

## 1. Título:

### **IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO BIOENSAYO FARMACOLÓGICO *IN VITRO* UTILIZANDO IMAGENOLÓGÍA DE CALCIO.**

## 2. Importancia del trabajo

Un desafío en las neurociencias es integrar el funcionamiento del nivel celular con el nivel sistémico: no sabemos cómo unas pocas docenas de neuronas se organizan en un microcircuito o módulo de escala histológica y cómo esta organización nos permitiría avizorar cambios que nos permitan correlacionar signos de enfermedad. Este es el problema que nos hemos planteado resolver en el laboratorio. El funcionamiento de un tejido no es la suma de las acciones de sus células sino de las interacciones entre ellas. En un microcircuito cerebral las interacciones son sinápticas, directas o indirectas. Para estudiarlas debemos ser capaces de observar muchas neuronas al mismo tiempo sin perder la resolución de célula única. La tecnología para hacer esto está en pleno desarrollo. Recientemente, en nuestro laboratorio, hemos logrado registrar la actividad de muchas neuronas con resolución de célula única, en una preparación cerebral *in vitro*. En este manuscrito nos referiremos al cuerpo estriado, el mayor núcleo de los ganglios basales, que se encarga del control motor. Para lo cual hemos utilizado la imagenología de calcio, lo que nos ha permitido estudiar la dinámica del microcircuito estriatal en condición normal y patológica. De hecho, hemos logrado describir la “huella fisiopatológica de la enfermedad de Parkinson”, la cual resultó ser muy descriptiva, casi metafórica, con los signos que presentan los sujetos. Por último, hemos mostrado como los fármacos anti-Parkinsonianos desenganchan al microcircuito del comportamiento patológico. En condición control el microcircuito estriatal tiene poca actividad espontánea. Ante un estímulo excitador adecuado o en la presencia de bajas concentraciones de NMDA u otras drogas, el microcircuito se activa dejándonos observar su funcionamiento. Este consiste en la activación de ensambles neuronales: grupos de neuronas que disparan juntas o de manera correlacionada. Estos ensambles alternan su actividad produciendo secuencias temporales y circuitos reverberantes tal como predice la Teoría de los ensambles neuronales. Utilizando el modelo murino de la enfermedad de Parkinson, observamos que la alternancia entre los ensambles se interrumpe generándose un ensamble neuronal altamente recurrente que absorbe la mayor parte de las neuronas. Esto es, el microcircuito se “traba” en un mismo ensamble interrumpiendo las secuencias temporales del microcircuito control, resultando en un paralelo de lo que sucede en los pacientes, que están “trabados” con dificultad para iniciar, cambiar o finalizar una actividad. Observando esto, decidimos probar las drogas anti-Parkinsonianas usadas en la terapéutica clínica en el mismo tejido. El resultado fue que el ensamble patológico se disolvió, regresando la alternancia entre los grupos de neuronas similar a las condiciones control. Nuestros resultados tuvieron alta concordancia con bio-ensayos de tipo bioquímico. Todo lo cual nos permitirá probar nuevas drogas con potencial terapéutico o diferentes combinaciones de las mismas. Ya tenemos los candidatos iniciales, pero estamos dispuestos a aceptar propuestas de la industria farmacéutica.

Nuestro bio-ensayo cuantifica con gran precisión qué moléculas restauran el microcircuito estriatal “parkinsoniano” regresándolo al control. Encontramos que los agonistas al receptor D2 fueron mejores que los agonistas inespecíficos D1, 2. Estos resultados no son intuitivos porque los microcircuitos cerebrales están conformados por diferentes tipos de neuronas que expresan diferentes receptores dopaminérgicos. En el estriado, la mitad de las neuronas expresan el receptor D1 y la otra mitad el receptor D2. Además, existen interneuronas que pueden expresar receptores D1, D2 o ambos. Predecir qué ligando producirán mejor efectos es difícil. Por lo que la ventaja de nuestro bioensayo funcional es que permite seguir la actividad neuronal de las distintas poblaciones neuronales al utilizar animales genéticamente modificados, que marcan neuronas específicas.

La utilidad de este bioensayo para la industria farmacéutica es la de determinar la eficacia de nuevos fármacos anti-Parkinsonianos midiendo la capacidad que tienen para restablecer a la normalidad ensambles neuronales patológicos en estudios pre-clínicos. También permite ensayar nuevas combinaciones de los mismos. Este mismo bio-ensayo lo estamos probando al mismo tiempo (no publicado) en discinesias incluyendo enf. de Huntington y en modelos de epilepsia.

### 3. Antecedentes, objetivos y alcance.

La mayoría de las funciones del sistema nervioso no son llevadas a cabo por neuronas únicas, si no por ensambles neuronales o grupos de neuronas conectadas entre sí. Es el disparo correlacionado de estos grupos de neuronas lo que viaja por la red, los ensambles son transitorios ya que alternan su actividad formando secuencias temporales: A-B-C...n (Buzsaki, 2010). A finales de los 70 se comprueba que existe la plasticidad sináptica de largo plazo postulada por D.O. Hebb a finales de los años 40 ("The Organization of Behavior"), que enuncia que las sinapsis que se usan mucho se potencian, las que se usan poco se deprimen, y al final las conexiones que quedan se dan entre las neuronas que fueron seleccionadas por el proceso potenciación/depresión. A la potenciación se le llama "potenciación de largo plazo" (LTP: *long term potentiation*), y a la depresión: "depresión de largo plazo" (LTD: *long term depression*). Los cambios en los pesos sinápticos de la red neuronal hacen que ciertas trayectorias queden facilitadas y otras deprimidas, formando rutas preferentes para el flujo de la actividad. Los circuitos que se forman mediante este proceso dejan "el trazo de memoria" necesario para realizar diversos procesos perceptuales, cognitivos, de toma de decisiones, selección de acciones, etc. Mucha de la acción es repetitiva, rítmica o habitual lo que forma ciclos cerrados de actividad reverberante (Lorente de Nó, 1934). Es decir, un trazo de memoria en el tejido nervioso se activará siguiendo un ciclo cerrado de actividad cuando se presente el estímulo adecuado (Dehaene y Changeux, 2005). Tendrían que registrarse decenas de neuronas simultáneamente para observar si esto es así.

En el laboratorio comenzamos a utilizar imagenología funcional de calcio con resolución de célula única, para tratar de observar si los circuitos neuronales se comportan de esta manera. Podemos seguir la actividad de cada neurona pues cada vez que dispara entra calcio por su membrana y en el interior celular se han absorbido o transfectado moléculas que emiten una señal fluorescente en presencia de calcio. Con esta estrategia hemos logrado observar la existencia de estructuras neuronales dinámicas que cumplen con los requisitos teóricos antedichos: alternancia y ciclos cerrados de actividad. El microcircuito estriatal en reposo muestra poca actividad espontánea pero ante un estímulo adecuado en la corteza o una baja concentración de un agonista excitador como el NMDA, el circuito puede activarse formando ensambles que se ven como picos de coactividad en una ventana de tiempo. Utilizando diferentes algoritmos de agrupamiento, así como herramientas tomadas de la Teoría de Redes Complejas se pueden revelar las secuencias temporales de los ensambles neuronales. Los agonistas colinérgicos y dopaminérgicos afectan estas secuencias exhibiendo una organización modular y jerárquica. La activación del receptor D1 favorece la selección de secuencias específicas, mientras que la activación del receptor D2 genera un mayor número de trayectorias. Por lo que se pudo inferir que el resultado final de la acción de los agonistas dopaminérgicos no puede predecirse con registros de células o pares de células aisladas. No es intuitivo, dado que los receptores son tanto pre- como post-sinápticos en todas las clases de neuronas del estriado. Las neuronas de proyección pueden expresar el receptor a dopamina tipo D1 o D2. La activación del receptor D1 incrementa el número de potenciales de acción y la liberación de neurotransmisor. En cambio, el receptor D2 disminuye la excitabilidad y la liberación de transmisor (Hernández-López et al, 1997; Tecuapetla et al., 2007). También forman parte del microcircuito estriatal interneuronas GABAérgicas y colinérgicas que expresan receptores a dopamina D1, D2 o ambos. Además, los receptores a dopamina se encuentran en las terminales presinápticas corticoestriatales y estriatonigrales, donde regulan la liberación de glutamato y GABA así como la misma liberación de DA (Surmeier et al., 2011). Sería muy complicado de averiguar el resultado final en el microcircuito yendo célula por célula. En el otro extremo, con los pacientes y los modelos conductuales pre-clínicos de las enfermedades en animales, sólo se tiene el resultado final pero no se tiene idea de cuáles son los mecanismos de acción, el porque y para qué. Por lo que la ventaja de nuestra preparación in vitro es tener un nivel intermedio: la acción final de una molécula sobre la actividad de un microcircuito o módulo, utilizando las conexiones funcionales de la red neuronal. Hemos determinado que el microcircuito actúa como una red de escala libre, mundo pequeño y jerárquico. Estas propiedades se pierden en el circuito patológico, lo que se puede cuantificar.

#### <sup>1</sup>Referencias

---

**Buzsaki G.** Neuron 68:362-385 (2010). **Lorente de No. J.** Neurophysiol. 1:207-44 (1938). **Dehaene, S. and Changeux, J.** PLoS Biology, 3(5), p.e141(2005). **Hernández-López, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Hamm, H. and Surmeier, D.** The Journal of Neuroscience, 20(24), pp.8987-8995. (2000). **Tecuapetla, F., Carrillo-Reid, L and Galarraga, E.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(24), pp.10258-10263. (2007). **Surmeier, D., Carrillo-Reid, L. and Bargas, J.** Neuroscience, 198,

En resumen, el análisis de las señales obtenidas con imagenología de calcio nos ha revelado la dinámica del microcircuito estriatal control, el cambio de la dinámica en presencia de neuromoduladores y en presencia de patología. En particular, la pérdida del tono dopaminérgico en el estriado debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta es causa principal de la Enfermedad de Parkinson. Desorden neurodegenerativo con signos y síntomas motores y no motores. Los signos motores correlacionan con la pérdida del 50 al 70% de las terminales dopaminérgicas en el estriado. La ausencia de dopamina cambia las funciones de las sinapsis estriatales, promoviendo consecuencias anómalas como la bradicinesia, acinesia, tremor y rigidez muscular, atribuidos a una sincronización neuronal anormal (Hammond et al, 2007; Obeso et al, 2017). Los modelos animales de la Enfermedad de Parkinson basados en moléculas neurotóxicas han sido utilizados durante muchos años porque mimetizan muchas de las características patológicas y de comportamiento de la enfermedad en humanos, lo que los hace convenientes para desarrollar nuevas terapias (Morissette and Di Paolo, 2018). Por esas razones, realizamos registros de imagenología de calcio en tejido cerebral proveniente de roedores lesionados en la sustancia nigra pars compacta con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Lo que nos permitió evidenciar los cambios ocurridos en la dinámica del microcircuito estriatal privado de dopamina al que nos referiremos como "Parkinsoniano". El microcircuito estriatal parkinsoniano muestra un aumento en la actividad espontánea de las neuronas, en ausencia de estímulos, exhibiendo picos de actividad sincrónica enganchados en un ensamble altamente recurrent o dominante, es decir, la secuencia de los ensambles neuronales se reduce drásticamente "trabando" al circuito en un estado virtualmente invariante haciendo recordar a los pacientes inmovilizados y rígidos. (Jáidar et al, 2010; Pérez-Ortega et al., 2016, ver video suplementario).

La restitución de la dopamina o la activación de sus receptores es la terapia principal utilizada para la Enfermedad de Parkinson. L-DOPA, molécula precursora, es el fármaco estándar para el tratamiento así como los agonistas dopaminérgicos. Por eso fue de nuestro interés saber si estos fármacos serían capaces regresar la actividad del microcircuito a condiciones control. En efecto, la presencia de la L-DOPA bastó para que la actividad espontánea exacerbada disminuyera. También probamos un agonista selectivo para el receptor a dopamina D1, SKF81297, en este caso, no fue disminuido el exceso de actividad espontánea, aunque sí se disolvió el ensamble altamente recurrente. Como resultado preliminar demostramos también que la nicotina también disminuye la actividad patológica.

Por lo tanto, proponemos que: El bioensayo funcional del microcircuito estriatal parkinsoniano es capaz de mostrar diferencias en la eficacia de fármacos anti-Parkinsonianos para restablecer la dinámica parkinsoniana a una similar a la del microcircuito control.

Para probar lo anterior:

El primer objetivo general fue cuantificar la capacidad de los fármacos anti-Parkinsonianos actualmente en uso clínico, como paso preliminar para probar fármacos novedosos con potencial terapéutico. Estos fueron: L-DOPA, apomorfina, rotigotina, pramipexole, ropinirole y quinolorane. Primero se trató de regresar el microcircuito estriatal Parkinsoniano a la actividad espontánea del control en reposo o no estimulado. Para ello nos trazamos los siguientes objetivos particulares:

- Registrar con imagenología de calcio la actividad neuronal espontánea del estriado (control en reposo) proveniente de una rebanada de cerebro de ratón utilizando el fluoróforo calcium Orange.
- Lesionar la sustancia nigra pars compacta (SNc) de ratón con la neurotoxina 6-OHDA para generar un modelo animal Parkinsoniano, validado por la conducta de giro e inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa en el estriado y la SNc, con el propósito de obtener rebanadas de cerebro de ratón que contengan al estriado.

