

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN EN CIENCIAS Y DE LA SALUD

Posgrado en Doctorado en Biología Experimental



**“Cambios en el receptor dopaminérgico D₄ y en la subunidad α_3 del
receptor GABA_A en el núcleo reticular del tálamo ante la lesión
unilateral del globo pálido”**

T E S I S

Que para obtener el grado de Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A

M .en C. Angela Lizette Montoya Gress

Matricula: 2191800069

Correo: a.lizz.m.gress@gmail.com

Directores

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Dr. Alberto Alatorre Pérez

Jurado:

Presidente

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Secretario

Dra. Eunice Dalet Farfán García

Vocal

Dr. Gerardo Blancas Flores

Vocal

Dr. Marvin Antonio Soriano Ursua

Iztapalapa, CDMX a 29 de noviembre del 2024.

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

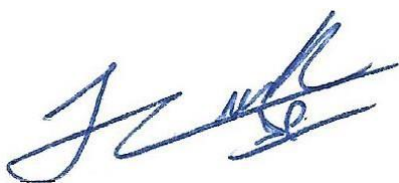
Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 665477

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Cambios en el receptor dopaminérgico D₄ y en la subunidad α_3 del receptor GABA_A en el núcleo reticular del tálamo ante la lesión unilateral del globo pálido”, que presentó

Angela Lizette Montoya Gress

Noviembre 29, 2024.

Sinodales:



Dr. Julio César Almanza Pérez

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa



Dr. Marvin Antonio Soriano Ursúa

Sección de Estudios de Posgrado e
Investigación.
Escuela Superior de Medicina del
Instituto Politécnico Nacional



Dra. Eunice Dalet Farfán García

Sección de Estudios de Posgrado e
Investigación.
Escuela Superior de Medicina del
Instituto Politécnico Nacional



Dr. Gerardo Blancas Flores

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Codirectora:

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Codirector:

Dr. Alberto Alatorre Pérez

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación.
Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional

Asesor:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Área de Medicina Experimental y Traslacional
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Agradecimientos

A mi madre

*Por guiarme, apoyarme y estar a mi lado en cada uno de los pasos que daba.
Q.E.P.D.*

A mi padre y hermanos

Por haberme acompañado en todo este recorrido, por ser mi fortaleza y por haberme brindado una vida llena de aprendizajes, experiencia y sobre todo felicidad.

A mis mentores

A los Doctores del laboratorio de farmacología de UAM-I, con los que inicié el este camino. A los Doctores de la ESM de los cuales me llevo de cada uno el mejor aprendizaje. A la Dra. Retana que me alentó e inspiró durante todo el proceso.

Gracias por haberme brindado su confianza, apoyo y dedicación para culminar este trabajo, que sin ustedes no hubiese sido posible lograrlo.

A mis amigos

Emmanuel, Arturo, Paulina, Iván, Michelle por su apoyo siempre incondicional después de tanto tiempo.

Y finalmente, al Dr. Quiroz, al Laboratorio de Fisiología y al Laboratorio Divisional de Biología Molecular, por el apoyo en la utilización de equipos para el desarrollo de algunas técnicas moleculares realizadas en este trabajo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

RESUMEN

El Núcleo Reticular del Tálamo (NRT) controla la actividad general cuando las neuronas talamocorticales procesan información. Las neuronas gabaérgicas de este núcleo expresan la subunidad α_3 en los receptores postsinápticos GABA_A para el GABA que liberan las neuronas del Globo Pálido (GP). De la misma manera, estas neuronas tienen receptores dopaminérgicos D₄ en sus terminales axónicas. El NRT conecta de manera recíproca con el tálamo y recibe aferencias de la corteza cerebral y de otras estructuras cerebrales que juegan un papel importante en la modulación de la red talámica. En este trabajo se evaluaron los efectos de la lesión unilateral del GP en la actividad eléctrica del NRT, así como los cambios que ocurren en la expresión del receptor D₄ y en la subunidad α_3 del receptor GABA_A. Para ello, se lesionó el GP derecho, utilizando ácido quinolínico, en ratas macho de 2 meses de edad. Siete días después de la lesión, ésta se confirmó mediante los giros ipsilaterales utilizando apomorfina. Mediante registros electrofisiológicos, se evaluó la actividad eléctrica de las neuronas del NRT. Posteriormente, se extrajo el NRT para evaluar la expresión del ARNm para el receptor D₄ y para la subunidad α_3 del receptor GABA_A mediante RT-PCR, Western blot e inmunohistoquímica. Los resultados electrofisiológicos mostraron que la lesión del GP causó un incremento en la frecuencia de disparo, así como disminución en el disparo en ráfagas de las neuronas reticulares. Además, la ARNm para el receptor dopaminérgico D₄ ARNm, así como la proteína se incrementaron. De modo contrario, el ARNm para la subunidad α_3 del receptor GABA_A se suprimió; sin embargo, la proteína se incrementó. Estos resultados muestran que el GP regula el disparo de las neuronas reticulares a través de los receptores D₄, así como la subunidad α_3 del receptor GABA_A en el núcleo reticular del tálamo.

Palabras clave: *núcleo reticular del tálamo, globo pálido, receptor D₄, subunidad α_3 del receptor GABA_A.*

ABSTRACT

The thalamic reticular Nucleus controls general activity when the thalamocortical neurons process information. GABAergic neurons in this nucleus express subunit α_3 of postsynaptic GABA_A receptors for GABA originating in Globus Pallidus neurons. Also, these neurons have dopaminergic D4 receptors in their axon terminals. The Thalamic Reticular Nucleus connects reciprocally with the Thalamus, and it receives afferents from the brain cortex, as well as from other brain structures that have an important role in the modulation of the thalamic network. This study was designed to assess the electrophysiological and molecular effects of unilateral lesion of the Globus Pallidus in the electric activity of the Thalamic Reticular Nucleus. The right Globus Pallidus of 2-month-old male rats was lesioned using quinolinic acid. Seven days after the lesion, ipsilateral turns were observed which confirmed the lesion. At this time, electrophysiological evaluation of the electrical activity of the thalamic reticular nucleus was performed. The right reticular nucleus was removed, and mRNA expression was assessed in D4 receptors and subunit α_3 using RT-PCR, Western blot and immunochemistry. The electrophysiology results showed of lesion of the Pallidus caused an increase in the firing frequency of reticular neurons. On the other hand, the molecular of D4 receptor and subunit α_3 showed increase in of expression after of unilateral lesion of the Globus Pallidus which suggests likely countervailing mechanisms associated with changes in the electrical activity of reticular neurons. Therefore, these results show that part destroying the pallidus disinhibit the reticular neurons, which increase its firing frequency due to the loss of GABAergic.

Key words: *thalamic reticular nucleus, globus pallidus, D4 receptors, GABA α_3 subunit.*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de las proyecciones glutamatérgicas corticotalámicas.	3
Figura 2. Posición del NRT rodeando al tálamo y sus núcleos.	4
Figura 3. Proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral hacia el tálamo	5
Figura 4. Circuito CT-RT-TC. NRT	6
Figura 5. Ganglios basales.....	7
Figura 6. Vías intrínsecas de los GB; vía directa, vía indirecta y vía hiperdirecta	9
Figura 7. Circuito cortico-estriado-pálido-nigral-tálamo-cortical	11
Figura 8. Circuitos cortico-estriado-pálido-tálamo-cortical.	13
Figura 9. Aferencias hacia el NRT. CT	15
Figura 10. Representación del mecanismo celular de generación de una espiga de calcio de bajo umbral.....	18
Figura 11. Modalidad de disparo de las neuronas reticulares talámicas.	19
Figura 12. Representación esquemática del mecanismo de acción las dos subfamilias de los receptores dopaminérgicos.	24
Figura 13. Representación esquemática de la conformación pentámerica de las subunidades que comprenden al receptor GABAA.	26
Figura 14. Diseño experimental.....	32
Figura 15. Ubicación del GP derecho	34
Figura 16. Conducta de giro en ratas con lesión unilateral del GP derecho.....	35
Figura 17. Ubicación del NRT derecho para la colocación del electrodo.	38
Figura 18. Extracción del tejido (NRT derecho).....	39
Figura 19. Fotomicrografías mostrando neuronas inmunorreactivas a anti-NeuN.....	48
Figura 20. Actividad eléctrica de las neuronas del NRT.	50
Figura 21. Expresión relativa del ARNm del receptor dopaminérgico D4 en el NRT.....	51
Figura 22. Distribución del receptor dopaminérgico D4 en el NRT.	52
Figura 23. Distribución de la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABAA en el NRT.	53
Figura 24. El análisis por Western blot de las proteínas en el receptor dopaminérgico D4 en el NRT.	54
Figura 25. El análisis por Western blot de la proteína de la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABAA en el NRT.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y secuencias de los primers utilizados en la RT-PCR.....	42
Tabla 2. Reactivos utilizados para la elaboración del gel de corrida y gel concentrador.....	45

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	El tálamo.....	1
1.2	Núcleo reticular del tálamo	3
1.3	Los ganglios basales	7
1.4	Conectividad intrínseca de los ganglios basales.....	11
1.5	Aferencias al NRT.....	13
1.6	Modalidades de disparo de las neuronas reticulares talámicas	15
1.7	Canales de Ca^{2+} tipo T	20
1.8	Vía pálido-reticular.....	22
1.9	Receptor dopaminérgico D_4	23
1.10	Subunidad α_3 del receptor $GABA_A$	24
2.	ANTECEDENTES	26
3.	JUSTIFICACIÓN	29
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	30
5.	HIPÓTESIS	30
6.	OBJETIVOS.....	30
6.1	Objetivo General.....	30
6.2	Objetivos particulares	30
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	31
7.1	Animales.....	31
8.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
8.1	Cirugía estereotáxica (lesión unilateral del GP)	32
8.2	Prueba de giro	34
8.3	Inmunohistoquímica para células inmunorreactivas a NeuN en el Globo Pálido	35
8.4	Registros electrofisiológicos.....	36
8.5	Obtención del NRT	38
8.6	Extracción del ARN total del NRT	40
8.7	Cuantificación relativa de la expresión del ARNm de la subunidad α_3 del	

receptor GABA _A y el receptor de Dopamina D ₄	40
8.8 Inmunohistoquímica para células inmunorreactivas a la subunidad α_3 del receptor GABA _A y el receptor de Dopamina D ₄	42
8.9 Western blot.....	44
Extracción de proteínas	44
8.10 Preparación de las proteínas	44
8.11 Preparación de los geles.....	44
8.12 Electroforesis y transferencia de proteínas	45
8.13 Análisis Estadístico.	46
9. RESULTADOS.....	47
9.1 Inmunohistoquímica para células inmunorreactivas a NeuN en el Globo Pálido	47
9.2 Actividad eléctrica.....	48
9.3 Expresión relativa del ARNm de los receptores de dopamina D ₄ y la subunidad	51
α_3 del receptor GABA _A	51
9.4 Inmunorreactividad del receptor dopaminérgico D ₄	52
9.5 Distribución de la subunidad α_3 del receptor GABA _A	53
9.6 Contenido del receptor dopaminérgico D ₄	54
9.7 Contenido de la subunidad α_3 del receptor GABA _A	55
10. DISCUSIÓN	56
11. CONCLUSIONES.....	61
12. PERSPECTIVAS.....	62
13. REFERENCIAS.....	63
RESEARCH PAPER	77

1. INTRODUCCIÓN

En 1984, Francis Crick afirmó que: *“El núcleo reticular del tálamo actúa como un “faro” para la entrada sensorial, es decir, un reflector dirigido desde el exterior que integra entradas corticales y subcorticales que posteriormente inhibe o desinhibe selectivamente a las células de relevo del tálamo, para que la información apropiada se pueda enviar a la corteza cerebral a través del tálamo.”*

1.1 El tálamo

La información proveniente de estímulos externos e internos se dirige al tálamo para pasar posteriormente a la corteza cerebral. El tálamo consiste en discretos núcleos organizados topográficamente con proyecciones recíprocas desde y hacia las regiones límbicas, cognitivas, motoras y sensoriales (visual, auditiva, gustativa y somatosensorial) de la corteza. El tálamo ha sido considerado tradicionalmente como una estación de relevo. Sin embargo, se ha demostrado que desempeña un papel clave en la transmisión e integración de la información [Clinton *et al.*, 2005, Pratt y Morrison 2015; Deleuze, C. y Huguenard, J.R., 2016].

Los núcleos talámicos procesan la información que envían a la corteza cerebral proveniente del medio externo, como son los estímulos visuales, auditivos o somatosensoriales, así como información interna asociativa, proveniente de la capa V de la corteza cerebral o de algún área del propio tálamo. Esta información es procesada a través de los circuitos recíprocos que interconectan al tálamo con la corteza, involucrando núcleos talámicos de primer orden, que desempeñan un papel crucial en la selección de señales sensoriales y transmiten información desde las vías

ascendentes a la corteza (vías iniciadoras), así como núcleos talámicos de orden superior que determinan cómo interpretar y procesar esta información; además, reciben información de un área cortical y la transmiten a otras áreas corticales, las cuales se conocen como vías moduladoras [Pinault, 2004; Zikopoulos y Barbas, 2010; Pinault, 2011].

Esta información es enviada a la corteza cerebral a través de proyecciones glutamatérgicas talamocorticales (TC). Sin embargo, la actividad de las neuronas TC depende de la actividad del único núcleo talámico que no proyecta hacia la corteza cerebral; se trata del núcleo reticular del tálamo (NRT), dado que el NRT recibe proyecciones unidireccionales glutamatérgicas provenientes de la corteza que excitan a las neuronas de proyección TC, que luego transmiten esta información a la corteza mediante proyecciones gabaérgicas. Las neuronas del NRT inervan a todas las células TC, controlando así de forma global toda la información que se procesa en los núcleos talámicos y que posteriormente se dirige a su respectiva área de asociación en la corteza cerebral [Guillery, 2003; Byoung-Kyong, 2010; Zikopoulos y Barbas, 2010; Halassa y Acsády, 2016]. Asimismo, el NRT recibe información de proyecciones colaterales por parte de las proyecciones TC, corticales y corticotálamicas (CT) glutamatérgicas. Las fibras CT surgen de las capas V y VI de la corteza cerebral [Pinault, 2004; Pinault, 2011; Pratt y Morrison, 2015]. De esta manera se forma un circuito entre las proyecciones TC, CT y reticulares, que tienen una estrecha retroalimentación entre ellas [Guillery, 2003 Byoung-Kyong Min, 2010], (Figura 1).

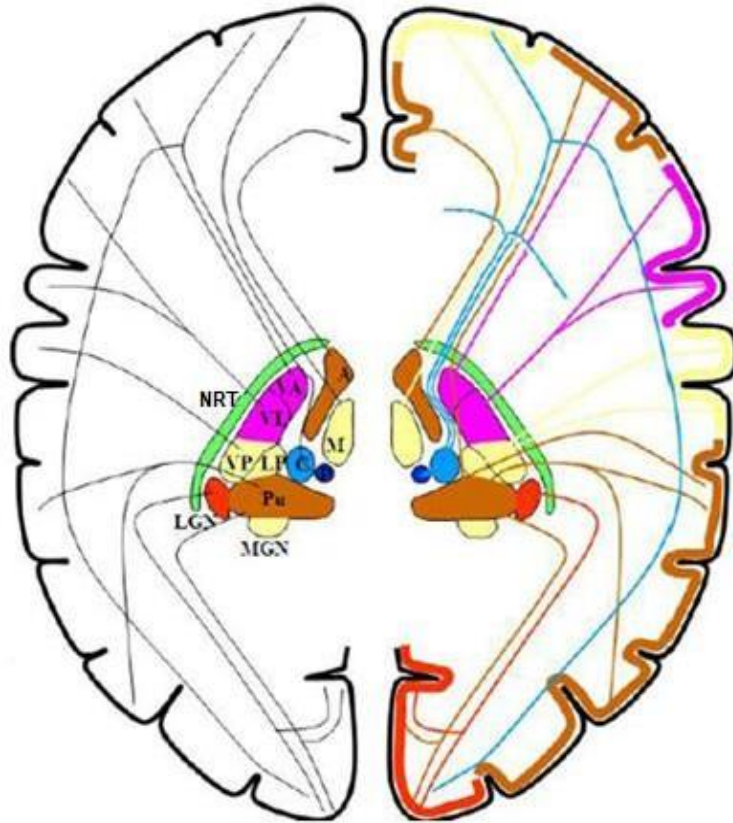


Figura 1. Diagrama de las proyecciones glutamatérgicas corticotálamicas.

Figura 1. Diagrama de las proyecciones glutamatérgicas corticotálamicas. (líneas en color negro) que proyectan a los diferentes núcleos talámicos. A, núcleo anterior, M, núcleo medial, VA, núcleo anterior ventral, VL, núcleo ventral lateral, VP, núcleo ventral posterior, LP, núcleo lateral posterior, Pu, núcleo pulvinar, C, núcleo centromedial, P, núcleo parafascicular, LGN, núcleo lateral geniculado, MGN, núcleo geniculado medial, NRT, núcleo reticular del tálamo; y las proyecciones glutamatérgicas talamocorticales (líneas en color) que se proyectan a las capas 4, 5 y 6 de la corteza formando así un circuito recíproco de intercambio de información entre los núcleos talámicos y la corteza cerebral. Imagen modificada de Byoung-Kyong Min, 2010.

1.2 Núcleo reticular del tálamo

El NRT es un cúmulo de neuronas gabaérgicas que rodea al tálamo [Florán et al., 2004; Sun et al., 2012; Ahrens et al., 2015; Hou et al., 2016; Villalobos et al., 2016], (Figura 2). Las neuronas reticulares no proyectan a la corteza cerebral, sino que envían

proyecciones gabaérgicas a los distintos núcleos talámicos que tiene en su vecindad, regulando su actividad de manera inhibitoria, dado que se encuentra en una posición clave entre la corteza y el tálamo; todas las proyecciones TC, CT y retículo-talámicas (RT) constituyen un circuito unificado y organizado topográficamente (Figura 3). Además, se han identificado siete sectores en el NRT: 1) motor, 2) auditivo, 3) visual, 4) somatosensorial, 5) límbico, 6) gustativo y 7) visceral [Shosaku y Sumimoto, 1983; Shosaku *et al.*, 1984; Clemente *et al.*, 2017; Crabtree, 2018].

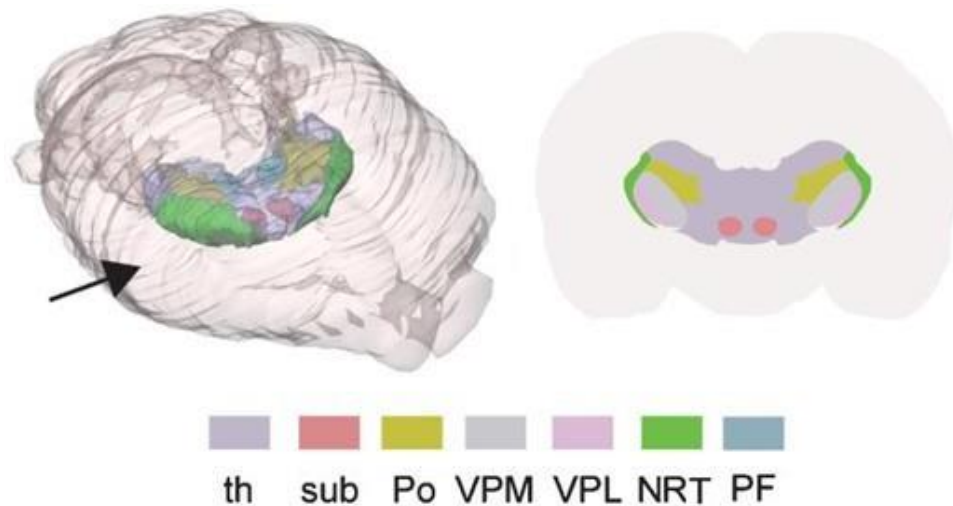


Figura 2. Posición del NRT rodeando al tálamo y sus núcleos.

Figura 2. Posición del NRT rodeando al tálamo y sus núcleos. th, tálamo; sub, núcleo talámico mediodorsal; Po, núcleo talámico posterior; VPM, núcleo talámico posterolateral ventral; VPL, núcleo talámico posteromedial ventral; NRT, núcleo reticular del tálamo; PF, núcleo talámico parafascicular. Imagen modificada de Hjernevik *et al.*, 2007.

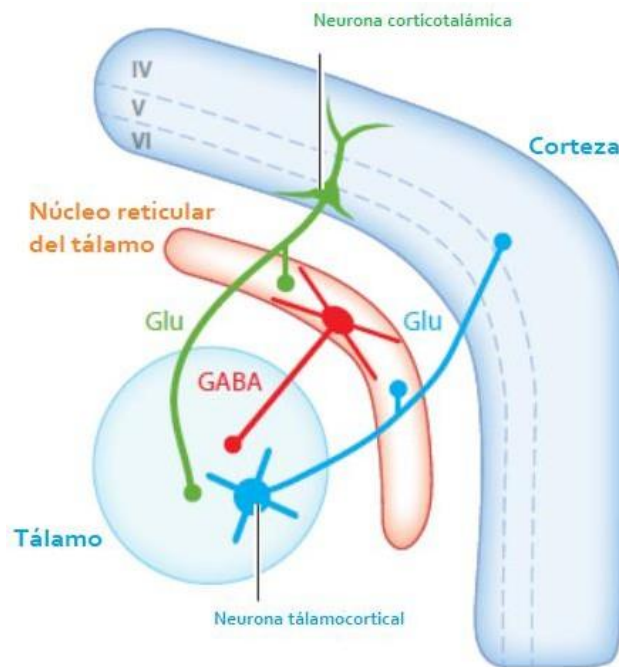


Figura 3. Proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral hacia el tálamo

Figura 3. Proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral hacia el tálamo, (neurona corticotalámica), proyecciones glutamatérgicas del tálamo hacia la corteza cerebral (neurona tálamocortical), proyecciones gabaérgicas por parte del NRT hacia el tálamo. GABA, ácido γ aminobutírico, Glu, glutamato. Imagen modificada de Pinault, 2004.

Muchas neuronas TC y CT inervan a una sola neurona GABAérgica del NRT y ésta, a su vez, envía proyecciones a muchas neuronas TC. Por esta razón, el NRT proporciona un medio para modular este circuito a través de sus proyecciones inhibitorias gabaérgicas hacia los núcleos talámicos. Los grandes campos receptivos para el NRT y sus células inhibitorias han llevado a la idea de que este tiene un papel integrativo, dado que cada sector del NRT recibe proyecciones de las correspondientes neuronas corticales y talámicas proyectándose de regreso al núcleo talámico que lo inerva [Pratt y Morrison, 2015; Woodward y Heckers, 2016].

También se cree que este núcleo comunica a la corteza y al estriado a través del circuito formado por las proyecciones TC-RT-CT en la activación de las neuronas reticulares, que pueden inhibir e interrumpir temporalmente la activación de neuronas de algún núcleo talámico que se encuentra en su vecindad. Estas interacciones entre pares de núcleos talámicos son recíprocas y modulan la transmisión de información a través del tálamo hacia la corteza cerebral, el estriado o bien alguna estructura de los ganglios basales (GB) [Crabtree, 2018], (Figura 4).

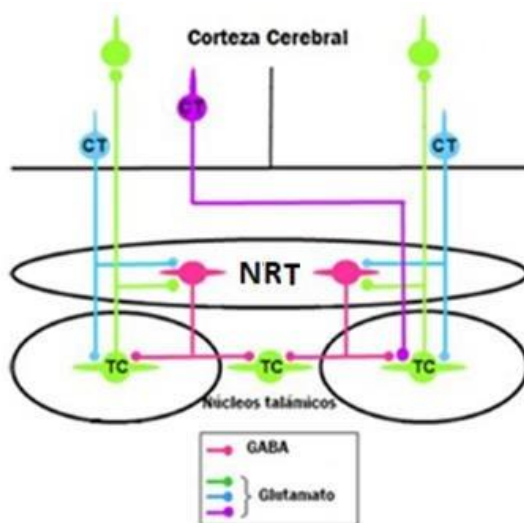


Figura 4. Circuito CT-RT-TC. NRT

Figura 4. Circuito CT-RT-TC. NRT. NRT que envía proyecciones inhibitorias gabaérgicas a los núcleos talámicos (rosa), CT, proyecciones excitatorias glutamatérgicas corticotálamicas provenientes de la corteza cerebral (verde y morado), TC, proyecciones excitatorias glutamatérgicas talamocorticales que van de los núcleos talámicos hacia la corteza cerebral y el NRT (azul). Imagen modificada de Crabtree, 2018.

1.3 Los ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son núcleos subcorticales bilaterales que forman un circuito altamente interconectado, poseen una estrecha relación anatómica y funcional con el tálamo y la corteza cerebral. Están constituidos por el núcleo caudado y el putamen (que en roedores se denominan colectivamente cuerpo estriado), el globo pálido (GP) con sus dos segmentos interno (llamado núcleo entopeduncular en los roedores) y el externo (se denomina simplemente GP en roedores), la sustancia negra (SN), compuesta por dos partes pars reticulata (SNr) y pars compacta (SNc) y el núcleo subtalámico (NST) [Parent y Hazrati, 1995; Knierim, 1997; Haber, 2003; Grillner *et al.*, 2020], (Figura 5).

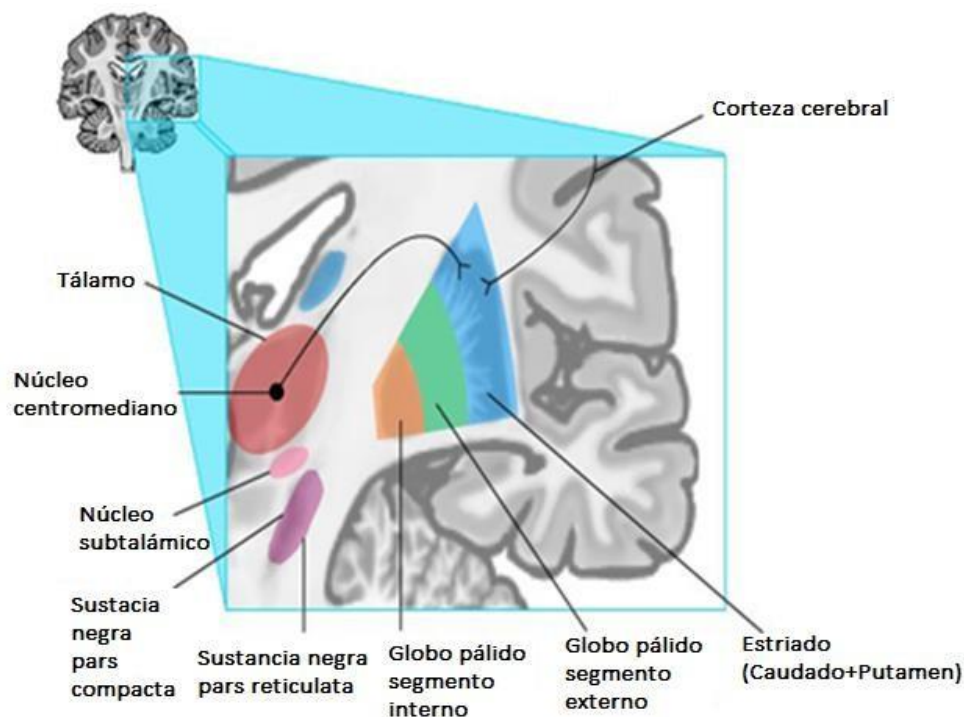


Figura 5. Ganglios basales

Figura 5. Ganglios basales. Imagen modificada de Knierim, 1997.

El cuerpo estriado es la estructura más grande de los GB y la principal entrada de información sensoriomotora [Ávila y Nava, 2014; Prager, 2019]. Los GB tienen una entrada excitatoria (glutamatérgica) que surge de toda la corteza cerebral y de los núcleos intralaminares del tálamo (central lateral, paracentral, centromediano y parafascicular), mientras que el GP interno (GPi) y la SNr constituyen los núcleos de salida donde ambas estructuras establecen conexiones gabaérgicas inhibitorias [Knierim, 1997; Hauber *et al*, 1998].

Los GB influyen en varios sistemas neuronales, dando lugar a las siguientes vías: la vía directa, que facilita el movimiento, comienza con las células del cuerpo estriado que envían proyecciones inhibitorias (gabaérgicas) a las células del GPi; las células del GPi, a su vez envían proyecciones gabaérgicas a las células del tálamo y la vía indirecta que inhibe el movimiento, la cual comienza con células del cuerpo estriado enviando proyecciones gabaérgicas con las células del GPe que proyecta células gabaérgicas al núcleo subtalámico (NST), el cual envía proyecciones excitatorias glutamatérgicas al GPi y, finalmente, estas células envían proyecciones inhibitorias a las neuronas talámicas. Ambas vías participan en la iniciación, ejecución y terminación de las secuencias motoras y son consideradas como vías intrínsecas de los GB, ambas vías son moduladas por la vía nigroestriatal, que es considerada una vía mixta, dado que a través de sinapsis dopaminérgicas tiene efectos excitatorios por parte del receptor dopaminérgico D₁ en la vía directa y con efectos inhibitorios por parte del receptor D₂ en la vía indirecta. Finalmente, la vía hiperdirecta, en la cual, la información de las distintas áreas corticales llega directamente al NST, sin pasar por el estriado.

