptica a este núcleo y un cambio en la actividad del mismo (Galarraga et al. 1987; Tang et al. 2001; Day et al. 2006; Goldberg et al. 2004; Raz et al. 1996; Uhlhaas and Singer, 2006; Walters et al. 2007).

Por lo tanto, es posible que la actividad de la red neuronal estriatal que se observará en el animal hemiparkinsoniano esté aumentada con respecto a la encontrada en ratas normales, no lesionadas.

## METODOLOGÍA

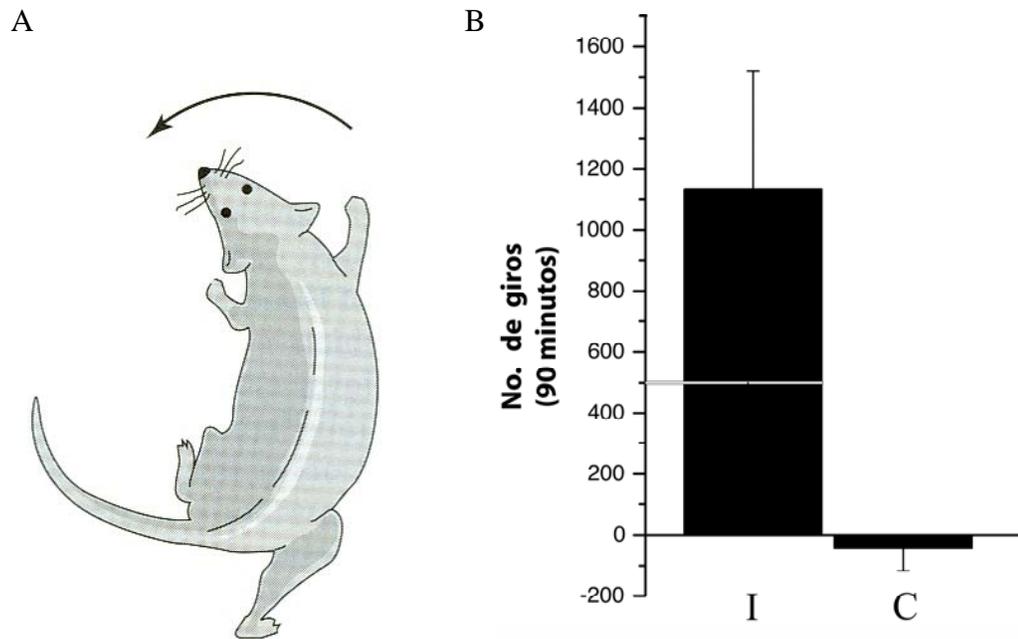
Lesión de la SNc en ratas jóvenes.

La ubicación de la SNc en el cerebro de la rata adulta (130 días de edad) está reportada en el atlas "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates" (Paxinos and Watson, 1998). Debido a que la técnica de imagenología de calcio mediante epifluorescencia es más eficiente mientras el animal sea más joven, se cambió la edad de las ratas por lo cual fue necesario adaptar las dimensiones proporcionadas por el atlas. Por lo tanto fue necesario localizar a la SNc en las ratas jóvenes por medio de la inyección de azul de metileno considerando distintas coordenadas. Mediante la introducción del azul de metileno, fue posible localizar mediante cortes coronales la estructura cerebral teñida. Las coordenadas típicamente empleadas en los animales adultos son: anteroposterior (AP): 5.4, lateral (L):2.4, ventral (V):7.5. Después de varias pruebas el ajuste de las coordenadas para las ratas jóvenes de 12-14 días de edad quedaron de la siguiente manera: AP: 3.9, L: 2, V:6.8.

Se utilizaron ratas albinas Wistar macho de 12-14 días de edad, mantenidas en condiciones de laboratorio. Se les inyectó 2µl de 6-hidroxydopamina (6-OHDA) (Sigma-Aldrich- RBI, St Louis, MO, USA; 4 µg/µl en 0.9% de NaCl, 0.5% C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>) en la SNc del hemisferio derecho, mediante técnicas estereotáxicas convencionales utilizando un adaptador para ratón y así poder montar a las ratas jóvenes. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas fueron las mencionadas anteriormente: AP:3.9, L:2, V:6.8.

Una semana después se evaluó el grado de la lesión con una prueba estandarizada de conducta de giro, administrando intraperitonealmente (IP) 4 mg/kg de anfetamina y contabilizando los giros con la ayuda de un rotómetro automatizado.

La administración de amfetamina induce la liberación de dopamina en las terminales dopaminérgicas de las células de la SNc, invirtiendo el transportador de DA. Por lo tanto, en una rata lesionada se han eliminado las terminales dopaminérgicas del NE en el hemisferio lesionado, esto trae como consecuencia que el aumento de la actividad dopaminérgica se presente en el lado intacto promoviendo la actividad motora, ocasionando en las ratas con una buena lesión, una conducta de giro ipsilateral a la lesión. Sólo fueron utilizados como modelos de la Enfermedad de Parkinson aquellos animales que superaron los 500 giros ipsilaterales al lado de la lesión y que presentaron pocos giros contralaterales en un lapso de 90 minutos (Figura 2). Estudios anteriores reportan que esa cantidad de giros corresponde a una muerte  $\geq 95\%$  de células dopaminérgicas de la SNc (Arias-Carrion et al. 2006; Dunnett et al, 1981; Ungerstedt and Arbuthnott, 1971).



**Figura 2.**  
Prueba de giro con amfetamina IP  
A: Esquema de una rata girando ipsilateralmente al lado de la lesión.  
B: Promedio del número de giros contabilizados durante las pruebas de conducta de los animales hemiparkinsonianos. I: giros ipsilaterales al hemisferio lesionado (eje y: números de giros positivos); C: contralaterales (eje y: números de giros negativos). La línea blanca indica el número mínimo de giros que una rata tiene que dar para sea considerada como modelo.

## Obtención de rebanadas de cerebro

Las ratas hemiparkinsonianas fueron utilizadas 3 días después de la evaluación conductual y también se utilizaron ratas sanas Wistar de 22-24 días de nacidas como controles. Las ratas fueron perfundidas con una solución salina que contiene en mM: 124 ColinaCl, 3.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub> y 11 glucosa (saturada con 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>; pH=7.4; 298 mOsm/L). El cerebro se sumergió en la misma solución con colina a 4°C para llevar a cabo los cortes. Con ayuda de un vibratomo (Vibratome Company), se obtuvieron rebanadas oblicuas de 200 micras de grosor, después éstas se transfirieron a una solución salina control, que en lugar de ColinaCl contiene 123 mM de NaCl, a temperatura ambiente (20-25°C) en donde permanecieron por lo menos una hora antes del registro de fluorescencia. Las concentraciones de sales de esta solución control favorecen la aparición de los estados activos (up-states) *in Vitro* necesarios para la generar la actividad de red (Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Vergara et al. 2003; Carrillo-Reid et al., 2008).

## Imagenología de calcio

Las rebanadas fueron incubadas en la oscuridad a 35°C durante 20-30 min inmersas dentro de la solución salina control en presencia de 10-20 µM acetoximetil de Fluo-4 (Fluo-4AM) (Tef Labs, Austin, TX) en 0.1% de dimetilsulfoxido, en una atmósfera saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, las rebanadas se mantuvieron con un flujo continuo de la solución salina control dentro de la cámara de registro, montada sobre la platina de un microscopio vertical de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Melville, Ny) equipado con un objetivo 10X de inmersión en agua (apertura numérica de: 0.3). La excitación del fluoróforo se hizo a 488 nm conectando el microscopio mediante una fibra óptica con un monocromador Polychrome V (TiLL Photonics). La adquisición de imágenes de fluorescencia se hizo a 510 nm con una cámara CCD (cooled digital camera) IMAGO-QE a 250-500 ms/imagen, 15 ms de

exposición por imagen. El software usado es TILLVISION (TiLL Photonics). Se realizaron películas cortas bajo diferentes condiciones experimentales (100-250 segundos de duración) con intervalos de 5-15 min durante aproximadamente una hora. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

### Análisis de imágenes

El procesamiento de las secuencias de imágenes se llevó a cabo con los programas Image J (v.1.36, National Institutes of Health), Multicell 2.0 y programas escritos en IDL (Cossart et al., 2003; Mao et al., 2001; Schwartz et al., 1998) o MATLAB (The Math-Works, Inc., Natick, MA).