---

pp.3-18. (2011). Hammond, C., Bergman, H. and Brown, P. *Trends in Neurosciences*, 30(7), pp.357-364. (2007). Obeso JA, Stamelou M, et al. *Movement Disorders*.32(9), pp.1264-1310. (2017). Morissette and Di Paolo. *J Neural Transmission* (Vienna). 125(3) pp.291-324 (2018). Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernandez, A., Drucker-Colin, R., Bargas, J. and Hernandez-Cruz, A. *Journal of Neuroscience*, 30(34), pp.11326-11336. (2010). Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A. and Bargas, J. *Neurobiology of Disease*, 91, pp.347-361. (2016). Ver video suplementario.

- Registrar con imagenología de calcio, utilizando el fluoróforo calcium Orange, la actividad neuronal espontánea del microcircuito estriatal Parkinsoniano proveniente del modelo de 6-OHDA en ratón. Antes y durante la aplicación de agonistas dopaminérgicos: apomorfina, rotigotina, pramipexole, ropinirole y quinlorane.
- Cuantificar la actividad de las neuronas del microcircuito estriatal en las siguientes condiciones: control espontáneo, Parkinsoniano espontáneo y Parkinsoniano espontáneo en presencia de agonistas dopaminérgicos. Calculamos la actividad acumulada de todas las neuronas en cada condición, y con la resolución de célula única del registro de imagenología de calcio, calculamos la actividad neuronal individual para obtener la distribución de probabilidad acumulada, en cada condición.
- Comparar con las pruebas estadísticas adecuadas la actividad acumulada y la distribución de probabilidad acumulada del microcircuito Parkinsoniano espontáneo y en presencia de cada uno de los fármacos, con la actividad del microcircuito estriatal control para evidenciar el efecto terapéutico de cada fármaco.

El segundo objetivo general fue cuantificar la capacidad de los fármacos anti-Parkinsoniano: L-DOPA, rotigotina, pramipexole y ropinirole, para restablecer el microcircuito Parkinsoniano activo, después de una estimulación adecuada que lo ponga en marcha. Los objetivos particulares fueron:

- Registrar con imagenología de calcio en una rebanada de cerebro de ratón con el fluoróforo calcium Orange, la actividad de las neuronas del microcircuito estriatal activado con estímulo proveniente de la capa V de la corteza motora con el propósito de evidenciar la dinámica de los ensambles neuronales en este estado (control activo).
- Registrar con imagenología de calcio, utilizando el fluoróforo calcium Orange, la actividad neuronal del estriado parkinsoniano de rebanadas de cerebro de ratón lesionado con 6-OHDA, antes y después de ser activado por un estímulo cortical en la capa V.
- Estimular la capa V de la corteza motora de una rebanada de cerebro de ratón lesionado con 6-OHDA, mientras se registra con imagenología de calcio el microcircuito estriatal Parkinsoniano en presencia de cada uno de los fármacos antiparkinsonianos: L-DOPA, rotigotina, pramipexole, ropinirole y quinlorane.
- Caracterizar la dinámica de los ensambles neuronales del estriado en las siguientes condiciones: microcircuito estriatal activado con un estímulo cortical, microcircuito estriatal parkinsoniano antes y después de un estímulo cortical, microcircuito estriatal parkinsoniano antes y después de un estímulo cortical en presencia de cada uno de los fármacos antiparkinsonianos, para determinar la secuencia de actividad de los ensambles neuronales.
- Cuantificar la recurrencia, alternancia y los ciclos cerrados de las secuencias de ensambles neuronales en cada condición, calculando la probabilidad de transición, un índice de recurrencia y la distribución del número de transiciones para formar un ciclo cerrado.
- Determinar la capacidad de los fármacos antiparkinsonianos para que el microcircuito muestre una secuencia de ensambles neuronales parecida al control comparando, con las pruebas estadísticas adecuadas, el índice de recurrencia y la distribución del número de transiciones para formar ciclos cerrados que observamos en el microcircuito parkinsoniano que ha recibido un estímulo en presencia de cada uno de los fármacos.

Con los objetivos anteriores queremos lograr que: El bioensayo funcional fundamentado en la dinámica de los ensambles neuronales pueda ser incluido en los ensayos farmacológicos preclínicos para probar fármacos novedosos con potencial terapéutico. Esta es la meta final, y para alcanzarla hemos logrado las metas parciales siguientes:

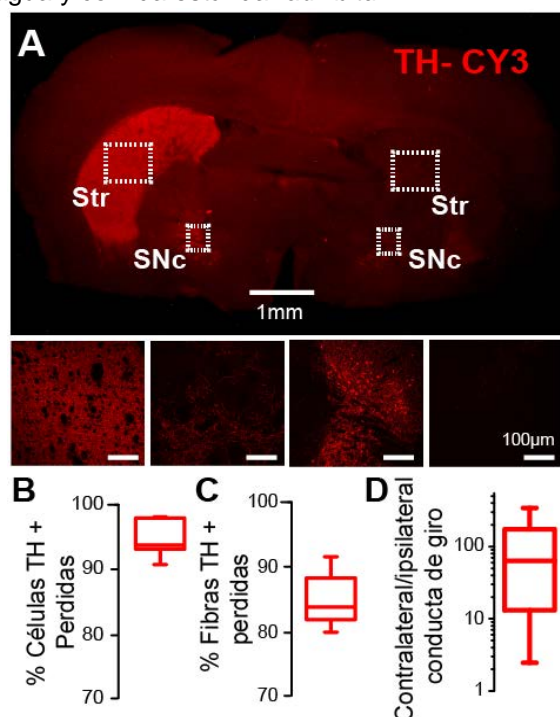
- i. Observar decenas de neuronas simultáneamente en una rebanada de cerebro utilizando la técnica de imagenología de calcio, y registrar sus señales de actividad neuronal por más de 1 hora.
- ii. Caracterizar la dinámica de los ensambles neuronales del estriado a partir de las señales fluorescentes registradas en el estriado de un ratón control con lo que tenemos su "huella fisiológica"
- iii. Tener la "huella fisiopatológica" del microcircuito estriatal parkinsoniano
- iv. Diferencias cuantificables y reproducibles entre la dinámica de los ensambles neuronales del estriado control y parkinsoniano para tener los límites de sensibilidad de nuestro ensayo.
- v. Poner a prueba diferentes fármacos antiparkinsonianos.

Por ahora solo se probaron fármacos que ya se usan en la clínica como tratamiento para la enfermedad de Parkinson. Con esto la preparación *in vitro* ha sido validada como bioensayo preclínico, porque se

cuantificó y comparó el rendimiento de fármacos antiparkinsonianos (resultados que se describen a continuación). Esto permite saber que molécula tiene un mejor rendimiento terapéutico. De modo que este bioensayo *in vitro*, basado en la caracterización de la dinámica de grupos de neuronas, puede servir para probar nuevas moléculas con efecto antiparkinsoniano o hacer combinaciones de las que ya se usan para encontrar posibles sinergias. Aunque este trabajo se ha dedicado a caracterizar la dinámica de las neuronas estriatales en condiciones control y parkinsoniana a través de observar docenas de neuronas al mismo tiempo. El bioensayo farmacológico *in vitro*, también puede ser utilizado en otras áreas cerebrales que se afectan en las diferentes neuropatologías como son: epilepsia, Alzheimer y enfermedad de Huntington por mencionar algunas. Más aún esta preparación podría ser validada en otros órganos como corazón, hígado, páncreas. Y probar moléculas blanco para cada una de las patologías que se desarrolla en los diferentes órganos corporales.

#### 4. Metodología y resultados

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas de bioética establecidas por el comité de bioética del Instituto de Fisiología Celular (IFC). En todos los experimentos se emplearon ratones machos y hembras C57BL/6 del bioterio del IFC. Se mantuvieron en una habitación libre de patógenos con temperatura controlada, bajo un ciclo luz/oscuridad de 24 horas (12/12) con agua y comida estándar *ad libitum*



**Figura 1.** (A) Microscopía estereoscópica de fluorescencia que muestra una disminución de TH-CY3 en el hemisferio lesionado (derecha) en comparación con el hemisferio intacto (izquierda) en el estriado (Str) y Sustancia nigra compacta (SNc). Abajo, microscopía confocal de áreas dentro de los cuadros blancos en el Str y SNc de ambos hemisferios. En comparación con el lado no lesionado ( $n = 17$  ratones: (C) Reducción porcentual de células TH+ en la SNc (D) Reducción porcentual de las fibras inmunoreactivas a TH. (E) gráfica de caja que muestra la evaluación de la conducta de giro ( $n = 65$  ratones; apomorfina 0.5 mg/kg).

(0.5 mg/kg en vehículo salino con 0.02% de ascorbato)

Se mantuvieron dos grupos experimentales, de los cuales se obtuvieron rebanadas de cerebro de ratón para realizar registros de imagenología de calcio en el núcleo estriado:

A. Grupo control, ratones C57BL/6.

B. Grupo parkinsoniano, ratones C57BL/6 lesionados con la neurotoxina 6-OHDA en la sustancia nigra pars compacta (SNc) para privar de dopamina a los ganglios basales, y así generar un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

#### Metodología para obtener el Modelo 6-OHDA en ratón

El ratón hemi-parkinsoniano generado mediante la inyección unilateral de 6-OHDA es el modelo de roedor Parkinsoniano más empleado en la investigación (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970). Para este propósito, 125 ratones de 25-30 días de edad, fueron anestesiados intraperitonealmente con ketamina (85 mg/kg)-xilacina (15 mg/kg). Usando cirugía estereotáctica se les inyectó 0.8  $\mu$ L de 6-OHDA (0.1 mg/mL) intracranealmente a una velocidad de 0.2  $\mu$ L/min en el borde de la SNc y el haz prosencefálico medial, con las siguientes coordenadas desde bregma: -2.6 mm AP, -1.5 mm LM y -4.7 mm DV. Durante el periodo de recuperación de 15-30 días (día postnatal 45-60) los ratones recibieron pellets de chocolate *ad libitum* y, en caso de ser detectada una pérdida de peso mayor al 20%, inyecciones subcutáneas de 100  $\mu$ L de glucosa al 2% en solución salina diariamente.

Validación del modelo de 6-OHDA en ratón

#### Conducta de giro.

La pérdida de dopamina se evaluó con la conducta de giro, se inyectó apomorfina subcutáneamente

Los giros ipsilaterales y contralaterales al sitio de la lesión se contaron con el programa RotaCount 2.0 (OmniTech) por al menos 50 minutos. Se utilizó la tasa de giros contralaterales vs ipsilaterales para identificar a los ratones con la deficiencia unilateral de DA. Cuando los ratones presentaron más giros contralaterales que ipsilaterales (tasa  $\geq 2$ ) y al menos 50 giros contralaterales totales en un minuto, se consideraron como modelos hemi-parkinsonianos exitosos (Figura 1D). Este criterio correlaciona con al menos el 80% de disminución de dopamina estriatal (Heuer et al., 2012).

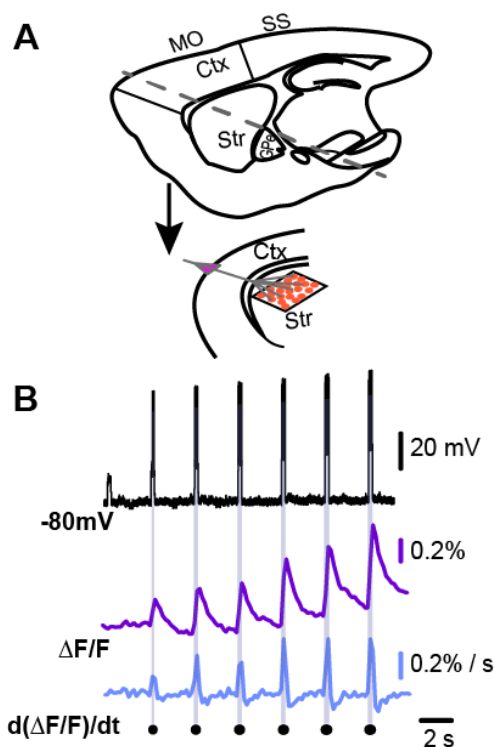
#### ■ Inmunohistoquímica

Para confirmar la pérdida dopaminérgica en la SNc y el estriado, en algunos ratones lesionados con 6-OHDA, se efectuó la tinción inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH) encima productora de dopamina (Fig. 1A-C). A los 8 días de la evaluación de la conducta de giro, los ratones lesionados se anestesiaron y se perfundieron con una solución buffer de fosfato 0.1 M (PBS). Después de la extracción del cerebro, se obtuvieron rebanadas coronales de 50  $\mu\text{m}$  en un vibrátomo (PELCO easiSlicer Ted Pella, Redding, CA) que se mantuvieron en PBS. Las rebanadas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) en PBS al 1% y Tritón 0.1 M al 3% durante 40 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron tres veces en PBS 0.1 M y se incubaron con el anticuerpo primario (de conejo, anti-tirosina hidroxilasa, Chemicon International, 1:500 en PBS 0.1 M-Tritón 3%) por 12 horas. Después las rebanadas se incubaron con el anticuerpo secundario (de asno, anti-conejo conjugado con Cy3 Affini Pure, Jackson Immuno Research, Inc. 711-165-152 1:250 en PBS 0.1 M-Tritón 3%) a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, las rebanadas se cubrieron con DAPI (Vecta Shield, Vector Laboratories, Inc. H-1200): Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal (Zeiss LSM-710, objetivo: C-Apochromat 10X N.A. 0.45, láser 543 nm). El grado de innervación dopaminérgica se cuantificó como intensidad de fluorescencia y se comparó con la del lado intacto a través de ImageJ®, mientras que los somas de las neuronas dopaminérgicas se contaron manualmente a partir de micrografías confocales. En ambos casos, se confirmó que la pérdida dopaminérgica fue de al menos 80%, como se ilustra en la Fig. 1C-D, en 17 rebanadas tomadas de distintos animales. Las imágenes estereoscópicas se obtuvieron con una cámara Nikon SMZ1500 (objetivo HR, Apo 1x WD 54).