Es decir, el NST dejó de considerarse una estación de relevo de la vía indirecta. El resultado neto es la excitación rápida del GPi y SNr, con la subsecuente inhibición del movimiento [Parent y Hazrati, 1995; Knierim, 1997; Benarroch, 2016; Grillner *et al.*, 2020], (figura 6).

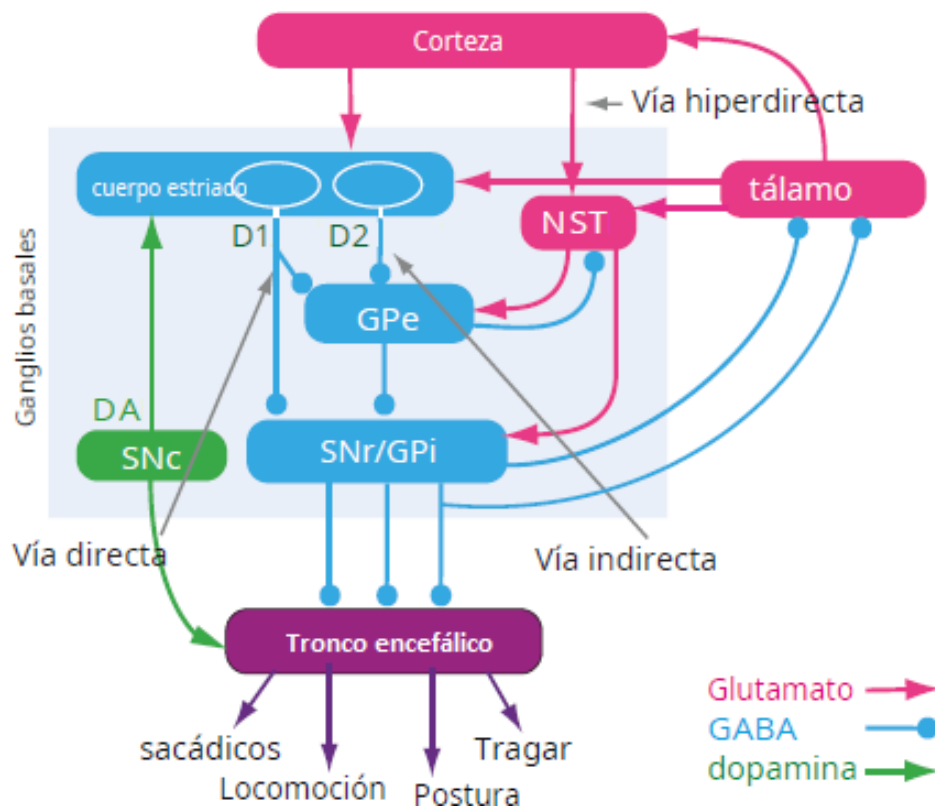


Figura 6. Vías intrínsecas de los GB; vía directa, vía indirecta y vía hiperdirecta

Figura 6. Vías intrínsecas de los GB; vía directa, vía indirecta y vía hiperdirecta. Cuerpo estriado; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; SNc, sustancia negra compacta; SNr, sustancia negra reticulata; NST, núcleo subtalámico. Imagen modificada de Grillner *et al.*, 2020.

También, existen proyecciones de los GB al NRT, que se originan en el GP y la SNc; estas proyecciones están asociadas con la vía talamocortical, que a menudo se trata como una simple vía de relevo unidireccional de proyecciones glutamatérgicas excitatorias de regiones talámicas límbicas, cognitivas, motoras y sensoriales (visual, auditiva, gustativa y somatosensorial) hacia la corteza. Sin embargo, esta vía no transfiere información de forma pasiva, sino que desempeña un papel clave regulando a la corteza cerebral a través de sus proyecciones a los diferentes núcleos subcorticales [Haber, 2003; Byoung-Kyong, 2010; Clemente *et al.*, 2017].

Como se mencionó anteriormente, los GB están localizados estratégicamente para interactuar o actuar en conjunto con la corteza cerebral. Sin embargo, a pesar de su relación privilegiada con la corteza, aún no se sabe cómo los GB complementan las funciones de la corteza, dado que la corteza impone una organización sobre ellos a través de proyecciones de sus diferentes capas. Los GB transmiten e integran información sensoriomotora a través de sus circuitos que se forman entre estas estructuras subcorticales. La proyección cortico-estriatal forma interconexiones que dan paso a la información cortical a lo largo del sistema cortico-estriado-pálido-nigral-tálamo-cortical (Figura 7), representando el primer paso en la transposición de información entre la corteza y los núcleos subcorticales y se cree que es de suma importancia para determinar la naturaleza de la información que se transmite e integra a través de los circuitos de los GB [Garret, 1986; Parent y Hazrati, 1995].

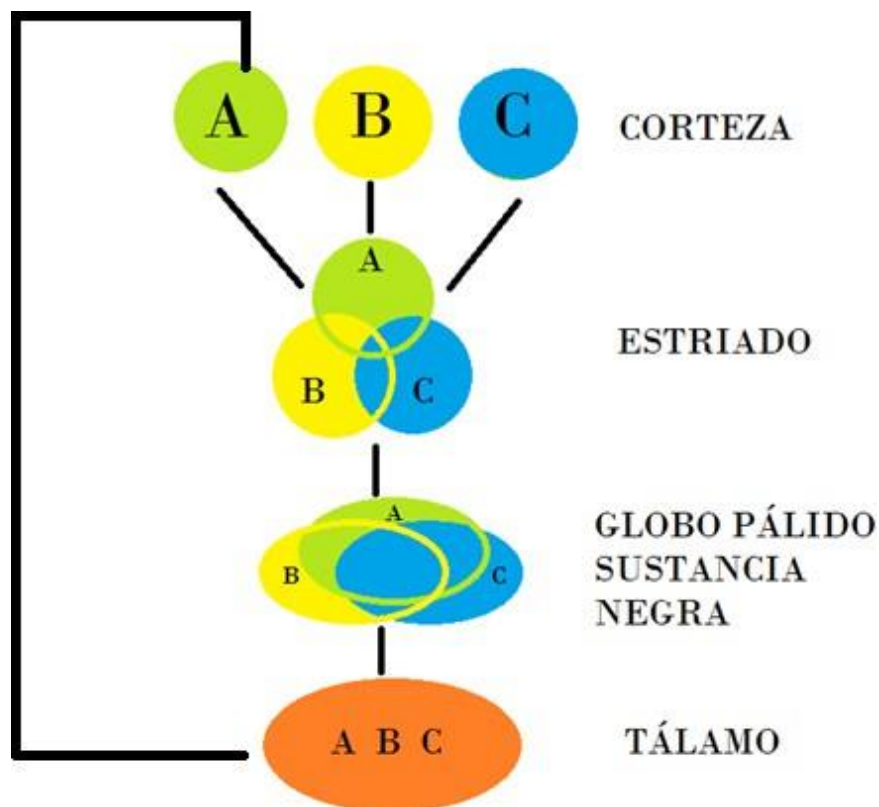


Figura 7. Circuito cortico-estriado-pálido-nigral-tálamo-cortical

Figura 7. Circuito cortico-estriado-pálido-nigral-tálamo-cortical. A, B, C, áreas de la corteza cerebral funcionalmente relacionadas e interconectadas, que envían información al cuerpo estriado que a su vez envía proyecciones a las estructuras subcorticales pertenecientes a los GB que proyectan a una región específica del tálamo y finalmente, el tálamo proyecta a alguna área específica de la corteza que asocia el mismo tipo de información, completando así el circuito. Imagen modificada de Garret, 1986.

1.4 Conectividad intrínseca de los ganglios basales

Las entradas corticales al cuerpo estriado se originan principalmente en la capa V de la corteza cerebral (áreas sensitivas, motoras y de asociación) y de las neuronas corticoestriatales, que proyectan a varias estructuras subcorticales incluidas el tálamo,

el núcleo subtalámico, el mesencéfalo, los núcleos pedúnculopontinos, el bulbo raquídeo y la medula espinal así los GB desempeñan un papel crucial en el procesamiento de la información sensoriomotora [Kreitzer y Malenka, 2008; Benarroch, 2016].

La organización corticotalámica se incorpora a los circuitos cortico-estriado-pálido-tálamo-cortical, lo que representa las conexiones estructurales entre la corteza, los ganglios basales y el tálamo. Los circuitos cortico-estriado-pálido-tálamo-cortical están organizados topográficamente como una serie de circuitos que comienzan en la corteza y se proyectan, a través de los ganglios basales, al tálamo y de vuelta a la zona original de proyección cortical que está implicada en múltiples funciones, como el procesamiento de estímulos sensoriales (facilitando la transmisión de estímulos relevantes frente a estímulos no relevantes), atencionales, asociativos, y sensoriomotores [Sherman y Guillery, 2006; Kimura, *et al*, 2012; Foster *et al*, 2021]. Cada circuito recibe múltiples entradas de la corteza, que se integran posteriormente a su paso por el GP y la sustancia negra, una porción restringida del tálamo y de ahí a su respectiva área de asociación cortical. Cada circuito tiene una proyección TC de regreso que está parcialmente restringida a una de las múltiples fuentes de entrada a la corteza. Por lo tanto, las múltiples entradas de la corteza hacia una sola área cortical se llevan a cabo progresivamente en los niveles estriatal, palidal, nigral y talámico. Al parecer, cada circuito de los ganglios basales y talamocortical recibe múltiples entradas de la corteza, pero solo en zonas corticales funcionalmente relacionadas y normalmente interconectadas [Garrett, 1986; Avram *et al.*, 2018], (Figura 8).

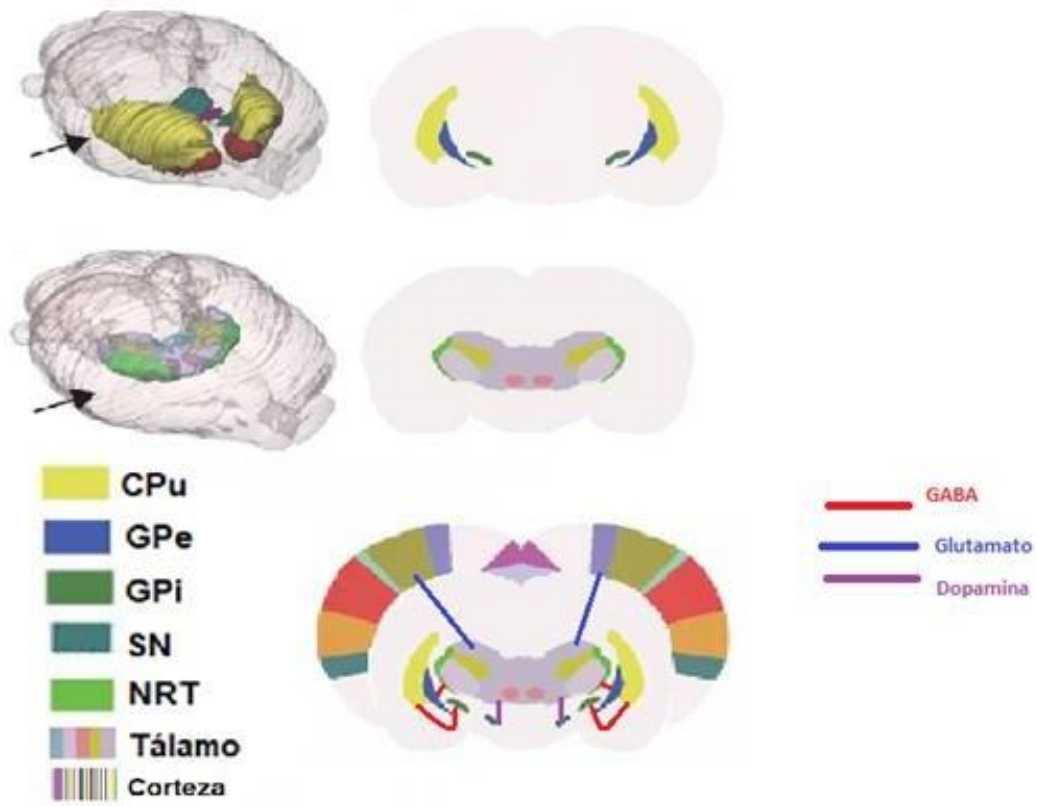


Figura 8. Circuitos cortico-estriado-pálido-tálamo-cortical.

Figura 8. Circuitos cortico-estriado-pálido-tálamo-cortical. CPu, cuerpo estriado, GPe, globo pálido externo, GPi, globo pálido interno, SN, sustancia negra, NRT, núcleo reticular del tálamo. Imagen modificada de Hjernevik *et al.*, 2007.

1.5 Aferencias al NRT

El NRT no solo recibe proyecciones glutamatérgicas del tálamo y de la corteza cerebral, sino también proyecciones gabaérgicas provenientes del GP y proyecciones dopaminérgicas desde la pars compacta de la sustancia negra (SNc) (estructuras subcorticales que pertenecen a los ganglios basales). Sin embargo, las neuronas de

la SNc no hacen sinapsis directamente con las neuronas del NRT, sino con las neuronas gabaérgicas del GP [Govindaiah *et al.*, 2010]. De manera adicional, el NRT recibe aferencias provenientes de diversas estructuras encefálicas, tales como proyecciones noradrenérgicas del locus coeruleus, proyecciones serotoninérgicas del núcleo dorsal de rafe y proyecciones colinérgicas del núcleo pedúnculo pontino. La influencia de estos núcleos pertenecientes al Sistema Reticular Activador Ascendente (SRAA) sobre el NRT, regula la transmisión del paso de un estado de sueño a uno de vigilia, la influencia de estos neurotransmisores modifica el patrón de disparo de las neuronas reticulares, pasando de ráfagas a disparo tónico. [Morrison y Foote, 1986; Pinault, 2004], (Figura 9).

Dicho de otra forma, el NRT es la estructura de control selectivo de información, mediante el modo de disparo de sus neuronas inhibe o desinhibe (la fuerza inhibitoria no es constante, sino debe adaptarse a los patrones dinámicos cambiantes y a la actividad de la red) a las neuronas de relevo talámicas para seleccionar la información relevante proveniente de las diferentes estructuras mencionadas anteriormente y que va a su respectiva área de asociación cortical.

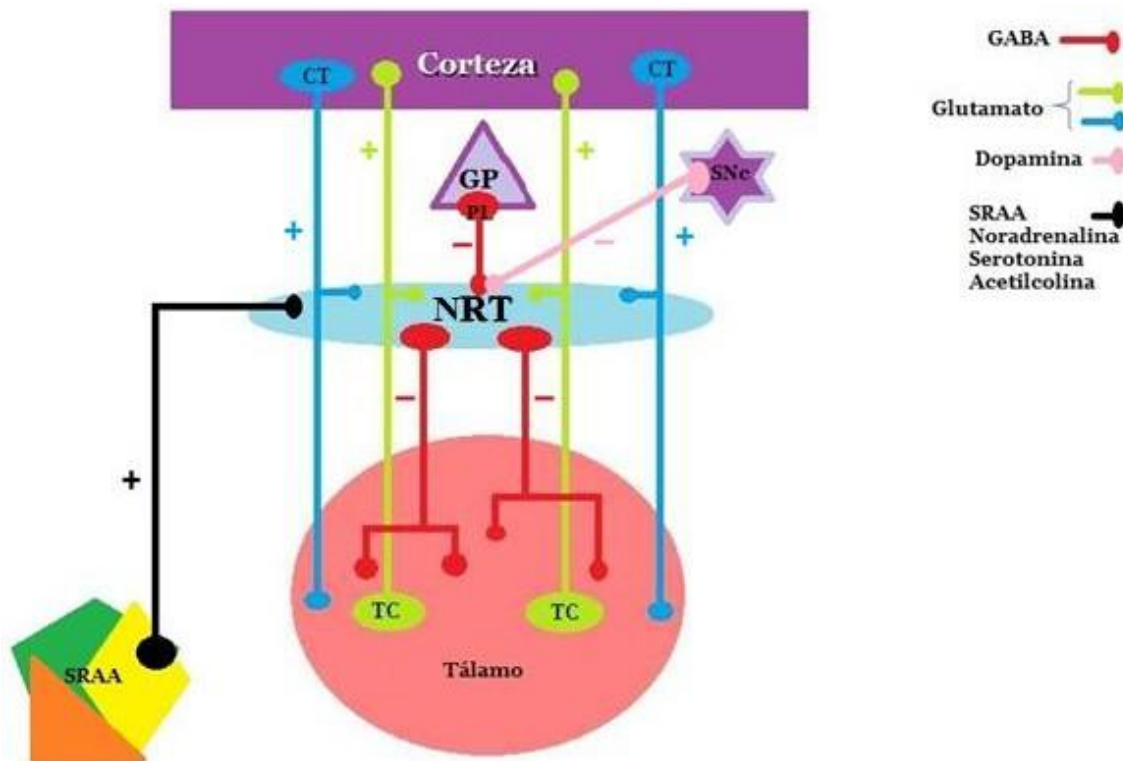


Figura 9. Aferencias hacia el NRT. CT

Figura 9. Aferencias hacia el NRT. CT, proyecciones corticotalámicas glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral hacia el tálamo y el NRT, TC, proyecciones talamocorticales glutamatérgicas que van del tálamo hacia la corteza cerebral y el NRT, SNc, la sustancia negra pars compacta envía proyecciones dopaminérgicas a las neuronas palidales, el GP envía proyecciones gabaérgicas hacia el NRT, el NRT, envía proyecciones gabaérgicas al tálamo, SRAA, sistema reticular activador ascendente envía proyecciones excitatorias (serotonina, acetilcolina y adrenalina) al NRT.

1.6 Modalidades de disparo de las neuronas reticulares talámicas

Las neuronas del NRT tienen dos tipos de respuesta neuronal, el modo tónico y las ráfagas de bajo umbral, definidas por el estado de polarización de la membrana celular. Éstas están relacionadas con la forma en la cual se produce la transmisión de información entre el tálamo y la corteza. En condiciones de despolarización, las células

disparan en modo tónico, generando potenciales de acción individuales de frecuencia variable, mientras que, ante estados de hiperpolarización de la membrana, las neuronas responden mediante ráfagas de bajo umbral.

La modalidad de disparo depende del potencial de membrana en reposo de una neurona. Cuando el potencial de membrana se encuentra en valores menos negativos (alrededor de -65/mV), el disparo es tónico. Si el voltaje de membrana se hiperpolariza (-65/mV) el disparo es en ráfagas [Bazhenov *et al*, 1999; Pinault, 2004; Byoung-Kyong, 2010; Pratt y Morrison, 2015]. La hiperpolarización de la membrana activa canales de Ca^{2+} de bajo umbral, también llamados canales tipo T (CaV3.2 y CaV3.3) [Bal y McCormick, 1996] cuya activación permite el ingreso de Ca^{2+} y la despolarización de la membrana ocasionando una meseta cuya duración abarca de 100 a 200 ms. Durante la meseta se genera el disparo en ráfagas.

Definir un potencial de acción tónico es relativamente sencillo, ya que éste corresponde a los potenciales de acción conocidos como clásicos o convencionales, producidos por la permeabilidad selectiva de la membrana celular, mediante canales dependientes de voltaje, para los iones Na^+ y K^+ , generando una despolarización de la membrana seguida de una hiperpolarización de ésta, para regresar de nuevo a un estado de equilibrio (potencial de reposo o membrana). Además de la conductancia a los iones Na^+ y K^+ , la conductancia de bajo umbral al Ca^{2+} es la más importante en las células neuronales talámicas y es el mecanismo que subyace al disparo en ráfagas. La corriente IT (corriente transitoria), es la corriente responsable de las

despolarizaciones transitorias sobre las que ocurren las ráfagas de potenciales de acción durante este tipo de disparo. Teniendo en cuenta que una corriente IT es en un rango pequeño de voltaje cercano al potencial de membrana de reposo, los canales pueden abrirse sin inactivar completamente dejando pasar a la célula una cantidad de iones de calcio que despolarizan la membrana celular [Sherman y Guillery, 2002; Rangel, 2020].

Las ráfagas de bajo umbral se generan cuando la corriente IT se encuentra activa, para lo cual es preciso que se produzca una hiperpolarización previa de la membrana de una duración mínima de 50 ms. Por el contrario, durante la respuesta tónica, la corriente IT se encuentra inactiva, debido al estado de despolarización de la membrana, impidiéndose la entrada de calcio al interior celular y generándose potenciales de acción convencionales tónicos [Ramcharan *et al.*, 2005; Gutierrez *et al.*, 2001] (Figura 10).

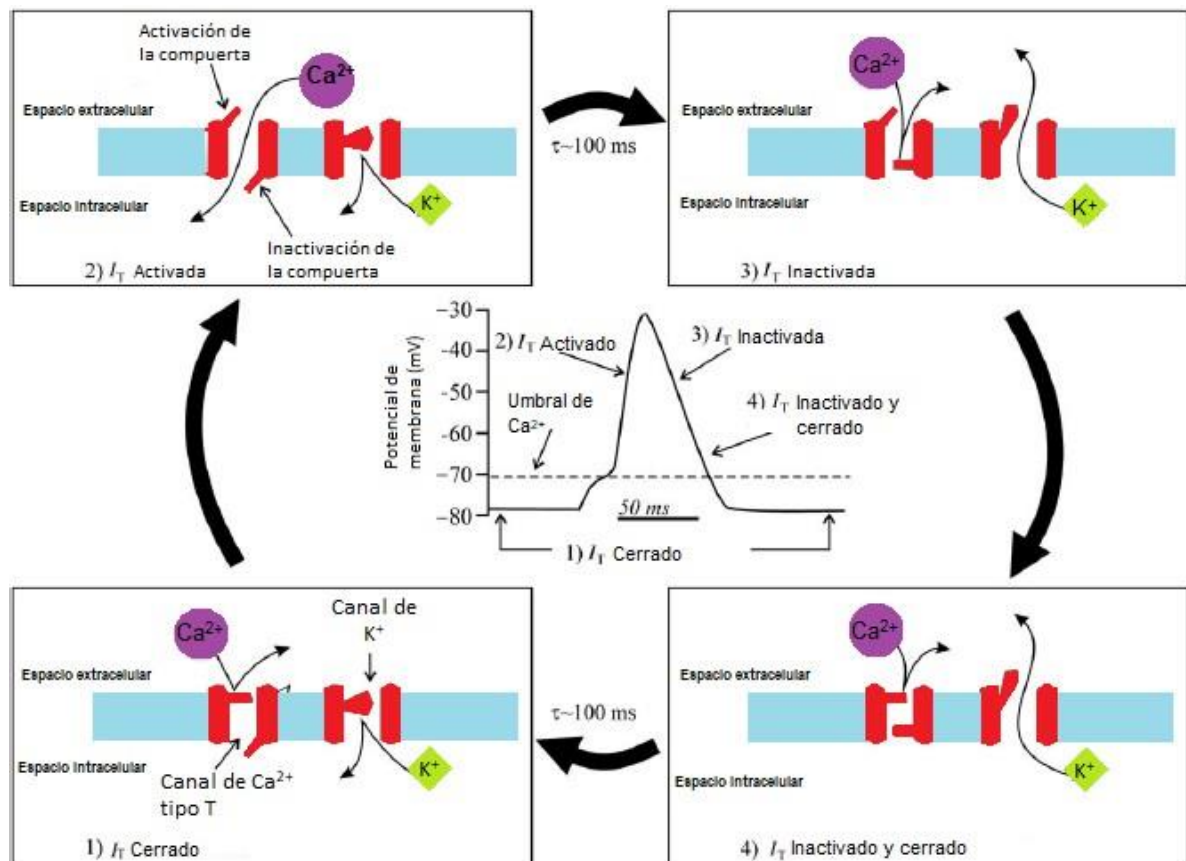


Figura 10. Representación del mecanismo celular de generación de una espiga de calcio de bajo umbral

Figura 10. Representación del mecanismo celular de generación de una espiga de calcio de bajo umbral. **1)** Representación de canal T (canal de Ca^{2+}) cerrado, al igual que los canales de K^+ **2)** Apertura del canal T por hiperpolarización de la membrana celular, durante al menos 50 ms y generación de la corriente I_T **3)** Inactivación del canal T por despolarización de la membrana plasmática y apertura de los canales de K^+ para devolver el potencial de membrana a su valor en reposo **4)** Canal T inactivado y cerrado. Potencial de membrana en reposo. Imagen modificada de Sherman y Guillery, 2006.

La diferencia en la proporción de espigas de ambos modos de disparo está relacionada con la función que cada modo de disparo desempeña en la transmisión de información hacia la corteza cerebral [Sherman y Guillery, 2006].

Las espigas tónicas son las encargadas de un procesamiento posterior y detallado de la información que llega de las neuronas de relevo talámicas para seleccionar la información relevante que se dirigirá a su respectiva área de asociación cortical. Las espigas en modo ráfaga responden a la desviación de la información hacia las cortezas primarias y redirigen la información hacia áreas de asociación, para procesos de memoria y hacia la corteza primaria de memoria, para recordar la información. De forma proporcional, ambos tipos de disparo el tónico y en ráfagas están presentes y responden de igual forma, debido a que las neuronas reticulares reciben diferentes estímulos e intercalan el disparo tónico y el disparo en ráfagas [Guido *et al.*, 1995], (Figura 11).

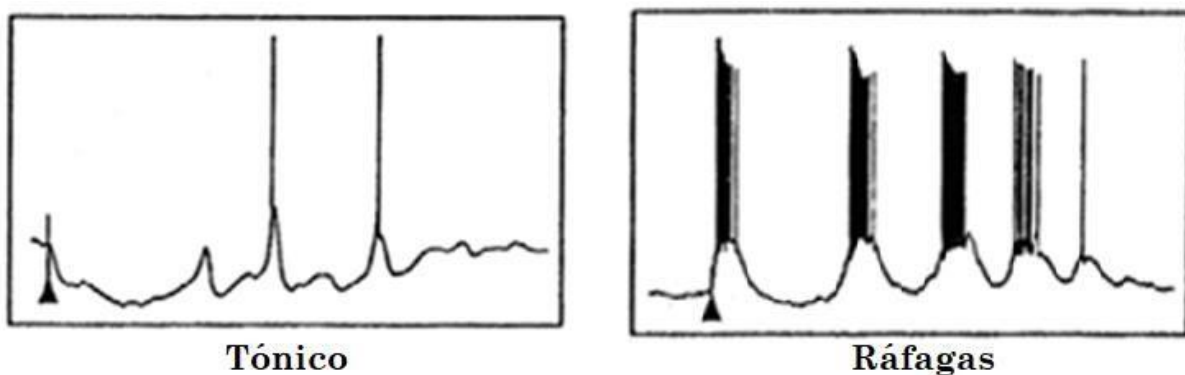


Figura 11. Modalidad de disparo de las neuronas reticulares talámicas.

Figura 11. Modalidad de disparo de las neuronas reticulares talámicas. El disparo tónico está presente cuando el voltaje de membrana se encuentra por arriba de los -60mV (despolarización) y el disparo en ráfagas cuando el voltaje de membrana está por debajo de -60mV (hiperpolarización). Imagen modificada de Steriade *et al.*, 2005.

1.7 Canales de Ca^{2+} tipo T

Los canales de Ca^{2+} se clasifican en dos tipos: dependientes de voltaje y dependientes de ligando. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son más prominentes y estos responden a cambios de voltaje de membrana que permite la entrada de iones de Ca^{2+} a través de ella. Estos canales dependientes de voltaje se subdividen a su vez en dos tipos: canales activados por alto voltaje, que son los canales tipo L, P, Q y N; canales activados por bajo voltaje tipo T. Los canales de Ca^{2+} tipo T se han asociado con una amplia gama de procesos fisiológicos como el sueño, el disparo neuronal, el dolor y la coordinación motora [Kaur *et al.*, 2019].

Los canales de Ca^{2+} tipo T median picos de Ca^{2+} de bajo umbral en las neuronas, lo que lleva a oscilaciones rítmicas. Estos canales se consideran activados por bajo voltaje (LVA). Los canales de Ca^{2+} requieren una despolarización de la membrana mucho menor para su apertura y producen una corriente IT que decae tan pronto como la corriente alcanza su máximo nivel en la célula, lo que llevó a su designación como tipo “T” para “transitorio”. Esta inusual sensibilidad al voltaje de los canales de Ca^{2+} tipo T hace que sean capaces de regular la excitabilidad celular y el potencial de membrana en reposo. Las neuronas TC, con un potencial de membrana en reposo despolarizado o una hiperpolarización transitoria de membrana que surge de los potenciales postsinápticos inhibitorios (PPIs) o la activación de ciertos tipos de canales de K^+ pueden desactivar los canales de Ca^{2+} tipo T. El posterior rebote de potencial de membrana desencadena su apertura y la resultante entrada de Ca^{2+} despolariza el potencial de membrana para alcanzar el umbral de los canales de Na^+ , iniciando así un tren de potenciales de acción. Se han identificado tres subtipos de

canales de Ca^{2+} tipo T: designados como Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3. Se sabe que los tres subtipos generan el componente de estado estacionario de las corrientes de Ca^{2+} tipo T, denominado corriente de “ventana” que se define como una superposición entre las curvas de activación y de inactivación en un estado estacionario. La cinética de recuperación de la inactivación es fundamental para que los canales tipo T desencadenen picos de rebote de bajo umbral (LTS). Dada la rápida recuperación de los canales tipo T durante un PPI, esto causa la desactivación de los canales, seguida de la apertura de éstos a medida que el potencial de membrana regresa a su potencial de reposo. Los tres subtipos de canales de Ca^{2+} , Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3 están altamente expresados en el circuito TC. En particular, los tres subtipos muestran un patrón de expresión ampliamente complementario en el tálamo; el Cav3.1 se expresa exclusivamente en regiones TC, mientras el Cav3.2 y Cav3.3 son abundantes en las neuronas gabaérgicas del NRT. El circuito talámico está compuesto por neuronas excitatorias TC y CT, así como neuronas inhibitorias del NRT. Se ha demostrado que las entradas inhibitorias del NRT a las neuronas TC van seguidas de una respuesta post inhibitoria, en la que el rebote del potencial de membrana induce el disparo de las neuronas TC y esto, a su vez, activa a las neuronas reticulares. Extensas conexiones sinápticas comunican a las neuronas TC y del NRT y juntas crean un circuito intratalámico recíprocamente inervado [Cheong y Shin, 2013].