Todas las neuronas activas fueron seleccionadas semi-automáticamente y la media de fluorescencia fue calculada en función del tiempo. El ruido generado por pixeles únicos fue descartado usando como filtro la media de 5 pixeles. Las señales de fluorescencia dependientes de calcio fueron computadas como  $(F_i - F_o)/F_o$  donde  $F_i$  es la intensidad de fluorescencia en cualquier cuadro (Frame) de la película y  $F_o$  es la fluorescencia basal (Fluorescencia promedio de los 4 primeros cuadros de la película).

Las señales de calcio generadas por los potenciales de acción neuronales son detectadas con base al valor umbral dado por la primera derivada de las señales de calcio (2.5 veces la desviación estándar por arriba del valor del ruido) (Carrillo-Reid et al., 2008). De esta forma obtuvimos una matriz binaria  $C \times F$ , donde  $C$  representa el número de neuronas activas y  $F$  el número de cuadros de cada película. Las espigas de actividad son señaladas por “unos” en esta matriz binaria, representando las transiciones a los estados despolarizados. Los registros fueron inspeccionados manualmente para eliminar artefactos y registros de células con cambios de calcio muy lentos, que se piensa podrían corresponder a las células gliales (Ikegaya et al. 2005; Sasaki et al. 2007).

## Análisis estadístico

Para determinar la existencia de correlaciones entre las espigas de calcio presentes en el registro de distintas células, se registró el número de activaciones simultáneas por experimento (considerando la presencia de espigas dentro de un rango de 3 cuadros). Para determinar el valor P de las espigas simultáneas que ocurren por casualidad, se calculó la distribución de la actividad bajo la hipótesis nula de las espigas independientes usando 1,000 interacciones en la simulación de Monte Carlo (Mao et al., 2001).

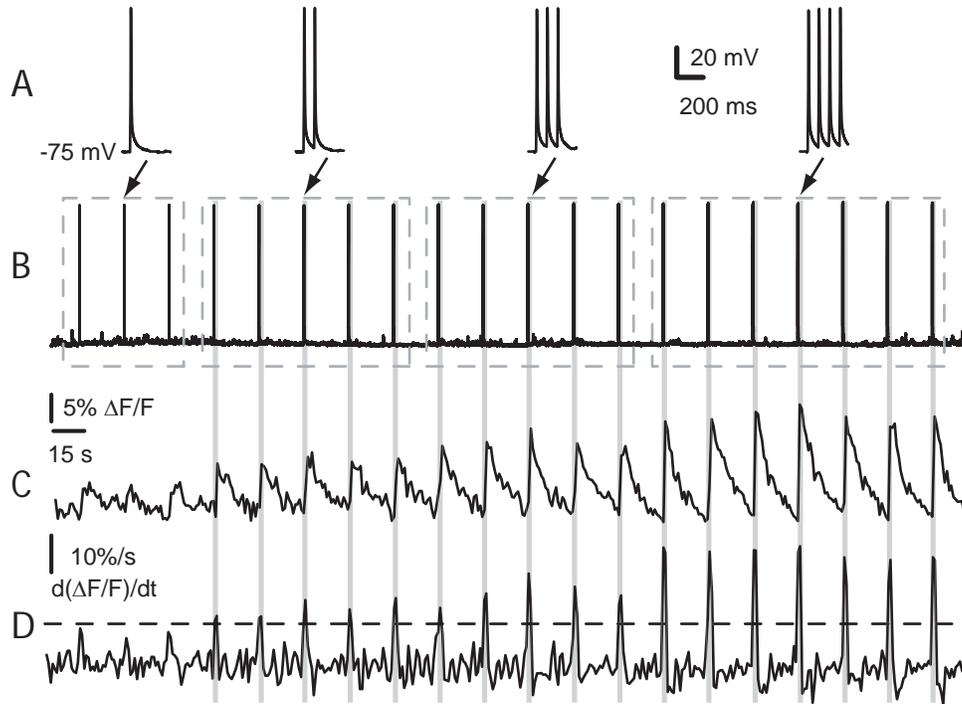
El grado de correlación entre las células activas fue calculado con el coeficiente de correlación Jaccard. De esta manera las células que se encuentran correlacionadas están unidas por líneas; el grosor de dichas líneas representa el grado de correlación. Aunque estos correlogramas nos brindan información importante, resulta complicado distinguir la magnitud de la correlación entre las células, ya que la mayoría de las líneas se encuentran sobrepuestas. Por lo tanto para mostrar de una manera más clara la magnitud de correlación entre las células fueron generados mapas en pseudocolor con base en los coeficientes de correlación Jaccard.

También fueron identificados en función del tiempo los grupos de células que se activaron simultáneamente. De esta forma a lo largo de un experimento es posible identificar los picos de actividad sincrónica (por ejemplo, aquellos que incluían a más células que las esperadas por casualidad), utilizando nuevamente la simulación Monte Carlo para validar la significancia de la sincronía. El umbral utilizado corresponde a una significancia de  $P < 0.05$ . El hecho de que existan periodos espontáneos de actividad sincrónica demuestra que se trata de una dinámica de red (Cossart et al., 2003, Carrillo-Reid et al., 2008).

## RESULTADOS

Como primer objetivo debimos de estandarizar el modelo de la lesión unilateral de la SNc en ratas jóvenes (12-14 días de edad). La estandarización de dicho modelo fue indispensable para el uso de técnicas de fluorescencia, ya que estas técnicas se encuentran limitadas por la edad de los animales (3-4 semanas como máximo) (Cossart et al., 2003).

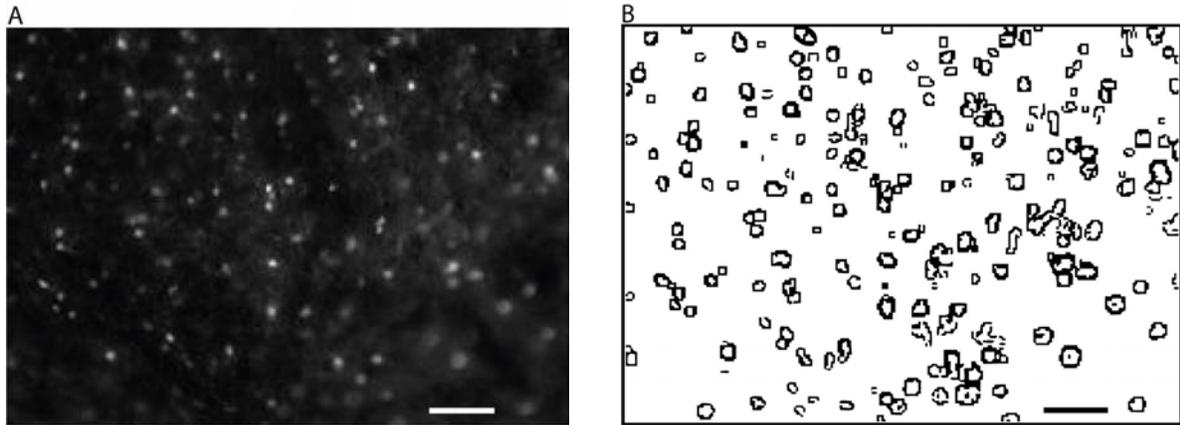
La actividad de red neocortical fue registrada gracias a la utilización de técnicas de microespectrofluorimetría de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha demostrado que los cambios de fluorescencia ( $\Delta F/F$ ) corresponden a los estados despolarizados de las neuronas debido a la generación de potenciales de acción que permiten la entrada de calcio a las neuronas por medio de los canales de calcio sensibles a voltaje; estos cambios tienen derivadas temporales ( $d(\Delta F/F)/dt$ ) que corresponden temporalmente con la duración de la ráfaga de los disparos (Kerr and Plenz, 2002; Cossart et al. 2003). En estudios anteriores, por medio del uso simultáneo de registros electrofisiológicos con epifluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en las NEMs, se ha mostrado que es necesario que se produzcan ráfagas de dos o más potenciales de acción para que los cambios en la fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  sean detectables (Carrillo-Reid et al., 2008) (ver Figura 3.).