#### Metodología para el ensayo funcional *in vitro*

##### ■ Obtención del tejido cerebral vivo

Tanto los ratones control como los modelos hemi-parkinsonianos se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina-xilacina (85 mg/kg-15 mg/kg), perfundidos intracardialmente con solución de sacarosa fría para realizar una craneotomización, extraídos los cerebros, se obtuvieron rebanadas para-horizontales con un ángulo de 30 grados (Figura 2A), de 300  $\mu\text{m}$ , en un vibrátomo (PELCO easiSlicer, Redding, CA),



**Figura 2.** (A) Diagrama de un corte sagital de cerebro de ratón muestra la orientación parahorizontal (30°, línea punteada). Inferior, diagrama del sitio de estimulación corteza (CtxS) y registro de imagenología de calcio núcleo estriado (Str) (parte inferior). (B) Registro electrofisiológico (señal superior) simultánea al de imagenología de calcio (centro). Potenciales de acción evocados con cambios de voltaje de membrana crecientes y respectivos incrementos de calcio entrante, vistos como cambios en la señal de fluorescencia ( $\Delta F/F$ ). La fase positiva de la derivada (parte inferior) del transitorio de calcio,  $d(\Delta F/F)/dt$ , corresponde a la duración de los potenciales de acción, la duración se indica con puntos debajo de los registros.

<sup>2</sup>Referencias

Ungerstedt, U & Arbuthnott, GW. Brain Research.18; 24(3) pp.485-93 (1970). Heuer A, Smith GA, Dunnett SB. Behavior Brain Research, 228 pp. 30-43. (2012)

las rebanadas con el núcleo estriado fueron conservadas en líquido cefalorraquídeo artificial (NaCl 126 mM, dextrosa 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, tiourea 0.2 mM, ácido ascórbico 0.2 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM y CaCl<sub>2</sub> 2.0 mM; pH = 7.4; 300 ± 5 mOsm/L) perfundidas con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

- Registros de imagenología de calcio

Se eligió a la molécula fluorescente Calcium Orange, un fluoróforo con bajo grado de fotoblanqueo (Thomas et al., 2000) que permitió hacer registros hasta de 90 minutos. Los cortes se incubaron en una solución de Calcium Orange (Calcium Orange 8.2 µM, DMSO al 0.1%, ácido plurónico al 0.67% en ACSF) a 36 °C durante 40 minutos y luego se depositaron en una cámara de perfusión con flujo constante de líquido cefalorraquídeo artificial, bajo un objetivo de inmersión de 20X (Olympus XLUMPLFLN, 1.00 NA, 2.0 mm WD). El campo de observación fue de 750 × 750 µm. La estimulación del fluoróforo se llevó a cabo con un iluminador Lambda LS (Sutter Instruments, Petaluma, CA, USA) acoplado a un filtro de luz de 570/30 nm. El software, Im-Patch©, diseñado en el entorno de LabView (National Instruments, ciudad de México, México; disponible en <http://Impatch.ifc.unam.mx>) se utilizó para el control de una cámara CoolSnap K4 (Photometrics, Tucson), AZ, USA) con la que se efectuaron los registros de imagenología. Los videos se componen de 720–2160 cuadros y la tasa de adquisición fue de 6 cuadros/s. Para cubrir largos periodos, se tomaron de 7 a 10 videos por experimento, lo que representa hasta 90 minutos de registro por cada uno.

- Validación de los registros de imagenología de calcio

Con el fin de constatar la fiabilidad de la fluorescencia del calcio como indicador de actividad neuronal, se efectuaron registros de fluorescencia y electrofisiología de manera simultánea, utilizando la configuración *current-clamp* de célula completa. Las pipetas empleadas en el protocolo experimental de *current-clamp* (3–6 MΩ) se llenaron con una solución que contiene en mM: 115 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 10 NaCl, 0.2 ATP, 0.2 GTP y 0.03 sal de Calcium Orange, a un pH de 7.24. Como se muestra en la Figura 2B, la derivada positiva d(ΔF/F)/dt de los transitorios de fluorescencia coinciden en el tiempo con el inicio y duración de la actividad celular.

- Adquisición de datos

Los registros de imagenología de calcio se realizaron en el estriado dorsolateral, con la siguiente estrategia experimental:

1. Las rebanadas provenientes del grupo control, que aquí llamaremos condición control, en las que se apreció el núcleo estriado se compararon bajo dos condiciones principales: actividad espontánea y actividad provocada por estimulación cortical (CtxS), el estímulo consistió en 10 pulsos, a 40 Hz, de 1.1–1.3 mA, a través de un electrodo concéntrico bipolar de 50 µm de diámetro (FHC, # CBCFE75, Bowdoin, ME, USA) que se insertó en la capa V de la corteza motora primaria (M1), como se muestra en la Fig. 1F.

2. Las rebanadas de estriado de ratones lesionados con 6-OHDA, que aquí referiremos como condición parkinsoniana, también se compararon en dos condiciones: actividad espontánea a la que se la aplicó alguno de los agonistas dopaminérgicos (L-DOPA 10 µM, apomorfina 20 µM, rotigotina 10 µM, pramipexol 10 µM, ropinirol 10 µM, quinlorane 10 µM), y actividad evocada por estimulación cortical (CtxS) en presencia de un agonista dopaminérgico. La actividad espontánea del tejido privado de dopamina se registró siempre antes de la adición de cualquier fármaco al sistema de perfusión.

## Análisis de los datos

Los vídeos fueron procesados con Im-Patch©. Tal procesamiento consiste en la extracción de la actividad celular y su transformación en matrices de actividad; para cada célula 1 indica actividad y 0 inactividad durante los cuadros adquiridos. Estas matrices pueden expresarse como gráficos tipo ráster, donde cada punto representa actividad neuronal en ese cuadro y cada fila representa la actividad de una célula a lo largo del tiempo (Fig. 2B). A partir de las matrices de actividad se obtuvo:

- **Actividad acumulada:** La cantidad de actividad neuronal por experimento se cuantificó mediante gráficos de actividad acumulativa, que se construyeron sumando la actividad de todas las neuronas a lo largo del tiempo. Para considerar muestras de experimentos en la misma condición, se hizo un ajuste lineal a los gráficos de actividad acumulada, las pendientes de los ajustes se representaron como diagramas de caja de Tukey.
- **Función de distribución acumulada (CDF, por sus siglas en inglés):** se construyó a partir de los valores de la actividad de cada célula, que se definió como el número total de cuadros



activos sobre el número total de cuadros, para comparar la actividad de las células individuales a través de diferentes secciones de un solo experimento. Las CDFs se realizaron para cada condición utilizando todas las neuronas de una muestra determinada.

- **Histogramas de coactividad:** es la suma de la actividad de todas las células por cada cuadro a lo largo del experimento, muestra cuantas neuronas se activaron juntas por cuadro, a esto le llamamos picos de coactividad que cuando son estadísticamente significativos constituyen los ensambles neuronales.
- **Picos de coactividad significativos:** un pico coactivo son las neuronas que tuvieron actividad sincrónica o correlacionada en una ventana de tiempo, la significancia estadística se determinó utilizando simulaciones de Montecarlo de las matrices de actividad, con 10,000 iteraciones cada una, sólo aquellos picos que superaron el umbral del azar se consideraron significativos, son los que se toman en cuenta para los siguientes análisis. Al dividir la cantidad de picos coactivos entre el tiempo total (minutos de duración) del experimento obtenemos el número de picos de coactividad/min.
- **Ensambls neuronales:** los picos coactividad se agruparon y compararon usando un índice de similitud: el coseno del ángulo tomado del producto punto de los vectores columna y se asociaron utilizando el análisis de agrupamiento jerárquico con ventanas de tiempo de 12 a 18 cuadros, definiendo así los ensambles neuronales como neuronas que disparan juntas o de manera correlacionada de forma transitoria y que pueden alternar su actividad formando secuencias.
- **Secuencia temporal de ensambles neuronales:** La actividad de las neuronas que forman ensambles se coloreó diferencialmente en los gráficos tipo ráster, y se simbolizaron como círculos de color en secuencias temporales de ensambles, permitiendo ver la actividad del circuito, así como las transiciones entre distintos ensambles de red y la recurrencia en el mismo ensamble.
- **Ciclos cerrados de ensambles:** Cuando cada ensamble apareció al menos una vez y el ensamble inicial es igual al último ensamble, esto es una reverberación, que tiene lugar cuando las transiciones entre los ensambles de la red generan un ciclo cerrado.
- **Índice de recurrencia:** La recurrencia es la repetición consecutiva de un ensamble de la red en lugar de alternar la actividad con otro ensamble; se calcula como la suma total de eventos recurrentes, cuyo valor mínimo es 1 que corresponde a la aparición de una vez. El índice de recurrencia es el número de veces seguidas que un solo ensamble se repite dividido por la suma de la recurrencia de todos los demás ensambles.
- **Distribución de las transiciones para formar un ciclo cerrado:** Cuantificamos el número de transiciones requeridas para lograr un ciclo cerrado entre los ensambles de la red; si no se observa un ciclo cerrado durante el experimento, se asigna el valor "infinito". La distribución del número de transiciones necesarias para cerrar un ciclo de actividad se presenta en gráficas de pastel. Con el fin de evaluar las transiciones necesarias para cerrar un ciclo de actividad, se excluyen las secuencias que nunca se cerraron.