1.8 Vía pálido-reticular

Desde inicios de los noventa, se ha descrito la presencia de proyecciones gabaérgicas provenientes del GP al NRT, cuyo papel en la actividad de las neuronas reticulares no ha sido analizado a profundidad [Asanuma, 1990; Cornwall, 1990; Hazrati, 1991; Gandia, 1993; Asanuma, 1994]. En la literatura son escasos los trabajos en donde se ha abordado el estudio de la vía pálido reticular [Pazo, 2013]. Sin embargo, algunos estudios indican la presencia de una elevada cantidad de receptores D₄ dentro del NRT cuya localización, de acuerdo con análisis electrofisiológicos y farmacológicos, se encuentran en las terminales de las neuronas pálido-estriatales, modulando de manera inhibitoria la descarga de GABA de las neuronas reticulares [Mrzljak, 1994; Defagot, *et al.*, 1997; Gasca-Martinez, 2010; Govindaiah *et al.*, 2010]. Estas observaciones implican que las proyecciones palidales pueden inhibir la actividad de las neuronas reticulares a través de la liberación de GABA.

De acuerdo con estudios *postmortem*, las neuronas reticulares expresan la subunidad α_3 del receptor GABA_A. El receptor GABA_A se ensambla a partir de cinco subunidades para formar la estructura pentámerica que conforma un canal de Cl⁻. La subunidad α_3 del receptor GABA_A es de especial interés, dado que la unión de GABA al receptor GABA_A induce la apertura de los canales iónicos de Cl⁻, lo que permite el paso de los iones a favor de un gradiente de concentración que hace más negativo el potencial de membrana y, como consecuencia, provoca la hiperpolarización de las neuronas reticulares que generan el disparo en ráfagas. Por lo tanto, el déficit de la subunidad α_3 del receptor GABA_A da como resultado neuronas reticulares disfuncionales [Bollan, 2003; Yee, *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007].

1.9 Receptor dopaminérgico D₄

De acuerdo con diversos estudios, se sabe que la mayoría de los receptores D₄ se encuentran localizados en las proyecciones colaterales gabaérgicas que van del GP al NRT. Más aún, las neuronas del GP movilizan y concentran más al receptor D₄ en las terminales pálido-nigrales y probablemente en todas sus áreas de proyección, en mayor medida, para establecer un control funcional robusto de la liberación de GABA [Erlj, *et al.*, 2012; Conde, 2020].

Las funciones de los receptores dopaminérgicos por lo general se han asociado con la vía de señalización que incluye la síntesis de AMPc y la activación de PKA, mediada por proteínas G. Existen cinco subtipos de receptores acoplados a proteínas G, estos receptores se han dividido en dos grupos: los receptores D₁, que comprenden a los receptores D₁ y D₅. Los receptores de esta clase generalmente se acoplan a las proteínas G_{as/olf} y su activación aumentan los niveles de adenilato ciclasa, la producción de AMPc y la activación de PKA. En contraste, los receptores D₂ que comprenden a los receptores D₂, D₃ y D₄, se acoplan a las proteínas G_{ai/o} y el resultado de su activación es la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, lo que causa la supresión de la síntesis de AMPc y la disminución de la actividad de PKA [Lindgren *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2011].

El análisis de la estructura del receptor de dopamina ha revelado una homología considerable entre los miembros de la misma familia. Los receptores D₂ y D₃ comparten el 75% de identidad en su dominio transmembrana y los receptores D₂ y D₄ un 53%. Con respecto a su extremo N-terminal, es aproximadamente siete veces más

largo para los receptores de la familia D₁ que para los de la familia D₂ [Rondou, 2010], (Figura 12).

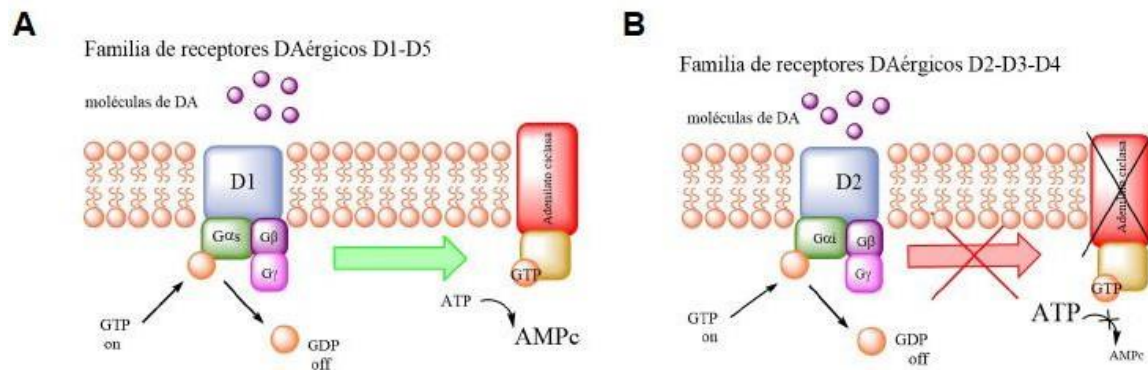


Figura 12. Representación esquemática del mecanismo de acción las dos subfamilias de los receptores dopaminérgicos.

Figura 12. Representación esquemática del mecanismo de acción las dos subfamilias de los receptores dopaminérgicos: A) D1 y D5 modulación excitatoria, por activación de proteínas G_s; B) D2-D3-D4, modulación inhibitoria debida a la activación de proteínas G_i. AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; GDP, guanósín difosfato; GTP, guanósín trifosfato, proteína G, proteína formadora del nucleótido de guanina, α_s , α_i , β , γ . Imagen tomada de Moreno 2017.

1.10 Subunidad α_3 del receptor GABA_A

Los receptores GABA_A son parte de canales de cloro (Cl⁻) activados por ligando y son los responsables de la rápida inhibición sináptica en el cerebro. En los mamíferos, se construyen como estructuras pentáméricas y se han identificado distintos subtipos. Su heterogeneidad está basada en una familia de al menos 17 subunidades que se agrupan en cinco principales: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ y ρ . La estructura pentámerica del receptor GABA_A es el resultado de las diferentes combinaciones de las 17

subunidades, existe una gran variedad de subtipos del receptor GABA_A y estos son responsables de la diversidad funcional de los receptores GABA en el cerebro. En el cerebro de los roedores parece comprender al menos 12 subunidades α 1-6, β 1-3, γ 1-3 [Pirker, 2000; Chen, 2001; Bollan, 2003].

Las subunidades más abundantes en el cerebro de la rata adulta son α 1-6, β 2, γ 2, que se encuentran presentes en un 60-90% de los receptores GABA. Las subunidades α 2, α 3, α 5, β 3 y δ son moderadamente abundantes 15-30% presentes en el receptor GABA_A. Las subunidades restantes α 4, α 6, β 1, γ 1 y γ 3 no son abundantes y representan un porcentaje menor al 10% [Fritschy, 1995]. La composición de los receptores GABA_A dependen de la composición de sus subunidades y éstas se ensamblan dos α , dos β y una γ , pero la subunidad γ puede ser sustituida por subunidades δ o π [Liu *et al*, 2007]. Específicamente, la conformación pentámerica de las subunidades que comprenden al receptor GABA_A que se encuentra en las células reticulares son: α ₁ y α ₃, dos β ₃ y una γ [Pirker, 2000], (Figura 13).

Estudios electrofisiológicos e inmunohistoquímicos muestran una clara evidencia de la existencia de la subunidad α ₃ del receptor GABA_A, dado que es el principal subtipo expresado en el NRT. En contraste con otros núcleos talámicos, es de suma importancia, debido a que sin esta subunidad el canal pentámerico que forma al receptor no sería funcional [Yee, 2005].

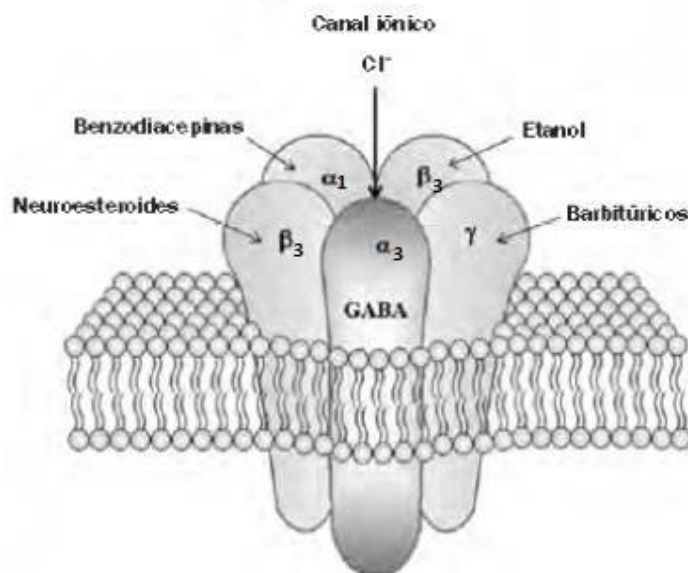


Figura 13. Representación esquemática de la conformación pentámera de las subunidades que comprenden al receptor GABA_A.

Figura 13. Representación esquemática de la conformación pentámera de las subunidades que comprenden al receptor GABA_A, que se encuentra en las células reticulares son: dos α, α₁ y α₃, dos β₃ y una γ. Imagen tomada y modificada de Medel- Matus *et al.*, 2011.

2. ANTECEDENTES

Estudios anatómicos, inmunológicos, electrofisiológicos y farmacológicos demostraron que la principal entrada GABAérgica desde el GP hacia el NRT es modulada por dopamina, a través de receptores dopaminérgicos D₄ que se encuentran en las terminales axónicas retículo-palidales. Además, la activación de estos receptores suprime la transmisión sináptica inhibitoria resultante de la estimulación eléctrica del GP [Gasca-Martinez, 2010; Govindaiah *et al.*, 2010]. De manera adicional, Pazo (2013) argumentó que la inervación palidal al NRT se deriva de sistemas colaterales del GP y que estas proyecciones, al igual que las proyecciones de la SNc, podrían

desempeñar un papel importante en el procesamiento de la información que recibe el tálamo por parte de los núcleos subcorticales y de la corteza cerebral.

La actividad eléctrica del NRT puede verse afectada y provocar, a su vez, anormalidades en la actividad eléctrica de la corteza cerebral y los núcleos talámicos. Por ejemplo, los estudios de estimulación eléctrica del GP llevados a cabo por Gasca-Martinez en 2010, muestran un incremento en la frecuencia y cambio del patrón de disparo en ráfagas de las neuronas reticulares talámicas, generando mayor inhibición de la actividad eléctrica de los núcleos talámicos, sincronizando el sistema talamocortical e imposibilitándolo para que los estímulos sensoriales lleguen a la corteza cerebral.

Es importante mencionar que la subunidad α_3 del receptor GABA_A es necesaria para el ensamblaje adecuado del receptor GABA_A en las células del NRT, esto para la generación del disparo en ráfaga, generado a su vez por los canales de Ca²⁺ tipo T en las células hiperpolarizadas [Liu *et al.*, 2007]. Algunos estudios farmacológicos demostraron que las neuronas del NRT son exclusivamente gabaérgicas y forman redes locales de sinapsis eléctricas y químicas. Se demostró que las sinapsis eléctricas entre pequeños racimos de neuronas del NRT median el disparo sincrónico, lo que es un papel clave para la generación de oscilaciones sincrónicas en el sistema TC. En consecuencia, cuando se reduce la actividad sináptica intra-NRT los circuitos talámicos que normalmente median la actividad sincrónica pueden cambiar a un estado hipersincrónico, dando lugar a la generación de actividad aberrante [Sun *et al.*, 2012].

En los últimos años, el NRT se ha definido como una estructura de enlace para los circuitos TC y CT, ya que funciona modulando las actividades talamocorticales. Además, este núcleo controla el flujo de información entre el tálamo y la corteza cerebral y las aferencias que recibe el NRT juegan un papel destacado en el procesamiento de información tálamo-cortical, dado que participa en procesos como la regulación del estado de alerta y la atención. Por ende, la actividad de la vía pálido-reticular debe modular la actividad de las neuronas del NRT.

Probablemente las neuronas reticulares sean las únicas que puedan controlar el flujo de información y a su vez sean el sitio principal de la generación de algunos trastornos neurológicos. El estudio de la importancia de los receptores D_4 y subunidad α_3 del receptor $GABA_A$, en la vía pálido reticular podría ser la base de enfoques terapéuticos para ciertos trastornos neurológicos conocidos como disritmias talamocorticales.

Las disritmias talamocorticales, se conocen como cambios electroencefalográficos constantes y cambios en los ritmos de la actividad eléctrica del cerebro. Existe una gran variedad de trastornos neurológicos, cada uno con diferentes manifestaciones. En general, se caracterizan por una combinación de alteraciones del pensamiento, la percepción, las emociones y el comportamiento. Entre ellas se incluyen la enfermedad de Parkinson, el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), la epilepsia, la esquizofrenia y otras psicosis [Javitt *et al.*, 2015].

Por otra parte, a nivel mundial, de acuerdo con la OMS, existe mayor número de personas que padecen esquizofrenia (alrededor de 21 millones) y datos del INEGI indican que 0.5% pertenece a la población mexicana. El TDAH se presenta en

alrededor de 1.5 millones de niños y adolescentes en México, ambos trastornos pertenecen a las disritmias TC, por lo tanto, se relaciona con el NRT, ya que la formación de alucinaciones se debe a la falla inhibitoria de las neuronas reticulares talámicas en las aferencias TC provocando que la información que se debe suprimir en los núcleos talámicos por parte del NRT llegue a áreas de asociación cortical y se tengan percepciones no presentes en el entorno. En el caso del TDAH puede suceder que no se filtre esta información y se reciban varios estímulos al mismo tiempo.

En la actualidad los tratamientos farmacológicos utilizados para el tratamiento de las disritmias talamocorticales no son específicos. Por lo tanto, los estudios de los receptores que expresa el NRT nos ayudarían a encontrar una combinación farmacológica idónea para la mejora de los diferentes trastornos que se asocian a esta estructura.

3. JUSTIFICACIÓN

Desde inicios de los noventas se describió la vía pálido-reticular con estudios anatómicos, electrofisiológicos y farmacológicos que indican la presencia de receptores D₄ dentro del NRT, cuya localización se encuentran en las terminales de las neuronas pálido-estriatales, modulando la liberación de GABA hacia las neuronas reticulares que expresan la subunidad α_3 del receptor GABA_A. Sin embargo, hay escasos trabajos moleculares sobre la vía pálido-reticular y los receptores dopaminérgicos D₄ y GABAérgicos, subunidad α_3 que la componen.

Los resultados obtenidos contribuirán a la posible comprensión del funcionamiento de la vía pálido-reticular.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿De qué manera la lesión unilateral del GP afecta a la subunidad α_3 del receptor GABA_A, al receptor de dopamina D₄ y la actividad eléctrica de las neuronas reticulares en la vía pálido-reticular?

5. HIPÓTESIS

Si el GP regula la actividad eléctrica de las neuronas del NRT, entonces la lesión de aquél modificará la actividad eléctrica de las neuronas reticulares, a través de la disminución de la expresión de los receptores D₄ y aumentando la expresión de la subunidad α_3 , dada la falta de regulación GABAérgica por parte del GP en la vía pálido-reticular.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Analizar la modificación de la actividad eléctrica de las neuronas reticulares tras la lesión unilateral del GP y los cambios en los receptores dopaminérgico D₄ y de la subunidad α_3 del receptor GABAérgico en el NRT.

6.2 Objetivos particulares

- Demostrar que la subunidad α_3 del receptor GABA_A y el receptor dopaminérgico D₄ son importantes para la función de la vía pálido-reticular.
- Identificar la relación entre los cambios de los receptores en la vía pálido-reticular y la actividad eléctrica de las neuronas reticulares.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Animales

Se emplearon ratas Wistar macho (n=36), de 60-75 días de edad, con un peso de 180-220 gramos, mantenidos en el bioterio que cuenta con control de ambiente: con temperatura promedio de 21°-23°, ciclo de luz invertido de 12 h luz por 12 de oscuridad (la luz se apaga de 7:00-19:00 h) y con libre acceso al agua y alimento. Los machos (n = 36) se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos: primer grupo, registros electrofisiológicos (n=6); segundo grupo, expresión relativa del ARNm (n=12); tercer grupo, inmunohistoquímica (n=6) y cuarto grupo, cuantificación de proteínas (n= 12). Los animales se mantuvieron en condiciones de acuerdo con las normas aprobadas por el Comité de Uso y Cuidado de Animales del Bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN. ESM-CICUAL-01/12-10-2016 y todos los procedimientos realizados a los animales cumplieron con los requisitos publicados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062ZOO-1999. Los cuatro grupos antes descritos fueron divididos a su vez en dos grupos: control y lesión unilateral del GP derecho.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL

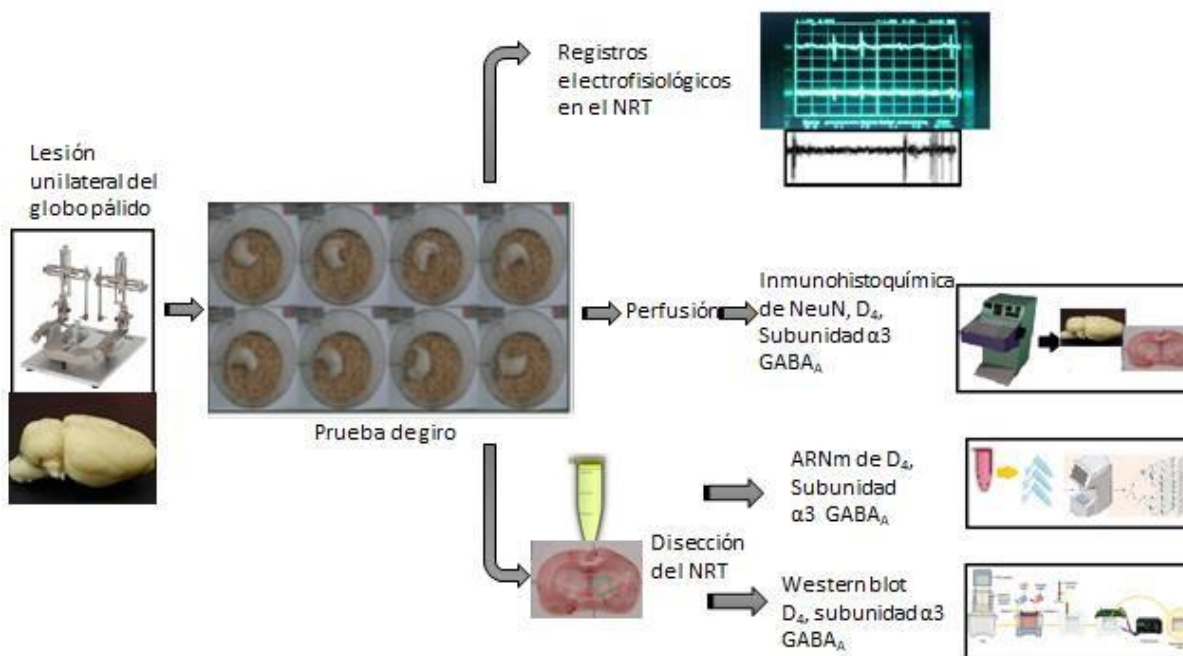


Figura 14. Diseño experimental.

Figura 14. Diseño experimental. 1.- Lesión unilateral del GP derecho. 2.- Prueba de giro con apomorfina vía i.p. para la selección de los individuos lesionados. 3.- Registros celulares unitarios en el NRT derecho. 4.- Perfusión de los individuos para la obtención del tejido (cerebro). 5.- Cortes coronales e inmunohistoquímica de los cortes. 6.- Obtención del NRT derecho. 7.- Cuantificación del ARNm del receptor de dopamina D₄ y la subunidad α_3 del receptor GABA_A. 8.- Western blot para cuantificación de las proteínas del receptor de dopamina D₄ y de la subunidad α_3 del receptor GABA_A.

8.1 Cirugía estereotáxica (lesión unilateral del GP)

Los animales (n = 18) fueron anestesiados con xilazina/ketamina 8 mg/Kg + 70 mg/Kg, ip (PROCIN®/ANESKET® VET) y se colocaron en un aparato estereotáxico David Kopf de dos torres modelo 902 (Tujunga CA, USA). Se aplicaron dosis suplementarias del anestésico (5 mg/Kg + 20 mg/Kg) ante la aparición del reflejo corneal. Se utilizó

una almohadilla térmica y un termómetro rectal para mantener y monitorear la temperatura a 37.5°C (Frederick Haer & Company, Bowdoin ME, USA).

Se colocó una cánula calibre 30 G usando las siguientes coordenadas: anteroposterior (AP) -0.84 mm, lateral 3.0 mm y profundidad 6.5 mm (Paxinos y Watson, 2007). Se aplicó un volumen de 200 nano-litros de ácido quinolínico durante un periodo de infusión de 4 min. La cánula se mantuvo fija por cinco min para permitir la adecuada difusión del neurotóxico. El ácido quinolínico se disolvió en una solución NaOH 4M y luego se ajustó el pH a 7.4 con una solución HCl 1M (Figura 15).

La eutanasia de los animales se llevó a cabo por decapitación, para la obtención de las muestras cerebrales y para cada una de las técnicas utilizadas. Después de la extracción de las muestras cerebrales, el resto del animal fue llevado al congelador del Bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN donde los residuos biológicos son manejados de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas NOM-087-ECOLSSA1-2002 y NOM-087-ECOL-1995 las cuales se apegan a los Lineamientos para la Conducción Ética de la Investigación.

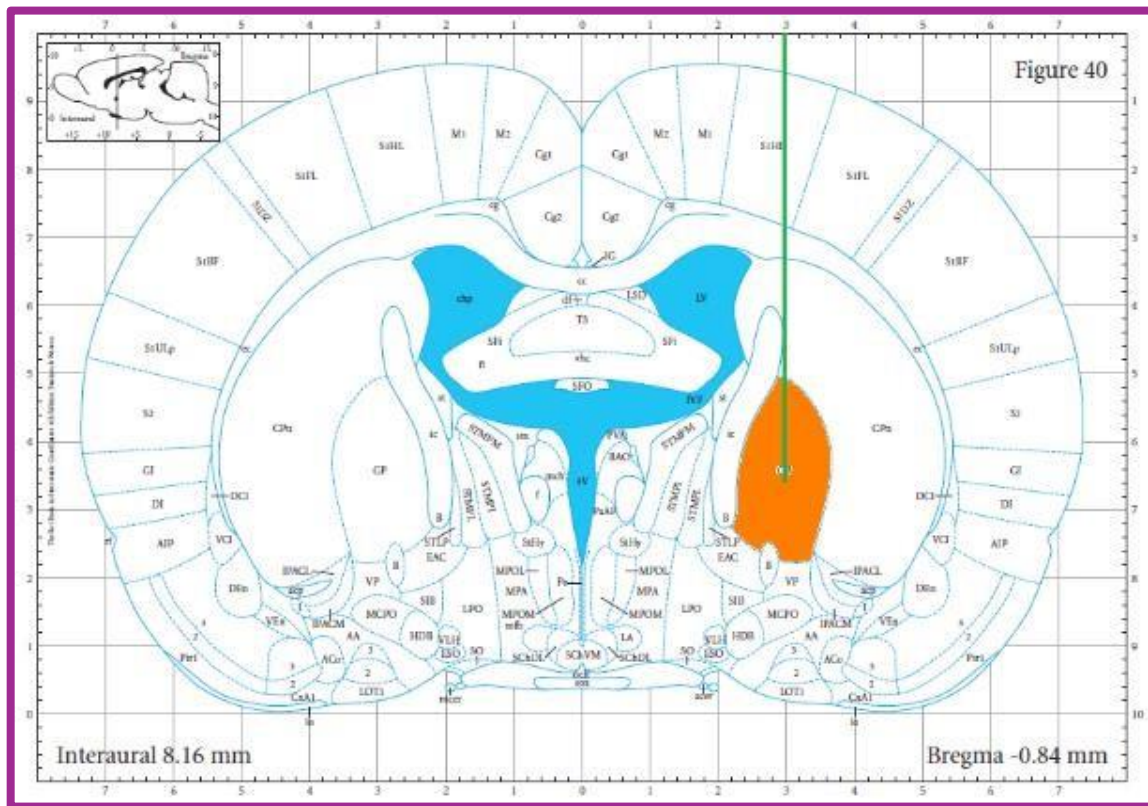


Figura 15. Ubicación del GP derecho .

Figura 15. Ubicación del GP derecho para la colocación de la cánula para la administración de 200 nano-litros de ácido quinolínico. Imagen modificada de Paxinos y Watson, 2007.

8.2 Prueba de giro

Los efectos de la lesión del GP se evaluaron induciendo la conducta de giro ipsilateral mediante la aplicación de apomorfina ip (0.1 mg/Kg) siete días después de la lesión ocasionada por ácido quinolínico. Solo aquellas ratas que presentaron más de tres giros por minuto fueron consideradas como lesionadas (Figura 16).

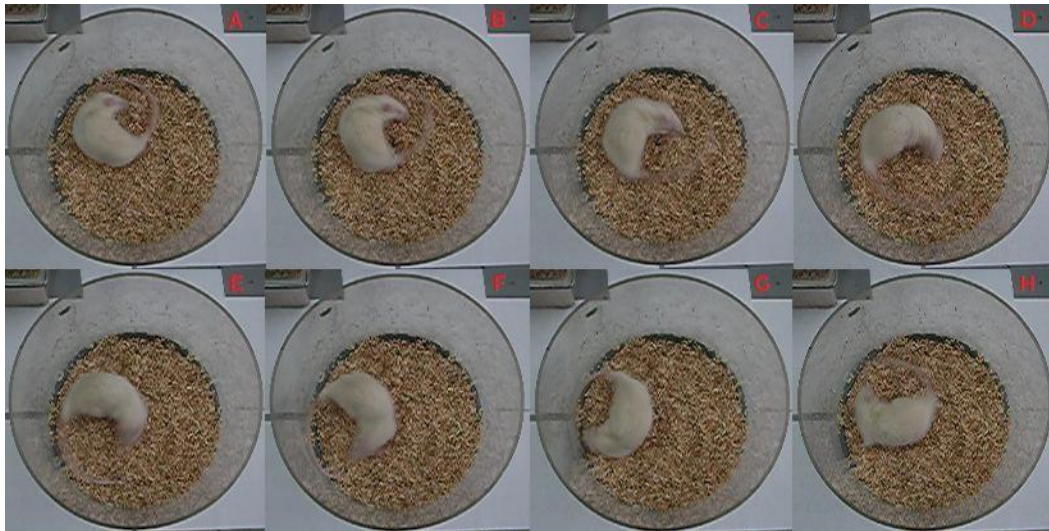


Figura 16. Conducta de giro en ratas con lesión unilateral del GP derecho.

Figura 16. Conducta de giro en ratas con lesión unilateral del GP derecho. Imágenes representativas de un individuo del grupo lesionado.

8.3 Inmunohistoquímica para células inmunorreactivas a NeuN en el Globo Pálido

Una semana después de la lesión las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de xilazina/ketamina 24mg/Kg+210mg/Kg (PROCIN®/ANESKET® VET) y fueron perfundidas transcardiacamente con una solución fijadora de paraformaldehído 4% en un buffer de PBS al 0.1M/L a un pH de 7.4. Los cerebros fueron extraídos, almacenados y fijados en la misma solución durante 3h. Posteriormente los cerebros fueron deshidratados en soluciones de sacarosa al 5% y 30% durante 12h en cada caso y fueron congeladas y almacenadas a -70°C. Para proceder a realizar cortes coronales de 30µm en un criostato. Se recogieron 2 series de 20 cortes y se almacenaron en una solución de sacarosa al 20% a -20°C.

Las muestras fueron descongeladas y lavadas con PBS 0.1M, posteriormente se incubaron en una solución de bloqueo durante 20min (PBS 0.1M, suero fetal de ternera

al 10% y tritón al 0.5%). El anticuerpo primario anti-NeuN (ab104225, Abcam), el anticuerpo secundario anti-conejo (Isab system-hrp kit; DAKO, CA, USA) y el complejo ABC peroxidasa, fueron diluidos en PBS más suero fetal de ternera al 1% y 0.125% de tritón.