**Figura 3.**

Número de potenciales de acción necesarios para producir transitorios de calcio detectables. A: Ejemplo de potenciales de acción generados por breves comandos intracelulares de corriente en una neurona espinosa mediana. Las flechas señalan los mismos registros mostrados en una escala de tiempo más lenta. B: Los potenciales de acción fueron provocados repetitivamente en series sucesivas (delimitadas por las líneas punteadas) desde uno hasta cuatro potenciales de acción. C: Registro simultáneo de transitorios de calcio acompañados por sus correspondientes potenciales de acción. D: Primera derivada de las señales de calcio mostradas en C. El umbral de detección (línea punteada) representa el valor de 2.5 veces la desviación estándar del ruido basal. El umbral es superado cuando se generan dos o más potenciales de acción (Carrillo-Reid et al., 2008).

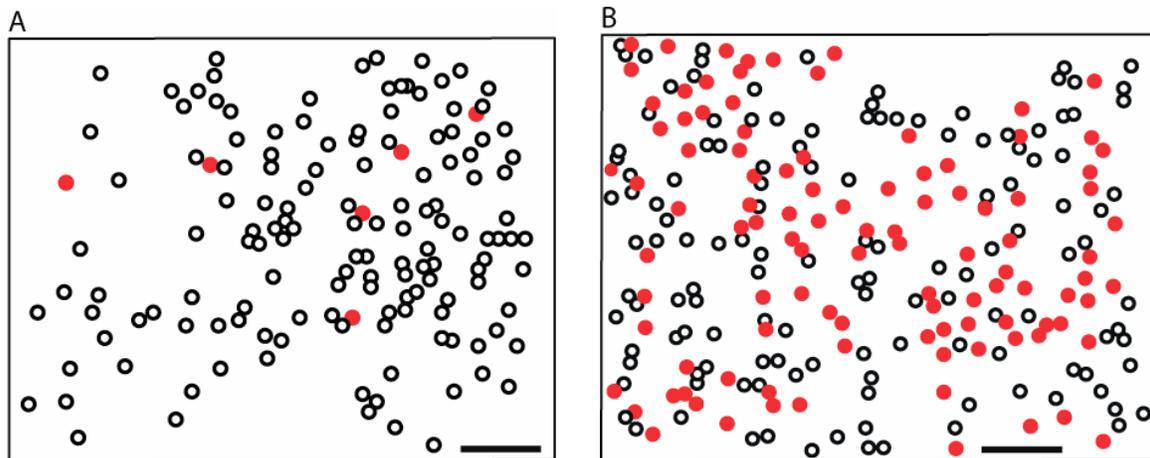
Las imágenes obtenidas con esta técnica nos permitieron registrar la actividad eléctrica de decenas de células simultáneamente con una resolución de célula única. Esta actividad eléctrica fue medida indirectamente, como cambios de fluorescencia. Secciones del estriado dorsal fueron examinadas en rebanadas cortico-estriatales cargadas con el indicador de calcio fluo-4 AM. El número total de neuronas cargadas con este fluoróforo dentro del campo de registro fue determinado al final de cada experimento mediante la aplicación en el flujo de una solución salina conteniendo 50 mM de KCl durante 5 segundos (Figura 4A). Los contornos de las células espontáneamente activas así como las silentes se muestran en la figura 4B (círculos vacíos). Se examinaron únicamente las neuronas que estuvieron activas durante el experimento, de cada secuencia de imágenes se obtuvo la proporción de células activas/inactivas.



**Figura 4.** Selección de neuronas cargadas con fluo 4-AM.

a) Neuronas de una rebanada corticoestriatal cargadas con fluo 4-AM. Respuesta a la aplicación de 50mM de KCl. b) Selección de los contornos de las neuronas que presentaron actividad durante el experimento. Escala 100 micras.

En los registros de estriado una rata normal, no tratada, observamos, como ya se había reportado antes (Carrillo-Reid et al., 2008), una baja actividad neuronal (Figura 5<sup>a</sup> n=10 rebanadas), confirmando que la red neostriatal en condiciones control se mantiene bastante “silenciosa”. En contraste encontramos que bajo las mismas condiciones de registro las rebanadas de los animales hemiparkinsonianos presentan una actividad neuronal incrementada (círculos llenos Figura 5B n=16 rebanadas).



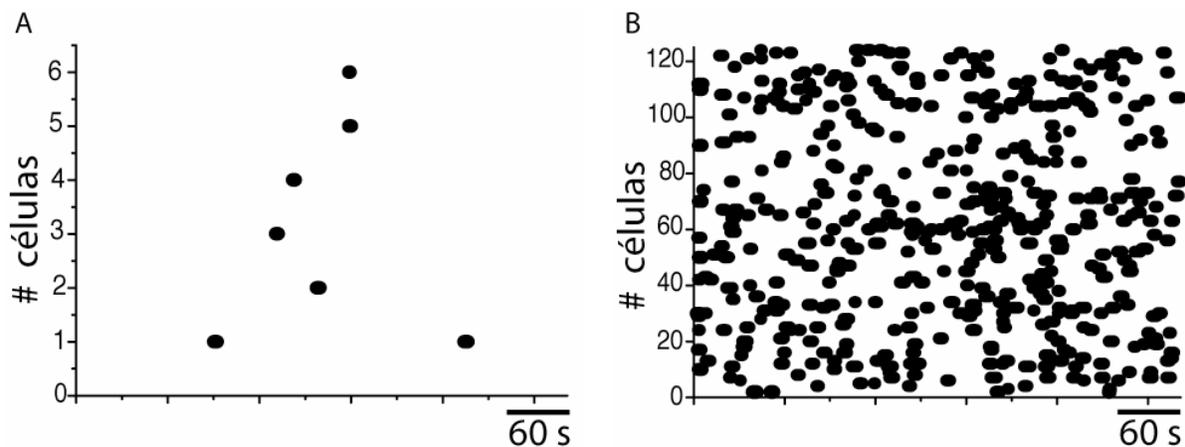
**Figura 5.** Actividad espontánea de la red estriatal.

a) Neuronas activas en el NE de una rata normal durante un registro (círculos rojos), los círculos corresponden a células inactivas durante el experimento.

b) Neuronas activas en el NE de una rata hemiparkinsoniana durante un registro (círculos rojos), los círculos vacíos corresponden a células inactivas.

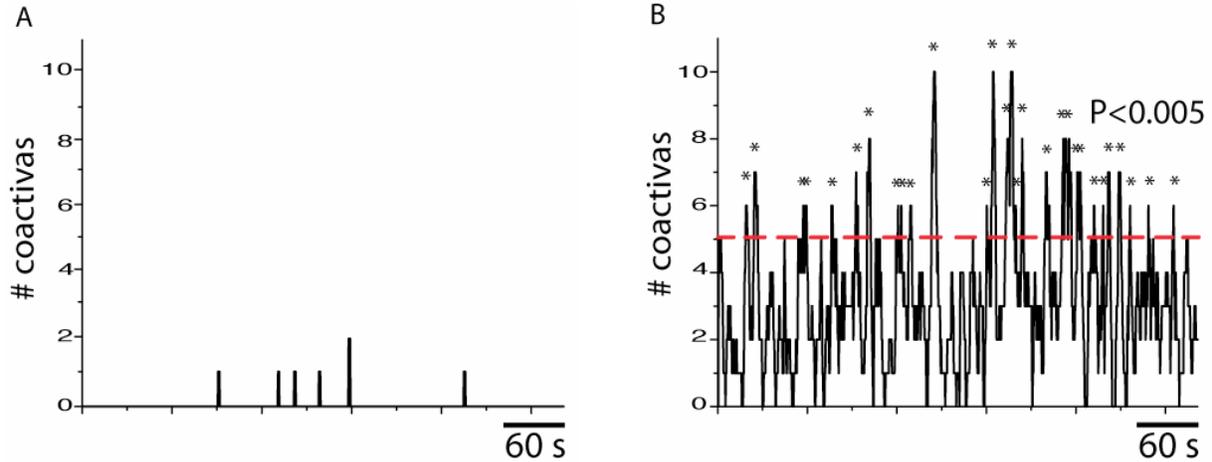
Escala: 100 micras.

