



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

DEPENDENCIA DOPAMINÉRGICA DE LAS NEURONAS COLINÉRGICAS DEL  
GLOBO PÁLIDO EXTERNO DE RATÓN.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JANINTZITZIC LÓPEZ NIÑO

**TUTOR PRINCIPAL**

DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ

[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ, [Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

DR. SALVADOR L. HERNÁNDEZ LÓPEZ, [Facultad de Medicina, UNAM](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias, UNAM, bajo la tutoría del Dr. José Bargas Díaz. Durante su desarrollo se contó con la beca doctoral CONAHCyT 630672 y el apoyo del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP). Además se tuvo el financiamiento de los proyectos DGAPA-UNAM IN255023 e IN204623, y CONAHCyT F003-154039.

## **Agradecimientos Institucionales**

A Xóchitl Ayala, Ariadna Aparicio-Juárez, Claudia Rivera Cerecedo, y Héctor Alfonso Malagón Rivero por las facilidades brindadas para el uso del bioterio y el cuidado de los animales utilizados en este trabajo.

A Ana María Escalante y Francisco Pérez por el soporte técnico con el equipo de cómputo.

Al Instituto de Fisiología Celular y al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas-

## **Agradecimientos personales**

Al Dr. José Bargas Díaz por su guía y su retroalimentación durante mi Doctorado. Ha sido un gran mentor y es un orgullo pertenecer a su laboratorio y equipo de trabajo.

A la Dra. Elvira Galarraga por su acompañamiento, las pláticas y su disposición a apoyarme en mi desarrollo como estudiante de posgrado.

A Antonio Laville, Técnico Académico del laboratorio, por todas sus enseñanzas, por alentarnos siempre a aprender más y a hacer las cosas mejor.

A todos mis compañeros de laboratorio, de todos aprendí algo, en especial a Montserrat Padilla por todas las horas de trabajo juntas, por mantener el entusiasmo para hacer experimentos y emprender nuevos proyectos. A Aidán Ortega, por tu disciplina y disposición a trabajar en equipo, y a Alejandra Fuentes, por tu dedicación y entusiasmo por la ciencia.

## **Dedicatorias**

A mis papás por su amor incondicional y su respaldo siempre necesario, son raíz y alas.

A Iyari, hermana y compañera de vida, eres inspiración y motivación para continuar con entusiasmo.

A Itzcoatl, hermano y compañero de vida, por tus alas que cobijan y tu corazón que protege.

A Yexalen, llegaste a darme grandes lecciones, eres una gran maestra de vida. Te amo, bebezuki.

A mi familia elegida: Eduardo, Rocío, Ángel, Cecilia, Jazmín, Rodrigo, Rafael y Daniel, la vida cambia, los senderos se bifurcan, pero su cariño y acompañamiento son indispensables.

# Contenido

Abstract .....	1
Resumen.....	2
Abreviaturas .....	4
Introducción .....	5
Globo pálido externo: un centro modulador de los ganglios basales .....	7
Neuronas palidales: conexiones dentro y fuera de los ganglios basales .....	9
Conexiones hacia el GPe: corteza y ganglios basales .....	11
Propiedades moleculares y electrofisiológicas de las neuronas del globo pálido externo .....	13
Neuronas prototípicas.....	13
Neuronas arquipalidales.....	15
Neuronas colinérgicas .....	16
El globo pálido externo y la enfermedad de Parkinson.....	18
Depleción de dopamina: efectos en el GPe .....	19
Hipótesis.....	22
Objetivos .....	22
Métodos .....	22
Inyección de virus.....	23
Preparación de las rebanadas de cerebro.....	23
Registros electrofisiológicos de patch-clamp <i>in vitro</i> .....	24
Fármacos .....	24
Marcaje de células y microscopía confocal .....	25
Análisis de datos.....	25
Resultados .....	27
Propiedades de disparo de las neuronas colinérgicas del globo pálido externo .....	27
La inhibición de la señalización dopaminérgica inhibe el disparo de potenciales de acción en las neuronas ChAT+ del GPe .....	33
Las propiedades del potencial de acción permanecen sin cambios después del antagonismo dopaminérgico agudo .....	37
El antagonismo dopaminérgico agudo es directamente responsable de los cambios en el modo de disparo de las neuronas ChAT+ del GPe .....	39
Los receptores de la clase D <sub>2</sub> son determinantes para los efectos que la DA tiene sobre las neuronas ChAT+ del GPe .....	41
Discusión .....	45