Para el anticuerpo primario anti-NeuN (1:1000) la incubación se realizó durante 48h y la incubación del anticuerpo secundario anti-conejo (1:1000) y el complejo ABC peroxidasa fue por 2h. Luego de las incubaciones a cada una se le realizaron 3 lavados con PBS durante 5min. Para el revelado se utilizó 3.3 de aminobenzidina (DAKO, CA, USA) al 0.05% y H₂O₂ al 0.01%. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol, aclaradas con xilol y cubiertas con resina DPX (Entellan™ new) para su montaje [Alatorre, *et al.*, 2019].

8.4 Registros electrofisiológicos

Para el registro celular unitario de las neuronas del NRT, los animales de los grupos control y con lesión unilateral del GP fueron anestesiados con xilazina/ketamina 8 mg/Kg + 70 mg/Kg, ip (PROCIN®/ANESKET® VET). Posteriormente se colocaron en un aparato estereotáxico David Kopf de dos torres modelo 902 (Tujunga CA, USA). Se aplicaron dosis suplementarias del anestésico (5 mg/Kg + 20 mg/Kg) ante la aparición del reflejo corneal. Se utilizó una almohadilla térmica y un termómetro rectal para mantener y monitorear la temperatura a 37.5 °C (Frederick Haer & Company, Bowdoin ME, USA). Se procedió al retiro del cráneo la piel y el tejido conjuntivo subyacente, se hizo un orificio de trepanación de 4 mm para introducir una micropipeta de borosilicato

(Frederick Haer & Company, Bowdoin ME, USA) construida con un puller (Pull-100 WPI, Sarasota FL, USA) rellena con NaCl 2 M y con azul de pontamina 1%, cuya resistencia fue de 4-8 m Ω para acceder al NRT derecho con las coordenadas -1.3-1.6 mm anteroposterior, -2.1 mm lateral y 5.2-6.5 mm de profundidad de acuerdo con Paxinos y Watson (2007); la señal de grabación de la micropipeta se filtró mediante un filtro diferencial entre 300 y 3000 Hz (DAM-80 WPI, Sarasota FL, EE. UU.) y fue monitoreada con un osciloscopio digital posteriormente, fue enviada a un discriminador de ventana (WPI-121, Sarasota FL, USA) y de ahí a una computadora (PC) para realizar histogramas de frecuencia mediante un programa INF-386 [Soto y Vega, 1987]. En algunos casos, la señal fue enviada directamente del discriminador de ventana de doble umbral (WP-121; WPI) para el análisis de datos fuera de línea. El ancho del contenedor era de 100 ms. Después fue enviado a una PC para analizar la señal mediante el programa MATLAB (The MathWorks, Inc. MA USA), (Figura 17).

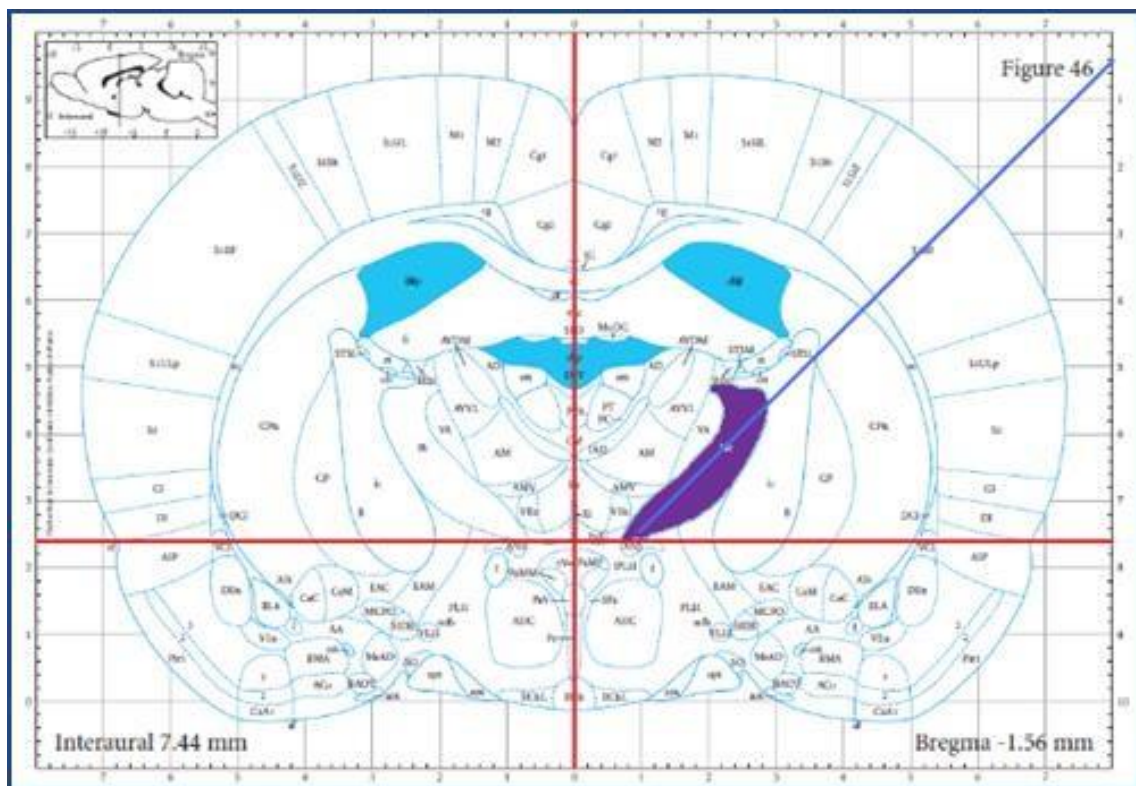


Figura 17. Ubicación del NRT derecho para la colocación del electrodo.

Figura 17. Ubicación del NRT derecho para la colocación del electrodo. Imagen modificada de Paxinos y Watson, 2007.

8.5 Obtención del NRT

Para la obtención del NRT del lado derecho los individuos fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital 100-150 mg/Kg, ip; el cerebro fue retirado del cráneo con una legra 7a y, para asegurar la integridad del tejido, el cerebro se colocó en hielo sobre una caja Petri para proceder a realizar los cortes con una navaja y apoyándonos de una espátula. El corte se realizó 7.68-7.20 mm de la línea interaural y 1.32-1.80 antero/posterior (A/P) desde bregma, de acuerdo con Paxinos y Watson (2007), para vislumbrar el tejido a retirar. Posteriormente se introdujo una cucharilla

en las coordenadas 1.0-3.20 mm medial/lateral (M/L) a la línea media y 4.7-7.5 mm dorsal/ventral (D/V) de profundidad de acuerdo con Paxinos y Watson (2007); apoyándonos de una espátula de leckon se extrajo el tejido de cada uno de los grupos (control y lesión) y el NRT fue aislado y almacenado en tubos Ependorf de 1mL (Figura 18).

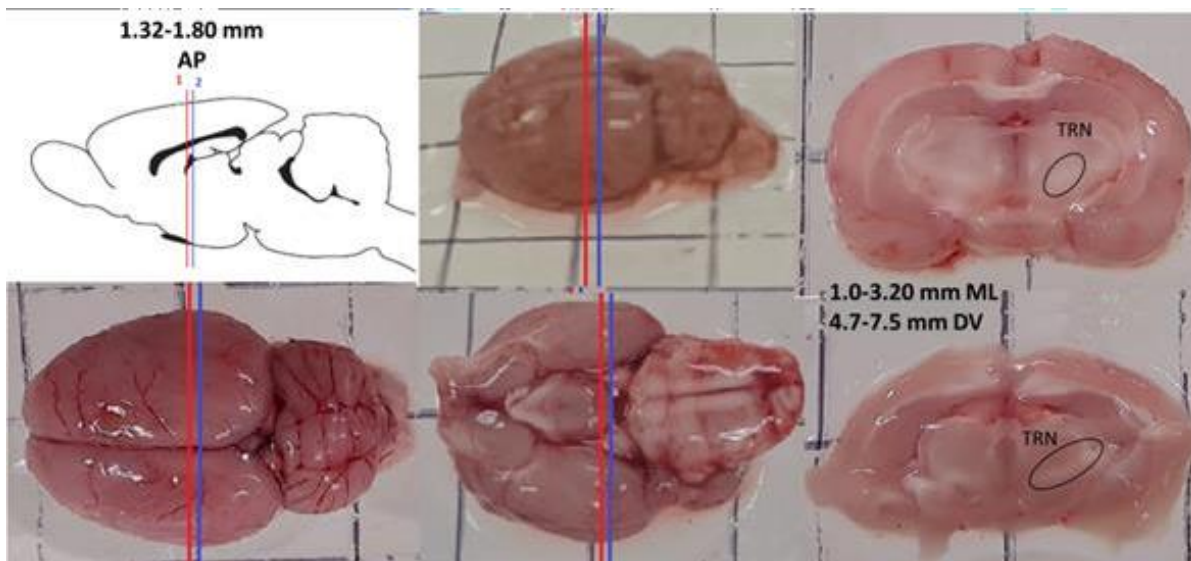


Figura 18. Extracción del tejido (NRT derecho).

Figura 18. Extracción del tejido (NRT derecho). Se muestran las coordenadas utilizadas.

8.6 Extracción del ARN total del NRT

Segundo grupo de animales, dividido en grupo control y con lesión unilateral del GP; al tejido previamente obtenido fue depositado en tubos Ependorf, se le agregó 1 mL de Trizol® y el homogenado se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregaron 0.2 mL de cloroformo y se agitó por inversión durante 15 segundos. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 15 min a 4° C. Para recolectar la fase acuosa (superior) se agregaron 0.5 mL de isopropanol; después se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4° C. El sobrenadante se decantó y el precipitado obtenido fue lavado con 1 mL de etanol al 75 %; luego se procedió a centrifugarlo a 12000 rpm durante 15 min a 4° C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado (ARN total) obtenido fue secado al vacío. El botón de ARN se suspendió en una solución de dietilpirocarbonato (DEPC 0.1 %) o bien agua libre de ARNasas. Posteriormente se procedió a la cuantificación del ARN por espectrofotometría mediante un NanoDrop® a una absorbancia de 260 nm y finalmente se observó la integridad del ARN total mediante el corrimiento de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

8.7 Cuantificación relativa de la expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABA_A y el receptor de Dopamina D₄

El ADNc se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total por PCR utilizando la transcriptasa reversa ImProm II, también se utilizaron iniciadores al azar (random primers 0.5 µg/µl). El volumen total de reacción (20 µl) fue incubado en el termociclador Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700 con el siguiente programa de ciclos: inicio

25° C por 5 min, seguido por la extensión a 42° C por 55 min y por último se detuvo la reacción inactivando la enzima a 70° C por 15 min y enfriando a 4° C por 5 min. El ADNc se amplificó mediante la enzima ADN polimerasa del kit de “ADN master plus SYBR Green 1” para la subunidad α_3 del receptor GABA_A, el receptor dopaminérgico D₄ y la β -actina, como gen de normalización (Tabla 1). El proceso se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo Rotor Gene. La mezcla de reacción con un volumen final de 10 μ L contuvo 0.5 mM de oligonucleótidos de la subunidad α_3 gen del receptor GABA_A y el receptor de dopamina D₄, usando β -actina como gen de referencia y la mezcla de reacción que contenía la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl₂ 3.5 mM en un volumen final de 10 μ L. Las reacciones se midieron en un Rotor-Gene en tiempo real (Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australia). La RT-PCR se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones de ciclos: preincubación y desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos. Los ciclos umbral (Ct) se midieron en tubos separados por duplicado. La integridad y la pureza de los productos amplificados se comprobaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. La curva de fusión se analizó al final de la amplificación siguiendo las condiciones del kit SYBER Green según las condiciones indicadas por la empresa (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). Cada ensayo incluyó un control negativo para cada gen. Los valores de Δ Ct se calcularon en cada muestra para cada gen de interés de la siguiente manera: Ct objetivo - Ct referencia (el ARNm de referencia se mantuvo estable a lo largo de los experimentos). Los cambios relativos en el nivel de expresión de un gen específico ($\Delta\Delta$ Ct) se calcularon como el

ΔCt del grupo de prueba menos el ΔCt del grupo de control y se presentaron como $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

Tabla 1. Características y secuencias de los primers utilizados en la RT-PCR.

Primers	Secuencias	Temperatura (°C)	Producto (pb)
Subunidad α_3 Receptor GABA _A NM_017069.3	F5'-GCTCCCAGTGCTTCTTCAAC-3' R5'-TGATAGCGGATTCCCTGTTC-3'	60.04	196
D ₄ NM_012944.2	F5'-GATGTGTTGGACGCCTTTCT-3' R5'-AAACTCGGCATTGAAGATGG-3'	60.12	154
β -actina NM_175594.2	F5'-GTGGGTAATGGGTCATAGGA-3' R5'-AGCGCGTAACCCTCATAGAT-3'	61	380

8.8 Inmunohistoquímica para células inmunorreactivas a la subunidad α_3 del receptor GABA_A y el receptor de Dopamina D₄

En el tercer grupo de animales (n = 3, cada uno, control y lesión), una semana después de la lesión, se sacrificaron las ratas con una sobredosis de xylazina/ketamina (24 mg/kg + 210 mg/kg, PROCIN®/ANESKET® VET) y se perfundieron transcardialmente con una solución fijadora de paraformaldehído 4% en un buffer de PBS al 0.1M/L a un pH de 7.4. Los cerebros fueron extraídos, almacenados y fijados en la misma solución

durante 3h. Posteriormente los cerebros fueron deshidratados en soluciones de sacarosa al 5% y 30% durante 12 h en cada caso y fueron congeladas y almacenadas a -70 °C. Para proceder a realizar cortes coronales de 20 μ m en un criostato. Se recogieron 2 series de 20 cortes y se almacenaron en una solución de sacarosa al 20% a -20°C.

Las muestras fueron descongeladas y lavadas con PBS 0.1 M, posteriormente se incubaron en una solución de bloqueo durante 20 min (PBS 0.1M, suero fetal de ternera al 20% y tritón al 0.25%). El anticuerpo primario anti-subunidad α_3 del RGABA_A, anti-RD₄ (Novus Biologicals), el anticuerpo secundario anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) y el complejo ABC peroxidasa, fueron diluidos en PBS más suero fetal de ternera al 1% y 0.125% de tritón.

Para el anticuerpo primario anti-GABA_A R α_3 y anti-R D₄ (1:500), la incubación se realizó durante 24 h y la incubación del anticuerpo secundario anti-conejo (1:1000) y el complejo ABC peroxidasa fue por 1 h. Luego de las incubaciones, a cada una se le realizaron 3 lavados con PBS durante 5min. Para el revelado se utilizó 3.3 mL de aminobenzidina al 0.05% y H₂O₂ al 0.01%. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol, aclaradas con xilol y cubiertas con resina DPX (Entellan™ new) para su montaje. El hemisferio izquierdo, sin lesión, se consideró como control; el hemisferio derecho contenía el GP lesionado. La inmunorreactividad a NeuN se evaluó en 4 secciones por animal. Se observaron al microscopio óptico a 200x y 400x para cuantificar el número de células inmunorreactivas.

8.9 Western blot

Extracción de proteínas

En el cuarto grupo de animales ($n = 6$), se obtuvo el NRT derecho de los animales se dividió en grupo control y con lesión unilateral del GP. Se trabajó con los 6 núcleos de cada grupo por separado y se mantuvieron a -80°C hasta el ensayo.

8.10 Preparación de las proteínas

Los tejidos fueron mezclados en frío dos veces con 200 μL del buffer de lisis T-Per (Thermo Fisher Scientific, Cat 78510, 0.2 M DTT, (1, 4-Dithiothreitol), 0.001 M PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro), 0.001 M de fluoruro de sodio (NaF), 0.2 M de ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), inhibidores de proteasas: coctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche Bioquímica molecular, Indianapolis, IN, USA). Posteriormente, los tejidos se homogenizaron con un homogeneizador con pistilo y se incubaron a 4°C por 15 min, posteriormente se centrifugaron a $12\,000 \times g$ por 10 min a 4°C . Los sobrenadantes con las proteínas totales extraídas se transfirieron a otro tubo y se almacenaron a -80°C . Posteriormente se determinó la concentración de proteína mediante el espectrofotómetro Nano-Drop One C, con una longitud de onda de 280 nm (ND-ONEC, Thermo Fisher Scientific, USA).

8.11 Preparación de los geles

Se consideraron las cantidades indicadas en la tabla 2 para preparar: el gel de corrida y el gel concentrador.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la elaboración del gel de corrida y gel concentrador.

Reactivos	Gel de corrida (10%)	Gel concentrador
Agua desionizada estéril	4.02 mL	3.05 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL	-----
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	-----	1.25 mL
SDS 10%	100 µL	50 µl
Acrilamida-bis	3.3 mL	650 µl
TEMED	10 µl	5 µl
Persulfato de amonio	50 µl	25 µl
Volumen final	10mL	5mL

8.12 Electroforesis y transferencia de proteínas

Para el análisis de western blot, se cargaron 200 µg de proteína en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% SDS y se corrió la electroforesis a 120 V por 90 min en un equipo Mini-Protean II Cell (Bio-Rad, CA, USA) junto con un marcador de peso molecular (SeeBlue Plus2/500, Cat LC5925, Invitrogen). Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF de 0.45 µm PVDF (PVDF Transfer Membrane; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) embebida en un buffer de transferencia (25 mM Tris-buffer, 190 mM glicina, 20% metanol) a 120 V y a 4°C por 90 min mediante el sistema de transferencia de proteínas (Mini-Transblot MCA, Bio-Rad). Posteriormente las membranas se bloquearon con leche desengrasada 5% disuelta en TTBS (137 mM

NaCl, 20 mM Tris-buffer y 0.1% Tween 20, pH 7.6) por 30 min a temperatura ambiente. Después de eso, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario contra la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABA_AR subunit, 1:500 (Cat No. NB 100-61096, Novus Biological), anti-D4R, 1:100 (Cat No. NBP1-00779, Novus Biologicals), respectivamente. A continuación, se realizaron tres lavados con TTBS (10 min cada uno) y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón IGG (Cat No. PI-2000-1, Vector Laboratories, CA, USA) a una dilución de 1:10,000 por 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas nuevamente con TTBS tres veces más (10 min cada uno). Las bandas de las proteínas se revelaron mediante un kit de detección por bioluminiscencia, el cual contiene peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el reactivo luminol (Cat. No. 1705060, Bio-Rad, CA, USA), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Posteriormente, las bandas se analizaron con el software Image J (desarrollado por el Instituto nacional de Salud) para obtener datos densitométricos. Después se utilizó un buffer (Tris-HCL 0.5 M, pH 2.0) para el desnudamiento de las membranas para su posterior incubación con el anticuerpo monoclonal anti β -actina (Cat No. A3854-200 UL, Sigma-Aldrich, USA) como la proteína control de carga. Finalmente se realizó la relación de la señal de las proteínas con la actina.

8.13 Análisis Estadístico.

Los resultados fueron expresados como Media $\pm$ el error estándar (S.E.M.), los datos se analizaron mediante la t-Student, para determinar diferencias entre los grupos para

el índice del patrón de ráfaga de disparo y el ISI, así como los cambios en la expresión de ARNm, Western blot e inmunohistoquímica. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 6. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$, en los cambios en la expresión de ARNm, Western blot e inmunohistoquímica y para el patrón de ráfagas y el ISI se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 Inmunohistoquímica para células inmunorreactivas a NeuN en el Globo Pálido

En un tercer grupo de animales ($n=4$) dividido en, grupo control (hemisferio izquierdo), grupo con lesión unilateral del globo pálido (hemisferio derecho); se analizaron los cortes de las figuras 19A que muestra al grupo control y 19B que muestra al grupo con la lesión unilateral ($400\times$), se observa la inmunoreactividad de NeuN en el globo pálido.

La inmunoreactividad relativa de NeuN mostró que el hemisferio lesionado (GP derecho) comparado con el hemisferio control (GP izquierda) (Fig. 19A), lesión unilateral en el GP derecho (Fig. 19B) disminuyó el número de NeuN-positivos ($t_{17}=39,33$, $P<0,0001$). El porcentaje de células restantes en el GP derecho era cerca de 23%, que confirma que la mayoría de las neuronas palidales fueron destruidas con ácido quinólico (Fig. 19C) [Alatorre *et al.*,2019].

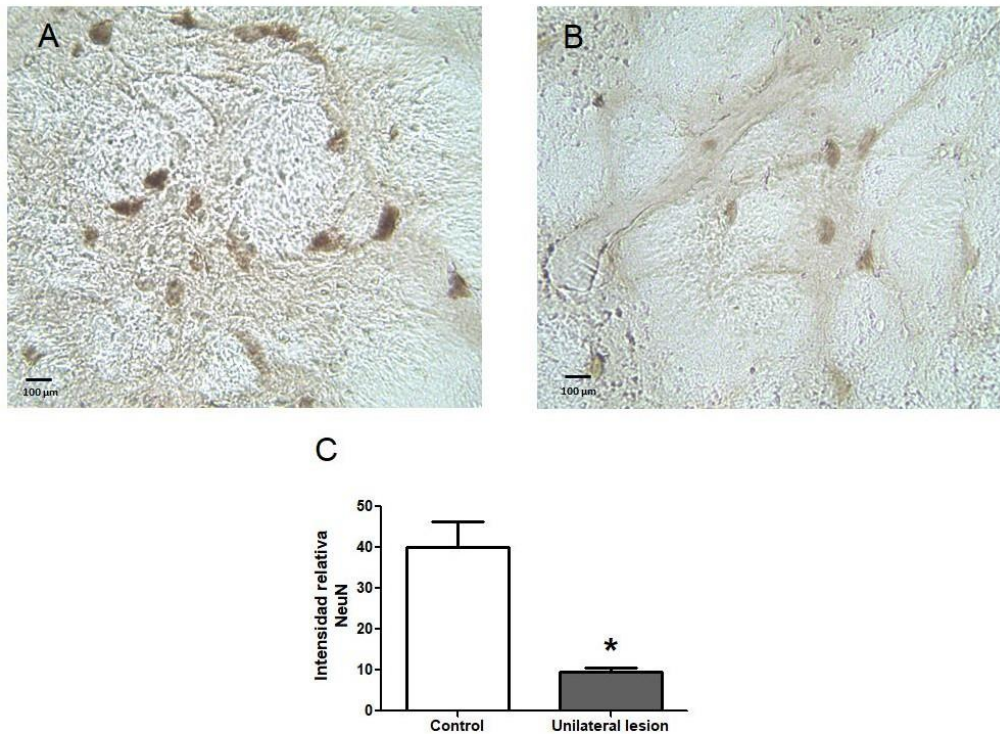


Figura 19. Fotomicrografías mostrando neuronas inmunorreactivas a anti-NeuN.

Figura 19. Fotomicrografías mostrando neuronas inmunorreactivas a anti-NeuN. A) hemisferio izquierdo del GP grupo control NeuN-positivas. B) hemisferio derecho del GP grupo lesionado. Se observa que la administración de ácido quilnolínico induce la pérdida neuronal en el lado derecho GP. Imágenes con aumento 400 $\times$, tamaño de la barra 100 μ m. Datos mostrados como Media $\pm$ error estándar (n = 2 ratas por grupo). * p = 0.05 comparado con el grupo control.

9.2 Actividad eléctrica

En el primer grupo de animales dividido en grupo control y con lesión unilateral del GP derecho. Siete días después de llevarse a cabo la lesión, se realizó la prueba de giro con la aplicación sistémica de apomorfina (0.1mg/Kg, ip); tanto en el grupo control (n=3) como en el grupo lesionado (n=3). Tres días posteriores a la prueba de giro, se realizaron los registros celulares unitarios en el NRT (n=12 neuronas por cada grupo).

Durante el registro de la actividad eléctrica del grupo control de las neuronas reticulares talámicas se observaron dos tipos de disparo neuronales, el disparo tónico y el disparo en ráfagas (Figura 20A). En la identificación del tipo de disparo se hizo una amplificación del histograma para diferenciar la actividad eléctrica de las neuronas reticulares y se observó el disparo en ráfaga (20B). Se analizó la frecuencia de disparo de las neuronas reticulares del grupo lesionado y se observó un incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas reticulares talámicas con respecto al grupo control. De 1.417 ± 0.1486 disparos por segundo a 34.00 ± 1.148 disparos por segundo (Figura 20C). En la actividad eléctrica del grupo con la lesión unilateral del GP derecho se observó incremento en la frecuencia de disparo espontáneo de estas neuronas (Figura 20D), comparado con la frecuencia de disparo neuronal del grupo control. El tipo de disparo se verificó mediante la amplificación del histograma de los registros unitarios (Figura 20E). También, se realizó una comparación entre el grupo control y el grupo lesionado de la tasa global de disparos (todas las neuronas, ambos patrones de disparo) llamado intervalo interespiga que muestra los tiempos entre disparos y la distribución de la longitud de los intervalos que separa dos disparos consecutivos. Un régimen tónico se refiere a disparos periódicos y los patrones temporales para determinar la presencia de una ráfaga, son un mínimo de dos espigas consecutivas, precedidas de un silencio de al menos 50 ms, y con un máximo de 6 ms entre espigas [Weyand *et al.*, 2001]. Al analizarlo, mostró una diferencia significativa entre ambos grupos 0.5196 ± 0.04158 disparos por segundo lo que nos dice que el grupo control tiene mayor número de disparos en ráfaga que el grupo lesionado (Figura 20F).

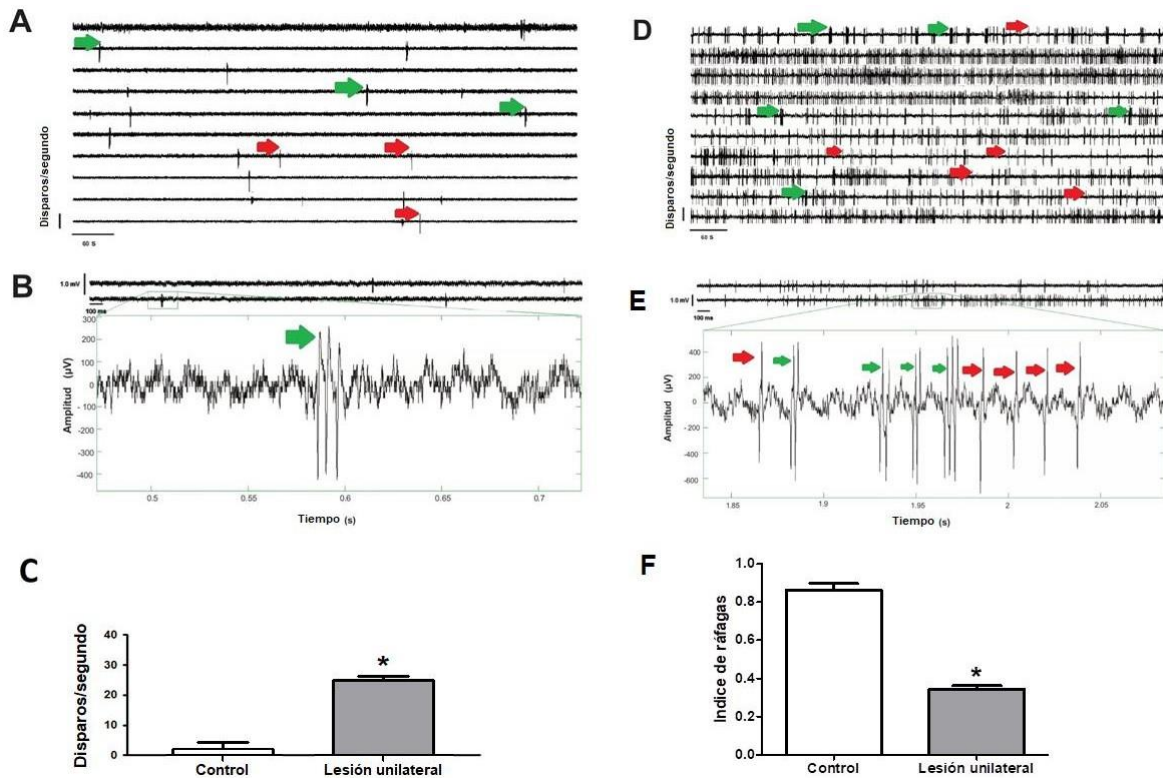


Figura 20. Actividad eléctrica de las neuronas del NRT.

Figura 20. A) Actividad eléctrica de las neuronas del NRT en el grupo control. Se observan los dos tipos de disparo: el disparo tónico y el disparo en ráfagas. Disparo en ráfaga (flecha verde) y con disparo tónico (flecha roja). B) Se amplificó una banda de registro del histograma donde observamos un disparo en ráfaga. C) Frecuencia de disparo de las neuronas reticulares talámicas de ratas control y ratas con lesión del GP. D) Actividad eléctrica de las neuronas del NRT en el grupo con lesión unilateral del GP derecho. Se observa una mayor actividad del disparo en ráfaga (Flecha verde) y menor disparo tónico (Flecha roja). E) Se amplificó una banda de registro donde observamos disparos tónicos y disparos en ráfaga. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo en neuronas del NRT. y ratas con lesión del GP. A, B, D y E datos expresados como la media $\pm$ error estándar *t*-Student. $P < 0.00$; $n = 12$. C y F datos mostrados como media $\pm$ error estándar *t*-Student. * $P < 0.001$, diferencia significativa con respecto al control, $p < 0.001$. $n = 12$ ratas por grupo.