## Estadística

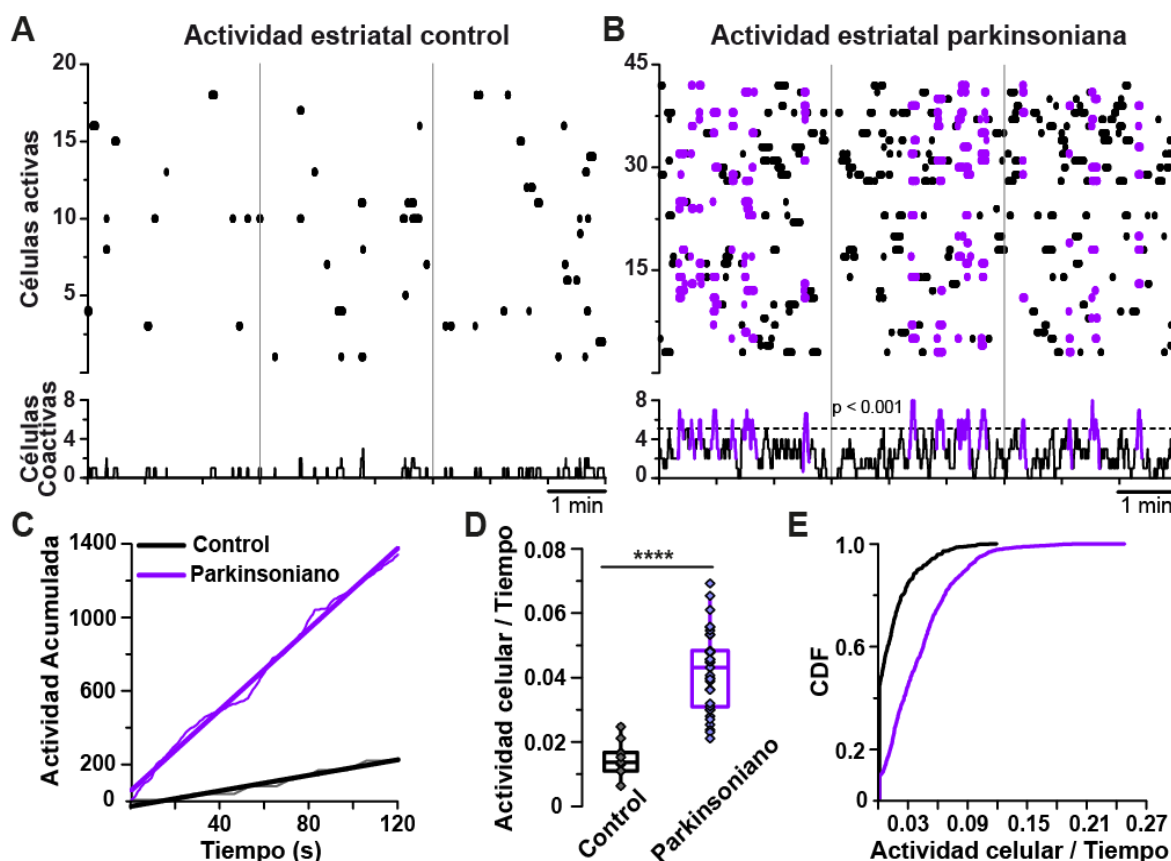
La actividad acumulada y la función de distribución acumulada se usaron para poder comparar condiciones experimentales que no presentaron picos de coactividad, como es el caso de la actividad espontanea del microcircuito estriatal control y del microcircuito estriatal Parkinsoniano en presencia de algún agonista dopaminérgico. Para comparar la pendiente del ajuste de la actividad acumulada de cada condición experimental se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y de Kolmogorov-Smirnov para comparar las funciones de distribución acumulada, pruebas estadísticas que se realizaron con el software Graph Prism. Para las condiciones experimentales que mostraron picos de coactividad se usaron las siguientes pruebas estadísticas: La determinación de un umbral de significancia para los picos de coactividad emplearon la prueba de Montecarlo, utilizando programas personalizados en MATLAB. Así mismo, se realizaron pruebas estadísticas en Graph Prism, con los siguientes propósitos: prueba de Mann-Whitney para comparar dos diferentes condiciones, prueba T de Wilcoxon para comparar dos condiciones pareadas, de los picos coactivos/min. La prueba de Kruskal-Wallis fue usada para comparar el número de transiciones para formar ciclos cerrados de actividad y su distribución fue comparada con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Y el índice de recurrencia entre las diferentes condiciones farmacológicas fue comparado mediante la prueba de homogeneidad de la varianza de O' Brian. Todas las comparaciones múltiples se corrigieron utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg con un FDR de 0.05.



## Resultados

### Los microcircuitos parkinsonianos son diferentes a los microcircuitos estriatales control

La actividad de un microcircuito estriatal *in vitro*, es decir, decenas de neuronas activas al mismo tiempo, se registró mediante la entrada de calcio durante el disparo neuronal utilizando a la molécula fluorescente Calcium Orange, de forma que, cada que ocurre un potencial de acción entra calcio a la neurona y el fluoróforo emite una señal, a la que llamamos transitorio de calcio. La derivada positiva de un transitorio de calcio con respecto al tiempo corresponde en duración y magnitud a los potenciales de acción disparados (Fig. 2B).



**Figura 3. Comparación de la actividad del microcircuito estriatal control con el parkinsoniano.**

(A-B, arriba) Gráficos tipo ráster de la actividad neuronal registrada con imagenología de  $\text{Ca}^{2+}$ , con resolución de célula única. En este y todos los rásters: cada fila en el eje y muestra la actividad de una sola célula, el eje x es el tiempo en min, cada punto en el gráfico representa una ráfaga de potenciales de acción como la primera derivada del transitorio somático de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto al tiempo, de una sola célula. Los histogramas debajo de los rásters muestran coactividad celular y picos de coactividad significativos (la línea punteada). (A) La actividad estriatal control sin estimulación muestra poca actividad espontánea, intervalos sin actividad y ningún evento coactivo significativo (abajo). (B) En contraste con el control el estriado parkinsoniano no estimulado muestra una actividad espontánea alta, sin aplicar ningún estímulo eléctrico o químico. También hay picos de coactividad significativos (abajo). Los gráficos tipo ráster son representativos de muestras en cada condición (control, n = 12 experimentos; n = 33 experimentos; parkinsoniano). (C) Gráficos de actividad acumulada de experimentos individuales representativos, se efectuó un ajuste lineal a los datos y las pendientes de las líneas ajustadas, denotan actividad celular a lo largo del tiempo (actividad/tiempo). (D) Gráficas de caja de la actividad celular a lo largo del tiempo en ambas condiciones, la condición parkinsoniana es significativamente diferentes al control (\*\*\*\*P < 0.0001; Prueba de Mann-Whitney; Ctr, n = 12 experimentos; parkinsoniano, n = 33 experimentos). (E) Funciones de distribución acumulativa (CDF) utilizando todas las células de las diferentes muestras experimentales en cada condición: (Ctr, n = 449 células; Pk, n = 1258 células). La prueba de Kolmogorov-Smirnov que arrojó diferencias significativas entre ambas condiciones P < 0.03

La actividad del microcircuito completo se puede representar a través de gráficos tipo ráster, donde las filas en el eje “y” representan la actividad de cada neurona en el microcircuito a lo largo del tiempo, y cada punto, la actividad de una célula en un cuadro (Fig. 2B, puntos abajo).

Primero registramos la actividad neuronal del estriado sin ser estimulada, esto es la actividad neuronal espontánea, en condición control y condición parkinsoniana. En la figura 3A, un ráster representativo del estriado en condición control (Ctr). Se observa que el Ctr no estimulado posee poca actividad espontánea, similar a la registrada en un sujeto en reposo *in vivo* (Mink, 2003; Parker et al., 2018). Los histogramas de coactividad celular en la parte inferior de los gráficos tipo ráster muestran la suma de la actividad neuronal por cuadro (Fig. 3A-B). El umbral, para considerar un pico de coactividad significativo, está representado por una línea punteada, umbral determinado por la prueba de Montecarlo ( $P < 0.001$ , ver métodos). En condiciones control no hay picos de coactividad significativos (Fig. 3A;  $n = 12$  experimentos) debido a la escasa actividad espontánea. En contraste el microcircuito estriatal parkinsoniano (Fig. 3B;  $n = 33$ ) muestra una actividad espontánea exacerbada, exhibiendo picos de coactividad significativos, coloreados en morado (histograma bajo el gráfico tipo ráster en Fig. 3B).

Para comparar la actividad del microcircuito estriatal control con el parkinsoniano (Pk). La actividad acumulada fue calculada para cada experimento, cada neurona representada por el área bajo los histogramas se sumó para obtener la actividad total, en la Fig. 3C se muestran ejemplos de ambas condiciones, a los que se les hizo un ajuste lineal, y los valores de la pendiente representan la actividad neuronal a lo largo del tiempo, se muestran ambas condiciones en las gráficas de cajas (Fig. 3D). El microcircuito Ctr tuvo actividad neuronal acumulada significativamente menor que el microcircuito parkinsoniano ( $****P < 0.0001$ ; Prueba de Mann-Whitney). Calculamos también la actividad individual por neurona de todos los experimentos en condición control y Parkinsoniana para construir funciones de distribución acumulada (CDF, Fig.3E). La CDF Ctr ( $n = 449$  células, trazo negro vs. la condición Parkinsoniana ( $n = 1258$  células, trazo morado) fueron significativamente diferentes ( $P < 0.03$ ; prueba de Kolmogorov Smirnov, con prueba de corrección FDR). Esto demuestra que nuestra estrategia experimental *in vitro*, es capaz de revelar los cambios plásticos que se producen cuando la red neuronal del estriado no tiene dopamina. Y permite cuantificar las diferencias de la actividad de varias neuronas al mismo tiempo, considerando todos los tipos neuronales existentes que interactúan en el estriado. La actividad neuronal significativamente aumentada en el microcircuito estriatal parkinsoniano se debe al desbalance de la red sináptica por la ausencia de la dopamina, esta actividad neuronal subyace a la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson: rigidez, bradicinesia. La restitución de la dopamina en el estriado es el tratamiento de elección para dicha enfermedad. Es por esto, que nos preguntamos si nuestra preparación puede constituir un bioensayo farmacológico preclínico *in vitro* eficaz para evaluar moléculas antiparkinsonianas. Para esto, aplicamos al microcircuito estriatal parkinsoniano, L-DOPA, molécula precursora de dopamina y fármaco de uso estándar para la enfermedad de Parkinson. Esto permitió hacer la comparación con la acción de otros agonistas dopaminérgicos que se usan en la clínica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

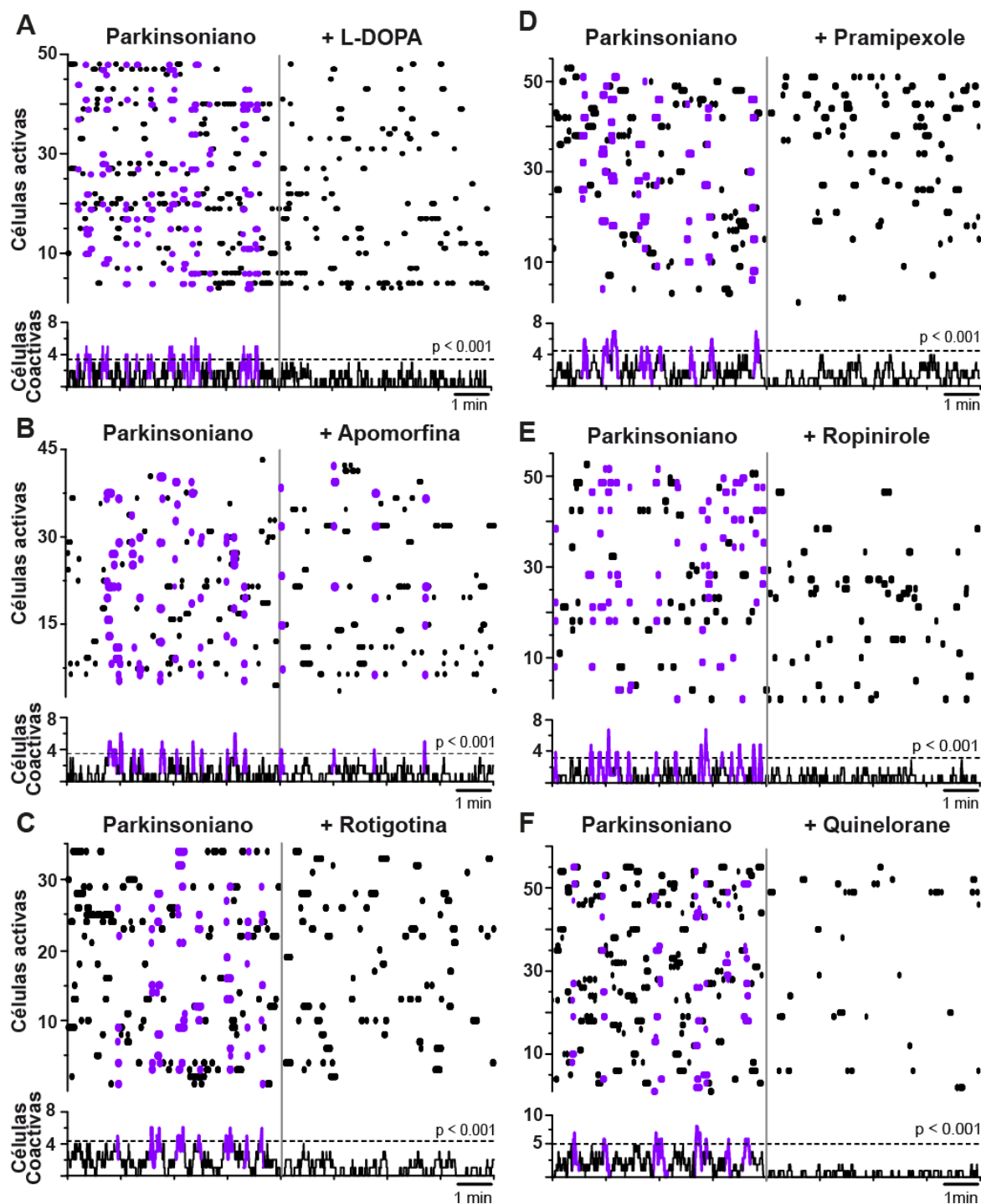
### **Los agonistas dopaminérgicos reducen la actividad espontánea aumentada en el microcircuito parkinsoniano.**

El microcircuito parkinsoniano exhibe un exceso de actividad espontánea en comparación con el estriado control (Fig.3). Anteriormente, demostramos que la aplicación de L-DOPA reduce la actividad espontánea del microcircuito parkinsoniano a niveles control (Figura 4 A), esto validó nuestra preparación como bioensayo *in vitro*. Ahora, compararemos la acción de otros agonistas dopaminérgicos (agonistas DA) sobre la actividad espontánea del microcircuito estriatal Parkinsonianos. Primero, se probaron los agonistas DA menos selectivos (Fig. 4B-C), es decir, agonistas que actúan sobre la familia de receptores D1 y D2. Los agonistas de este tipo, más utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson son la apomorfina y la rotigotina. Al ser aplicados al microcircuito estriatal parkinsoniano, redujeron la actividad espontánea aumentada típica del microcircuito patológico. Tanto la apomorfina 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 4B; ráster representativo; donde la línea gris divide la actividad antes y después de administrar el fármaco) como la rotigotina 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 4C, representativo) mostraron efectos similares al reducir significativamente la actividad del microcircuito.