Referencias .....	50
Artículo .....	66



## Abstract

The external globus pallidus is a subcortical nucleus that belongs to the basal ganglia circuit. It became relevant for the understanding of the motor function due to its neuronal and synaptic diversity. Besides the well-known population of GABAergic neurons that connect with the subthalamic nucleus and the output nuclei of the basal ganglia (prototypic neurons), the external globus pallidus has other GABAergic neurons that innervate the striatum (arkypallidal neurons), and a population of cholinergic neurons that innervate the cortex. Cholinergic innervation of the cortex is remarkably important for learning and cognition and it participates in the generation of gamma oscillations which correlate with the cognitive function. The object of study of this work is the cholinergic population of the external globus pallidus. These neurons are innervated by the striatum, the subthalamic and the substantia nigra compacta nuclei. Hence, it is important to know their intrinsic characteristics in order to better understand the function of the external globus pallidus within the basal ganglia circuit in normal physiological conditions, as well as in a condition of dopamine depletion that affects its function and causes motor disorders such as Parkinson's disease. In this study, we characterized for the first time the electrophysiological properties of the pallidal cholinergic neurons and we evaluate the effect of acute dopaminergic blockade on them. Our results show that, in normal physiological conditions, pallidal cholinergic neurons are mostly silent, and have passive and active electrophysiological properties that distinguish them from the pallidal GABAergic populations. Moreover, we demonstrate that the acute dopaminergic blockade causes hyperpolarization of the membrane potential, diminution of action potential frequency, and the presence of depolarization block. These findings are an alternative hypothesis for the lack of gamma oscillations during Parkinson's disease. In general, the excitability of the pallidal cholinergic neurons diminishes due to the interruption of the dopaminergic signaling, which is apparently constitutive. Finally, we found that the D<sub>2</sub> class receptors are the main responsible of this change in the excitability. It is not a coincidence that the agonists of these receptors are the most common treatment for Parkinson's disease.

## Resumen

El globo pálido externo es un núcleo subcortical que pertenece al circuito de los ganglios basales. Su diversidad neuronal y sináptica lo han puesto en el centro de investigaciones recientes dedicadas a la comprensión de su rol en la función motora. Además de la reconocida población GABAérgica que inerva al núcleo subtalámico y a los núcleos de salida de los ganglios basales (neuronas “prototípicas”), el globo pálido cuenta con otra población (neuronas “arquipalidales”), también GABAérgica, que inervan al núcleo estriado y en parte a la corteza cerebral. Por último, cuenta con una población de neuronas colinérgicas que inerva a la corteza cerebral. La inervación colinérgica de la corteza cerebral es de suma importancia para la cognición y el aprendizaje y se le atribuye la generación del ritmo gamma que correlaciona con estas funciones. Esta población colinérgica es el objeto de estudio de este trabajo. Se cuenta con evidencia que indica que las neuronas colinérgicas del globo pálido reciben aferencias del núcleo estriado, del núcleo subtalámico y de la sustancia nigra compacta. Por lo tanto, su estudio es importante para completar el panorama de la función del globo pálido externo en el circuito de los ganglios basales tanto en condiciones fisiológicas normales, como en condiciones de depleción dopaminérgica que afecta la función de este núcleo y da lugar a desórdenes del movimiento como la enfermedad de Parkinson. En este trabajo, hicimos una primera caracterización electrofisiológica de las neuronas colinérgicas del globo pálido externo y evaluamos sus cambios bajo condiciones de bloqueo dopaminérgico agudo. Nuestros resultados muestran que, en condiciones fisiológicas normales, las neuronas colinérgicas de este núcleo son en su mayoría silentes, y tienen propiedades electrofisiológicas pasivas y activas que las distinguen de las neuronas GABAérgicas del globo pálido. Además, demostramos que el bloqueo dopaminérgico agudo induce la hiperpolarización del potencial de membrana, la disminución de la frecuencia de disparo y la aparición del bloqueo de disparo por despolarización. Hallazgos que originan una hipótesis alternativa para la desaparición del ritmo gamma durante el parkinsonismo. En general, la excitabilidad de las neuronas disminuye considerablemente cuando se interrumpe la señalización dopaminérgica, que aparentemente, es constitutiva. Encontramos

que los receptores de la clase D<sub>2</sub> son los responsables mayoritarios de estos cambios. Acaso no sea casual que los agonistas de estos receptores son los más usados para tratar el mal de Parkinson.