En cada condición se le dio seguimiento a las células activas en, registrando los cambios de fluorescencia a lo largo del tiempo y graficándolos como “raster plots”. En estas gráficas cada renglón corresponde a una célula activa y cada columna corresponde a un cuadro. Los raster plots nos muestran claramente la cantidad de células involucradas en la actividad de red además del comportamiento que presenta cada célula a lo largo del registro. Interesantemente, los registros en animales hemiparkinsonianos muestran más células activas y más correlacionadas; en contraste con los animales control, que presentan pocas células activas, las cuales frecuentemente están desincronizadas (Figura 6).



**Figura 6.** Raster plots muestran la actividad neuronal neocortical espontánea en rebanadas corticoestriatales de un animal sano (A) y uno hemiparkinsoniano (B). Cada renglón representa una neurona activa diferente, las columnas representan cada una de los cuadros del registro (segundos). Cada punto representa una ráfaga de potenciales de acción en las neuronas individuales.

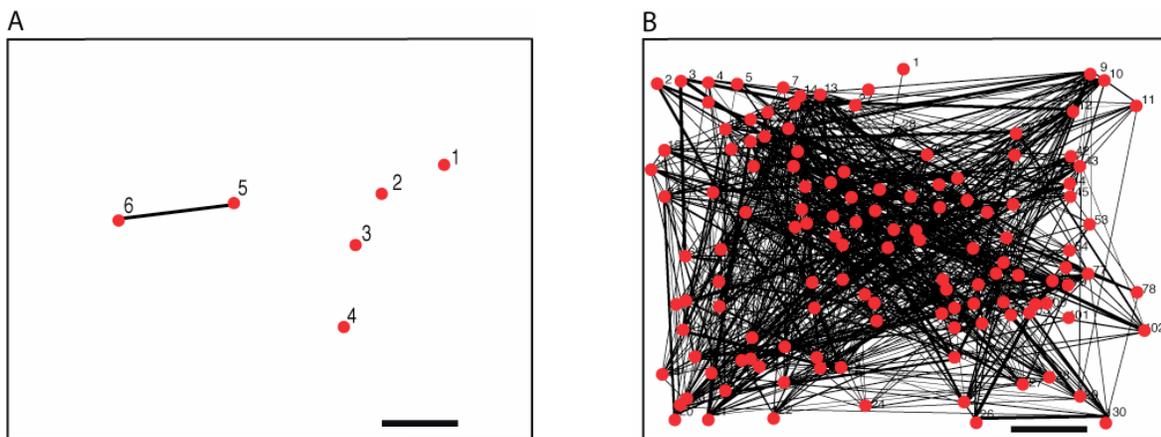
Los histogramas temporales generados a partir de los raster plots, muestran la actividad global de las células con respecto al tiempo. Cuando el disparo de diferentes neuronas está sincronizado, es posible observar picos de sincronía en el histograma de la actividad global. Sorprendentemente encontramos picos de correlación y sincronización de distintos grupos neuronales en todos los registros de los animales hemiparkinsonianos (umbral= $P < 0.005$ ) (Figura 7b), no siendo éste el caso en los animales normales (Figura 7a.).



**Figura 7.** Histogramas temporales de la actividad neuronal de toda la rebanada estriatal a lo largo de un registro.

Los picos son la representación de conjuntos de células que dispararon sincrónicamente a lo largo del experimento, cada pico de sincronización significativamente no azarosa está señalado con un asterisco.

Otra de las cosas que podemos observar es que las numerosas neuronas que disparan sincrónicamente pueden estar separadas cientos de micras entre sí y contener células no activas interpuestas (Figura 5b, círculos rellenos). Los mapas de correlación espacial (Figura 8.) muestran a los pares de neuronas que tienen una actividad correlacionada estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) (el grosor de la línea es proporcional al grado de correlación).

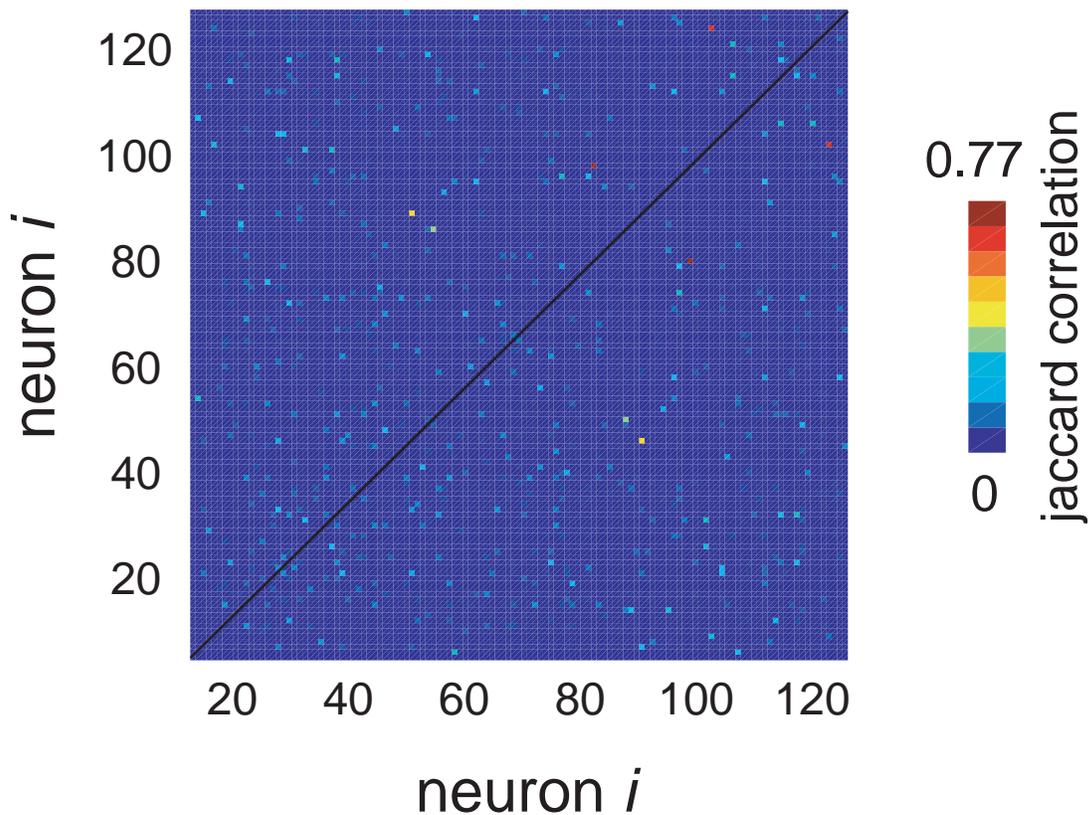


**Figura 8.** Mapas de correlación espaciotemporales de la actividad espontánea en una rebanada control (A) y una hemiparkinsoniana (B).

Cada punto representa una neurona dentro del campo de registro, las líneas unen a las neuronas que tienen un disparo correlacionado ( $P < 0.05$ ). El grosor de las líneas representa el grado de correlación que existe entre las células.

Escala 100 micras.

Cerca del 90% de las neuronas activas en los registros de los animales hemiparkinsonianos muestran correlación con otra(s) en algún momento dado (Figura 8b). La mayoría de las células que presentan esta correlación son las que están involucradas dentro de los picos de sincronización. Las gráficas de correlación de esta actividad (Figura 9) demuestran que el grado de sincronización de las neuronas activas es heterogéneo, demostrando que la actividad generada durante la denervación dopaminérgica no es generada por la correlación entre pares de neuronas, sino por una dinámica espacio-temporal de muchas células. Nótese que esta dinámica no se presenta en el animal normal.



**Figura 9.** Mapa de correlación con todos los pares posibles de neuronas, nótese como se presenta una distribución heterogénea de los coeficientes de correlación. (Para una mejor visualización la correlación entre las mismas células fue removida del mapa; línea negra.)