<sup>3</sup>Referencias

---

Mink JW, Squire LR, Bloom, et al. (Eds.), Fundamental Neuroscience (2nd ed.), Academic Press, pp. 815-839 (2003). Parker JG, Marshall JD, et al. Nature.557(7704):177-182(2018)



**Figura. 4. Los agonistas dopaminérgicos disminuyen la actividad espontánea de los microcircuitos parkinsonianos *in vitro*.** Paneles A-F: gráficos tipo ráster representativos de microcircuitos parkinsonianos, antes y después de la adición de un agonista dopaminérgico (separados por línea gris). Los histogramas en la parte inferior muestran picos significativos (en morado) de neuronas coactivas. Las líneas punteadas muestran el umbral significativo de coactividad. El efecto de los agonistas DA que fueron adicionados se puede notar después de la línea vertical gris, como en A, se nota la disminución de la actividad neuronal por la presencia de L-DOPA. (B) La adición de apomorfina 20  $\mu$ M. (C) La adición de rotigotina 10  $\mu$ M. (D) pramipexole 10  $\mu$ M. (E) Después de la línea vertical, se observa el efecto de la adición de ropinirole 10  $\mu$ M. (F) Al agregar 10  $\mu$ M de quinelorane, se evidencia la reducción de la actividad y los picos de coactividad fueron abolidos. En todos disminuyen significativamente los picos de coactividad (Prueba Wilcoxon)

Los picos de coactividad significativos por minuto se compararon antes y después de la administración del fármaco (prueba T de Wilcoxon; datos no mostrados), se redujeron significativamente los picos coactivos tanto de apomorfina ( $n = 6$  experimentos;  $P = 0.0313$ ) como de rotigotina ( $n = 7$  experimentos;  $P = 0.0156$ ). El bioensayo muestra que, a concentraciones terapéuticas, pero de saturación, el rendimiento de la rotigotina es mejor que el de la apomorfina para disminuir la actividad exacerbada del microcircuito parkinsoniano (Figura 4B-C)

El uso de agonistas selectivos a la familia de receptores D2 también son indicados para el tratamiento temprano de la Enfermedad de Parkinson (Stocchi et al., 2016). Para explorar los efectos de estos agonistas sobre la actividad espontánea exacerbada de los microcircuitos parkinsonianos, se utilizaron pramipexole 10  $\mu$ M (Fig. 4D;  $n = 6$  experimentos), ropinirole 10  $\mu$ M (Fig. 4E;  $n = 7$  experimentos) y quinlorane 10  $\mu$ M (Fig. 4F;  $n = 6$  experimentos). Como podemos observar en la figura 4D-F, todos los agonistas D2 consiguieron reducir el exceso en la actividad espontánea de los microcircuitos parkinsonianos, además todos redujeron significativamente los picos de coactividad significativos (pramipexole:  $P = 0.0313$ ; ropinirole: Fig. 5D;  $P = 0.0156$ ; quinlorane: Fig. 5F;  $P = 0.0313$ ; mediante prueba T de Wilcoxon, datos no mostrados). Por lo tanto, todos los agonistas DA probados redujeron la actividad patológica espontánea de los microcircuitos deficientes en DA. De modo que es necesario cuantificar la actividad neuronal acumulada y construir sus funciones de distribución de actividad, después de la aplicación de cada fármaco. Cuantificar la capacidad de los fármacos para regresar los valores de actividad neuronal a valores control, y así ubicar el efecto farmacológico sobre la actividad neuronal parkinsoniana tratada con cada uno de los fármacos entre las fronteras extremas que arroja el bioensayo: entre la actividad Ctr y la Parkinsoniana (Fig. 3). Fronteras que definen la sensibilidad del ensayo.

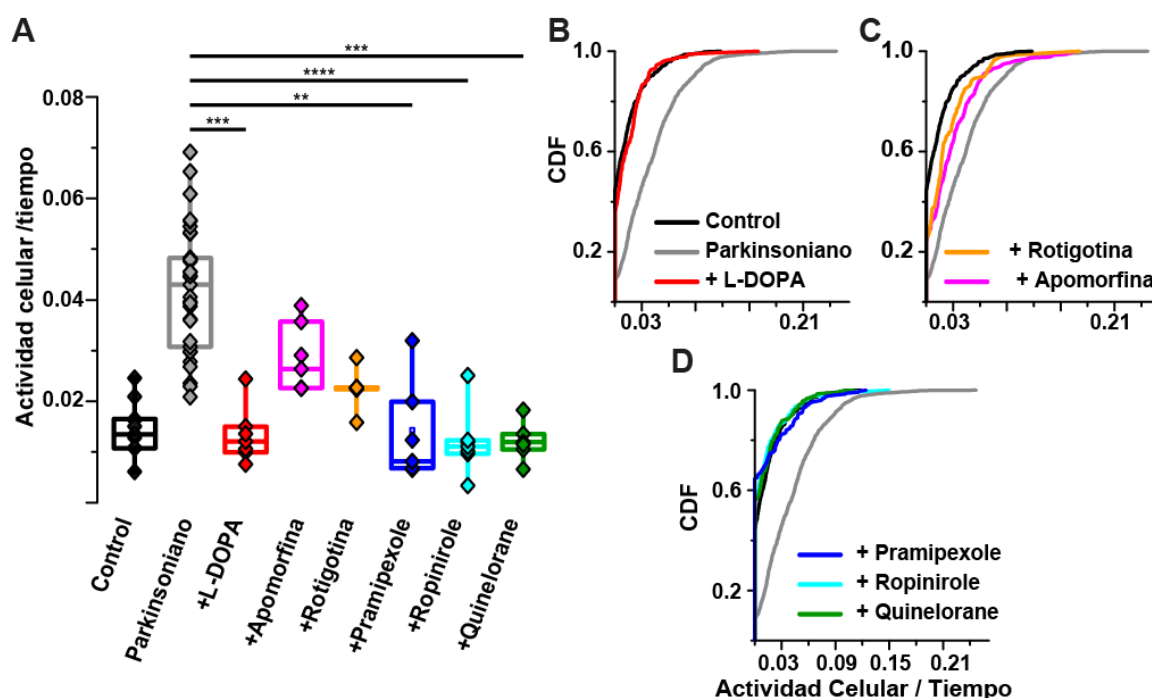
### Los agonistas D2 fueron más efectivos

Todos los agonistas DA redujeron el exceso de actividad patológica espontánea de los microcircuitos deficientes en dopamina (consulte la sección anterior). Para evaluar mejor si hubo diferencias entre los distintos agonistas empleados, se realizó un análisis de la actividad celular acumulada (Fig. 5A). Como se mencionó en los primeros resultados, la actividad neuronal espontánea del microcircuito parkinsoniano fue significativamente mayor en comparación con el microcircuito Ctr. Luego, comparamos la actividad acumulada de los microcircuitos parkinsonianos antes y después de la aplicación de un agonista DA con el objetivo de medir el efecto terapéutico de cada uno (Kruskal-Wallis,  $P < 0.0001$ , prueba de corrección FDR post hoc). La actividad espontánea del microcircuito parkinsoniano fue significativamente mayor que la actividad de las neuronas después de la aplicación de L-DOPA ( $P = 0.0001$ ;  $n = 7$  experimentos). Además, de que la actividad de las neuronas parkinsonianas en presencia de L-DOPA, molécula transformada por la encima TH en DA, no mostró diferencia significativa con la actividad del microcircuito control ( $P = 0.97$ ;  $n = 7$  experimentos). Sorpresivamente cuando se aplicó apomorfina o rotigotina al microcircuito parkinsoniano, la actividad neuronal no logró ser significativamente diferente a los microcircuitos parkinsonianos no tratados (Fig. 6A; apomorfina,  $P = 0.28$ ,  $n = 6$  experimentos y rotigotina,  $P = 0.08$ ,  $n = 7$  experimentos). Además, la actividad neuronal parkinsoniana en presencia de estos agonistas siguió siendo significativamente diferente a la del microcircuito estriatal control (Fig. 5A; apomorfina,  $P = 0.08$  y rotigotina,  $P = 0.28$ ). Lo que sugiere que los agonistas menos selectivos, es decir, los que actúan sobre los receptores de dopamina de ambas clases D1 y D2, tienen una acción más limitada sobre la actividad espontánea parkinsoniana. No obstante, al agregar agonistas D<sub>2</sub> a los microcircuitos Parkinsonianos, la actividad fue significativamente menor que la encontrada en los microcircuitos patológicos no tratados, a saber: pramipexole ( $P = 0.0003$ ,  $n = 6$  experimentos), ropinirole ( $P = 0.0001$ ,  $n = 8$  experimentos) y quinlorane ( $P = 0.0001$ ;  $n = 6$  experimentos). Estos resultados proponen que los agonistas de la familia D2 son mejores que los agonistas de todos los receptores a DA, para reducir el exceso de actividad espontánea observada en microcircuitos parkinsonianos en reposo. Esto debería correlacionar con la disminución de la rigidez.

Por otro lado, se realizó una prueba aún más rigurosa, comparando las funciones de distribución acumulada (CDF) de la actividad de las neuronas de cada tratamiento farmacológico, utilizando todas las células de todos los experimentos (Fig. 5B-D). Primero, comparamos CDF del microcircuito espontáneo ( $n = 449$  células, trazo negro; Fig. 5B) con la del Parkinsoniano ( $n = 1258$  células, trazo gris; Fig. 5B), y con el Parkinsoniano tratado con L-DOPA ( $n = 232$  células, trazo rojo; Fig. 5B).

<sup>4</sup>Referencias

No hubo diferencia significativa entre la actividad del microcircuito control y el microcircuito parkinsoniano más L-DOPA ( $P = 0.15$ ; prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección por FDR), lo que muestra porque en esta etapa temprana del Parkinsonismo experimental (llamada también "luna de miel"), la L-DOPA tiende a devolver la dinámica del microcircuito alterado a las condiciones control. Como se esperaba, la CDF del microcircuito Parkinsoniano fue significativamente distinta de la distribución de actividad de la condición control y Parkinsoniana en presencia de L-DOPA, su CDF se encontraba muy a la derecha con respecto a las CDF del control y del tratamiento con L-DOPA (Fig. 5B). Utilizando esta rigurosa prueba, la mayoría de los agonistas DA probados sobre los microcircuitos parkinsonianos no lograron igualar el efecto de la L-DOPA. Sin embargo, el quinolorane no fue significativamente distinto del microcircuito control espontáneo (207 células,  $P = 0.06$ ). Mientras que el resto de las CDF fueron significativamente diferentes a la CDF control: apomorfina = 262 células,  $P = 6.6 \times 10^{-12}$ ; rotigotina = 139 células,  $P = 5.0 \times 10^{-6}$ ; pramipexole = 255 células,  $P = 0.004$ ; ropinirole = 249 células,  $P = 0.006$ . Este análisis mostró que las CDF de apomorfina y rotigotina están a la derecha de las funciones de distribución acumulada del control y la L-DOPA (Fig. 5C), mientras que las CDF de los agonistas D2 se superponen en parte a las CDF del control y de L-DOPA (Fig. 5D). Así, llegamos a la conclusión de que los agonistas D2 reducen mejor el exceso de actividad espontánea de los microcircuitos parkinsonianos, pero ninguno emula completamente las acciones de la L-DOPA.



**Fig. 5. Los agonistas D2 fueron más efectivos en disminuir el exceso de actividad parkinsoniana.** (A) La actividad celular a lo largo del tiempo se comparó entre las diferentes condiciones experimentales (Control (Ctr)  $n = 12$ , Parkinsoniano (Pk)  $n = 33$ , Pk+ L-DOPA = 7, + apomorfina  $n = 6$ , + rotigotina = 7, + pramipexole  $n = 6$ , + ropinirole  $n = 8$ , + quinolorane  $n = 6$ ). La actividad del microcircuito Pk disminuyó significativamente (Kruskal-Wallis,  $P < 0.0001$ , corrección post hoc por pares FDR (Benjamini et al., 2006)) después de la administración de L-DOPA ( $P < 0.0004$ ), y agonistas D2: pramipexole ( $P = 0.00015$ ), ropinirole ( $P = 0.0001$ ) y quinolorane ( $P = 0.0001$ ). Sin embargo, apomorfina ( $P = 0.99$ ) y rotigotina ( $P = 0.5$ ) no fueron diferentes al parkinsoniano. (B) Funciones de distribución acumulada (CDF) de la actividad celular de los microcircuitos: control ( $n = 449$  células; trazo negro); parkinsoniano ( $n = 1258$  células; trazo gris), y Pk + L-DOPA, cuya distribución ya no fue diferente al control (Trazo rojo,  $P = 0.15$ ;  $n = 232$  células; prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección FDR). (C) Las CDF de los microcircuitos parkinsonianos, después de ser tratados con apomorfina ( $n = 262$  células;  $P = 6.6 \times 10^{-12}$ ) y rotigotina ( $n = 139$  células;  $P = 5.0 \times 10^{-6}$ ) mostraron diferencias significativas con Ctr. (D) En comparación con las CDF del control, las CDF de los microcircuitos parkinsonianos tras la adición del agonista D2, también fueron significativamente diferentes a los Ctr: pramipexole ( $n = 255$  células;  $P = 0.004$ ), ropinirole ( $n = 249$  células;  $P = 0.006$ ) y quinolorane ( $n = 207$  células;  $P = 0.06$ ). No obstante, las CDF de los agonistas DA están más cerca de las CDF control (línea negra).