## Abreviaturas

AHP	post-potencial hiperpolarizante
AHPm	post-potencial hiperpolarizante medio
AP	potencial de acción
APO	área preóptica
BFCN	neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal
ChAT	enzima colina acetiltransferasa
C <sub>N</sub>	capacitancia de la membrana
Cx	corteza
dSPN	neurona estriatal de proyección de la vía directa
EEM	error estándar de la media
EGL	eminencia ganglionar lateral
EGM	eminencia ganglionar media
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GAD	ácido glutámico descarboxilasa
GB	ganglios basales
GP	globo pálido externo
ISI	intervalo interespiga
iSPN	neurona estriatal de proyección de la vía indirecta
MΩ	megaohm
NST	núcleo subtalámico
pF	picofaradio
PV	parvalbúmina
RIC	rango intercuartil
R <sub>N</sub>	resistencia de entrada
SNC	sustancia nigra compacta
SNr	sustancia nigra reticulata
Str	núcleo estriado
Tal	tálamo
τ <sub>m</sub>	constante de tiempo de la membrana
V <sub>m</sub>	potencial de membrana en reposo

## Introducción

El globo pálido externo (GPe) es un núcleo subcortical que forma parte de los ganglios basales (GB). Hasta hace poco tiempo, el GPe era considerado un núcleo anatómicamente homogéneo que funcionaba como simple relevo de la vía indirecta dentro del circuito de los GB (Albin et al., 1989). Sin embargo, actualmente se sabe que el GPe es un núcleo anatómicamente heterogéneo que está formado por al menos tres tipos de neuronas: dos poblaciones GABAérgicas (neuronas prototípicas y arquipalidales) y una colinérgica (Mallet et al., 2012; Hernández et al., 2015; Saunders, et al., 2015b). El GPe no sólo recibe entradas del estriado (Str), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia nigra compacta (SNc), como ya se había descrito, sino que también recibe aferentes de la corteza cerebral (Cx) y el tálamo (Tal; Naito & Kita; 1994; Yasukawa et al., 2004; Mastro et al., 2014; Abecassis et al., 2020). Asimismo, el GPe manda eferentes de regreso a los núcleos de los GB y a la Cx (Mallet et al., 2012; Saunders et al., 2015b; Glajch et al., 2016; Abecassis et al., 2020). Por ejemplo, las neuronas prototípicas mandan eferentes principalmente a los núcleos de salida de los GB (NST, globo pálido interno, GPi; y sustancia nigra reticulata, SNr) (Mallet et al., 2012; Mastro et al., 2014; Oh et al., 2017); mientras las neuronas arquipalidales inervan mayormente al Str (Mallet et al., 2012; Glajch et al., 2016; Mallet et al., 2016), y las neuronas colinérgicas a la Cx (Saunders et al., 2015b).

Por lo tanto, el GPe cuenta con poblaciones neuronales diversas que le permiten modular o influenciar la actividad de otros núcleos dentro y fuera del circuito de los GB. De hecho, el GPe tiene un papel funcional importante en la actividad motriz de los mamíferos, y la alteración de su actividad electrofisiológica, debida a la denervación dopaminérgica, se ha relacionado con la enfermedad de Parkinson (EP; Magill et al., 2001; Mallet et al., 2008a; Nevado-Holgado, et al., 2018). Investigaciones recientes se han dedicado a la caracterización molecular y electrofisiológica de las dos poblaciones GABAérgicas principales del GPe (Mastro et al., 2014; Abdi et al., 2015; Dodson et al., 2015; Abrahao & Lovinger, 2018); y al estudio *in vivo* e *in vitro* de sus respuestas ante la denervación dopaminérgica (Abdi