En resumen, la actividad espontánea de las neuronas de los animales hemiparkinsonianos se encuentra incrementada significativamente en comparación con la encontrada en los animales normales. Dicha actividad se encuentra correlacionada, mostrando picos de sincronización frecuentes. En contraste la poca actividad neuronal de la red estriatal de los animales control presenta una escasa correlación entre pares de neuronas y no muestra picos de sincronización.

## METODOLOGÍA

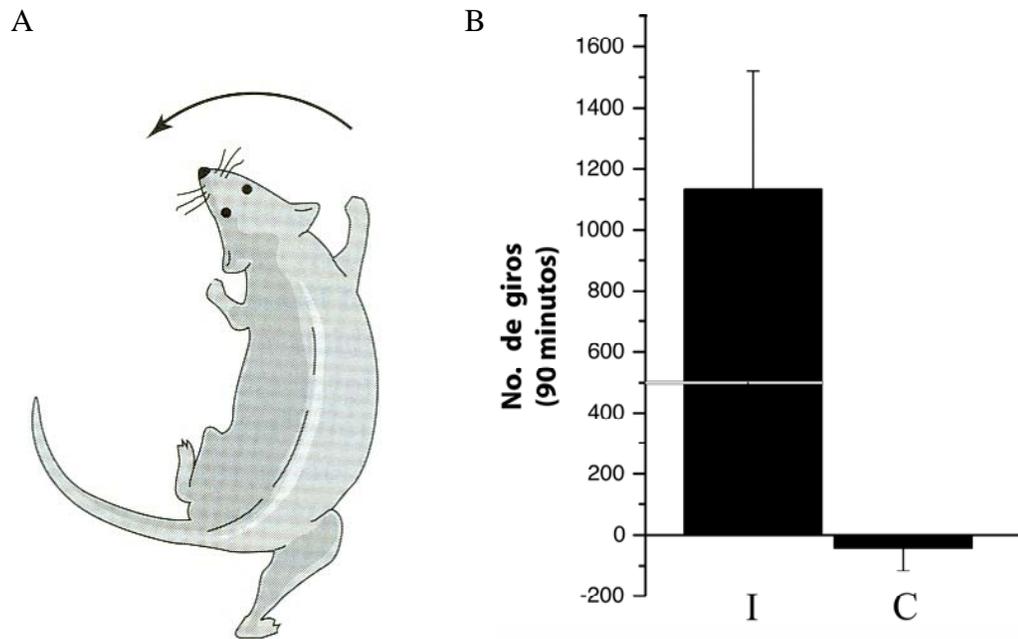
Lesión de la SNc en ratas jóvenes.

La ubicación de la SNc en el cerebro de la rata adulta (130 días de edad) está reportada en el atlas "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates" (Paxinos and Watson, 1998). Debido a que la técnica de imagenología de calcio mediante epifluorescencia es más eficiente mientras el animal sea más joven, se cambió la edad de las ratas por lo cual fue necesario adaptar las dimensiones proporcionadas por el atlas. Por lo tanto fue necesario localizar a la SNc en las ratas jóvenes por medio de la inyección de azul de metileno considerando distintas coordenadas. Mediante la introducción del azul de metileno, fue posible localizar mediante cortes coronales la estructura cerebral teñida. Las coordenadas típicamente empleadas en los animales adultos son: anteroposterior (AP): 5.4, lateral (L):2.4, ventral (V):7.5. Después de varias pruebas el ajuste de las coordenadas para las ratas jóvenes de 12-14 días de edad quedaron de la siguiente manera: AP: 3.9, L: 2, V:6.8.

Se utilizaron ratas albinas Wistar macho de 12-14 días de edad, mantenidas en condiciones de laboratorio. Se les inyectó 2µl de 6-hidroxydopamina (6-OHDA) (Sigma-Aldrich- RBI, St Louis, MO, USA; 4 µg/µl en 0.9% de NaCl, 0.5% C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>) en la SNc del hemisferio derecho, mediante técnicas estereotáxicas convencionales utilizando un adaptador para ratón y así poder montar a las ratas jóvenes. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas fueron las mencionadas anteriormente: AP:3.9, L:2, V:6.8.

Una semana después se evaluó el grado de la lesión con una prueba estandarizada de conducta de giro, administrando intraperitonealmente (IP) 4 mg/kg de anfetamina y contabilizando los giros con la ayuda de un rotómetro automatizado.

La administración de amfetamina induce la liberación de dopamina en las terminales dopaminérgicas de las células de la SNc, invirtiendo el transportador de DA. Por lo tanto, en una rata lesionada se han eliminado las terminales dopaminérgicas del NE en el hemisferio lesionado, esto trae como consecuencia que el aumento de la actividad dopaminérgica se presente en el lado intacto promoviendo la actividad motora, ocasionando en las ratas con una buena lesión, una conducta de giro ipsilateral a la lesión. Sólo fueron utilizados como modelos de la Enfermedad de Parkinson aquellos animales que superaron los 500 giros ipsilaterales al lado de la lesión y que presentaron pocos giros contralaterales en un lapso de 90 minutos (Figura 2). Estudios anteriores reportan que esa cantidad de giros corresponde a una muerte  $\geq 95\%$  de células dopaminérgicas de la SNc (Arias-Carrion et al. 2006; Dunnett et al, 1981; Ungerstedt and Arbuthnott, 1971).



**Figura 2.**  
 Prueba de giro con amfetamina IP  
 A: Esquema de una rata girando ipsilateralmente al lado de la lesión.  
 B: Promedio del número de giros contabilizados durante las pruebas de conducta de los animales hemiparkinsonianos. I: giros ipsilaterales al hemisferio lesionado (eje y: números de giros positivos); C: contralaterales (eje y: números de giros negativos). La línea blanca indica el número mínimo de giros que una rata tiene que dar para sea considerada como modelo.

## Obtención de rebanadas de cerebro

Las ratas hemiparkinsonianas fueron utilizadas 3 días después de la evaluación conductual y también se utilizaron ratas sanas Wistar de 22-24 días de nacidas como controles. Las ratas fueron perfundidas con una solución salina que contiene en mM: 124 ColinaCl, 3.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub> y 11 glucosa (saturada con 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>; pH=7.4; 298 mOsm/L). El cerebro se sumergió en la misma solución con colina a 4°C para llevar a cabo los cortes. Con ayuda de un vibratomo (Vibratome Company), se obtuvieron rebanadas oblicuas de 200 micras de grosor, después éstas se transfirieron a una solución salina control, que en lugar de ColinaCl contiene 123 mM de NaCl, a temperatura ambiente (20-25°C) en donde permanecieron por lo menos una hora antes del registro de fluorescencia. Las concentraciones de sales de esta solución control favorecen la aparición de los estados activos (up-states) *in Vitro* necesarios para la generar la actividad de red (Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Vergara et al. 2003; Carrillo-Reid et al., 2008).

## Imagenología de calcio

Las rebanadas fueron incubadas en la oscuridad a 35°C durante 20-30 min inmersas dentro de la solución salina control en presencia de 10-20 µM acetoximetil de Fluo-4 (Fluo-4AM) (Tef Labs, Austin, TX) en 0.1% de dimetilsulfoxido, en una atmósfera saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, las rebanadas se mantuvieron con un flujo continuo de la solución salina control dentro de la cámara de registro, montada sobre la platina de un microscopio vertical de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Melville, Ny) equipado con un objetivo 10X de inmersión en agua (apertura numérica de: 0.3). La excitación del fluoróforo se hizo a 488 nm conectando el microscopio mediante una fibra óptica con un monocromador Polychrome V (TiLL Photonics). La adquisición de imágenes de fluorescencia se hizo a 510 nm con una cámara CCD (cooled digital camera) IMAGO-QE a 250-500 ms/imagen, 15 ms de

exposición por imagen. El software usado es TILLVISION (TiLL Photonics). Se realizaron películas cortas bajo diferentes condiciones experimentales (100-250 segundos de duración) con intervalos de 5-15 min durante aproximadamente una hora. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

### Análisis de imágenes

El procesamiento de las secuencias de imágenes se llevó a cabo con los programas Image J (v.1.36, National Institutes of Health), Multicell 2.0 y programas escritos en IDL (Cossart et al., 2003; Mao et al., 2001; Schwartz et al., 1998) o MATLAB (The Math-Works, Inc., Natick, MA).