En resumen, todos los agonistas dopaminérgicos redujeron la actividad patológica en reposo o espontánea. Sin embargo, sólo la L-DOPA (y en menor medida, el quinolorane) redujeron significativamente la actividad Parkinsoniana, mientras que la reducción de la actividad patológica por parte de cualquiera de los agonistas DA no logra ser similar a la actividad control. Aunque los agonistas D2: pramipexole, ropinirole y quinolorane, fueron mejores reduciendo la actividad parkinsoniana, pues sus CDFs se sobreponen en parte con la CDF del control (Fig. 5D). Sorprendentemente, los agonistas de los receptores D1 y D2, apomorfina y rotigotina, no fueron buenos en disminuir esta actividad patológica espontánea. Lo que sugiere que cuando un sujeto está en reposo, los agonistas D2 serían mejores controlando la rigidez y el temblor, correlatos clínicos de la actividad espontánea aumentada del microcircuito parkinsoniano. Las conclusiones anteriores demuestran que la preparación estriatal in vitro sirve como bioensayo farmacológico porque permite cuantificar la capacidad de los fármacos para inhibir la actividad neuronal patológica. Además, con la información obtenida es posible hacer comparaciones entre los fármacos para saber cuál resulta más efectivo.

### **La estimulación cortical activa al microcircuito estriatal control y desengancha la actividad patológica del microcircuito Parkinsoniano.**

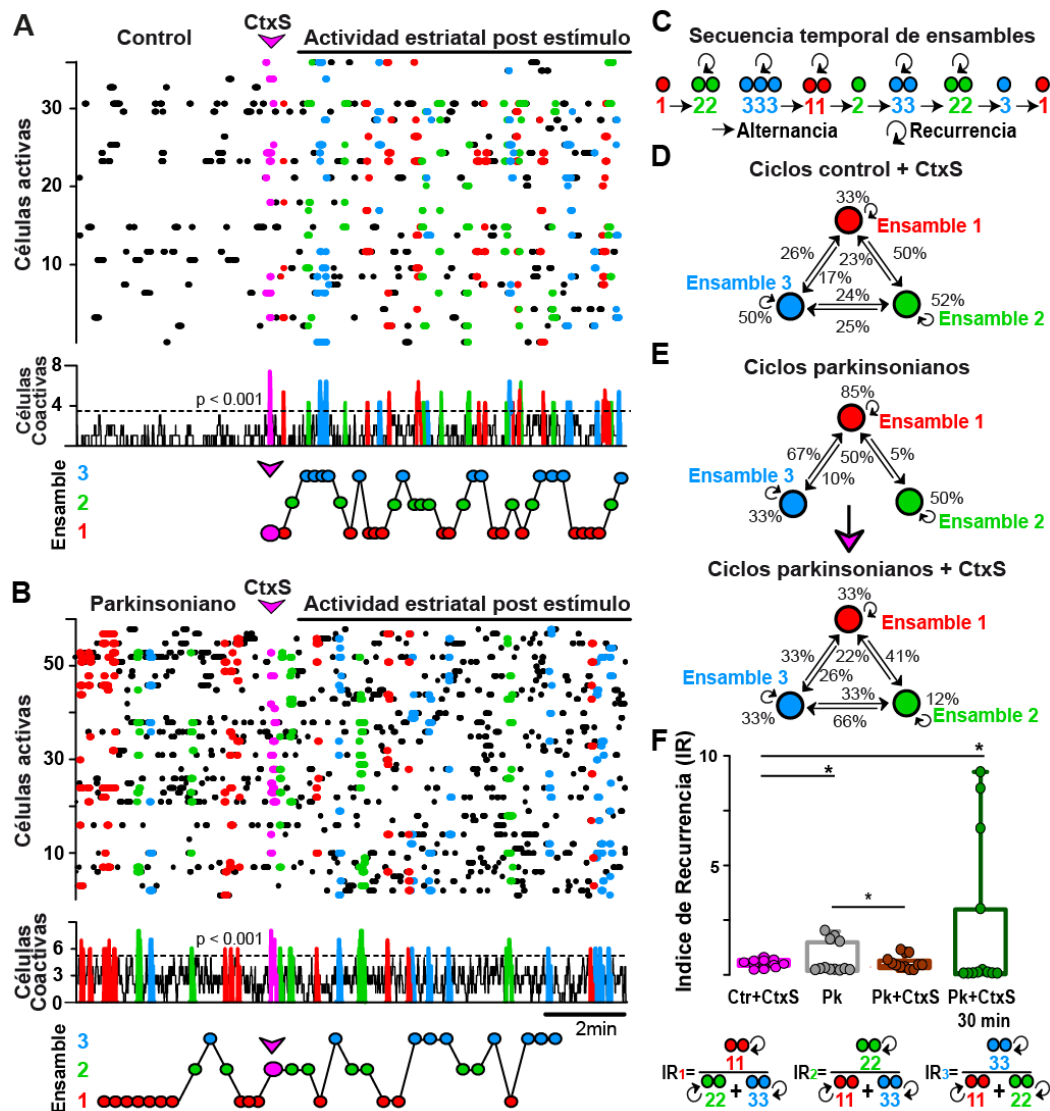
El bioensayo farmacológico fue realizado sobre la actividad espontánea (en reposo o no estimulada) de los microcircuitos estriatales, como se mostró en la figura 3, el microcircuito estriatal control tiene poca actividad espontánea por lo que rara vez presenta picos de coactividad significativos. El estriado es un núcleo formado en su mayoría por neuronas inhibitorias que reciben axones excitatorios de la corteza cerebral, comando que inicia el movimiento voluntario. De modo que para activar al microcircuito estriatal es necesario presentar un estímulo excitatorio. En el laboratorio previamente se demostró que al aplicar un estímulo químico con un agonista de receptores glutaminérgicos tipo NMDA, la actividad neuronal del estriado aumenta y muestra picos de coactividad significativos que revelan los ensambles neuronales, alternándose entre sí hasta formar secuencias y ciclos cerrados, esto es la dinámica del microcircuito estriatal control activado. Si al activar un receptor de glutamato se observan ensambles neuronales, logaremos esto también, si se aplica un estímulo adecuado en la corteza cerebral para que sus terminales sinápticas liberen glutamato en el estriado. La actividad en reposo del estriado control fue registrada por algunos minutos para después estimular la corteza motora (CtxS; 10 pulsos a 40 Hz en la capa V de corteza motora primaria, ver procedimientos experimentales), lo que activa el microcircuito estriatal exhibiendo una secuencia de picos de coactividad neuronal significativos por al menos 30 minutos después de CtxS. Esta actividad neuronal es semejante a la registrada durante la actividad motora in vivo (Mink, 2003; Parker et al., 2018). Un gráfico ráster de esta actividad neuronal después del estímulo cortical se muestra en la Figura 6A, cada fila representa la actividad de una sola neurona en el tiempo. En la parte central, un histograma de la actividad de cada cuadro sumada en el tiempo muestra las células coactivas, la línea discontinua representa el umbral de significancia que se determinó con simulaciones de Monte Carlo ( $P < 0.001$ ). Los picos de coactividad significativos están marcados en el ráster y el histograma con puntos y líneas coloreadas. El CtxS evoca un pico de actividad significativo compuesto por neuronas estimuladas que son diferentes a los picos de coactividad que aparecen después (pico rosa, Fig. 6A). Los picos de coactividad se agruparon de acuerdo con el índice de similitud y se clasificaron, como ensambles neuronales, utilizando el análisis de agrupamiento jerárquico. Los picos de coactividad significativos en el microcircuito Ctr+CtxS se ilustran como círculos de distintos colores según el ensamble que representan, estos forman secuencias temporales con alternancia entre los ensambles y recurrencia en el mismo ensamble (Fig. 6C). La secuencia temporal de los ensambles que aparecieron después del estímulo cortical se muestra en la parte de abajo de Fig. 6A. Claramente el CtxS activa el microcircuito estriatal revelando grupos de neuronas que alternan su actividad y forman ciclos reverberantes ( $n = 5$ , experimentos; Figura 5E) (Buzaki, 2010), que no fue diferente a la dinámica de microcircuito control activado con NMDA (datos no mostrados).

Al inicio de los resultados se mostró que hay un exceso de actividad neuronal espontánea en el microcircuito Parkinsoniano significativamente diferente al control, esto se puede observar en el gráfico ráster e histograma de coactividad en la Fig. 6B antes del CtxS (indicado con la punta de flecha rosa).

#### <sup>5</sup>Referencias

- 
- Mink JW, Squire LR, Bloom, et al.**(Eds.), Fundamental Neuroscience (2nd ed.), Academic Press, pp. 815-839 (2003).  
**Parker JG, Marshall JD, et al.** Nature.557(7704):177-182(2018)  
**Buzsaki G.** Neuron 68:362-385 (2010)





**Figura. 6. El estímulo cortical activa el microcircuito estriatal control y desengancha al microcircuito parkinsoniano.** (A-B) Gráficos tipo ráster representativos de la actividad del microcircuito control y parkinsoniano, antes y después de un estímulo cortical. En el microcircuito control (A) se observa un aumento general de la actividad tras la estimulación (señalada por la flecha CtxS), que se refleja en la aparición de picos significativos de coactividad que se colorearon de acuerdo con el ensamble que pertenecen (centro, histograma de coactividad), representado por un círculo del mismo color en una secuencia temporal de los tres ensambles encontrados (abajo del histograma). (B) Sobreactividad espontánea del microcircuito parkinsoniano, los picos de coactividad revelaron un ensamble dominante (1, rojo), previo al CtxS. Inmediatamente después se disuelve el ensamble dominante y reaparecen ensambles alternantes. (C) Esquema de una secuencia temporal de ensambles que indica con una flecha entre los círculos (ensambles) la alternancia, esto es pasar de ensamble 1 al 2 por ejemplo. O que se repita el mismo ensamble, del 3 al 3 por ejemplo, lo que llamamos recurrencia, indicada con una flecha circular, y la secuencia temporal de ensambles forma ciclos. (D) El microcircuito control después del CtxS exhibe ciclos reverberantes, es decir, ciclos cerrados. (E) El microcircuito parkinsoniano es incapaz de lograr un ciclo cerrado (arriba), debido a la presencia del ensamble altamente recurrente (rojo), que interrumpe la alternancia, y que se recupera tras la estimulación cortical permitiendo alcanzar ciclos cerrado de ensambles parecidos al control activado. (F) Gráficas de caja del índice de recurrencia, (número de veces seguidas de un ensamble entre la suma de la recurrencia de los demás, esquema del cálculo, abajo), según la prueba de homogeneidad de varianza de O'Brien. La CtxS inmediata (caja marrón) disuelve el ensamble dominante y el índice de recurrencia ya no fue diferente al control estimulado, caja rosa, ( $P=0.149$ ,  $n=12$  ensamble s de 4 rebanadas), Pero después de 30 min del CtxS, caja verde, reaparece el ensamble recurrente y vuelve a ser diferente del control estimulado ( $P=0.015$ ).