9.3 Expresión relativa del ARNm de los receptores de dopamina D₄ y la subunidad α_3 del receptor GABA_A

Tres días después de la prueba de giro inducido por apomorfina, se obtuvieron los NRT para evaluar el receptor D₄ y la subunidad α_3 del receptor GABA_A por RT-PCR. El análisis del ARNm para D₄R en el NRT mostró una mayor expresión relativa en los animales con lesión del GP derecho, en comparación con el grupo control ($t_4 = 7.15$, $P = 0.002$) (Figura 21A). Con respecto a la expresión relativa del ARNm para la subunidad α_3 del receptor GABA_A, se observó lo contrario que con el D₄R, esto es, la expresión fue menor en el grupo con lesión unilateral del GP comparado con el control ($t_4 = 6.94$, $P = 0.002$) (Figura 21 B).

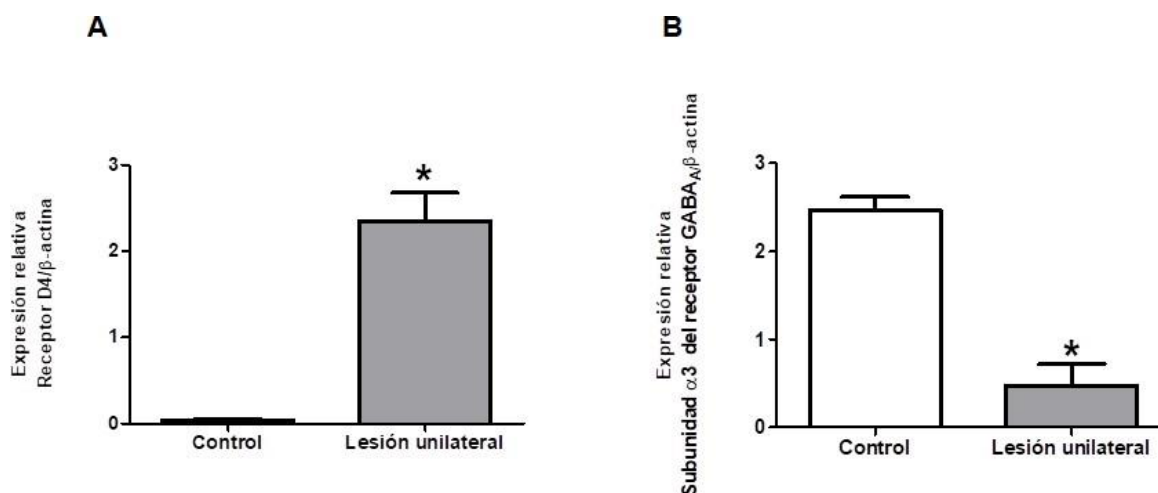


Figura 21. Expresión relativa del ARNm del receptor dopaminérgico D₄ en el NRT.

Figura 21. A) Expresión relativa del ARNm del receptor dopaminérgico D₄ en el NRT. B) Expresión relativa del ARNm de la subunidad α_3 del receptor GABAérgico en el NRT. Las gráficas comparan al grupo control con el grupo lesionado (lesión del GP derecho) t-Student. * $p = 0.002$ respecto al grupo control. Datos mostrados como Media $\pm$ error estándar ($n = 6$ ratas por grupo).

9.4 Inmunorreactividad del receptor dopaminérgico D₄

En los grupos de animales (control y lesión del GP), los cortes histológicos coronales de 20 μm del NRT se analizaron a 200x. En la figura 22A (superior) se observa que la marca del receptor dopaminérgico D₄ en el NRT del grupo control fue relativamente baja, en comparación con la de los animales con lesión unilateral del GP ($t_6 = 3.82$, $P = 0.008$) (Figura 22 A, inferior). La intensidad relativa de los receptores D₄ en el NRT de los animales lesionados en el GP derecho fue mayor, con respecto a los animales control ($t_6 = 3.82$, $P = 0.008$) (Figura 22B).

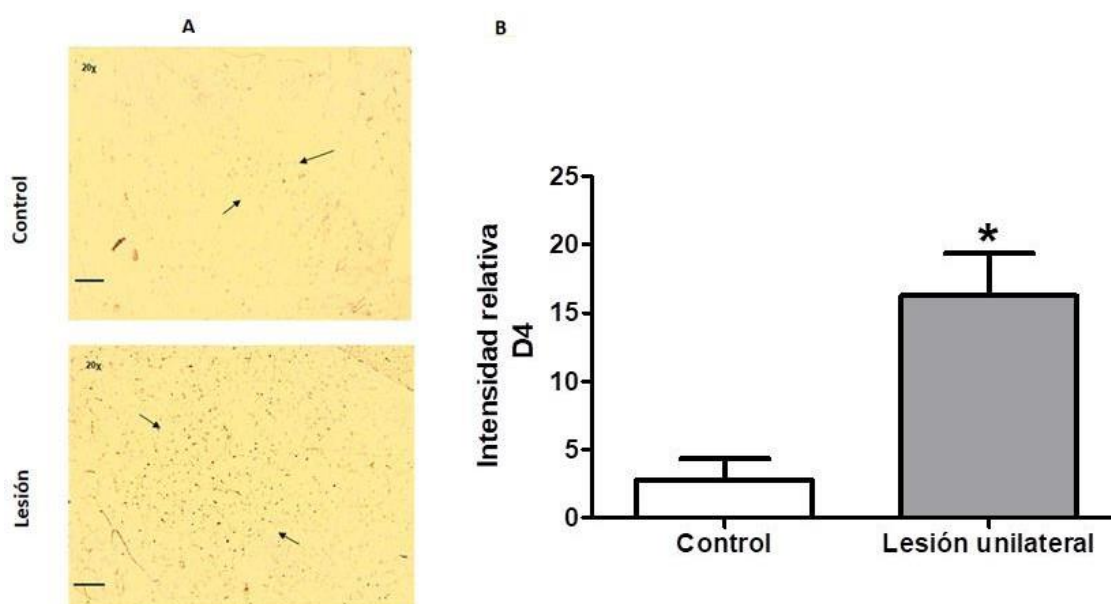


Figura 22. Distribución del receptor dopaminérgico D₄ en el NRT.

Figura 22. Distribución del receptor dopaminérgico D₄ en el NRT. A) grupo control (imagen superior). Se señala las células positivas para el receptor dopaminérgico D₄ en el NRT. Imagen inferior del grupo con lesión unilateral del GP se señala las células positivas en el NRT para el receptor dopaminérgico D₄. Imágenes en aumento de 200 $\times$. Tamaño de la barra 10 μm . Datos mostrados como Media $\pm$ error estándar ($n = 6$ ratas por grupo). * $p = 0.008$ comparado con el grupo control.

9.5 Distribución de la subunidad α_3 del receptor GABA_A

En las secciones coronales de 20 μ m se observa la marca para la subunidad α_3 del receptor GABA_A en el grupo control (Figura 23 A superior). En el NRT de los animales con lesión del GP derecho, la marca es más abundante que en los controles (Figura 23 A inferior). La intensidad relativa de la marca para dicha subunidad α_3 fue mayor en los animales con lesión del GP derecho ($t_8 = 6.52$, $P = 0.0002$), como se aprecia en la gráfica (Figura 23 B).

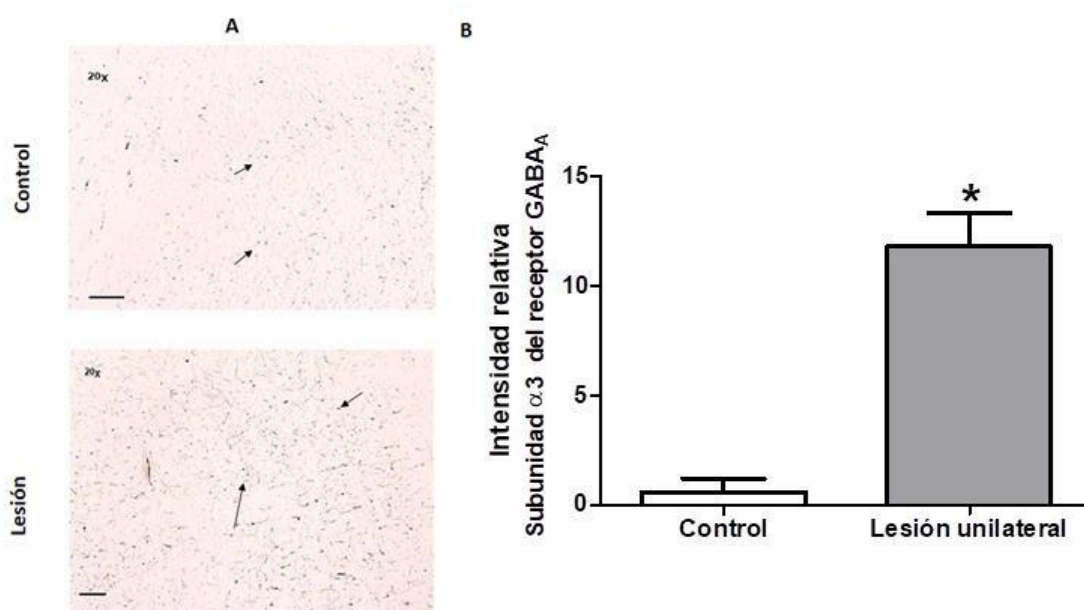


Figura 23. Distribución de la subunidad α_3 del receptor GABA_A en el NRT.

Figura 23. Distribución de la subunidad α_3 del receptor GABA_A en el NRT. A) grupo control (imagen superior), grupo con lesión unilateral del GP (imagen inferior) se señala un número mayor de células positivas en el NRT para la subunidad α_3 del receptor GABA_A. Imagen en aumento de 200 $\times$. Datos mostrados como Media $\pm$ error estándar (n = 6 ratas por grupo). * p = 0.0002 comparado con el grupo control.

9.6 Contenido del receptor dopaminérgico D₄

En relación con el contenido del receptor D₄, se observó que la densidad de las bandas fue mayor en los animales con lesión del GP derecho que en los animales control ($t_6 = 2.88$, $P = 0.028$), (Figura 24 A). Esto se observa claramente en la Figura 24 B. Estos resultados son acordes al análisis inmunohistoquímico y al ARNm para esta proteína

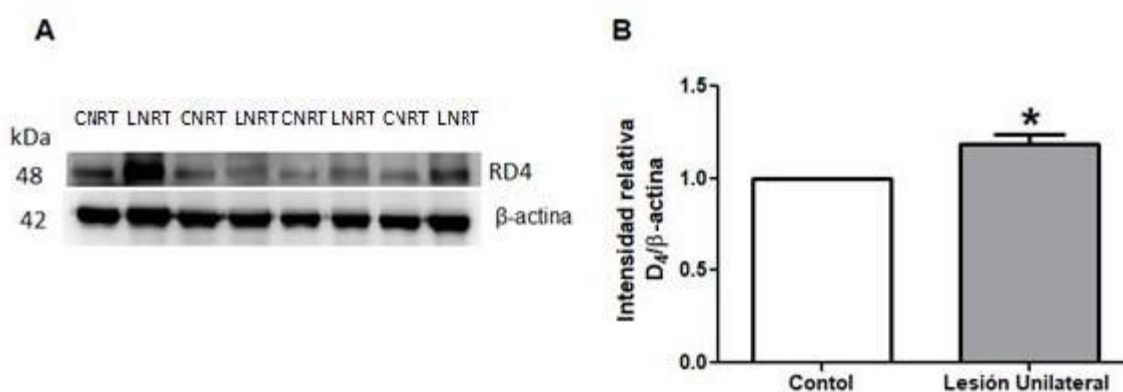


Figura 24. El análisis por Western blot de las proteínas en el receptor dopaminérgico D₄ en el NRT.

Figura 24. El análisis por Western blot de las proteínas en el receptor dopaminérgico D₄ en el NRT; en CNRT (grupo control), LNRT (grupo con lesión unilateral del GP). A) Los datos son presentados como la expresión relativa de proteína (DO: densidad óptica) normalizada con β-actina. B) t-Student. * $p = 0.028$, diferencia significativa respecto al grupo control. Datos mostrados como media $\pm$ error estándar ($n=6$ ratas por grupo).

9.7 Contenido de la subunidad α_3 del receptor GABA_A

El contenido de la subunidad α_3 del receptor GABA_A en el NRT de los animales con el GP lesionado fue mayor que en los animales control ($t_6 = 3.74$, $P = 0.009$), (Figuras 25 A y 25 B). Este resultado es consistente con el incremento observado en el análisis inmunohistoquímico de esta subunidad, pero no con el decremento observado en el ARNm para dicha proteína.

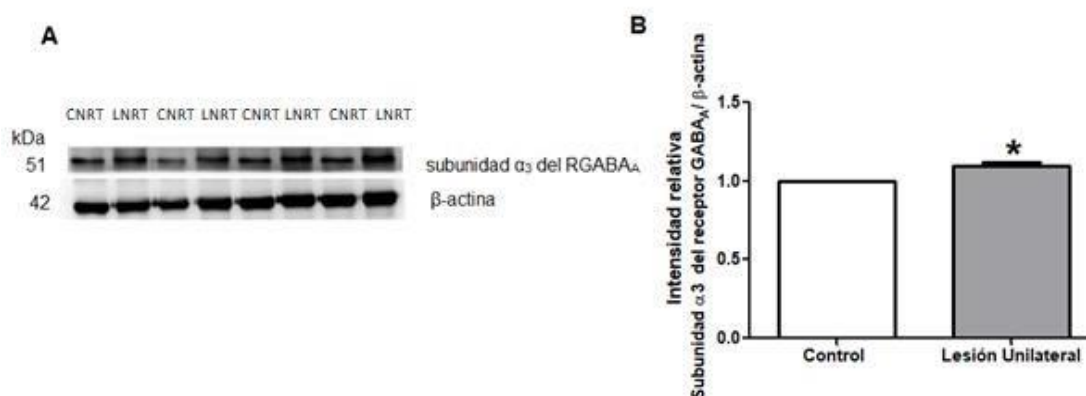


Figura 25. El análisis por Western blot de la proteína de la subunidad α_3 del receptor GABA_A en el NRT.

Figura 25. El análisis por Western blot de la proteína de la subunidad α_3 del receptor GABA_A en el NRT; en CNRT (grupo control), LNRT (grupo con lesión unilateral del GP). A) Los datos son presentados como la expresión relativa de proteína (DO: densidad óptica) normalizada con β -actina. B) t-Student * $p = 0.009$, diferencia significativa respecto al grupo control. Datos mostrados como media $\pm$ error estándar ($n = 6$ ratas por grupo).

10. DISCUSIÓN

El núcleo reticular del tálamo es un grupo de neuronas gabaérgicas que están involucradas en múltiples procesos para la integración y el procesamiento de la información sensorial, motora, atencional y cognitiva. Además, es responsable de la modulación de las actividades rítmicas talamocorticales [Lee *et al.*, 2007; Pinault, 2004]. Las neuronas reticulares poseen predominantemente la subunidad α_3 de los receptores GABA_A [Mozrzymas *et al.*, 2007; Pratt y Morris, 2015; Waldvogel *et al.*, 2017], el cual determina el grado de inhibición que el GP ejerce sobre las neuronas del NRT para la generación del disparo en ráfaga [Liu X. B. *et al.*, 2007]. Además, la principal entrada GABAérgica desde el GP hacia el NRT es modulada por dopamina, a través de receptores dopaminérgicos D₄, los cuales se localizan en las terminales axónicas pálido-reticulares [Gasca-Martinez, D. 2010; Govindaiah *et al.*, 2010]. De esta forma, las terminales axónicas provenientes del GP reciben fibras dopaminérgicas desde la pars compacta de la sustancia negra, las cuales modulan la liberación de GABA por medio de una inhibición presináptica de los receptores dopaminérgicos D₄ [Floran B. *et al.*, 2004; Pazo *et al.*, 2013].

El registro extracelular unitario de las neuronas del NRT que se llevó a cabo en este trabajo mostró en los individuos control dos tipos de disparo, el disparo tónico y el disparo en ráfagas. El modo de disparo que presentan está determinado por el potencial de membrana, el cual se caracteriza por presentar dos tipos, uno llamado tónico, que se presenta cuando la neurona se despolariza y depende de sus interacciones con la corteza y con el tálamo a través de proyecciones glutamatérgicas, noradrenérgicas, provenientes del locus coeruleus del tallo cerebral, serotoninérgicas,

provenientes del núcleo del rafe dorsal y colinérgicas, provenientes del núcleo pedúnculo pontino. El otro tipo de disparo es en ráfagas y ocurre cuando la neurona está hiperpolarizada; este tipo de disparo depende de las proyecciones gabaérgicas que se proyectan desde el GP [Morrison y Foote, 1986; Pinault, 2004; Govindaiah *et al.*, 2010]. Las terminales axónicas del GP reciben sinapsis dopaminérgicas desde la SNc, las cuales modulan la liberación de GABA a través de inhibición presináptica mediante los receptores dopaminérgicos D4 [Pazo *et al.*, 2013]. Las lesiones en el GP que se realizaron con el ácido quinolínico tienen un efecto óptimo, ya que son específicas para el GP interno (núcleo endopeduncular) en las proyecciones estriado-palidales y no causa lesiones en los axones que pasan a través de él, como es la vía estriado-nigral [Hauber *et al.*, 1998; Lonser *et al.*, 1999]. Los resultados obtenidos muestran que la lesión unilateral del GP causó el incremento en la frecuencia de disparo tónico y la disminución de los disparos en ráfagas de las neuronas del NRT ipsilateral. Esto se comprobó midiendo el intervalo inter espiga, que muestra los tiempos entre disparos y la distribución de la longitud de los intervalos que separa dos disparos consecutivos. Un disparo tónico se identifica por disparos periódicos; en cambio, los patrones temporales para determinar la presencia de una ráfaga presentan un mínimo de dos espigas consecutivas, precedidas de un silencio de al menos 50 ms, y con un máximo de 6 ms entre espigas [Weyand *et al.*, 2001]. La disminución de los disparos en ráfaga en las neuronas reticulares talámicas puede atribuirse a la disminución de la liberación de GABA, debido a la pérdida de las neuronas gabaérgicas que proyectan desde el GP, debido a que solamente queda el 23 % de las neuronas palidales después de la lesión. Al mismo tiempo, las proyecciones

talamocorticales y corticotálámicas, además de las que provienen de núcleos del tronco encefálico parecen favorecer el incremento del número de disparos tónicos debido a la liberación de DA, 5HT y NA liberados de la SNCc, del rafe dorsal y del locus coeruleus, respectivamente [Guillery y Harting, 2003].

La baja liberación de GABA también podría ser responsable de la reducción de los disparos en ráfaga de las neuronas reticulares. El NRT contiene neuronas gabaérgicas y está involucrado en múltiples procesos de integración y procesamiento de información sensorio-motora, atencional y cognitiva, también es responsable de la modulación global de las actividades tálamo-corticales [Lee *et al.*, 2007; Pinault, 2004]. Como ya se mencionó, la subunidad α_3 de los receptores GABA_A predomina en las neuronas del NRT [Mozrzymas *et al.*, 2007; Pratt y Morrison, 2015], lo que determina el grado de inhibición o silenciamiento que el GP ejerce sobre las células del NRT, generando ráfagas [Liu *et al.*, 2007]. Además, la principal entrada GABAérgica desde el GP hacia el NRT está modulado por receptores dopaminérgicos D₄, localizados en las terminales axónicas pálido-reticulares [Gasca-Martinez *et al.*, 2010; Govindaiah *et al.*, 2010]. De esta forma, las fibras dopaminérgicas que proyectan desde la SNc modulan la liberación de GABA, mediante la inhibición presináptica por los receptores D₄ [Florán *et al.*, 2004; Pazo *et al.*, 2013].

Con respecto a los resultados sobre la expresión relativa del ARNm para el receptor dopaminérgico D₄ en el NRT, se observó aumento en las ratas del grupo con lesión unilateral del GP derecho, en comparación con los animales del grupo control. Considerando que la lesión del GP no fue total, sino que solo el 80 % de las neuronas

fue destruido, es posible que el 20 % de las neuronas que no fueron destruidas en el GP, hayan incrementado tanto la expresión del ARNm como el contenido de la proteína D₄, probablemente como un mecanismo compensatorio, debido a la presencia de colaterales recurrentes de fibras nerviosas dopaminérgicas desde la SNc, que son más del 50 % [Gasca-Martinez *et al.*, 2010]. Con respecto al decremento de la expresión relativa del ARNm para la subunidad α_3 del receptor GABAérgico en el NRT, esto podría deberse a la baja liberación de GABA, dado el pequeño número remanente de neuronas gabaérgicas después de la lesión (aproximadamente 23 %). Esto, aunado al incremento en el receptor D₄, el cual contribuye a la inhibición de la liberación de GABA desde las neuronas del GP, resulta en el decremento del ARNm para la subunidad α_3 del receptor GABA (Graziane *et al.*, 2009). Considerando que el NRT está innervado por neuronas provenientes de la SNc y que la sobre exposición de las neuronas a un neurotransmisor causa tolerancia o desensibilización, modificando la síntesis o degradación de los receptores, podría especularse que el aumento del ARNm para el receptor D₄, así como la proteína pudieran deberse a proyecciones de colaterales recurrentes de la SNc. Es probable que estas proyecciones continúen liberando la misma cantidad de neurotransmisor; sin embargo, la lesión del GP redujo el número de neuronas que reciben dopamina, por lo que el aumento en el número de receptores D₄ podría ser un mecanismo de compensación de la reducción de la transmisión GABAérgica después de la lesión del GP.

En el caso de la subunidad α_3 del receptor GABA_A, la disminución del ARNm en el NRT contrasta con los datos de inmunohistoquímica y el contenido de la proteína en

ese núcleo, que muestran incremento en la proteína. Este contraste podría deberse a ARN de interferencia (iARN), como un posible mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos, que consiste en la degradación de ARNm específicos; también podría deberse a procesos post-traduccionales, tales como la metilación, la acetilación, hidroxilación o fosforilación (Agrawal *et al.*, 2003; Zhu y Palli, 2020; Mattick y Amaral, 2022). Existen también otros mecanismos, como los ARN pequeños no codificantes (snoARN), los cuales se requieren predominantemente en la maduración de los ARNm y ribosomal. Los snoRNAs llevan a cabo funciones celulares como la regulación transcripcional, muchos de ellos son derivados de intrones, que son transcritos no codificantes de proteínas y que tienen funciones reguladoras del ARN (Nahkuri *et al.*, 2008; Ogorelkova *et al.*, 2009; Kishore *et al.*, 2010). El aumento del contenido de la subunidad α_3 en el NRT podría deberse al bajo número de neuronas gabaérgicas que proyectan desde el GP, causando baja liberación de GABA hacia las neuronas del NRT, ocasionando el aumento en la síntesis de la subunidad α_3 . Sin embargo, el disparo tónico se incrementó debido a la lesión del GP; esto indica que el aumento de la subunidad α_3 del receptor GABA_A no compensa la disminución de la liberación de GABA, por lo que se pierde la inhibición de las neuronas del NRT por el GABA, por lo que la frecuencia del disparo tónico aumenta. Las proyecciones gabaérgicas del GP al NRT pueden influenciar directamente la transmisión talamocortical a través de la actividad de las neuronas del NRT (Asanuma, 1994), ya que el NRT es la estructura que conecta los circuitos talamocorticales y corticotalámicos, actuando como un mediador de la atención selectiva y un iniciador de las actividades corticotalámicas rítmicas (Zhao *et al.*, 2020).

Por tanto, si la actividad del NRT se vuelve aberrante o existe algún defecto en la neurotransmisión GABAérgica por las neuronas de dicho núcleo, esto puede causar la activación de la corteza cerebral y generar ritmos inusuales en el procesamiento de la información talamocortical.

11. CONCLUSIONES

Los hallazgos reportados en este estudio muestran que la lesión unilateral del GP incrementa la frecuencia del disparo tónico y disminuyen las ráfagas de las neuronas del NRT.

Las neuronas reticulares presentan mecanismos compensatorios moleculares para el receptor dopaminérgico D₄ que suprimen la liberación de GABA lo que aumenta los disparos tónicos en las neuronas del NRT.

La subunidad $\alpha 3$ del receptor GABA_A tiene posibles cambios post-traduccionales en las neuronas del NRT que se relacionan con la disminución del disparo en ráfagas por parte de las neuronas reticulares.

12. PERSPECTIVAS

De manera general, considerando que el registro celular de las neuronas reticulares reveló un cambio en la frecuencia de disparo tras la lesión del globo pálido, en este estudio se sugirió que el cambio en la frecuencia de disparo en las neuronas del NRT se debe a los mecanismos moleculares del receptor dopaminérgico D4 y de la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABAérgico. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales se lleva a cabo ese cambio en la actividad eléctrica de las neuronas reticulares no han sido dilucidado. Por lo tanto, se sugiere que, sería adecuado la incorporación de estudios de visualización de los receptores a través de inmunofluorescencia y estudios farmacológicos que permitirán evaluar el sitio específico de la terminal sináptica (presináptico o postsináptico) donde se expresan los receptores D4 y la subunidad $\alpha 3$ en el NRT, además de, ampliar los estudios moleculares que pertenecen a la vía pálido-reticular.

13. REFERENCIAS

1. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4):657-85. doi:10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003. PMID: 14665679; PMCID: PMC309050.
2. Ahrens S, Jaramillo S, Yu K, Ghosh S, Hwang GR, Paik R, Lai C, He M, Huang ZJ, Li B. (2015). ErbB4 regulation of a thalamic reticular nucleus circuit for sensory selection. *Nat Neurosci.* 18(1):104-11. doi: 10.1038/nn.3897. Epub 2014 Dec 15. PMID: 25501036; PMCID: PMC4281280.
3. Alatorre A, Farfán E, Oviedo A, Martínez J, Querejeta E. (2019). Electrical activity of the reticular thalamic nucleus is controlled in a differential way by the globus pallidus. *Presentación de Poster. Neuroscience October 19-23. Chicago, IL.*
4. Asanuma C, Porter LL. (1990). Light and electron microscopic evidence for a GABAergic projection from the caudal basal forebrain to the thalamic reticular nucleus in rats. *J. Comp. Neurol.* (302) 159-172
5. Asanuma C. (1994). GABAergic and pallidal terminals in the thalamic reticular nucleus of squirrel monkeys. *Exp. Brain Res.* (101) 439-451
6. Avila-Luna A, Bueno-Nava A. (2014). Los ganglios basales: la participación dopaminérgica estriatal. *Investigación en Discapacidad.*3(1):19-24.
7. Avram M, Brandl F, Bäuml J, and Sorg C, (2018). Cortico-thalamic hypo- and hyperconnectivity extend consistently to basal ganglia in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* (43) 2239-2248 www.nature.com/npp

8. Bal T, McCormick DA. (1996). What stops synchronized thalamocortical oscillations. *Neuron* (17) 297-308
9. Bazhenov M, Timofeev I, Steriade M, Sejnowski TJ. (1999). Self-sustained rhythmic activity in the thalamic reticular nucleus mediated by depolarizing GABAA receptor potentials. *Nat Neurosci.* 2(2):168-74. doi: 10.1038/5729. PMID: 10195202.
10. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 63(1):182-217. doi: 10.1124/pr.110.002642. PMID: 21303898.
11. Benarroch EE. (2016). Intrinsic circuits of the striatum: Complexity and clinical correlations. *Neurology.* 86(16):1531-42. doi: 10.1212/WNL.0000000000002599. PMID: 27009259.
12. Bollan K, King D, Robertson LA, Brown K, Taylor PM, Moss SJ, Connolly CN. (2003). GABA(A) receptor composition is determined by distinct assembly signals within alpha and beta subunits. *J Biol Chem.* 278(7):4747-55. doi: 10.1074/jbc.M210229200. PMID: 12471031.
13. Byoung-Kyong Min (2010). A thalamic reticular networking model of consciousness. *Min Theoretical Biology and Medical Modelling* 7-10
14. Chen L, Yang C, Mower GD. (2001). Developmental changes in the expression of GABA(A) receptor subunits (alpha(1), alpha(2), alpha(3)) in the cat visual cortex and the effects of dark rearing. *Brain Res Mol Brain Res.* 88(1-2):135-43. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00042-0. PMID: 11295239.

15. Cheong E, Shin HS. (2013). T-type Ca^{2+} channels in absence epilepsy. *Biochim Biophys Acta*. 1828(7):1560-71. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.02.002. PMID: 23416255.
16. Clemente Perez A, Ritter Makinson S, Higashikubo B, Acsády L, Deisseroth K, Paz T. J. (2017). Distinct Thalamic Reticular Cell Types Differentially Modulate Normal and Pathological Cortical Rhythms. *Cell Reports* 19, 2130-2142
17. Clinton Sarah M, Hisham M. Ibrahim, Kirk A. Frey, Kenneth L. Davis, Vahram Haroutunian, James H. Meador-Woodruff. (2005). Dopaminergic abnormalities in select thalamic nuclei in schizophrenia: involvement of the intracellular signal integrating proteins calcyon and spinophilin. *Am J Psychiatry* (162) 1859-1871
18. Conde Rojas I, Acosta-García J, Caballero-Florán RN, Jijón-Lorenzo R, Recillas-Morales S, Avalos-Fuentes JA, Paz-Bermúdez F, Leyva-Gómez G, Cortés H, Florán B. (2020). Dopamine D4 receptor modulates inhibitory transmission in pallido-pallidal terminals and regulates motor behavior. *Eur J Neurosci*. 52(11):4563-4585. doi: 10.1111/ejn.15020. PMID: 33098606.
19. Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT. (1990). Projections to the rostral reticular thalamic nucleus in the rat. *Experimental Brain Research* (80) 157-171
20. Crabtree J. W (2018). Functional Diversity of Thalamic Reticular Subnetworks. *Front. Syst. Neurosci* 12:41
21. Crick F. (1984). Function of the thalamic reticular complex: the searchlight hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81(14):4586-90. doi: 10.1073/pnas.81.14.4586. PMID: 6589612; PMCID: PMC345636.

22. Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC. (1997). Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Brain Res Mol Brain Res.* 45(1):1-12. doi: 10.1016/s0169-328x(96)00235-5. PMID: 9105665.
23. Deleuze C. and Huguenard J. R, (2016). Two classes of excitatory synaptic responses in rat thalamic reticular neurons. *J Neurophysiol* (116) 995-1011.
24. Erlij D, Acosta-García J, Rojas-Márquez M, González-Hernández B, Escartín-Perez E, Aceves J, Florán B. (2012). Dopamine D4 receptor stimulation in GABAergic projections of the globus pallidus to the reticular thalamic nucleus and the substantia nigra reticulata of the rat decreases locomotor activity. *Neuropharmacology.* 62(2):1111-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.11.001. PMID: 22108379.
25. Filipowicz W. (2022). RNA, the epicenter of genetic information: written by John Mattick and Paulo Amaral, CRC Press, Boca Raton. *RNA Biol.* 19(1):961-2. doi: 10.1080/15476286.2022.2108246. PMCID: PMC9359375.
26. Florán B, Florán L, Erlij D, Aceves J. (2004). Activation of dopamine D4 receptors modulates [3H] GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus. *Neuropharmacology.* 46(4):497-503. doi: 10.1016/j.neuropharm.2003.10.004. PMID: 14975673.
27. Foster NN, Barry J, Korobkova L, Garcia L, Gao L, Becerra M, Sherafat Y, Peng B, Li X, Choi JH, Gou L, Zingg B, Azam S, Lo D, Khanjani N, Zhang B, Stanis J, Bowman I, Cotter K, Cao C, Yamashita S, Tugangui A, Li A, Jiang T, Jia X, Feng Z, Aquino S, Mun HS, Zhu M, Santarelli A, Benavidez NL, Song M, Dan G, Fayzullina M, Ustrell S, Boesen T, Johnson DL, Xu H, Bienkowski MS, Yang XW,

- Gong H, Levine MS, Wickersham I, Luo Q, Hahn JD, Lim BK, Zhang LI, Cepeda C, Hintiryan H, Dong HW. (2021). The mouse cortico-basal ganglia-thalamic network. *Nature*. 598(7879):188-194. doi: 10.1038/s41586-021-03993-3. PMID: 34616074; PMCID: PMC8494639.
28. Fritschy JM, Mohler H. (1995). GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*. 359(1):154-94. doi: 10.1002/cne.903590111. PMID: 8557845.
 29. Gandia JA, de las Heras, S, García M, Gimenez-Amaya JM. (1993). Afferent projections to the reticular thalamic nucleus from the globus pallidus and the substantia nigra in the rat. *Brain Research Bulletin* (32) 351-358
 30. Garret E. A. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann. Rev. Neuroscience* (9) 357-381
 31. Gasca-Martinez, D., Henandez, A., Sierra, A., Valdiosera, R., Anaya-Martinez, V., Floran, B., Erlij, D., and Aceves, J. (2010). Dopamine inhibits GABA transmission from the globus pallidus to the thalamic reticular nucleus via presynaptic D4 receptors. *Neuroscience* (169) 1672-1681
 32. Govindaiah G, Wang T, Gillette MU, Crandall SR, Cox CL. (2010). Regulation of inhibitory synapses by presynaptic D₄ dopamine receptors in thalamus. *J Neurophysiol*. 104(5):2757-65. doi: 10.1152/jn.00361.2010. PMID: 20884758; PMCID: PMC2997036.
 33. Grillner S, Robertson B, Kotaleski JH. (2020). Basal Ganglia-A Motion Perspective. *Compr Physiol*. 10(4):1241-1275. doi: 10.1002/cphy.c190045. PMID: 32969510.

34. Guido W, Weyand T. (1995). Burst responses in thalamic relay cells of the awake behaving cat. *J Neurophysiol.* 74(4):1782-6. doi: 10.1152/jn.1995.74.4.1782. PMID: 8989413.
 35. Guillery RW, Harting JK. (2003). Structure and connections of the thalamic reticular nucleus: advancing views over half a century. *J Comp Neurol* (463) 360-371
 36. Gutierrez C, Cox CL, Rinzel J, Sherman SM. (2001). Dynamics of low-threshold spike activation in relay neurons of the cat lateral geniculate nucleus. *J Neurosci.* 21(3):1022-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-03-01022.2001. PMID: 11157087; PMCID: PMC6762305.
 37. Haber S, N, (2016). Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience* (18)
 38. Haber S. N. (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chemical Neuroanatomy* (26) 317-330
 39. Halassa MM, Acsády L. (2016). Thalamic Inhibition: Diverse Sources, Diverse Scales. *Trends Neurosci.* 39(10):680-693. doi: 10.1016/j.tins.2016.08.001. PMID: 27589879; PMCID: PMC5048590.
 40. Hauber W, Lutz S, and Mönkle M. (1998). The effects of globus pallidus lesions on dopamine-dependent motor behaviour in rats. *Neuroscience* (86) 147-157
 41. Hazrati LN, Parent A. (1991). Projection from the external pallidum to the reticular thalamic nucleus in the squirrel monkey. *Brain Research* (550) 142-146
- head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

42. hj J. (1997) Cap. 4. Basal ganglia. [McGovern Medical School at UTHealth](#). Site webmaster:nba.webmaster@uth.tmc.edu
43. Hjernevik T, Leergaard TB, Darine D, *et al.* (2007). Three-Dimensional Atlas System for Mouse and Rat Brain Imaging Data. *Frontiers in Neuroinformatics*. 1:4. doi:10.3389/neuro.11.004.2007.
44. Hou G, Smith AG, Zhang ZW. (2016). Lack of Intrinsic GABAergic Connections in the Thalamic Reticular Nucleus of the Mouse. *J Neurosci*. 36(27):7246-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0607-16.2016. PMID: 27383598; PMCID: PMC4938865.
45. Javitt Daniel C. and Sweet Robert A. (2015). Auditory dysfunction in schizophrenia: integrating clinical and basic features. *Nature Reviews Neuroscience* (16) 535-550
46. Kaur S, Maslov LN, Singh N, Jaggi AS. (2019). Dual role of T-type calcium channels in anxiety-related behavior. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 31(3):/j/jbcpp.2020.31.issue-3/jbcpp-2019-0067/jbcpp-2019-0067.xml. doi: 10.1515/jbcpp-2019-0067. PMID: 31644427.
47. Kimura A, Yokoi I, Imbe H, Donishi T, Kaneoke Y. (2012). Auditory thalamic reticular nucleus of the rat: anatomical nodes for modulation of auditory and cross-modal sensory processing in the loop connectivity between the cortex and thalamus. *J Comp Neurol*. 520(7):1457-80. doi: 10.1002/cne.22805. PMID: 22101990.
48. Kishore S, Khanna A, Zhang Z, Hui J, Balwierz PJ, Stefan M, Beach C, Nicholls RD, Zavolan M, Stamm S. (2010). The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is

- processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Hum Mol Genet.* 19(7):1153-64. doi: 10.1093/hmg/ddp585. Epub 2010 Jan 6. PMID: 20053671; PMCID: PMC2838533.
49. Knierim J. (2020) Neuroanatomy online. Chapter 4: Basal Ganglia. <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s3/chapter04.html>
50. Kreitzer AC, Malenka RC. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron.* 60(4):543-54. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.005. PMID: 19038213; PMCID: PMC2724179.
51. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0. PMID: 5432063.
52. Lee S. H, Govindaiah G, Cox L. C, (2007). Heterogeneity of firing properties among rat thalamic reticular nucleus neurons. *J Physiol* (582.1) 195-208
53. Lindgren N, Usiello A, Goigny M, Haycock J, Erbs E, Greengard P, Hokfelt T, Borrelli E, Fisone G. (2003). Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7):4305-9. doi: 10.1073/pnas.0730708100. PMID: 12651945; PMCID: PMC153088.
54. Liu XB, Coble J, van Luijckelaar G, Jones EG. (2007). Reticular nucleus-specific changes in alpha3 subunit protein at GABA synapses in genetically epilepsy-prone rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(30):12512-7. doi: 10.1073/pnas.0705320104. PMID: 17630284; PMCID: PMC1916487.

55. Medel-Matus J. S. Cortijo-Pañacios L. X. Gasca-Pérez E. Susan-Tepetlan P. V. Pérez-Palacios A. Ramos-Morles (2011). Receptor GABAA: implicaciones farmacológicas a nivel central. Archivos de Neurociencias (Mex) Vol. 16, No. 1: 40-45
56. Moreno, A. (2017). Regulación del transportador de dopamina por autorreceptores.
<https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/6796/Regulacion%20del%20Transportador%20de%20Dopamina%20por%20autoreceptores.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
57. Morrison, J. H. and Foote, S.L. (1986). Noradrenergic and serotonergic innervations of cortical, thalamic, and tectal visual structures in Old and New World monkeys. J. Comp Neurol. (243) 117-138
58. Mrzljak, L., Bergson, C., Pappy, M., Huff, R., Levenson, R. and Goldman-Rakic, P.S. (1994). Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. Nature (381) 245-248
59. Mozrzymas JW, Barberis A, Vicini S. (2007). GABAergic currents in RT and VB thalamic nuclei follow kinetic pattern of alpha3- and alpha1-subunit-containing GABAA receptors. Eur J Neurosci. 26(3):657-65. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05693.x. PMID: 17651426; PMCID: PMC1978095.
60. Nahkuri S, Taft RJ, Korbie DJ, Mattick JS. (2008). Molecular evolution of the HBII-52 snoRNA cluster. J Mol Biol. 381(4):810-5. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.057. PMID: 18616950.

61. Ogorelkova M, Navarro A, Vivarelli F, Ramirez-Soriano A, Estivill X. (2009). Positive selection and gene conversion drive the evolution of a brain-expressed snoRNAs cluster. *Mol Biol Evol.* 26(11):2563-71. doi: 10.1093/molbev/msp173. PMID: 19651851.
62. Parent A, Hazrati L. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I- The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain research news* (20) 91-127
63. Paxinos G, Watson C (2006). The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Academic Press
64. Pazo JH, Barceló A, Bellantonio E, Pazo VC, Almares N. (2013). Electrophysiological study of globus pallidus projectiones to the thalamic reticular nucleus. *Brain Research Bulletin* (94) 82-89
65. Pinault D. (2004). The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Research Reviews* (46) 1-31
66. Pinault, D. (2011). Dysfunctional Thalamus-Related Networks in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* vol. 37(2) 238-243
67. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. (2000). GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* 101(4):815-50. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00442-5. PMID: 11113332.
68. Prager EM, Plotkin JL. (2019). Compartmental function and modulation of the striatum. *J Neurosci Res.* 97(12):1503-1514. doi: 10.1002/jnr.24522. PMID: 31489687; PMCID: PMC6801090.

69. Pratt J. A. and Morris B, (2015). The thalamic reticular nucleus: a functional hub for thalamocortical network dysfunction in schizophrenia and target for drug discovery. *J. Psych pharm* (29)127-137.
70. Ramcharan EJ, Gnadt JW, Sherman SM. (2005). Higher-order thalamic relays burst more than first-order relays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(34):12236-41. doi: 10.1073/pnas.0502843102. PMID: 16099832; PMCID: PMC1189315.
71. Rangel-Galván M. (2020). Los canales de calcio tipo T: estructura, función y canalopatías. *Elementos* 119. 43-48.
72. Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K. (2010). The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci*. 67(12):1971-86. doi: 10.1007/s00018-010-0293-y. PMID: 20165900.
73. Sherman SM, Guillery RW. (2002). The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 357(1428):1695-708. doi: 10.1098/rstb.2002.1161. PMID: 12626004; PMCID: PMC1693087.
74. Sherman, S. & Guillery, R. (2006). *Exploring the Thalamus and its Role in Cortical Functioning*. Academic Press, New York, NY.
75. Shosaku A, Kayama Y, Sumimoto C. (1984). Somatotropic organization in the rat thalamic reticular nucleus. *Brain Research* (311) 57-63
76. Shosaku A, Sumimoto C. (1983). Auditory neurons in the rat thalamic reticular nucleus. *Brain Research* 432-442.
77. Skinbjerg M, Sibley DR, Javitch JA, Abi-Dargham A. (2012). Imaging the high-affinity state of the dopamine D2 receptor in vivo: fact or fiction? *Biochem*

- Pharmacol. 83(2):193-8. doi: 10.1016/j.bcp.2011.09.008. PMID: 21945484; PMCID: PMC3610415.
78. Soto, E., Vega, R. (1987). A Turbo Pascal program for on line spike data acquisition and analysis using a standard serial port. *J. Neurosci. Meth.* 19, 61-68.
79. Steriade M. (2005). Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends Neurosci.* 28(6):317-24. doi: 10.1016/j.tins.2005.03.007. PMID: 15927688.
80. Sun YG, Wu CS, Renger JJ, Uebele VN, Lu HC, Beierlein M. (2012). GABAergic synaptic transmission triggers action potentials in thalamic reticular nucleus neurons. *J Neurosci.* 32(23):7782-90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0839-12.2012. PMID: 22674255; PMCID: PMC3376355.
81. Sun YG, Wu CS, Renger JJ, Uebele VN, Lu HC, Beierlein M. (2012). GABAergic synaptic transmission triggers action potentials in thalamic reticular nucleus neurons. *J Neurosci.* 32(23):7782-90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0839-12.2012. PMID: 22674255; PMCID: PMC3376355.
82. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 76(9): 4350-4354.
83. Villalobos N, Oviedo-Chávez A, Alatorre A, Ríos A, Barrientos R, Delgado A, Querejeta E. (2016). Striatum and globus pallidus control the electrical activity of reticular thalamic nuclei. *Brain Res.* 1644:258-66. doi: 10.1016/j.brainres.2016.05.032. PMID: 27208494.

84. Wang X, Zhong P, Yan Z. (2002). Dopamine D4 receptors modulate GABAergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J Neurosci*. 22(21):9185-93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-21-09185.2002. PMID: 12417643; PMCID: PMC6758062.
85. Weyand TG, Boudreaux M, Guido W. (2001). Burst and tonic response modes in thalamic neurons during sleep and wakefulness. *J Neurophysiol*. 85(3):1107-18. doi: 10.1152/jn.2001.85.3.1107. PMID: 11247981.
86. Woodward D. N, and Heckers S. (2016). Mapping thalamocortical functional connectivity in chronic and early stages of psychotic disorders. *Biological Psychiatry*. 79: 1016-1025
87. Yee B.K, Keist R, Von Boehme L, Studer R, Benke D, Hagenbuch N, Dong Y, Malenka R. C, Fritschy J. M, Bluethmann H, Feldon J, and Rudolph U. (2005). A schizophrenia-related sensorimotor deficit links $\alpha 3$ -containing GABA_A receptors to a dopamine hyperfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (47) 17154-17159.
88. Zhao W, Guo S, Linli Z, Yang C. A, Lin C. P, Tsai S. J, (2019). Functional, Anatomical, and Morphological Networks Highlight the Role of Basal Ganglia-Thalamus-Cortex Circuits in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, Volume 46(2) 422-431
89. Zhu KY, Palli SR. (2020). Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annu Rev Entomol*. 65:293-311. doi: 10.1146/annurev-ento-011019-025224. PMID: 31610134; PMCID: PMC9939233.

90. Zikopoulos B, Barbas H. (2007). Circuits for multisensory integration and attentional modulation through the prefrontal cortex and the thalamic reticular nucleus in primates. *Rev Neurosci*. 18(6):417-38. doi: 10.1515/revneuro.2007.18.6.417. PMID: 18330211; PMCID: PMC2855189.

Changes in D₄ and GABA_A subunit α_3 receptors in the thalamic reticular nucleus caused by unilateral lesion of the globus pallidus

Lizette Montoya-Gress¹, Lizbeth Juárez-Rojas², Julio Almanza-Pérez³, Eunice Farfán-García⁴, Luis Gómez-Quiroz⁵, Mohammad Mehdi Ommati⁶, Reza Heidari⁷, Enrique Querejeta-Villagómez⁴, Alberto Alatorre-Pérez⁴, Socorro Retana-Márquez^{2*}

¹ Postgraduate in Experimental Biology, Health and Biological Sciences Division, Autonomous Metropolitan University-Iztapalapa, Mexico

² Department of Biology of Reproduction, Autonomous Metropolitan University-Iztapalapa, Mexico

³ Pharmacology Laboratory, Department of Health Sciences, Autonomous Metropolitan University-Iztapalapa, Mexico

⁴ Section of Postgraduate Studies and Research, Higher School of Medicine of the National Polytechnic Institute, Mexico City, Mexico

⁵ Area of Experimental and Translational Medicine, Department of Health Sciences, Autonomous Metropolitan University-Iztapalapa, Mexico

⁶ Henan Key Laboratory of Environmental and Animal Product Safety, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China

⁷ Pharmaceutical Sciences Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

* Email: rems@xanum.uam.mx

The thalamic reticular nucleus controls information processing in thalamocortical neurons. GABAergic neurons present in this nucleus express the α_3 subunit of post-synaptic GABA_A receptors, which bind GABA from globus pallidus neurons. Pallidal neurons, in turn, have dopaminergic D₄ receptors in their axon terminals. The thalamic reticular nucleus connects reciprocally with the thalamus, and it receives afferents from the brain cortex, as well as from other brain structures that have an important role in the modulation of the thalamic network. Based on the above, the purpose of this study was to assess the electrophysiological and molecular effects of unilateral lesion of the globus pallidus on the electric activity of the thalamic reticular nucleus. Two-month-old male rats were used. The right globus pallidus was lesioned with quinolinic acid. Seven days after the lesion, ipsilateral turning was registered, confirming the lesion. Afterward, electrophysiological evaluation of the right thalamic reticular nucleus' electrical activity was performed. Subsequently, mRNA expression for D₄ receptors and subunit α_3 , as well as protein content were assessed in the right reticular nucleus. Pallidum lesion caused an increase in firing frequency and decreased firing bursts of reticular neurons. In addition, dopaminergic D₄ mRNA, as well as protein increased. In contrast, GABAergic GABA_A subunit α_3 expression was suppressed, but protein content increased. These results show that the globus pallidus regulates firing in reticular neurons through D₄ receptors and subunit α_3 of GABA_A receptor in the reticular nucleus of the thalamus.

Key words: thalamic reticular nucleus, globus pallidus, thalamocortical pathway, D₄ receptors, GABA_A α_3 subunit

INTRODUCTION

The thalamic reticular nucleus (TRN) is a cluster of GABAergic neurons surrounding the thalamus (Florán et al., 2004; Sun et al., 2012; Ahrens et al., 2015; Hou

et al., 2016; Villalobos et al., 2016). Reticular neurons do not project directly to the cerebral cortex, instead, they send GABAergic projections to different nearby thalamic nuclei, thereby inhibiting their activity, due to its key location between the cortex and the thalamus. All thalamic-cortical (TC), cortical-thalamic (CT),

and reticular-thalamic (RT) projections constitute a unified and topographically organized circuit (Lam and Sherman, 2011). Furthermore, seven sectors have been identified in the TRN: motor, auditory, visual, somatosensory, limbic, gustatory, and visceral (Shosaku & Sumimoto, 1983; Shosaku et al., 1984; Kimura et al., 2012; Clemente-Perez et al., 2017; Crabtree, 2018). Many TC and CT neurons innervate a single GABAergic neuron in the TRN which, in turn, sends projections to many TC neurons (Pinault, 2004; Pratt & Morris, 2015). The large receptive fields for the TRN and its inhibitory cells have led to the idea that it has an integrative role, since each sector of the TRN receives projections from the corresponding cortical and thalamic neurons, projecting back to the thalamic nucleus that innervates it. Also, it is possible that this nucleus communicates to the cortex and the striatum through the circuit formed by the TC-RT-CT projections in the reticular neurons that can inhibit and temporarily interrupt neuronal activation in some thalamic nucleus located in the vicinity. These interactions between pairs of thalamic nuclei are reciprocal and modulate the transmission of information through the thalamus to the cerebral cortex, the striatum, and other structures of the basal ganglia (Crabtree, 2018).

The TRN receives not only glutamatergic projections from the thalamus and cortex, but also GABAergic projections from the globus pallidus (GP) (Villalobos et al., 2016), and dopaminergic projections from the pars compacta substantia nigra (SNc). However, SNc neurons do not synapse directly with TRN neurons, but rather with GABAergic pallidal neurons by axo-axonic synapses (Govindaiah et al., 2010).

The TRN nucleus has two types of neural responses, the tonic mode, and low-threshold bursts, defined by the polarization state of the cell membrane. These two responses are related to the way in which the transmission of information between the thalamus and the cortex occurs. Under depolarized conditions, cells fire in a tonic mode, generating individual action potentials of variable frequency, while in states of membrane hyperpolarization, neurons respond through low-threshold bursts. The firing mode depends on the resting membrane potential; when it is around -65 mV, firing is tonic, but when membrane voltage is lower than -65mV, firing is in bursts (Bazhenov et al., 1999; Pinault, 2004; Byoung-Kyong, 2010; Pratt & Morrison, 2015). Membrane hyperpolarization activates low-threshold Ca^{2+} channels, also called T-type channels (Bal & McCormick, 1996), the activation of which allows entry of Ca^{2+} and membrane depolarization, causing a plateau, the duration of which ranges from 100 to 200 ms. Tonic spikes are responsible for subsequent and detailed processing of select

relevant information from thalamic neurons to their respective cortical association area. The burst mode responds to information deviation to primary cortices and redirects the information to association areas for memory processes and to the primary memory cortex to remember the information (Guido & Weyand, 1995).

Although the presence of GABAergic projections from the GP to the TRN is known, their role in the activity of reticular neurons has not been deeply analyzed (Asanuma & Porter, 1990; 1994; Cornwall et al., 1990; Hazrati & Parent, 1991; Gandia et al., 1993). There are a few studies addressing the pallidal-reticular pathway (Pazo et al., 2013). It has been reported that activation of GP predominantly diminishes the spontaneous TRN neurons firing rate, while its inhibition increases their firing rate (Villalobos et al., 2016). Some studies indicate the presence of a high number of D_4 receptors within the TRN, which are located, according to anatomical, immunohistochemical, electrophysiological, and pharmacologic studies, in the presynaptic buttons of pallidal axon terminals (Mrzljak 1994; Defagot et al., 1997). Thus, GABA release from pallidal neurons, mediated by depolarization, is modulated by dopaminergic receptors responding to dopamine (DA) from striatal neurons (Shin et al., 2003; Florán et al., 2004; Gasca-Martínez 2010; Govindaiah et al., 2010; Erlij et al., 2012). Dopaminergic innervation of the thalamic reticular nucleus originates from the substantia nigra pars compacta (SNc) (Gasca-Martínez et al., 2010; Ferrarelli & Tononi, 2011; Pazo et al., 2013). In summary, the activation of the GP inhibits the spontaneous activity of TRN neurons through GABAergic terminals. In turn, dopaminergic neurons from the SNc inhibit GP GABAergic transmission to the TRN *via* presynaptic D_4 dopaminergic receptors, thus activating TRN neurons, which then inhibit thalamic relay neurons, originating a dysfunctional activity in the passage of information to the cerebral cortex (Shin et al., 2003; Gasca-Martínez et al., 2010; Govindaiah et al., 2010; Pazo et al., 2013; Pratt & Morris, 2015).

It is known that the majority of D_4 receptors are present in GABAergic collateral projections going from the GP to the TRN, modulating GABA release (Erlij et al., 2012; Conde-Rojas et al., 2020). D_4 receptors are coupled to $\text{G}_{\alpha i/o}$ proteins, which inhibit adenylyl cyclase and cAMP production (Lindgren et al., 2003; Beaulieu et al., 2011). GABA_A receptors are part of ligand-gated chlorine channels and are responsible for rapid synaptic inhibition in the brain. In mammals, they are pentameric, with different combinations of 17 subunits. There is a great variety of subtypes of GABA_A receptors in the brain, and are responsible for the functional diversity of those re-

ceptors. In rodent brain it seems to comprise at least 12 subunits: $\alpha 1$ -6, $\beta 1$ -3, $\gamma 1$ -3 (Pirker, 2000; Chen, 2001; Bollan et al., 2003). The most abundant subunits in adult rat brain are $\alpha 1$ -6, $\beta 2$, and $\gamma 2$, which are present in 60-90 % of GABA receptors; $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 3$ are moderately abundant, with 15-30% present in the GABA receptor (Fritschy, 1995). Specifically, the pentameric conformation of the subunits that comprise the GABA_A receptor found in reticular cells are: $\alpha 1$ and $\alpha 3$, two $\beta 3$, and one γ (Pirker, 2000). Electrophysiological and immunohistochemical studies show the presence of the $\alpha 3$ subunit in GABA_A receptors, which is the main subtype expressed in the reticular nucleus of the thalamus, in contrast to other nuclei (Yee et al., 2005). The $\alpha 3$ subunit of the GABA_A receptor is important for the function of chloride channels in the TRN neurons, as the activation of GABA_A receptors increases the passage of chloride ions to induce neuron hyperpolarization, thus activating T-type Ca²⁺ channels, which are necessary for the generation of firing bursts (Liu et al., 2007; Mozrzymas et al., 2007). Consequently, deficiency of the $\alpha 3$ subunit disturbs reticular neurons response to pallidal neurons, decreasing generation of firing bursts (Yee et al., 2005; Liu et al., 2007). Therefore, the aim of this study was to evaluate, the effects of a unilateral lesion of the GP on the electrical function of the TRN by using electrophysiological and molecular approaches.

METHODS

Animals

Two-month-old, male Wistar rats (n=40), weighing 180-220 g, with free access to water and food were used. They were divided in two groups: control (n=20) and lesion (n=20). Animals were handled according to the regulations approved by the Animal Care and use Committee of the National Polytechnical Institute, School of Medicine Animal Care Facility. Num. ESM-CICUAL-01/12-10-2016.

Fig. 1 shows the experimental design.

Stereotaxic surgery (unilateral lesion of the right globus pallidus)

Animals were anesthetized with xylazine/ketamine (8 mg/kg + 70 mg/kg ip), placed on a two tower David Kopf stereotaxic device, model 902 (Tujunga, CA, USA). Supplementary doses of anesthesia were given (50-70 mg/kg) if/when the corneal reflex was present. A thermal pad and a rectal thermometer (Frederick Haer & Company, Bowdoin ME, USA) were used to monitor and maintain body temperature at 37.5°C.

For lesion of the right GP, a 30 G caliber cannula was placed with the following coordinates: antero/posteri-

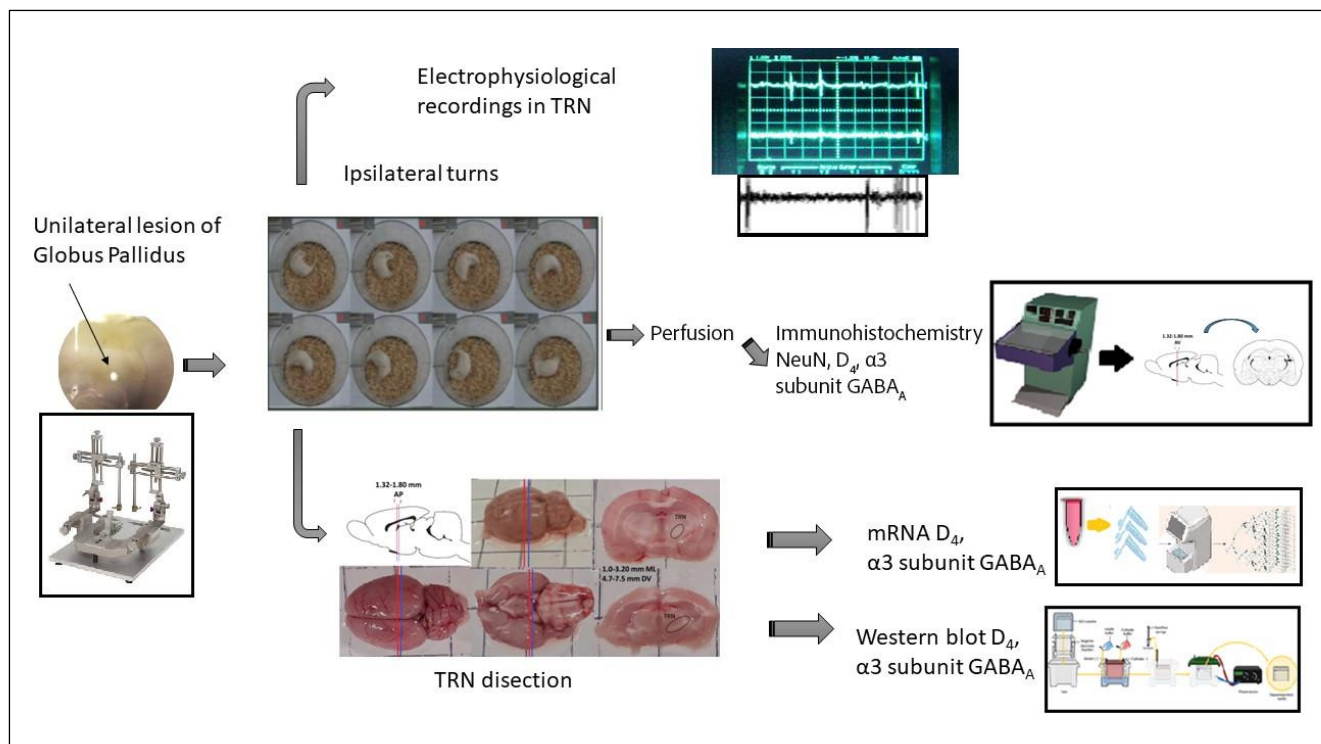


Fig. 1. Experimental design.

or (AP) -0.84 mm from bregma, medial/lateral to midline (ML) 3.0 mm, and dorsal/ventral from dura (DV) 6.5 mm (Paxinos and Watson, 2007). 200 nL of quinolinic acid (240 nmol/ μ L) were applied for a 4-min infusion period. The cannula was maintained in place for 5 min to allow for adequate diffusion of the neurotoxic substance. Quinolinic acid was dissolved in a NaOH (4M) solution, adjusted to a 7.4 pH using a HCl (1M) solution.