Todas las neuronas activas fueron seleccionadas semi-automáticamente y la media de fluorescencia fue calculada en función del tiempo. El ruido generado por pixeles únicos fue descartado usando como filtro la media de 5 pixeles. Las señales de fluorescencia dependientes de calcio fueron computadas como  $(F_i - F_o)/F_o$  donde  $F_i$  es la intensidad de fluorescencia en cualquier cuadro (Frame) de la película y  $F_o$  es la fluorescencia basal (Fluorescencia promedio de los 4 primeros cuadros de la película).

Las señales de calcio generadas por los potenciales de acción neuronales son detectadas con base al valor umbral dado por la primera derivada de las señales de calcio (2.5 veces la desviación estándar por arriba del valor del ruido) (Carrillo-Reid et al., 2008). De esta forma obtuvimos una matriz binaria  $C \times F$ , donde  $C$  representa el número de neuronas activas y  $F$  el número de cuadros de cada película. Las espigas de actividad son señaladas por “unos” en esta matriz binaria, representando las transiciones a los estados despolarizados. Los registros fueron inspeccionados manualmente para eliminar artefactos y registros de células con cambios de calcio muy lentos, que se piensa podrían corresponder a las células gliales (Ikegaya et al. 2005; Sasaki et al. 2007).

## Análisis estadístico

Para determinar la existencia de correlaciones entre las espigas de calcio presentes en el registro de distintas células, se registró el número de activaciones simultáneas por experimento (considerando la presencia de espigas dentro de un rango de 3 cuadros). Para determinar el valor P de las espigas simultáneas que ocurren por casualidad, se calculó la distribución de la actividad bajo la hipótesis nula de las espigas independientes usando 1,000 interacciones en la simulación de Monte Carlo (Mao et al., 2001).

El grado de correlación entre las células activas fue calculado con el coeficiente de correlación Jaccard. De esta manera las células que se encuentran correlacionadas están unidas por líneas; el grosor de dichas líneas representa el grado de correlación. Aunque estos correlogramas nos brindan información importante, resulta complicado distinguir la magnitud de la correlación entre las células, ya que la mayoría de las líneas se encuentran sobrepuestas. Por lo tanto para mostrar de una manera más clara la magnitud de correlación entre las células fueron generados mapas en pseudocolor con base en los coeficientes de correlación Jaccard.

También fueron identificados en función del tiempo los grupos de células que se activaron simultáneamente. De esta forma a lo largo de un experimento es posible identificar los picos de actividad sincrónica (por ejemplo, aquellos que incluían a más células que las esperadas por casualidad), utilizando nuevamente la simulación Monte Carlo para validar la significancia de la sincronía. El umbral utilizado corresponde a una significancia de  $P < 0.05$ . El hecho de que existan periodos espontáneos de actividad sincrónica demuestra que se trata de una dinámica de red (Cossart et al., 2003, Carrillo-Reid et al., 2008).

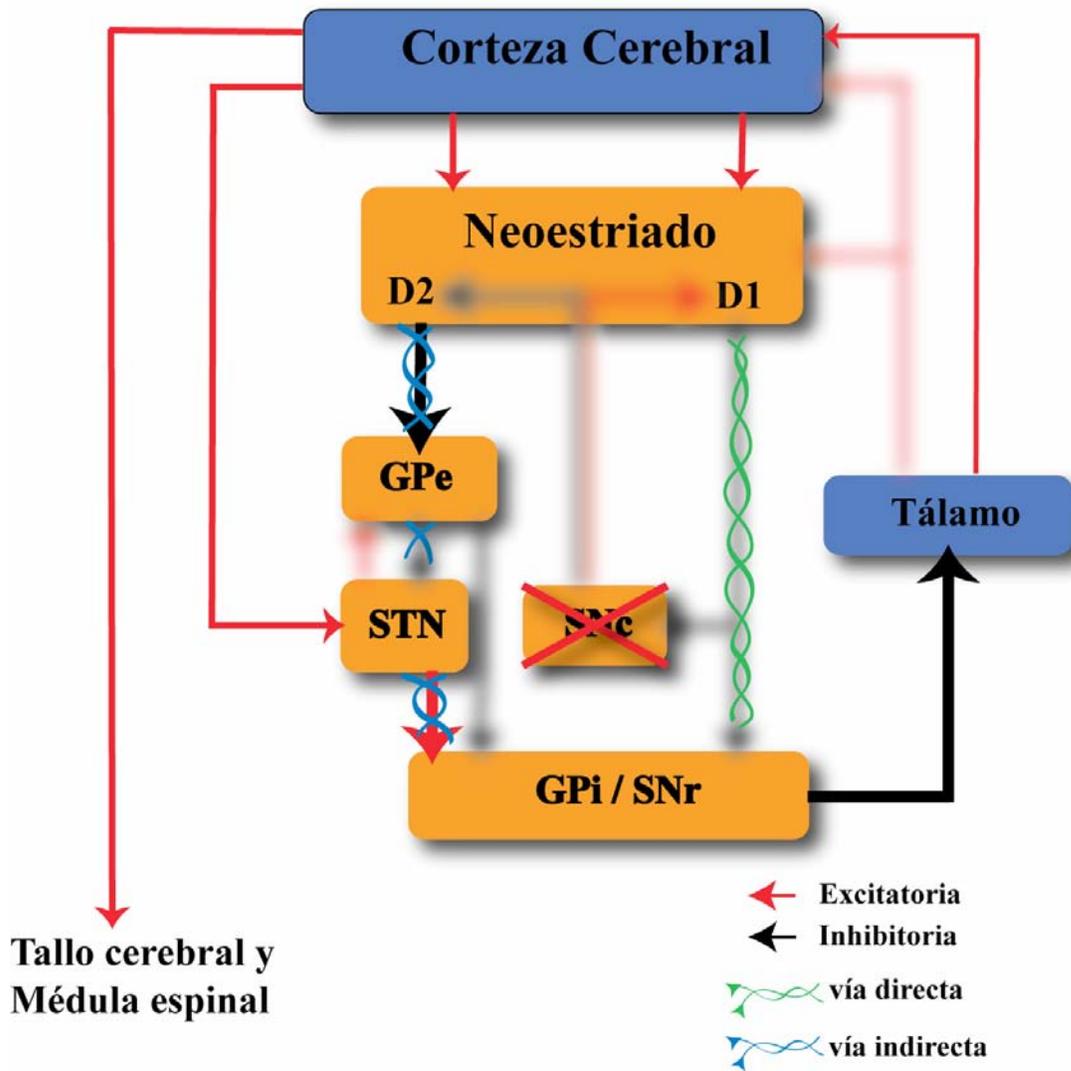
## DISCUSIÓN

El desarrollo de esta preparación *in vitro*, nos abre muchas posibilidades en la investigación de la fisiología y fisiopatía del estriado ya que el incremento y cambio de patrones de actividad dentro del NE durante la depleción dopaminérgica descrito tanto *in vitro* como *in vivo* (Galárraga et al., 1987; Tang et al., 2001; Day et al., 2006; Goldberg et al., 2004; Raz et al., 1996; Uhlhaas and Singer, 2006; Walters et al., 2007) es claramente reproducible a nivel de microcircuito, haciendo de esta preparación una excelente herramienta para el análisis objetivo de los posibles tratamientos de la EP. Además gracias al uso de esta técnica por primera vez se puede llenar el espacio vacío existente entre la bioquímica y la conducta, correlacionando las pruebas de comportamiento (por ejemplo, conducta de giro) con cambios bioquímicos y electrofisiología celular, generando la oportunidad de probar nuevas hipótesis y correlaciones de comportamiento a nivel de microcircuito.