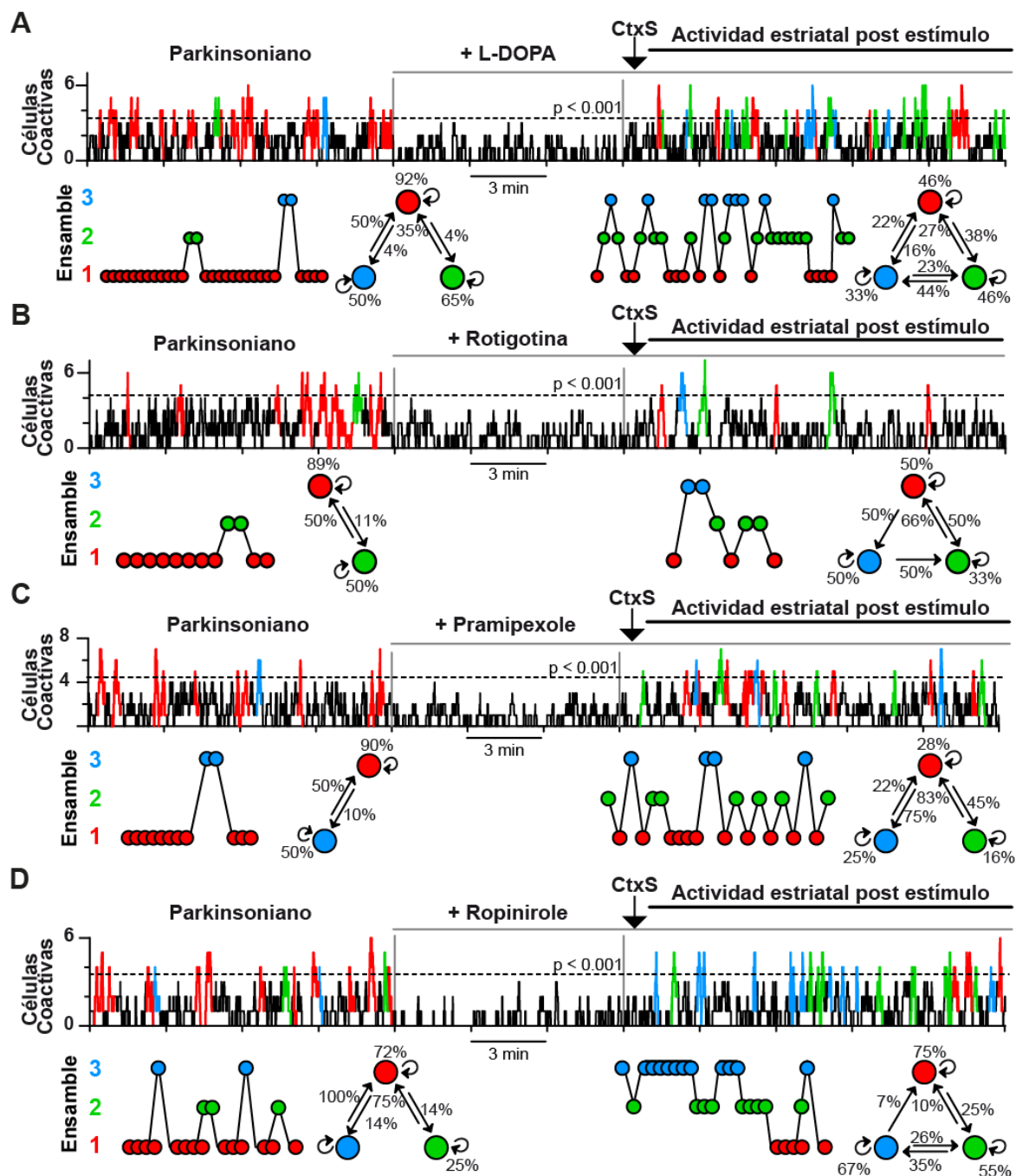


La hiperactividad espontánea patológica, muestra picos de coactividad significativo y con el propósito de determinar la dinámica del microcircuito estriatal Parkinsoniano, se analizaron los grupos de neuronas coactivas como lo hicimos para el microcircuito control. Encontramos que hay una secuencia temporal de ensambles, pero a diferencia de la dinámica control, un ensamble altamente recurrente bloquea la secuencia, por lo tanto, se reduce en gran medida la alternancia con otros ensambles (Fig. 6B, coloreado en rojo;  $n = 33$ ). De hecho, las transiciones entre los ensambles de la red se vuelven poco frecuentes en los circuitos parkinsonianos. Por otro lado, una disminución en las transiciones entre los ensambles puede correlacionarse claramente con la rigidez y lentitud del movimiento característico de los sujetos Parkinsonianos.

La dinámica del microcircuito Parkinsoniano exhibe muy recurrente cuando registramos la actividad espontánea del microcircuito estriatal (Fig. 6B, antes del CtxS), es decir, a diferencia el microcircuito control, la actividad parkinsoniana muestra ensambles sin haber recibido algún estímulo excitatorio. Debido al desbalance de la red neuronal ante la falta de dopamina, la dinámica del microcircuito Parkinsoniano es la huella fisiopatológica de la enfermedad en el tejido cerebral. Ahora bien, se ha demostrado en otros trabajos de investigación que la estimulación cortical mejora el Parkinsonismo. Lo quisimos confirmar *in vitro*. La actividad espontánea del estriado Parkinsoniano fue registrada por algunos minutos para después estimular la corteza motora (CtxS; 10 pulsos a 40 Hz en la capa V de corteza motora primaria, ver procedimientos experimentales). Después del CtxS (Fig. 6B;  $n = 7$ ), la alternancia entre los ensambles de la red se vuelve más equilibrada y se recuperan las transiciones; esta nueva dinámica se mantiene durante varios minutos después de la estimulación (parte central, Fig. 6B; CtxS está marcado con una punta de flecha). La secuencia temporal de actividad de ensambles antes de CtxS (parte inferior, Fig. 6B), exhibe una alta recurrencia (ensamble rojo), como si el microcircuito estuviera atrapado en ese ensamble. Como consecuencia, los ciclos de ensambles son comúnmente abiertos (Fig. 6E, arriba). Momentos después del CtxS las transiciones aumentan, la aparición del ensamble dominante disminuye y así los ciclos de actividad se cierran (Fig. 6E, abajo). El efecto de la CtxS dura alrededor de 1 h.

Para comparar la actividad total en el microcircuito estriatal bajo diferentes tratamientos, analizamos la actividad acumulada tomando todas las neuronas de todos los experimentos en cada condición. El microcircuito estriatal Ctr muestra actividad espontánea escasa y un aumento de la actividad neuronal significativa después de la estimulación cortical (CtxS) en condiciones de control, datos no mostrados ( $n = 5$ ; prueba t de Wilcoxon;  $P < 0.01$ ).

El microcircuito estriatal Parkinsoniano tiene mayor actividad espontánea que el control no estimulado. Pero después de la estimulación cortical, el microcircuito Parkinsoniano no aumentó significativamente su actividad a pesar de los cambios inducidos en la dinámica del circuito. Así que, concluimos que las diferencias entre el control y los microcircuitos patológicos no consisten en la actividad neuronal total, sino en diferencias más sutiles en la dinámica y la composición de la red. Para ver si la diferencia de los microcircuitos estriatales se encuentra en la dinámica de los ensambles entonces graficamos las secuencias temporales de ensambles neuronales del microcircuito en diferentes condiciones (Fig. 6 A-B, abajo): control más estímulo cortical (Ctr + CtxS), parkinsoniano (Pk) y parkinsoniano más estímulo cortical (Pk + CtxS). A partir de estas secuencias temporales de los ensambles se calculó el índice de recurrencia (Fig. 6F abajo, ver métodos), para medir cuanto se repite el mismo ensamble en una secuencia temporal de ensambles de todos los experimentos en cada condición. Cuando un ensamble del microcircuito tiene alta recurrencia patológica con respecto a los otros ensambles, la muestra exhibe dos grupos diferentes y una varianza aumentada como en la gráfica de caja del microcircuito parkinsoniano en la Fig. 6F. Cuando ningún ensamble tiene una recurrencia mayor que los otros ensambles de la red, la distribución de la muestra parece homogénea como un grupo único sin ensamble dominante, como se ve en la gráfica de caja del control estimulado (Ctr + CtxS) y la caja del parkinsoniano inmediatamente después del estímulo cortical (Pk + CtxS) en la figura 6F. Es decir, CtxS elimina temporalmente el ensamble patológico ( $P = 0.007586$ ; prueba de O'Brien para la homogeneidad de la varianza en este y otros valores de  $P$  de esta sección), restaurando la alternancia de los ensambles. La dinámica ya no fue diferente a la del control: Ctr + CtxS ( $P = 0.149$ ;  $n = 12$  ensambles de cuatro rebanadas). Sin embargo, fue evidente que 30 min después de CtxS regresan los ensambles patológicos altamente recurrentes (Fig. 6F, derecha;  $P = 0.018$  en comparación con Ctr + CtxS). Además, los ensambles altamente recurrentes aparecen más que en la condición inicial Parkinsoniana ( $P = 0.015$  en comparación con Pk + CtxS), como si la traba al circuito regresara peor que antes. Por lo tanto, otro hallazgo de este trabajo es que la estimulación cortical libera al microcircuito estriatal del ensamble dominante, momentáneamente permite que el circuito regrese a la



**Figura. 7. La estimulación cortical activa los microcircuitos parkinsonianos tratados con agonistas DA de manera similar al control estimulado.** Los histogramas de células coactivas muestran tres épocas delimitadas por líneas verticales grises: 1) actividad parkinsoniana 2) adición de 10  $\mu$ M: L-DOPA (A), rotigotina 10  $\mu$ M (B), pramipexole (C) y ropinirole (D) al microcircuito, y 3) actividad después de la estimulación cortical (CtxS) en presencia de agonistas dopaminérgicos. Los picos de coactividad significativos coloreados con ensamble al que pertenecen. En todos los casos, los microcircuitos parkinsonianos muestran un estado altamente recurrente (rojo), confirmado por la secuencia de ensambles (histogramas, abajo) que no forman ciclos cerrados. Y en todos los casos se observa la disminución de la actividad parkinsoniana en presencia de los agonistas DA. En esa condición, la CtxS reinicia la actividad del microcircuito parkinsoniano en presencia de los agonistas DA. Los microcircuitos presentan varios picos de coactividad significativos y alternantes (histograma y secuencias en la parte inferior, época 3). Las secuencias de ensambles ahora tienen reverberaciones durante el tiempo de registro. Es menos probable que se produzcan picos de coactividad después de CtxS en presencia de rotigotina (B) que con L-DOPA (A). El pramipexole (C) redujo mejor el ensamble dominante y ropinirole muestra menos alternancia entre los ensambles, después de CtxS

alternancia y haya transiciones con los otros ensambles. En los pacientes con enfermedad de Parkinson, este fenómeno se puede relacionar con los eventos de Kinesia Paradoxa, en los que una entrada sensorial fuerte puede aliviar temporalmente los signos de la EP, no obstante, una vez que el estímulo sensorial ha pasado, la rigidez y la dificultad para iniciar movimientos regresa (Banou, 2015). En nuestra preparación *in vitro*, el efecto de la estimulación cortical se observó aproximadamente durante 30 min para después volver a la dinámica patológica. Por lo tanto, nos preguntamos si al coaplicar algún agonista DA ambos procedimientos interactuarían sinérgicamente, quizás prolongando la acción terapéutica. Además, una comparación entre las acciones de los diferentes agonistas DA ante la estimulación cortical, puede sugerir cuáles son los más efectivos.