Seven days after the lesion by quinolinic acid, the lesion of the GP was assessed by inducing ipsilateral turns with apomorphine (0.1 mg/kg, i.p.). Only those rats presenting more than three turns per min were used for the evaluations. Histological analysis indicated that approximately 80% of cells in the GP died due to quinolinic acid.

NeuN immunoreactivity

One week after the lesion, four rats were euthanized with an overdose of xylazine/ketamine (24 mg/kg + 210 mg/kg, Procin®/Anesket® Vet). Afterward, they were transcardially perfused with a fixative solution (4% paraformaldehyde in PBS 0.1M, pH 7.4). Brains were extracted, stored, and fixed in the same solution for 3 h. Subsequently, brains were dehydrated in 5% and 30% sucrose solutions for 12 h, then frozen and stored at -70°C. Coronal cuts (30 μ m) were obtained, 2 series of 20 slices were collected and stored in a 20% sucrose solution at -20°C. Samples were thawed and washed with PBS (0.1 M, 10% fetal calf serum and 0.5% triton). Anti-NeuN primary antibody (ab104225, Abcam), anti-rabbit secondary antibody (Isab System-hrp kit; DAKO, CA, USA), and ABC peroxidase complex were diluted in PBS with 1% fetal calf serum and 0.125% triton. Incubation with anti-NeuN primary antibody (1:1000) was carried out for 48 h; incubation with anti-rabbit secondary antibody (1:1000), and the ABC peroxidase complex was for 2 h. After incubations, each slice was washed 3 times with PBS for 5 min. Reveal was made using 3.3 mL of amino benzidine (DAKO, CA, USA) 0.05% and H₂O₂ 0.01%. Finally, the sections were dehydrated in increasing alcohol concentrations, followed by xylol, and covered with DPX resin (Entellan™ new) for mounting. The left hemisphere (no lesion) was considered as control; right hemisphere contained the injured the GP. NeuN immunoreactivity was evaluated in 4 sections per animal.

Electrophysiological recordings

To evaluate unitary cell recording in neurons of the TRN, 3 control animal and 3 animals with unilateral lesion of the GP were anesthetized with xylazine/

ketamine (8 mg/kg + 70 mg/kg). A 3 mm burr hole was drilled to allow for neuronal recordings. Once the duramater was visible, we proceeded to remove it using a fine hook. A recording electrode was placed in the TRN; according to Paxinos and Watson (2007), the coordinates for the location of the electrode were: 1.3-1.6 mm AP from bregma, -2.1 mm ML, 5.2-6.5 mm DV into the thalamic reticular nucleus. Borosilicate pipettes (Frederick Haer & Company, Bowdoin ME, USA) made using a puller (Pull-100 WPI, Sarasota, FL, USA) filled with a hyperosmolar NaCl₂ M solution and pontamine blue 1% (resistance 4-8 m Ω).

Extracellular signals were amplified 10³x and filtered using a differential filter between 300 and 3000 Hz (DAM-80 WPI, Sarasota, FL, USA). Signals were previously processed online using a window discriminator (WPI-121, Sarasota, FL, USA), to evaluate the quality of single-unit isolation. Subsequently, signals were stored in a PC, and analyzed offline with the INF-386, program developed by Soto and Vega (1987), and custom MATLAB scripts (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) for peak analysis. Neurons with a stable basal discharge for 5 min were recorded. The interspike interval (ISI) (Weyand et al., 2001), which determines the presence of bursts, and the burst patterns were analyzed to establish whether the lesion of the GP modified the firing frequency of reticular neurons. Four neurons with a stable signal were recorded, one per track to carry out experiments. In total, 12 neurons per group were recorded. The coefficient of variation was considered as the ratio between the standard deviation and the mean of ISI distribution, according to criteria established by Weyand et al. (2001).

At the end of each experiment, a lethal dose (150 mg/kg ip) of pentobarbital was given. Then, a dissection by layers was done up to where the heart was visible. Before finely cutting into the right atrium, the left ventricle was injected with 20 ml of a 4% formaldehyde saline solution. The brain was removed and placed in a 4% formaldehyde solution overnight. Coronal slices (20 μ m) were stained with safranin to observe the trajectories of the recording electrodes.

Thalamic reticular nucleus dissection

Animals (n=6, each group) were euthanized by decapitation, brains were removed from the skull and placed on a Petri dish on ice. The cut was made at 7.68-7.20 mm interaural, and -1.32 to -1.80 AP from bregma (Paxinos & Watson, 2007), to glimpse the tissue to be removed. Subsequently, a small spoon was introduced at the coordinates 1.0- 3.20 mm ML, and 4.7-7.5 mm DV (Paxinos & Watson, 2007). Using a leek-

on spatula, the tissue was extracted from each brain of the control and lesion; TRN was isolated and stored in 1 mL Eppendorf tubes at -80°C until assay.

Determination of mRNA expression in GABA_A receptor subunit $\alpha 3$ and in dopaminergic D₄ receptors

Total RNA was isolated using isolating reagent TriPure (Roche, Indianapolis, IN, USA). Complementary DNA was synthesized with a single strand using the kit for reverse transcription ImProm II (Promega Madison, WI, USA.) following the manufacturer's instructions. cDNA was amplified using SYBR Green Master Mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and the following primers were used:

Target gene	Primer sequence (5' – 3')	Amplicon size (pb)
GABA _A $\alpha 3$	Forward GCTCCAGTGCTTCTTCAAC	196
	Reverse TGATAGCGGATTCCTGTTC	
D ₄	Forward GATGTGTTGGACGCCTTTCT	154
	Reverse AAACTCGGCATTGAAGATGG	
β -actin	Forward GTGGGTAATGGGTCATAGGA	380
	Reverse AGCGCGTAACCTCATAGAT	

Reactions were measured real time in a Rotor-Gene (Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australia). RT-PCR was done using the following cycle conditions: pre-incubation and denaturation at 95°C for 10 min. The threshold cycles (Ct) were measured in duplicate in separate test tubes. The integrity and purity of the amplified products were demonstrated through electrophoresis in a 2% agarose gel. The fusion curve was analyzed at the end of the amplification following the SYBER Green Kit conditions indicated by the manufacturer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Every assay included a negative control for each gene. The values for Δ Ct were calculated in each sample for each gene of interest as follows: Goal Ct – reference Ct (mRNA was stable throughout all experiments). The relative changes in the expression levels of a specific gene ($\Delta\Delta$ Ct) were calculated as the Δ Ct of the test group minus the Δ Ct of the control group, and they were presented as $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

Content of D₄ receptor and GABA_A $\alpha 3$ -subunit

The right TRN was obtained from control (n=6) and unilateral lesion of the GP (n=6) animals and main-

tained at -80°C until assay. The tissue was minced in 200 μ L ice cold Lysis (T-Per tissue protein reagent Thermo Fisher Scientific, Cat 78510, 0.2 M DTT (1, 4-Dithiothreitol), 0.001M PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.001M NaF (Sodium fluoride), 0.2 M Na₃VO₄ (Sodium orthovanadate), protease inhibitors: Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, IN, USA). Tissue was homogenized using a dounce homogenizer. After incubation at 4°C for 15 min, samples were centrifuged at 12 000 $\times$ g for 10 min at 4°C. Supernatants (total protein extract) were transferred to a new tube and stored at -80°C for further use. Protein concentration was determined using the Nano-Drop Spectrophotometer One C with a spectral range of 280 nm (Cat No. ND-ONEC, Thermo Fisher Scientific, USA). For western blot analysis, 200 μ g of protein was loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel at 120 V for 90 min in a Mini-Protean II Cell (Bio-Rad, CA, USA) along with a low-range marker standard (SeeBlue Plus2/500, Cat LC5925, Invitrogen.). Proteins were transferred to a 0.45 μ m PVDF membranes (PVDF Transfer Membrane; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) embedded in transfer buffer (25 mM Tris-buffered saline, 190 mM glycine, 20% methanol) at 120 V at 4°C for 90 min by using the Protein Transfer System (Mini-Transblot MCA, Bio-Rad). The membranes were blocked with nonfat dried milk 5% dissolved in TTBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20, pH 7.6) for 30 min at room temperature. Later, the membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (diluted 1:1000) against anti-GABA_A R $\alpha 3$ subunit, 1:500 (Cat No. NB 100-61096, Novus Biological), anti-D₄R, 1:100 (Cat No. NBP1-00779, Novus Biologicals), respectively. After three TTBS washes (10 min/each), membranes were incubated with horse anti-mouse IGG secondary antibody (Cat No. PI-2000-1, Vector Laboratories, CA, USA) at a 1:10,000 dilution for 2 h at room temperature. Membranes were washed again with TTBS three times (10 min/each). Proteins were visualized using a chemiluminescent detection kit Clarity Western ECL Substrate (contains Hydrogen Peroxide (H₂O₂) reagent and Luminol/Enhancer Reagent. Cat. No. 1705060, Bio-Rad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Bands were analyzed by using ImageJ software (developed by National Institutes of Health) for densitometric data. Stripping buffer (Tris-HCL 0.5 M, pH 2.0) was used on the membranes for later incubation with monoclonal anti β -actin peroxidase antibody (Cat No. A3854-200 UL, Sigma-Aldrich, USA) as protein loading control. The protein specific signal ratio was compared with actin, the internal standard.

Immunoreactivity

In other groups of animals ($n=3$, each, control, and lesion), one week after the injury, the rats were sacrificed with an overdose of xylazine/ketamine (24 mg/kg + 210 mg/kg, Procin/Anesket Vet) and transcardially perfused with a fixative solution of 4 % paraformaldehyde in a PBS buffer at 0.1 M at pH 7.4. Brains were extracted, stored, and fixed in the same solution for 3 h. Subsequently, they were dehydrated in 5% and 30% sucrose solutions for 12 h in each case, frozen and stored at -80°C . 20 μm coronal sections were obtained with a cryostat. Two series of 20 sections were collected and stored in a 20% sucrose solution at -20°C . Samples were thawed with PBS, 0.1 M, then incubated in a blocking solution for 20 min (0.1 M PBS, 20% fetal calf serum and 0.25% triton). The primary anti GABA_AR $\alpha 3$ subunit and anti D₄R antibody (Nobus Biologicals), the anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) and the ABC peroxidase complex were diluted in PBS +1% and fetal calf serum and 0.125% triton. The incubation for the primary anti GABA_AR $\alpha 3$ and anti D₄R antibodies (1:500) was carried out for 24 h and the incubation with anti-rabbit secondary antibody (1:1000) and the ABC peroxidase complex was for 1 h. After incubations, each sample was washed 3 times with PBS for 5 min. To reveal, 3.3 mL of aminobenzidine 0.05% and H₂O₂ 0.01% were used. The sections were dehydrated in increasing concentrations of alcohol, rinsed, and covered with DPX resin (EntellanTM new) for mounting.

Statistical analysis

Data were expressed as average values with their respective standard error of the mean. Neuronal firing rates from lesioned *versus* control rats, as well as the ISI, changes in the expression of mRNA for D₄ and $\alpha 3$ subunit, protein content, and immunohistochemistry were analyzed using Student's t-test. Statistical analysis was carried out with GraphPad Prism ver. 6 software. For mRNA, Western blot, and immunohistochemistry data, a value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant, and $p \leq 0.001$ for burst pattern and ISI.

RESULTS

Immunoreactivity to NeuN

Relative NeuN immunoreactivity showed that, compared to control (left GP) (Fig. 2A), unilateral lesion in the right GP decreased the number of NeuN-positive cells ($t_{17}=39.33$, $P<0.0001$) (Fig. 2B). The percentage of

cells remaining in the right GP was close to 23%, which confirms that most of the pallidal neurons were destroyed with quinolic acid (Fig. 2C).

Electric activity

Seven days after the lesion of the right GP, the turn test induced by apomorphine (0.1 mg/kg i.p.) was performed in the control group and in the lesion group. Three days after the turn test, electrical recordings of the thalamic reticular nucleus were performed ($n=12$ neurons, each group). In the control and lesioned groups, two types of neuronal firings were observed in thalamic reticular neurons: spikes, and firing bursts (Fig. 3A, 3D). An amplification of the continuous signal was made to differentiate the electrical activity and identify the firing bursts of TRN neurons. A tonic regime refers to periodic firings. The temporal pattern to determine the presence of a burst is a minimum of two consecutive spikes, preceded by a silence of at least 50 ms, with a maximum of 6 ms between spikes (Weyand et al., 2001). As shown in Fig. 3B, three consecutive spikes are observed, indicating a firing burst. In the animals with a lesioned GP, neurons showed a higher frequency of spontaneous firing compared to the control group (Fig. 3C). In control animals there were 1.417 ± 0.1486 spikes/s compared to 34.760 ± 1.148 spikes/s in lesioned animals ($t_{22}=28.14$, $P=0.0001$). When amplifying an area of the recording, both spikes and bursts were observed clearly (Fig. 3B, 3E). In controls, for each neuron recorded, 80-85 of 100 firings recorded were bursts. In the animals with a lesioned GP, only 35-38 firings out of 100 were bursts, the rest were tonic firings. A comparison between the two groups as to the interval between spikes, and the time between two consecutive spikes (ISI) was also made. This analysis showed a greater number of bursts in the TRN from control animals than in that of the lesioned animals (Fig. 3F). In control animals, ISI in control animals was 0.868 ± 0.036 , compared to 0.342 ± 0.605 ($t_{22}=12.5$, $P=0.0001$).

mRNA expression and immunoreactivity for D₄ and $\alpha 3$ subunit of the GABA_A receptors

Three days after the turn test induced by apomorphine, the thalamic reticular nucleus was removed to analyze dopamine D₄ receptors and subunit $\alpha 3$ of GABA_A receptors by RT-PCR. The analysis of D₄R mRNA in the TRN showed a higher relative expression in the animals with the right GP lesioned, compared to the control group ($t_4=7.15$, $P=0.002$) (Fig. 4A).

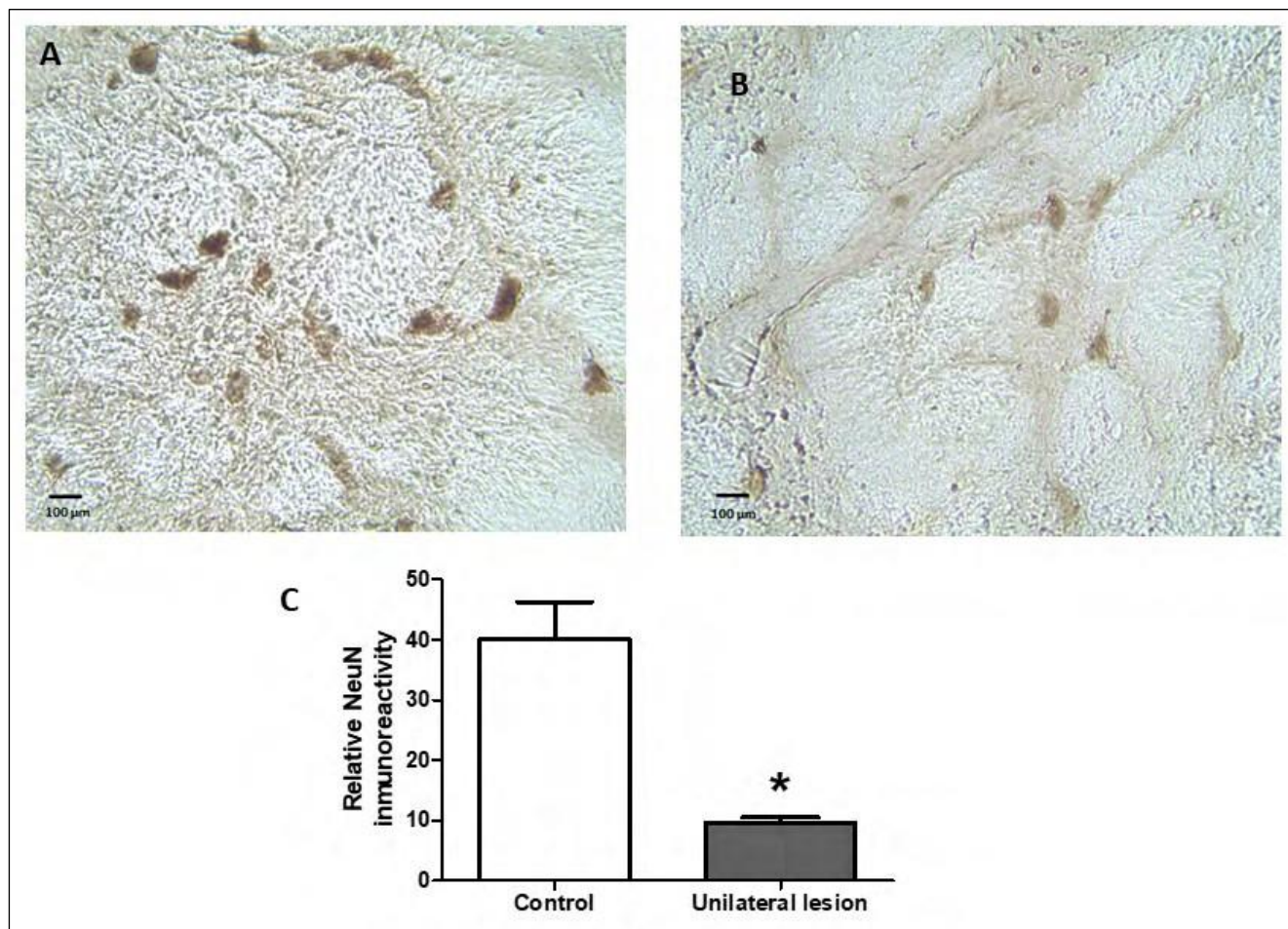


Fig. 2. Anti-NeuN immunoreactivity in the GP. Photomicrographs showing NeuN-positive neurons of control, left GP (A). Notice that the unilateral lesion (B) with quinolinic acid administration induced neuronal loss in the right side GP. Magnification 400 x, scale bar=100 μ m. (C) Anti-NeuN immunoreactivity in left, not injured, and right lesioned GP. Data shown as mean $\pm$ standard error. Student t-test. * $p < 0.05$ compared to the control. (n=4).

Regarding mRNA relative expression of subunit $\alpha 3$ of GABA_A receptors, it showed the opposite to that observed in dopaminergic D₄ receptors. There was lower mRNA expression in the group with unilateral lesion of the right GP compared to the control group ($t_4=6.94$, $P=0.002$) (Fig. 4B).

In other groups of animals (control and GP lesion) sections of TRN were analyzed at 200x. The label in the control group animals was relatively low, compared to that in animals with lesioned GP (Fig. 5A). The relative intensity of dopamine D₄ receptors in the TRN of lesioned GP animals showed higher intensity, with respect to control animals ($t_6=3.82$, $P=0.008$) (Fig. 5B).

Immunohistochemistry in coronal sections of TRN shows that in animals with the right-side GP lesion, the label for $\alpha 3$ subunit of the GABA_A receptor is higher than in control animals (Fig. 6A). The relative intensity

of the label for $\alpha 3$ subunit was higher in animals with the lesioned right-side GP ($t_8=6.52$, $P=0.0002$) (Fig. 6B).

Content of D₄ in TRN and $\alpha 3$ subunit of GABA_A receptors

Regarding D₄ receptor protein content, it was higher in animals with lesioned right-side GP than in control animals ($t_6=2.88$, $P=0.028$). These results are in accordance to the immunohistochemistry analysis and mRNA for the protein, which were increased (Fig. 7).

The levels of the $\alpha 3$ subunit of GABA_A receptors in the TRN of animals with the lesioned right-side GP was higher than in control animals ($t_6=3.74$, $P=0.009$). This is consistent with the increase observed in the immunohistochemical analysis for this subunit, but not with the decrease observed in mRNA for the protein (Fig. 8).

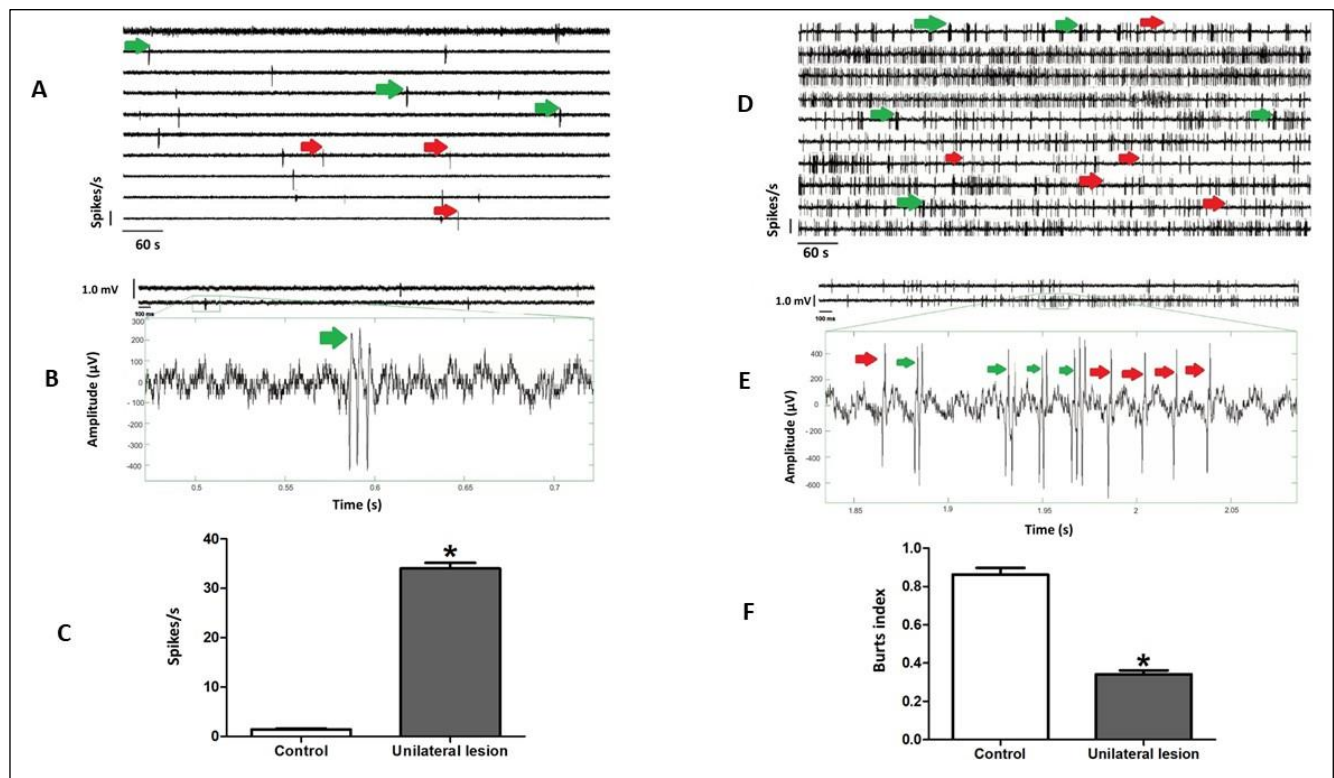


Fig. 3. (A) Electric activity of thalamic reticular nucleus neurons in the control group. Two types of firing are observed: firing bursts (green arrows) and tonic firing (red arrows). (B) Amplification of a band from the recording, showing a firing burst in controls. (C) Electric activity of thalamic reticular neurons in animals with the right GP lesioned increased. A higher tonic activity (green arrows) and lower firing bursts (red arrows) is observed. (D) Firing frequency of thalamic reticular neurons in rats with the right table lesioned. (E) Amplification of a band from the recording showing tonic and firing bursts with lesioned GP. Periodic spikes indicate tonic firings, whereas consecutive spikes indicate firing bursts. (F) Burst index in thalamic reticular neurons in control and rats with lesion in the right GP. Data shown as Mean $\pm$ Standard Error. * $p < 0.001$ compared to control group ($n = 12$ neurons per group).

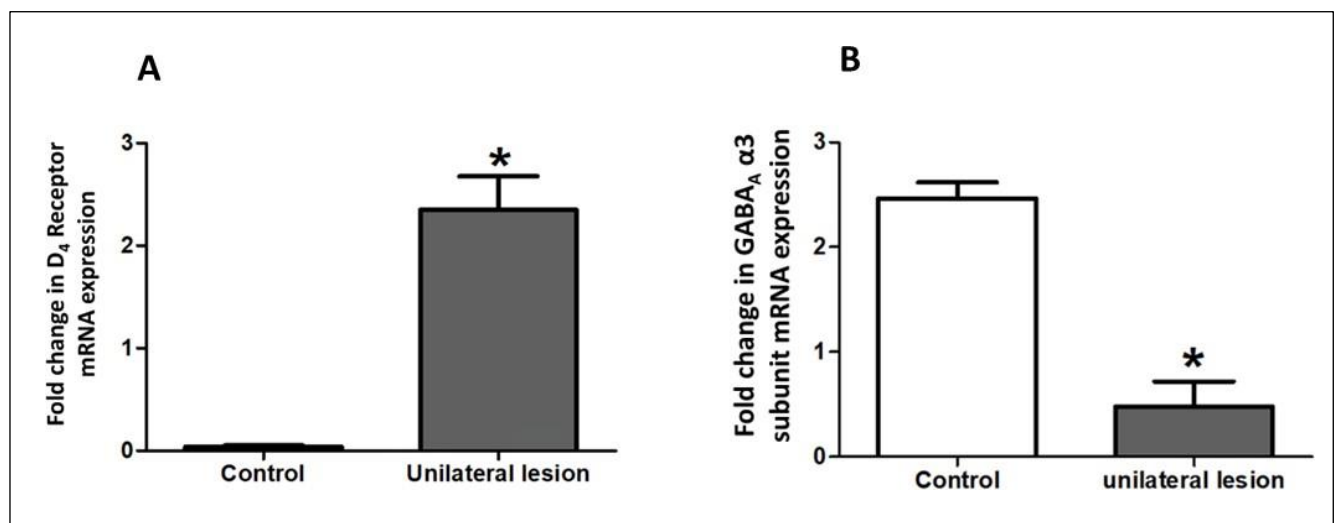


Fig. 4. (A) mRNA expression of dopamine D₄ receptor in thalamic reticular neurons. The graph compares the control group vs. the group with a lesion of the right GP. (B) mRNA expression of subunit α₃ of GABAergic receptors in the thalamic reticular nucleus. Data shown as Mean $\pm$ Standard Error. * $p = 0.002$, compared to control group. ($n = 6$ rats per group).