La sincronía entre diferentes neuronas es un fenómeno que se ha observado de manera fisiológica durante la ejecución de distintas conductas motoras voluntarias como caminar, correr, escribir, nadar, etc. (Gordon y Whelan, 2006; Kiehn, 2006; Schnitzler y Gross, 2005). En sujetos sanos se observa que las conductas se pueden iniciar, detener y cambiar de una conducta a otra de forma continua y simple. De una forma similar la sincronía celular inicia, se detiene y cambia reclutando distintos grupos neuronales dentro del NE en presencia de estímulos que se saben están relacionados con el movimiento (Carrillo-Reid et al., 2008, Ossowska y Wolfarth, 1995). Nuestros resultados pueden ser útiles para entender por qué las personas con EP presentan una incapacidad de realizar estas tareas motoras simples. Nuestros métodos muestran que en ausencia de cualquier estímulo, las neuronas del NE parecen estar atrapadas en un estado sincrónico general constante. Es posible que esta actividad anormal le impida al NE de llevar a cabo su función de “filtro”.

Se ha demostrado que en condiciones patológicas, el circuito GP-NST-SNr presenta actividad oscilatoria en ráfagas a una frecuencia de 10 – 25 Hz (Bergman et al., 1994; Bevan et al., 2002; Plenz y Kitai, 1999). La sincronización observada en nuestros registros de animales denervados coincide con el modelo oscilatorio de la fisiopatología de la EP donde se postula que durante la sincronización celular exagerada, recluta un gran número de neuronas en esta actividad oscilatoria no dejando neuronas disponibles para poder participar en el control de los movimientos voluntarios (Bevan et al., 2002; Bergman et al., 1994; Galarraga et al 1987; Hutchison et al., 2004; Kreiss et al., 1996; Levy et al., 2000; Magill et al., 2001; Salamone et al., 1998; Tang et al., 2001).

Por otro lado, el modelo de la “tasa de disparo” (Albin et al., 1989; Mink, 1996; Smith et al., 1998), postula que los síntomas de la EP resultan de un desequilibrio entre las vías directa e indirecta que proyectan hacia los núcleos de salida (SNr/GPi), disminuyendo la actividad de las neuronas de la vía directa y aumentando en las neuronas de la vía indirecta provocando, gracias a la inhibición del GPe, que la conexión NST-SNr se refuerce, inhibiendo el circuito tálamo-cortical (Figura 10). Tomando en cuenta este modelo, podríamos suponer que las neuronas que presentan una hiperactividad en nuestros experimentos pertenecen a las NEMs de la vía indirecta y por lo tanto se presentan acinesias en los animales hemiparkinsonianos debido a la sobreexcitación de los núcleos de salida. Esta hipótesis puede ponerse a prueba utilizando animales knock-in los cuales coexpresan proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) con algún receptor dopaminérgico específico aunado a esta preparación implementada en esta tesis.



**Figura 10.** Diagrama simplificado de los GB (recuadros naranjas) durante la Enfermedad de Parkinson (Muerte neuronal de la SNc). Las líneas difuminadas representan una pérdida de la sinapsis mientras que las líneas engrosadas representan un aumento.

## CONCLUSIONES

- El uso de fluorescencia de calcio en rebanadas corticoestriatales de animales hemiparkinsonianos, es una preparación potencialmente muy útil para el estudio de los cambios de actividad en la red neoestriatal durante la EP.
- Demostramos que la ausencia de Dopamina en el NE genera un aumento en la actividad espontánea de la red estriatal.
- Dicha actividad se acompaña de una sincronía espacio-temporal que involucra a la mayoría de las células activas en algún momento dado.

## **PERSPECTIVAS**

El desarrollo de esta metodología nos ofrece la oportunidad de probar una gran cantidad de hipótesis, que surgen de preguntas simples como ¿Qué es lo que genera esta actividad anormal?, ¿Realmente son las NEMs de la vía indirecta las responsables de esta actividad sincrónica?, ¿Cómo se ve modificada la actividad de las interneuronas?, ¿Qué efecto tienen los agentes antiparkinsonianos en la red estriatal? , etc.

Gracias al desarrollo de esta nueva preparación, se abre una nueva herramienta para estudiar la red estriatal, siendo estos resultados sólo un punto de partida para poder entender mejor que sucede con la actividad de circuito en los GB durante enfermedades neurodegenerativas.

## REFERENCIAS

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TINS* 12:366-375.
- Alexander GE (1995) Basal-ganglia: *in handbook of Brain theory and Neural Networks*: (Arbib. M. A; Ed): Pp 139-144: The. MIT. Press; Cambridge. MA.
- Arias-Carrión O., Hernández-López S., Ibañez-Sandoval O., Bargas J., Hernández-Cruz A., Drucker-Colín R. (2006) Neuronal precursors within the adult rat subventricular zone differentiate into dopaminergic neurons after substantia nigra lesion and chromaffin cell transplant. *J. Neuroscience Research* 84(7):1425-37.
- Beiser DG, Houk JC (1998) Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events. *J. Neurophysiol.* 79, 3168-3188.
- Bennett BD, Bolam JP (1993) Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat. *Brain Res* 609:137-148.
- Bennett BD. y Wilson CJ. (2000). Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* 20(22):8493-503.
- Berke JD, Okatan M, Skurski J, Eichenbaum HB (2004) Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron* 43:883-896.
- Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B. and DELong, M. R. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72 (1994) 507-520.
- Bevan, M. D., Bolam, J. P. and Crossman, A. R. Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 6 (1994a) 320-334.
- Bevan MD, Francis CM, Bolam JP (1995) The glutamate-enriched cortical and thalamic input to neurons in the subthalamic nucleus of the rat: convergence with GABA-positive terminals. *J. Com. Neurol.* 361:491-511.
- Bevan MD, Booth PAC, Eaton SA, Bolam JP (1998) Selective Innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *Journal of Neuroscience* 18,22:9438-9452.
- Bolam JP, Smith Y (1995) Microcircuitry of the neostriatum. In: *Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function* (Ariano MA, Surmeier DJ, eds), pp1-20. Austin: Landes.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernandez-Cruz A, Galarraga E, Druker-Colin R, Bargas J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* (Epub ahead of print).

- Cepeda C, Levine MS (1998) Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci* 20:1-18.
- Cossart, R., Aronov, D., and Yuste, R. (2003). Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423, 283-288.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS. and Gellene R. (1969) Modification of parkinsonism-chronic treatment with L-DOPA. *New Engl. J. Med.* 280:337-345.
- Czubayko U, Plenz D (2002) Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15764-15769.
- Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9: 251-259.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *TINS* 13:281-285.
- DiFiglia M, Pasik P, Pasik T (1976) A Golgi study of neural types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 224:245 - 256.
- Divac I, Fonnum F, Storm-Mathisen J (1977) High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature* 266:377-378.
- Dunnett SB., Bjorklund A., Stenevi U., Iversen S.D. (1981) Grafts of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairments and akinesia in rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Research* 229(1):209-17.
- Ehringer, H. & O. Hornykiewicz. 1960. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen der extrapyramidalen Systems. *Klin. Wochenschr.* **38**: 1236–1239
- Fahn, S. & S. Przedborski. 2000. Parkinsonism. *In Merritt's Neurology*, 10th edit. L.P. Rowland, Ed.: 679–693. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Foix, C. & I. Nicolesco. 1925. Anatomie Cerebrale; Les Noyeux Gris Centraux et la Region Mesencephalo-Sous-Optique, Suive d'un Appendice sur l'Anatomie Pathologique de la Maladie de Parkinson. Masson et Cie. Paris.
- Galarraga E, Bargas J, Martínez-Fong D, Aceves J. (1987) Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neurosci Letts* 81: 351-355.
- Gerfen CR, Young WS (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both paxth and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460:161-167

- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Godukhin OV, Zharikova AD, Novoselov VI (1980) The release of labeled Lglutamic acid from rat neostriatum in vivo following stimulation of frontal cortex. *Neuroscience* 5:2151-2154.
- Goldberg JA, Rokni U, Boraud T, Vaadia E, Bergman H (2004) Spike synchronization in the cortex-basal ganglia networks of parkinsonian primates reflects global dynamics of the local field potentials. *J Neurosci* 24: 6003–6010.
- Gonon F (1997) Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *J Neurosci.* 17:5972-5978.
- Gordon, I. T. and Whelan, P. J. Deciphering the organization and modulation of spinal locomotor central pattern generators. *J Exp Biol* 209 (2006) 2007-2014.
- Grillner, S. (2006). Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52, 751-766.
- Greenamyre J.T., Hastings T.G. Parkinson's—divergent causes, convergent mechanisms. *Science* 2004; **304**: 1120–22.
- Hammond C, Deniau JM, Rizk A, Féger J (1978) Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat. *Brain Res.* 151:235-244.
- Hartmann-von Monakow K, Akert K, Künzle H (1978) Projections of the precentral motor cortex and other cortical areas of the frontal lobe to the subthalamic nucleus in the monkey. *Expl Brain Res.* 33:395-403
- Hassler R, Haug P, Nitsch C, Kim JS, Paik K (1982) Effect of motor and premotor cortex ablation on concentrations of amino acids, monoamines, and acetylcholine and on the ultrastructure in rat striatum. A confirmation of glutamate as the specific cortico-striatal transmitter. *J Neurochem* 38:1087-1098.
- Hernández-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurones by modulating an L-Type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J Neurosci.* 17:3334-3342
- Hernández-Lopez S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability through a novel PLCβ1IP3/calceineurin signaling cascade. *J Neurosci.* 15;20(24):8987-95.
- Hornykiewicz O (1973) Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA). *Br Med Bull* 29:172-178.

- Hutchison, W. D., Dostrovsky, J. O., Walters, J. R., Courtemanche, R., Boraud, T., Goldberg, J. and Brown, P. Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci* 24 (2004) 9240-9243. Review
- Ikegaya, Y., Le Bon-Jego, M., and Yuste, R. (2005). Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci Res* 52:132-138, 2005.
- Izzo PN, Graybiel AM, Bolam JP (1987) Characterization of substance p- and [met]enkephalin-immunoreactive neurons in the caudate nucleus of cat and ferret by a single section golgi procedure. *Neuroscience* 20,2:577-587.
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *Journal of Neuroscience* 13,11:4908-4923.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.
- Kerr, J.N., and Plenz, D. (2002). Dendritic calcium encodes striatal neuron output during up-states. *J. Neurosci.* 22,1499-1512.
- Kita H, Kosaka T, Heizmann CW (1990) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 536:1-15
- Kita H (1993) GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99:51-72.
- Kita H, Kita T (2001) Number, origins, and chemical types of rat pallidostriatal projection neurons. *J Comp Neurol* 437:438-448.
- Kitai ST, Deniau JM (1981) Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis. *Brain Res.* 214:411-415.
- Kiyatkin EA, Rebec GV (1996) Dopaminergic modulation of glutamate-induced excitations of neurons in the neostriatum and nucleus accumbens of awake, unrestrained rats. *J Neurophysiol* 75:142-153.
- Koós T, Tepper JM (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2:467-472.
- Koós T. and Tepper JM. (2002) Dual Cholinergic control of Fast-Spiking interneurons in the neostriatum. *The Journal of Neuroscience* 22,2:529-535.
- Kreiss, D. S., Anderson, L. A. and Walters, J. R. Apomorphine and dopamine D1 receptor agonists increase the firing rates of subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience* 72 (1996) 863-876.

- Künzle H (1978) An autoradiographic analysis of the efferent connections from premotor and adjacent prefrontal regions (areas 6 and 9) in *Macaca fascicularis*. *Brain Behav Evol.* 15:185-234.
- Levy, R., Hutchison, W. D., Lozano, A. M. and Dostrovsky, J. O. High-frequency synchronization of neuronal activity in the subthalamic nucleus of parkinsonian patients with limb tremor. *J Neurosci* 20 (2000) 7766-7775.
- Magill, P. J., Bolam, J. P. and Bevan, M. D. Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106 (2001) 313-330
- Mallet N, Le Moine C, Charpier S, Gonon F (2005) Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. *J Neurosci* 25:3857-3869.
- Mao, B.Q., Hamzei-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R.C., and Yuste, R. (2001). Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* 32, 883-898.
- McGeer PL, McGeer EG, Scherer U, Singh K (1977) A glutamatergic corticostriatal path? *Brain Res* 128:369-373.
- Mink JW, Thach WT (1993) Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. *Curr Opin Neurobiol* 3:950-957.
- Mink JW (1996) the basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol.* 50:381-425.
- Momiyama T (2003) Parallel decrease in omega-conotoxin-sensitive transmission and dopamine-induced inhibition at the striatal synapse of developing rats. *J Physiol* 546:483-490.
- Nambu A, Takada M, Inase M, Tokuno H (1996) Dual somatotopic representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *J. Neurosci.* 16:2671-2683.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.
- Nisenbaum ES, Berger TW (1992) Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by GABAergic and dopaminergic inputs--I. In vivo analysis. *Neuroscience* 48:561-578.
- Ossowska, K., and Wolfarth, S. (1995). Stimulation of glutamate receptors in the intermediate/caudal striatum induces contralateral turning. *Eur. J. Pharm.* 273, 89-97.

- Pacheco-Cano MT,argas J, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E (1996) Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Ca<sup>+</sup>-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res*. 110:205-211.
- Paxinos G & Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth edition. San Diego Academic Press
- Phelps PE, Houser CR, Vaughn JE (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol* 238:286-307.
- Plenz, D. and Kitai, S. T. A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* 400 (1999) 677-681.
- Prescott TJ, Gurney K, Redgrave P. (2003). Basal Ganglia. En: “*The Hand-Book of Brain Theory and Neural Networks*”, ed. por: M.A. Arbib. MIT Press. pp. 147-151.
- Raz A, Feingold A, Zelanskaya V, Vaadia E, Bergman H. (1996) Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates. *J Neurophysiol* 76: 2083-2088.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K. (1999). The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neurosci* 89: 1009-1023.
- Reubi JC, Iversen LL, Jessell TM (1977) Dopamine selectively increases 3H-GABA release from slices of rat substantia nigra in vitro. *Nature* 268:652-4.
- Rinvink E, Ottersen OP (1993) Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamatelike immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat. *J Chem Neuroanat*. 6: 19-30.
- Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF (2004) Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J Comp Neurol* 469:325-339.
- Salamone, J. D., Mayorga, A. J., Trevitt, J. T., Cousins, M. S., Conlan, A. and Nawab, A. Tremulous jaw movements in rats: A model of parkinsonian tremor. *Progress in Neurobiol* 56 (1998)591-611.
- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*. 80:1-27.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- Schwartz, T.H., Rabinowitz, D., Unni, V., Kumar, V.S., Smetters, D.K., Tsiola, A., and Yuste, R. (1998). Networks of coactive neurons in developing layer 1. *Neuron* 20, 541-552.

- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14:385-97
- Tang K, Low MJ, Grandy DK, Lovinger DM (2001) Dopamine-dependent synaptic plasticity in striatum during in vivo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1255-1260.
- Tepper JM, Bolam JP (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14:685-692.
- Tepper JM, Plenz D (2005) Microcircuits in the striatum: Striatal cell types and their interaction. In: *The Interface between Neurons and Global Brain Function, Dahlem Workshop Report 93* (Grillner S, Graybiel AM, eds), pp 127- 48. Cambridge, M.A.: MIT, Press.
- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol.* 88:1263-1269.
- Uhlhaas PJ, Singer W. (2006) Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron* 52: 155-168.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW. (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research* 24(3): 485-93.
- Wichmann T. (1999). Oscillations in the basal ganglia. *Nature.* 400(6745):621-2.
- Walters JR, Hu D, Itoga CA, Parr-Brownlie LC, Bergstrom DA (2007) Phase relationships support a role for coordinated activity in the indirect pathway in organizing slow oscillations in basal ganglia output after loss of dopamine. *Neuroscience* 144: 762-776.
- Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599-615.
- Wilson CJ (1988a) Basal ganglia. In: *The Synaptic organization of the brain.* pp. 329-376 Ed.Oxford University Press. Compiler: Shepherd G.M.
- Wilson CJ (1993) The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. In: *Chemical Signalling in the Basal Ganglia* (Arbuthnott GW, Emsom PC, eds), pp 277-297. Oxford: Elsevier.