### **Efectos de los agonistas dopaminérgicos en el microcircuito parkinsoniano estimulado en la corteza**

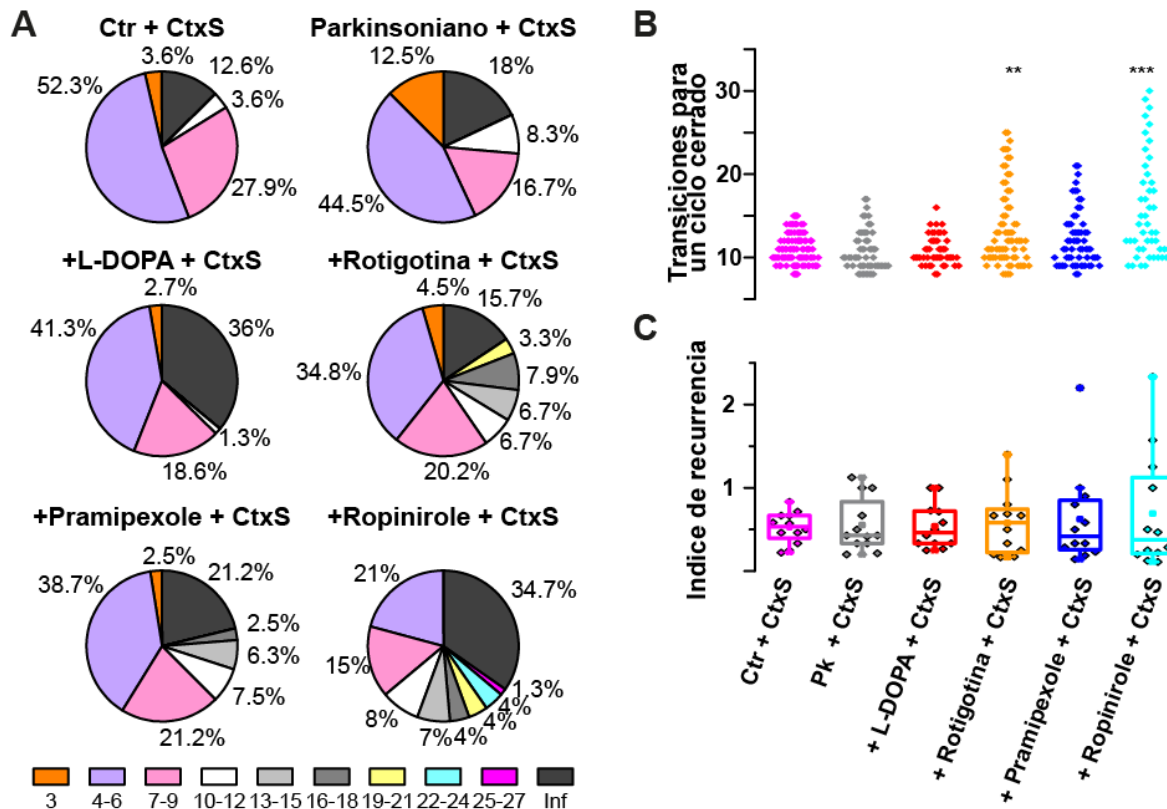
Para responder a las preguntas anteriores, se aplicó CtxS a microcircuitos parkinsonianos en presencia de L-DOPA y otros agonistas de DA (Fig. 7). Primero, se muestra el histograma de coactividad representativo de la L-DOPA en la Fig. 7A (arriba) dividida en tres diferentes épocas separadas por líneas verticales. La época de la izquierda muestra la típica actividad espontánea de un microcircuito Parkinsoniano. La época intermedia muestra la disminución de esta actividad espontánea debido a la administración de L-DOPA. La época de la derecha ilustra la actividad después de la estimulación cortical (CtxS) en presencia continua de L-DOPA. Las secuencias de transiciones entre ensambles (debajo de los histogramas) muestran los picos de coactividad significativos en el microcircuito parkinsoniano, antes y después de CtxS + L-DOPA. Es evidente que el microcircuito parkinsoniano no tratado presenta un ensamble (rojo) altamente recurrente que impide la reverberación (Fig. 7A, parte inferior), mientras que el microcircuito Parkinsoniano estimulado y con L-DOPA recupera la variedad de picos de coactividad con alternancia entre los ensambles, incluyendo los ciclos reverberantes o cerrados (derecha;  $n = 4$  experimentos) que se asemejan a la actividad en el control activo o estimulado (ver Fig. 6D). En presencia de L-DOPA, el microcircuito parkinsoniano puede responder a un comando de estimulación cortical con dinámicas parecidas a las del control estriatal. Este protocolo fue usado también con microcircuitos parkinsonianos al administrar rotigotina, un agonista las dos clases de receptor a DA (Fig. 7B), pramipexole, agonista de la familia de receptores D2 (Fig. 7C) y ropinirole, otro agonista D2 (Fig. 7 D).

Los resultados obtenidos fueron similares a los observados con la administración de L-DOPA: antes de la estimulación, un ensamble altamente recurrente impide la alternancia, la aplicación de agonistas DA ejerce un efecto silenciador, la coaplicación del CtxS en presencia continua de alguno de los agonistas DA, hace que la dinámica del microcircuito regrese a una secuencia con alternancia entre los ensambles neuronales. La rotigotina indujo menos picos de coactividad que la L-DOPA (prueba T de Mann-Whitney,  $P = 0.02$ ), aunque restauró la alternancia entre los ensambles y formó ciclos cerrados. Por otro lado, el pramipexole indujo una alternancia más equilibrada entre los ensambles del microcircuito, aunque en el experimento que se muestra, los ciclos cerrados no reaparecieron (ver estadísticas a continuación). El ropinirole no restauró completamente la alternancia entre los ensambles, por lo que solo pudieron permanecer algunos ciclos cerrados.

### **Comparación del rendimiento terapéutico de los agonistas DA en microcircuitos parkinsonianos activados**

Como se muestra en la Fig. 6B, la dinámica del microcircuito parkinsoniano se recupera brevemente y de forma transitoria después de un estímulo cortical, al inducir una secuencia de actividad entre los ensambles neuronales, similar a la inducida en los circuitos Ctr activados. Sin embargo, este cambio hacia la dinámica de control activado sólo dura aproximadamente 30 minutos (Fig. 6F), a menos que se administre L-DOPA (Figura 7A). En ese caso, un microcircuito activado por CtxS mantiene la alternancia de los ensambles durante un período de tiempo más largo, por ejemplo, 60 min. Por lo tanto, comparamos las acciones de CtxS en presencia de L-DOPA con otros agonistas DA a los 60 min de la CtxS, y únicamente con CtxS a los 30 min del estímulo. Primero, contamos el número de transiciones entre ensambles para lograr un ciclo cerrado, una medida de cuánta alternancia entre los ensambles está permitida por el microcircuito, presentada en gráficas de pastel (Fig. 8A)

<sup>6</sup>Referencias



**Figura 8. Comparaciones del rendimiento de los agonistas dopaminérgicos en microcircuitos parkinsonianos corticalmente activados.** (A) Los gráficos de pastel muestran el número de transiciones necesarias para cerrar un ciclo de ensambles, incluidos los casos en que no hubo ciclos cerrados durante el registro (en negro). En la parte superior: los primeros 30 minutos después de CtxS en un microcircuito parkinsoniano en ausencia de cualquier fármaco ( $n = 4$  experimentos) se compararon respecto a los microcircuitos estimulados control ( $n = 5$  experimentos): no hubo una diferencia significativa (prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección por FDR post hoc,  $P = 0.206$ ). Se compararon las acciones de los agonistas DA sobre el microcircuito parkinsoniano + CtxS con los controles + CtxS, 60 minutos después de la estimulación: L-DOPA ( $P = 0.007$ ,  $n = 4$ ), rotigotina ( $P = 0.002$ ,  $n = 4$ ), pramipexole ( $P = 0.016$ ,  $n = 4$ ) y ropinirole ( $P = 1 \times 10^{-9}$ ,  $n = 4$ ). Los resultados de esta prueba rigurosa fueron que ningún agonista DA, incluyendo L-DOPA, es capaz de parecerse del todo al circuito control activado (Ctrl + CtxS). (B) Para ver si estos resultados se debieron al número de ciclos incompletos, los excluimos de los análisis y simplemente observamos el número de transiciones requeridas para cerrar un ciclo. Estos datos se muestran en gráficos de densidad comparados con Ctrl + CtxS (Kruskal-Wallis con corrección FDR post hoc): parkinsoniano + CtxS a los 30 min ( $P = 0.149$ ) y después del CtxS en presencia de un agonista DA determinado a los 60 min: L-DOPA + CtxS ( $P = 0.736$ ), rotigotina + CtxS (\*\* $P = 0.003$ ), pramipexole + CtxS ( $P = 0.199$ ) y ropinirole + CtxS (\*\* $P = 0.001$ ). Esta métrica muestra que la L-DOPA y el pramipexol producen un mejor rendimiento sobre la actividad del microcircuito que la rotigotina y el ropinirole después de CtxS. (C) Índice de recurrencia, indica la aparición de un ensamble altamente recurrente, mostrado en la gráfica de cajas como varianza incrementada, se compara con la prueba de homogeneidad de varianza de O'Brien. Con esta perspectiva, los tejidos parkinsonianos + CtxS (30 min)  $P = 0.073$  no fueron significativamente diferentes al Ctrl + CtxS. Mientras que los agonistas de DA + CtxS se compararon a los 60 minutos: L-DOPA + CtxS ( $P = 0.186$ ); rotigotina + CtxS ( $P = 0.079$ ); pramipexol + CtxS ( $P = 0.214$ ); ropinirole + CtxS,  $P = 0.071$ ), lo que demuestra que todos los agonistas dopaminérgicos tienen algún efecto positivo sobre los microcircuitos parkinsonianos estimulados.

La escala de color (en la parte inferior) muestra el número de transiciones necesarias para alcanzar un ciclo cerrado, el color negro indica los casos en donde no se alcanzó un ciclo cerrado durante el tiempo de registro. Incluso en condiciones control (Ctrl + CtxS), las secuencias de ensambles neuronales pueden no alcanzar un ciclo cerrado durante el curso del experimento (12%). Cuando los microcircuitos Parkinsonianos reciben un estímulo cortical (Pk + CtxS), el ensamble altamente recurrente se suprime

de forma transitoria y la dinámica del microcircuito ya no es significativamente diferente a los microcircuitos Ctr + CtxS, sólo una minoría de secuencias no alcanza ciclos cerrados (18%;  $P = 0.206$ ; prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección FDR post hoc). Esto confirma que la estimulación cortical alivia brevemente (30 min) al ensamble altamente recurrente del microcircuito estriatal parkinsoniano, lo que apoya la terapéutica basada en estimulación cortical. El mantenimiento de una dinámica de ensambles similar a la del control en microcircuitos Parkinsonianos, durante más tiempo, por ejemplo, 60 min; requiere de la acción de algún agonista dopaminérgico. Por lo tanto, aquí se compara en qué medida los distintos agonistas DA podrían prolongar la acción de CtxS en términos de secuencias temporales de los ensambles y ciclos cerrados que puedan formar.

Se encontró que la L-DOPA es capaz de inducir alternancia entre los ensambles en la condición estimulada, pero hay un mayor porcentaje de ciclos no cerrados, 36%, en comparación con Ctr + CtxS ( $P = 0.007$ ;  $n = 4$  experimentos; prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección post hoc de FDR, en esta y las siguientes comparaciones de la sección). Aun así, la mayoría de las secuencias temporales de ensambles tienen ciclos cerrados, usando la misma prueba, se observó que los otros agonistas también logran ciclos cerrados pero su distribución fue diferente a la distribución de secuencias de ensambles que exhiben los microcircuitos estriatales activados: rotigotina ( $P = 0.002$ ,  $n = 4$  experimentos), pramipexole ( $P = 0.016$ ,  $n = 4$  experimentos) y ropinirole ( $P = 1 \times 10^{-9}$ ,  $n = 4$  experimentos). Los resultados sugieren que ningún agonista DA, incluyendo la L-DOPA, es capaz de mostrar una dinámica completamente parecida a la del microcircuito estriatal Ctr estimulado, sin embargo, todas las dinámicas de los microcircuitos parkinsonianos tratados con algún agonista DA más CtxS presentan secuencias temporales de ensambles que forman ciclos cerrados. Entonces, nos preguntamos cuántas transiciones entre los ensambles son necesarias para alcanzarlos, excluyendo los casos en que los que no se logran ciclos cerrados durante el tiempo de registro. La Fig. 8B muestra esta comparación con gráficas de densidad: se comparó el Ctr + CtxS con de los microcircuitos Parkinsonianos más CtxS a los 30 min ( $P = 0.149$  Kruskal-Wallis, con corrección por FDR post hoc), con los microcircuitos parkinsonianos más agonistas DA y CtxS a los 60 min: L-DOPA ( $P = 0.736$ ), rotigotina (\*\* $P = 0.003$ ), pramipexole ( $P = 0.199$ ) y ropinirole (\*\* $P = 0.001$ ). Estos resultados sugieren que la L-DOPA y el pramipexole tienen un mejor desempeño que la rotigotina y el ropinirole para mostrar ciclos cerrados de actividad reverberante en el microcircuito estriatal Parkinsoniano. Con el fin de revelar la eficacia de los medicamentos y hacer una escala jerárquica entre ellos, calculamos el índice de recurrencia (Fig. 6F), una medida de si hay un ensamble altamente recurrente que reduce la alternancia con los otros ensambles como lo muestra el microcircuito patológico. Usando esta métrica, todos los agonistas DA fueron significativamente similares a la recurrencia que muestra la dinámica del control estriatal estimulado corticalmente (prueba de homogeneidad de varianza de O'Brien): parkinsoniano + CtxS (30 min)  $P = 0.073$ , y a los 60 min: L-DOPA + CtxS ( $P = 0.186$ ); rotigotina + CtxS ( $P = 0.079$ ); pramipexole + CtxS ( $P = 0.214$ ); ropinirole + CtxS,  $P = 0.071$ ). Los resultados sugieren que los agonistas DA clínicamente disponibles ayudan a mantener la dinámica del microcircuito estriatal lejos de la recurrencia del ensamble dominante, típico de la condición parkinsoniana, incluso si no logran preservar completamente los efectos de la CtxS a lo largo del tiempo.

Mediante el uso de la imagenología de calcio, con resolución de célula única y registrando docenas de neuronas simultáneamente, encontramos diferente eficiencia entre los agonistas dopaminérgicos para revertir la dinámica de la red patológica en ambas condiciones: el tejido en reposo no estimulado y el activo estimulado. La jerarquía en el desempeño de los agonistas fue: L-DOPA > agonistas D2 > agonistas D1,2.

## 5. Etapa en se encuentra el trabajo:

El bio-ensayo *in vitro*, en un modelo parkinsoniano, mostró su capacidad para evaluar fármacos anti-Parkinsonianos, pero ahora lo estamos desarrollando en otros modelos patológicos: discinético, Huntingtoniano y epiléptico.

## 6. Recursos humanos formados:

Una doctora en ciencias graduada y otro a punto de graduarse, mas una licenciada en investigación graduada realizaron los bio-ensayos. Cuatro Doctores en Ciencias graduados describieron la fisiología y fisiopatología del microcircuito estriatal. Con la dirección de un investigador principal.

Total, 6 D.C., 1 Lic.