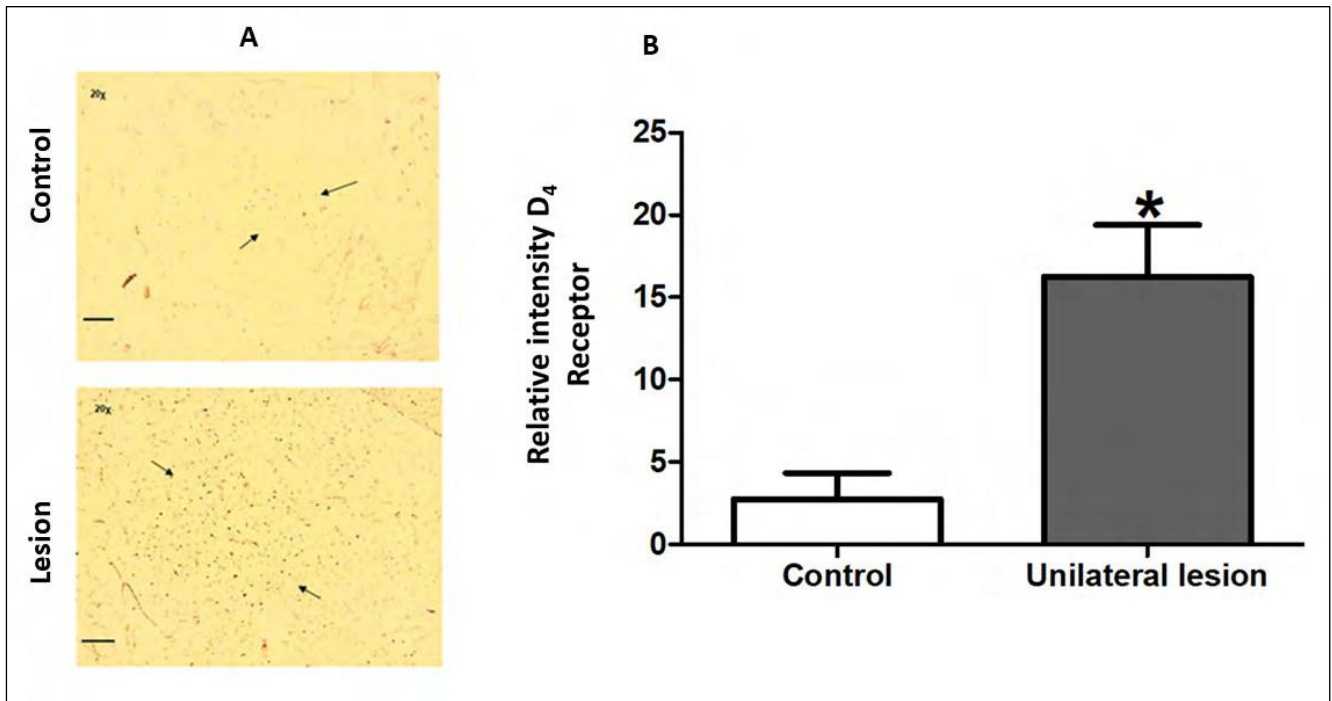


Fig. 5. Dopaminergic D₄ receptor distribution in the TRN. (A) Control and lesion group. Magnification 200 x. Positive cells for D₄ R in TRN are shown (arrows). A higher number of cells positive to D₄ receptor is observed in the lesioned group. Bar scale 10 μ m. (B) Relative intensity of D₄ receptor in the TRN of control and right GP lesioned animals. The intensity is higher in lesioned animals. Data shown as Mean $\pm$ Standard Error (n=6 rats per group). * p=0.008 compared to control group.

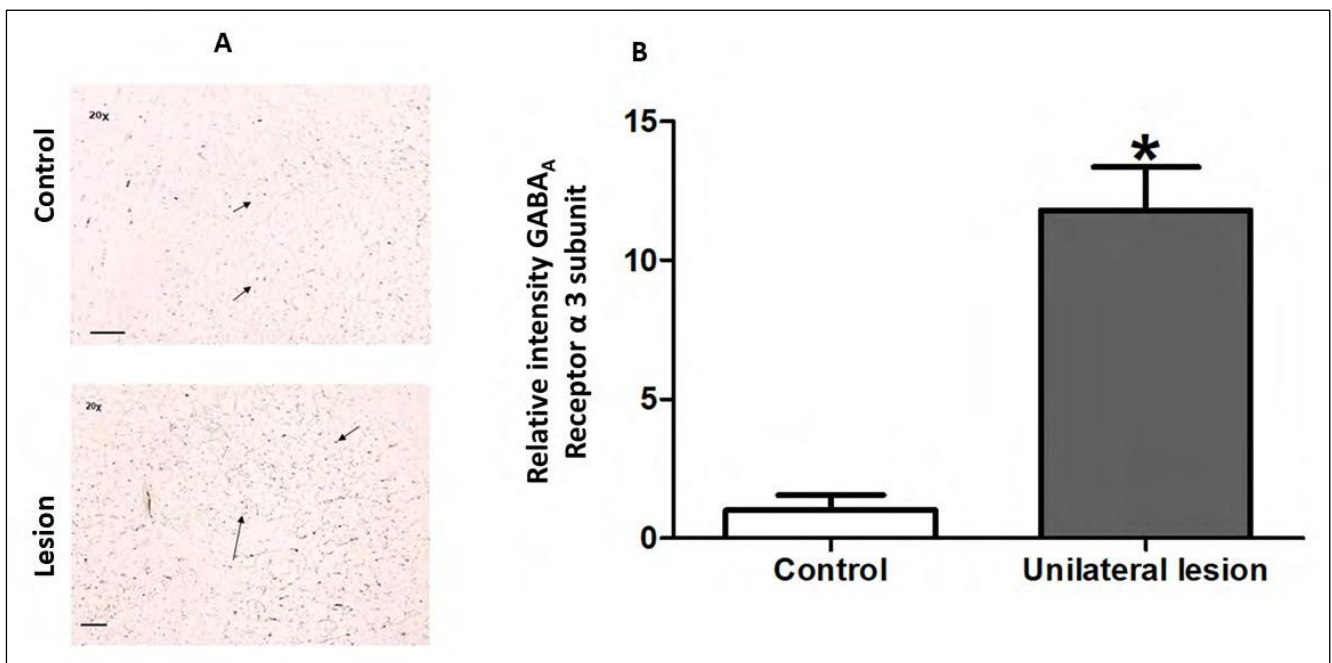


Fig. 6. Distribution of subunit $\alpha 3$ of GABA_A receptors in the TRN. (A) control and lesion group. Magnification 200 x. Positive cells to $\alpha 3$ subunit are shown (arrows) in the TRN nucleus. Bar scale, 10 μ m. (B) Relative intensity of $\alpha 3$ subunit of GABA_A receptors in the TRN. The number of cells labeled is higher in the TRN of animals with the right GP lesioned than in control animals. Data shown as Mean $\pm$ Standard Error (n=6 rats per group). * p=0.0002 compared to control group.

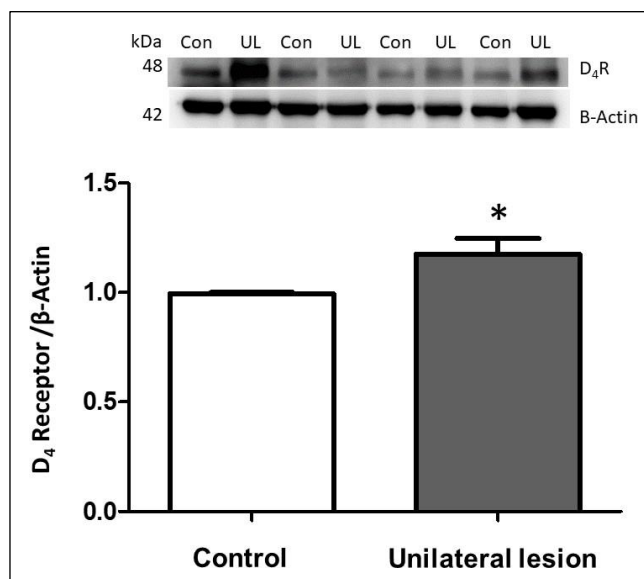


Fig. 7. Dopaminergic receptor D₄ content in the TRN of control and animals with the right GP lesioned. The content of the protein is higher in the experimental group. Data shown as Mean $\pm$ Standard Error (n=6 rats per group). * p=0.01 compared to control group.

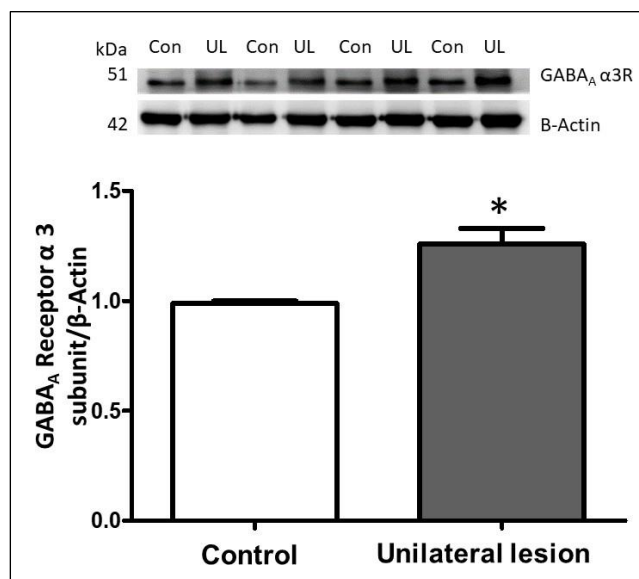


Fig. 8. Content of α 3 subunit of GABA_A receptors in the TRN of control and animals with the right GP lesioned. The content of protein is higher in the experimental group. Data shown as Mean $\pm$ Standard Error (n=6 rats per group). * p=0.01 compared to control group.

DISCUSSION

The thalamic reticular nucleus is a group of GABAergic neurons which is involved in multiple processes for the integration and processing of sensory, motor, attentional and cognitive information, and it is responsible for the modulation of rhythmic thalamocortical activities (Lee et al., 2007; Pinault, 2004). Reticular neurons predominantly have subunit α 3 of GABA_A receptors (Mozrzymas et al., 2007; Pratt & Morris, 2015; Waldvogel et al., 2017). Their firing mode is determined by the membrane potential, and is characterized by presenting two types of firings, one called tonic, which occurs when the cell is depolarized and is dependent on its interactions with the cortex and the thalamus (glutamatergic projections), the locus coeruleus (noradrenergic projections), the dorsal rafe nucleus (serotonergic projections) and the penduncular-pontine nucleus (cholinergic projections). The other type of firing is in bursts and occurs when the cell is hyperpolarized; this firing is dependent on GABAergic projections originating in the GP (Morrison & Foote, 1986; Pinault, 2004; Govindaiah et al., 2010). Axon terminals in the GP receive dopaminergic fibers from the SNc, which modulate the release of GABA by presynaptic inhibition of dopaminergic D₄ receptors (Pazo et al., 2013).

Pallidal lesions with quinolinic acid have an optimal effect, since they are specific to the internal GP (endopeduncular nucleus) in striatopallidal projec-

tions and does not cause lesions in the axons that pass through it, for example, the nigrostriatal or striatonigral pathway (Hauber et al., 1998; Lonser et al., 1999). The present results show that unilateral lesion of the GP caused an increase in firing frequency in ipsilateral TRN neurons, which may be attributed to a reduction in GABA release due to the loss of GABAergic neurons projecting from the GP, since only 20% of cells remained after the lesion. At the same time, thalamocortical, corticothalamic and brainstem nuclei projections appear to favor an increase in the number of tonic firings due to DA, 5HT and NA released by neurons coming from SNc, Raphe dorsal, and locus coeruleus, respectively (Guillery & Harting 2003).

Low GABA release could also be responsible for the reduction in firing bursts from thalamic reticular neurons. The TRN contains GABAergic neurons and is involved in multiple processes of integration and processing of sensory-motor, attentional and cognitive information, and is also responsible for the global modulation of thalamocortical rhythmic activities (Lee et al., 2007; Pinault, 2004). The α 3 subunit of GABA_A receptors predominates in TRN neurons (Mozrzymas et al., 2007; Pratt & Morrison, 2015), which determines the degree of inhibition or silence that the GP exerts on the cells of the TRN generating firing bursts (Liu et al., 2007). Furthermore, the main GABAergic input from the GP to the TRN is modulated by dopaminergic D₄ receptors, which are located in the pallidal-reticular axon

terminals (Gasca-Martinez et al., 2010; Govindaiah et al., 2010). So, the dopaminergic fibers coming from the SNc, modulate the release of GABA through presynaptic inhibition by dopaminergic D₄ receptors (Florán et al., 2004; Pazo et al., 2013).

Regarding the results of the relative expression of the dopaminergic D₄ receptor mRNA in the TRN, an increase was observed in the individuals of the group with unilateral lesion of the right GP, compared to control animals. Considering that the lesion of the GP was not total, but that only 80% of pallidal neurons were destroyed, it is possible that the 20% remaining neurons in the GP increased their expression and protein D₄ content, probably as a compensatory mechanism, due to the presence of recurrent collaterals from the dopaminergic projections coming from the SNc, which are more than 50% (Gasca-Martinez et al., 2010). Regarding the decrease in the relative expression of the $\alpha 3$ subunit of the GABAergic receptor mRNA in the TRN, this could be due to the low release of GABA, given the small number of GABAergic neurons remaining after injury (23% approximately), together with the increase in D₄ receptor, which can contribute to the inhibition of GABA release from the GP, resulting in a decrease in the $\alpha 3$ subunit of the GABA receptor mRNA (Graziane et al., 2009). Considering that this nucleus is innervated by dopaminergic axons originating from the SNc, and that the overexposure of neurons to a neurotransmitter causes tolerance or desensitization, changing the synthesis or degradation of the receptors, it can be speculated that the increase in dopamine D₄ receptor mRNA, and in the protein could be due to dopaminergic projections of recurrent collaterals coming from the SNc. Probably, these projections continue to release the same amount of the neurotransmitter; however, the pallidal lesion reduces the number of neurons receiving dopamine, and an increase in the number of D₄ receptors could be a mechanism to compensate for the reduction in GABAergic transmission after pallidal lesion. The decrease in the $\alpha 3$ subunit of GABA receptor mRNA in the TRN contrasts with the immunohistochemistry data and the amount of protein in the TRN. Possibly, this contrast could be due to interference RNA (iRNA), as a mechanism of post-translational silencing of specific genes, consisting in the degradation of specific mRNA, or by post-translational processes, such as methylation, acetylation, hydroxylation, or phosphorylation (Agrawal et al., 2003; Zhu & Palli, 2020; Mattick & Amaral, 2022). There are other possible mechanisms, such as small non-coding RNAs (snoRNA). These are predominantly required in the maturation of nuclear RNAs and ribosomal RNA. snoRNAs have other cellular functions such as transcriptional regulation, and many of them are derived from introns, non-protein-coding

transcripts, with functions of RNA regulators (Nahkuri et al., 2008; Ogorelkova et al., 2009; Kishore et al., 2010).

The results of the current study show a decrease in the expression of the $\alpha 3$ subunit of GABA_A receptor within the TRN after unilateral lesion of the GP. However, the protein content increased. This could be due to fewer GABAergic projections from the GP, leading to low GABA release from the GP to the TRN neurons, thus increasing the synthesis of GABA_A receptor $\alpha 3$ subunit. However, tonic firing increased due to the GP lesion, which indicates that the increase in $\alpha 3$ subunit of GABA_A does not compensate for the lack of GABA, losing the inhibition of the TRN cells by GABA, increasing tonic firing.

GABAergic projections from the GP to the TRN, can directly influence thalamocortical transmission through activity of TRN neurons (Asanuma, 1994), and TRN is the linking structure for thalamocortical and corticothalamic circuits, acting as a mediator of selective attention and an initiator of corticothalamic rhythmic activities (Zhao et al., 2020). Therefore, if the activity of the TRN becomes aberrant, or there is some defect in GABAergic neurotransmission by the neurons of this structure, this can cause the activation of the cerebral cortex and generate unusual rhythms in processing thalamocortical information.

CONCLUSIONS

The findings of the current study show that unilateral lesion of the GP increases tonic firing frequency and decreases the bursts of TRN neurons. This can be due to the decrease in pallidal neurons releasing GABA to TRN, and $\alpha 3$ subunit of GABA_A, as well as the increase in D₄ receptor expression and content, due to collaterals coming from SNc.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to Edith Monroy for her advice on the language of the text.

A.L.M.G. had a scholarship from CONACyT (CVU 665477) to achieve her Ph.D. in Experimental Biology at the Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa.

REFERENCES

- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 67(4), 657–685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003>

- Ahrens, S., Jaramillo, S., Yu, K., Ghosh, S., Hwang, G. R., Paik, R., Lai, C., He, M., Huang, Z. J., & Li, B. (2015). ErbB4 regulation of a thalamic reticular nucleus circuit for sensory selection. *Nature neuroscience*, 18(1), 104–111. <https://doi.org/10.1038/nn.3897>
- Asanuma C. (1994). GABAergic and pallidal terminals in the thalamic reticular nucleus of squirrel monkeys. *Experimental brain research*, 101(3), 439–451. <https://doi.org/10.1007/BF00227337>
- Asanuma, C., & Porter, L. L. (1990). Light and electron microscopic evidence for a GABAergic projection from the caudal basal forebrain to the thalamic reticular nucleus in rats. *The Journal of comparative neurology*, 302(1), 159–172. <https://doi.org/10.1002/cne.903020112>
- Bal, T., & McCormick, D. A. (1996). What stops synchronized thalamo-cortical oscillations? *Neuron*, 17(2), 297–308. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80161-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80161-0)
- Bazhenov, M., Timofeev, I., Steriade, M., & Sejnowski, T. J. (1999). Self-sustained rhythmic activity in the thalamic reticular nucleus mediated by depolarizing GABAA receptor potentials. *Nature neuroscience*, 2(2), 168–174. <https://doi.org/10.1038/5729>
- Beaulieu, J. M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 63(1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Bollan, K., King, D., Robertson, L. A., Brown, K., Taylor, P. M., Moss, S. J., & Connolly, C. N. (2003). GABA(A) receptor composition is determined by distinct assembly signals within alpha and beta subunits. *The Journal of biological chemistry*, 278(7), 4747–4755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210229200>
- Chen, L., Yang, C., & Mower, G. D. (2001). Developmental changes in the expression of GABA(A) receptor subunits (alpha(1), alpha(2), alpha(3)) in the cat visual cortex and the effects of dark rearing. *Brain research. Molecular brain research*, 88(1-2), 135–143. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00042-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00042-0)
- Clemente-Perez, A., Makinson, S. R., Higashikubo, B., Brovarney, S., Cho, F. S., Urry, A., Holden, S. S., Wimer, M., Dávid, C., Fenno, L. E., Acsády, L., Deisseroth, K., & Paz, J. T. (2017). Distinct Thalamic Reticular Cell Types Differentially Modulate Normal and Pathological Cortical Rhythms. *Cell reports*, 19(10), 2130–2142. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.044>
- Conde Rojas, I., Acosta-García, J., Caballero-Florán, R. N., Jijón-Lorenzo, R., Recillas-Morales, S., Avalos-Fuentes, J. A., Paz-Bermúdez, F., Leyva-Gómez, G., Cortés, H., & Florán, B. (2020). Dopamine D4 receptor modulates inhibitory transmission in pallido-pallidal terminals and regulates motor behavior. *The European journal of neuroscience*, 52(11), 4563–4585. <https://doi.org/10.1111/ejn.15020>
- Cornwall, J., Cooper, J. D., & Phillipson, O. T. (1990). Projections to the rostral reticular thalamic nucleus in the rat. *Experimental brain research*, 80(1), 157–171. <https://doi.org/10.1007/BF00228857>
- Crabtree J. W. (2018). Functional Diversity of Thalamic Reticular Subnetworks. *Frontiers in systems neuroscience*, 12, 41. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2018.00041>
- Erlj, D., Acosta-García, J., Rojas-Márquez, M., González-Hernández, B., Escartín-Perez, E., Aceves, J., & Florán, B. (2012). Dopamine D4 receptor stimulation in GABAergic projections of the globus pallidus to the reticular thalamic nucleus and the substantia nigra reticulata of the rat decreases locomotor activity. *Neuropharmacology*, 62(2), 1111–1118. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.001>
- Ferrarelli, F., & Tononi, G. (2011). The thalamic reticular nucleus and schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, 37(2), 306–315. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbq142>
- Florán, B., Florán, L., Erlj, D., & Aceves, J. (2004). Activation of dopamine D4 receptors modulates [3H]GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus. *Neuropharmacology*, 46(4), 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.10.004>
- Fritschy, J. M., & Mohler, H. (1995). GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *The Journal of comparative neurology*, 359(1), 154–194. <https://doi.org/10.1002/cne.903590111>
- Gandia, J. A., De Las Heras, S., García, M., & Giménez-Amaya, J. M. (1993). Afferent projections to the reticular thalamic nucleus from the globus pallidus and the substantia nigra in the rat. *Brain research bulletin*, 32(4), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90199-I](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90199-I)
- Gasca-Martínez, D., Hernández, A., Sierra, A., Valdósera, R., Anaya-Martínez, V., Florán, B., Erlj, D., & Aceves, J. (2010). Dopamine inhibits GABA transmission from the globus pallidus to the thalamic reticular nucleus via presynaptic D4 receptors. *Neuroscience*, 169(4), 1672–1681. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.048>
- Govindaiah, G., Wang, T., Gillette, M. U., Crandall, S. R., & Cox, C. L. (2010). Regulation of inhibitory synapses by presynaptic D₄ dopamine receptors in thalamus. *Journal of neurophysiology*, 104(5), 2757–2765. <https://doi.org/10.1152/jn.00361.2010>
- Guido, W., & Weyand, T. (1995). Burst responses in thalamic relay cells of the awake behaving cat. *Journal of neurophysiology*, 74(4), 1782–1786. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.4.1782>
- Graziane, N. M., Yuen, E. Y., & Yan, Z. (2009). Dopamine D4 Receptors Regulate GABAA Receptor Trafficking via an Actin/Cofilin/Myosin-dependent Mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 284(13), 8329–8336. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807387200>
- Guillery, R. W., & Harting, J. K. (2003). Structure and connections of the thalamic reticular nucleus: Advancing views over half a century. *The Journal of comparative neurology*, 463(4), 360–371. <https://doi.org/10.1002/cne.10738>
- Hauber, W., Lutz, S., & Munkle, M. (1998). The effects of globus pallidus lesions on dopamine-dependent motor behaviour in rats. *Neuroscience*, 86(1), 147–157. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00009-8)
- Hazrati, L. N., & Parent, A. (1991). Projection from the external pallidum to the reticular thalamic nucleus in the squirrel monkey. *Brain research*, 550(1), 142–146. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90418-u](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90418-u)
- Hou, G., Smith, A. G., & Zhang, Z. W. (2016). Lack of Intrinsic GABAergic Connections in the Thalamic Reticular Nucleus of the Mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(27), 7246–7252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0607-16.2016>
- Kimura, A., Yokoi, I., Imbe, H., Donishi, T., & Kaneoke, Y. (2012). Auditory thalamic reticular nucleus of the rat: anatomical nodes for modulation of auditory and cross-modal sensory processing in the loop connectivity between the cortex and thalamus. *The Journal of comparative neurology*, 520(7), 1457–1480. <https://doi.org/10.1002/cne.22805>
- Kishore, S., Khanna, A., Zhang, Z., Hui, J., Balwier, P. J., Stefan, M., Beach, C., Nicholls, R. D., Zavolan, M., & Stamm, S. (2010). The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Human molecular genetics*, 19(7), 1153–1164. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp585>
- Lam, Y. W., & Sherman, S. M. (2011). Functional organization of the thalamic input to the thalamic reticular nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(18), 6791–6799. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3073-10.2011>
- Lee, S. H., Govindaiah, G., & Cox, C. L. (2007). Heterogeneity of firing properties among rat thalamic reticular nucleus neurons. *The Journal of physiology*, 582(Pt 1), 195–208. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.134254>
- Lindgren, N., Usiello, A., Gojny, M., Haycock, J., Erbs, E., Greengard, P., Hokfelt, T., Borrelli, E., & Fisone, G. (2003). Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4305–4309. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730708100>
- Liu, X. B., Coble, J., van Luijcklaar, G., & Jones, E. G. (2007). Reticular nucleus-specific changes in alpha3 subunit protein at GABA synapses in genetically epilepsy-prone rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), 12512–12517. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705320104>

- Lonser, R. R., Corthésy, M. E., Morrison, P. F., Gogate, N., & Oldfield, E. H. (1999). Convection-enhanced selective excitotoxic ablation of the neurons of the globus pallidus internus for treatment of parkinsonism in nonhuman primates. *Journal of neurosurgery*, 91(2), 294–302. <https://doi.org/10.3171/jns.1999.91.2.0294>
- Mattick, J., & Amaral, P. (2022). RNA, the Epicenter of Genetic Information: A new understanding of molecular biology. CRC Press.
- Morrison, J. H., & Foote, S. L. (1986). Noradrenergic and serotonergic innervation of cortical, thalamic, and tectal visual structures in Old and New World monkeys. *The Journal of comparative neurology*, 243(1), 117–138. <https://doi.org/10.1002/cne.902430110>
- Mozrzymas, J. W., Barberis, A., & Vicini, S. (2007). GABAergic currents in RT and VB thalamic nuclei follow kinetic pattern of α 3- and α 1-subunit-containing GABAA receptors. *The European journal of neuroscience*, 26(3), 657–665. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05693.x>
- Nahkuri, S., Taft, R. J., Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Molecular evolution of the HBII-52 snoRNA cluster. *Journal of molecular biology*, 381(4), 810–815. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.057>
- Ogorelkova, M., Navarro, A., Vivarelli, F., Ramirez-Soriano, A., & Estivill, X. (2009). Positive selection and gene conversion drive the evolution of a brain-expressed snoRNAs cluster. *Molecular biology and evolution*, 26(11), 2563–2571. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp173>
- Paxinos, G. & Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Academic Press
- Pazo, J. H., Barceló, A. C., Bellantonio, E., Pazo, V. C., & Almaraz, N. (2013). Electrophysiologic study of globus pallidus projections to the thalamic reticular nucleus. *Brain research bulletin*, 94, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.02.009>
- Pinault D. (2004). The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain research. Brain research reviews*, 46(1), 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.008>
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., & Sperk, G. (2000). GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*, 101(4), 815–850. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00442-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00442-5)
- Pratt, J. A., & Morris, B. J. (2015). The thalamic reticular nucleus: a functional hub for thalamocortical network dysfunction in schizophrenia and a target for drug discovery. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 29(2), 127–137. <https://doi.org/10.1177/0269881114565805>
- Shin, R. M., Masuda, M., Miura, M., Sano, H., Shirasawa, T., Song, W. J., Kobayashi, K., & Aosaki, T. (2003). Dopamine D₄ receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(37), 11662–11672. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-37-11662.2003>
- Shosaku, A., Kayama, Y., & Sumitomo, I. (1984). Somatotopic organization in the rat thalamic reticular nucleus. *Brain research*, 311(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91398-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91398-2)
- Shosaku, A., & Sumitomo, I. (1983). Auditory neurons in the rat thalamic reticular nucleus. *Experimental brain research*, 49(3), 432–442. <https://doi.org/10.1007/BF00238784>
- Soto, E., & Vega, R. (1987). A Turbo Pascal program for on line spike data acquisition and analysis using a standard serial port. *Journal of neuroscience methods*, 19(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(87\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0165-0270(87)90021-5)
- Sun, Y. G., Wu, C. S., Renger, J. J., Uebele, V. N., Lu, H. C., & Beierlein, M. (2012). GABAergic synaptic transmission triggers action potentials in thalamic reticular nucleus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(23), 7782–7790. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0839-12.2012>
- Thankachan, S., Katsuki, F., McKenna, J. T., Yang, C., Shukla, C., Deisseroth, K., Uygun, D. S., Strecker, R. E., Brown, R. E., McNally, J. M., & Basheer, R. (2019). Thalamic Reticular Nucleus Parvalbumin Neurons Regulate Sleep Spindles and Electrophysiological Aspects of Schizophrenia in Mice. *Scientific reports*, 9(1), 3607. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40398-9>
- Villalobos, N., Oviedo-Chávez, A., Alatorre, A., Ríos, A., Barrientos, R., Delgado, A., & Querejeta, E. (2016). Striatum and globus pallidus control the electrical activity of reticular thalamic nuclei. *Brain research*, 1644, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.032>
- Waldvogel, H. J., Munkle, M., van Roon-Mom, W., Mohler, H., & Faull, R. L. M. (2017). The immunohistochemical distribution of the GABA_A receptor α ₁, α ₂, α ₃, β _{2/3} and γ ₂ subunits in the human thalamus. *Journal of chemical neuroanatomy*, 82, 39–55. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.04.006>
- Weyand, T. G., Boudreaux, M., & Guido, W. (2001). Burst and tonic response modes in thalamic neurons during sleep and wakefulness. *Journal of neurophysiology*, 85(3), 1107–1118. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.3.1107>
- Yee, B. K., Keist, R., von Boehmer, L., Studer, R., Benke, D., Hagenbuch, N., Dong, Y., Malenka, R. C., Fritschy, J. M., Bluethmann, H., Feldon, J., Möhler, H., & Rudolph, U. (2005). A schizophrenia-related sensorimotor deficit links α 3-containing GABAA receptors to a dopamine hyperfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 17154–17159. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508752102>
- Zhao, W., Guo, S., Linli, Z., Yang, A. C., Lin, C. P., & Tsai, S. J. (2020). Functional, Anatomical, and Morphological Networks Highlight the Role of Basal Ganglia-Thalamus-Cortex Circuits in Schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, 46(2), 422–431. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbz062>
- Zhu, K. Y., & Palli, S. R. (2020). Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annual review of entomology*, 65, 293–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025224>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00158

Matricula: 2191800069

Cambios en el receptor dopaminérgico D_4 y en la subunidad α_3 del receptor GABA_A en el núcleo reticular del tálamo ante la lesión unilateral del globo pálido.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 29 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DR. GERARDO BLANCAS FLORES
DR. MARVIN ANTONIO SORIANO URSUA
DR. EUNICE DALET FARFAN GARCIA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: ANGELA LIZETTE MONTOYA GRESS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

ANGELA LIZETTE MONTOYA GRESS
ALUMNA

REVISÓ
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. GERARDO BLANCAS FLORES

VOCAL

DR. MARVIN ANTONIO SORIANO URSUA

SECRETARIO

DR. EUNICE DALET FARFAN GARCIA