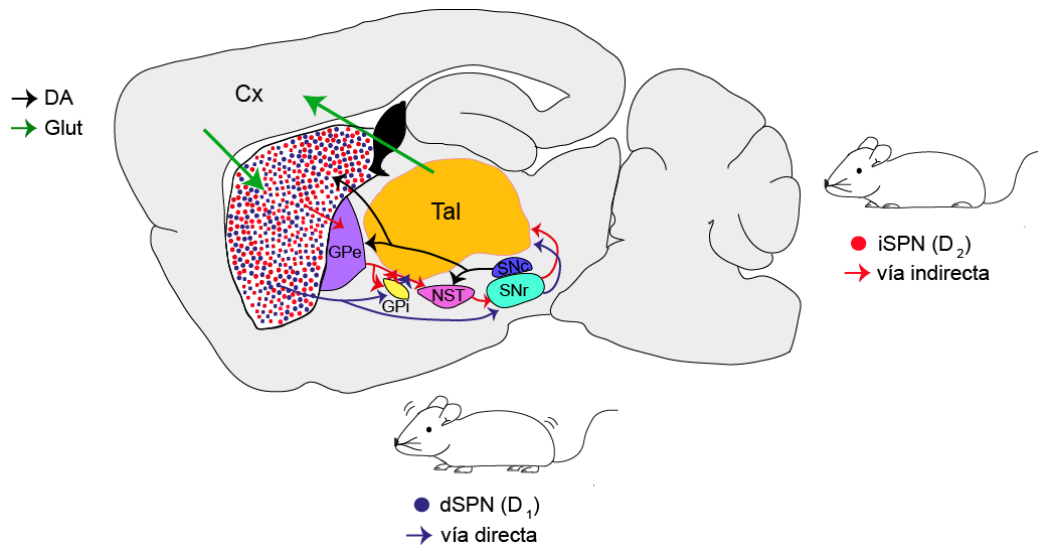
et al., 2015; Hernández et al., 2015; Kovaleski et al., 2020). No obstante, la caracterización de las neuronas colinérgicas del GPe ha sido poco abordada, así como su respuesta a la denervación dopaminérgica.

Debido a que el GPe ha cobrado importancia en el entendimiento y el tratamiento de la EP (Mastro et al., 2017; Dong et al., 2021; Lilascharoen et al, 2021), es necesario esclarecer el papel que las neuronas colinérgicas desempeñan en esta patología. En este trabajo caracterizamos las propiedades electrofisiológicas de neuronas palidales positivas a la enzima colina acetiltransferasa (ChAT+ por sus siglas en inglés). Además, se probó *in vitro* la respuesta de las neuronas palidales ChAT+ al efecto agudo de antagonistas dopaminérgicos. Nuestros resultados demuestran que el bloqueo de la señalización dopaminérgica induce la inhibición del disparo de los potenciales de acción (PA) en las neuronas ChAT+, específicamente a través de los receptores de la clase D<sub>2</sub>.

## Globo pálido externo: un centro modulador de los ganglios basales

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que participan en diversas funciones, entre las que se encuentran: motricidad, toma de decisiones y aprendizaje (Graybiel, 1998; 2000; Dunovan et al., 2015; Tecuapetla et al., 2016). El modelo clásico de los GB subdivide a estos núcleos en dos vías, según sus conexiones con los llamados núcleos de salida (GPi y SNr) y los receptores que expresan. La vía directa parte del Str, recibe aferencias excitatorias de la Cx, y conecta sin relevos con el GPi y la SNr; mientras que la vía indirecta conecta el Str con el GPe que a su vez conecta con el NST. El NST es quien proyecta a los núcleos de salida (**Fig. 1**; Albin et al., 1989; Mink, 1996; Calabresi et al., 2014). En este modelo clásico, el GPe es visto sólo como un núcleo de relevo de la actividad neuronal dentro del circuito de los GB, específicamente de la vía indirecta.

Fisiológicamente, estas dos vías están reguladas por la inervación dopaminérgica que reciben de la SNc. En el modelo clásico, las neuronas espinosas de proyección (SPN o "*striatal projection neurons*" por sus siglas en inglés) del Str son el blanco preferente de la DA. Las de la vía directa (dSPNs) a través de receptores de la clase D<sub>1</sub>; mientras que las de la vía indirecta (iSPNs) expresan receptores de la clase D<sub>2</sub> (Gerfen et al., 1990; Hernández-López et al., 1997; 2000). La falta de DA trae consigo la desregulación de la actividad de estas vías y consecuencias motoras graves.



**Figura 1. Modelo clásico de la vía directa e indirecta de los ganglios basales.** La vía directa parte de las neuronas estriatales de proyección que expresan los receptores de la clase D<sub>1</sub>, mientras que la vía indirecta lo hace de las neuronas estriatales de proyección que expresan los receptores de la clase D<sub>2</sub>. Cx: corteza; GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalámico; SNc: sustancia nigra compacta; SNr: sustancia nigra reticulata; Tal: tálamo; dSPN: neurona estriatal de proyección de la vía directa; iSPN: neurona estriatal de proyección de la vía indirecta.

Se consideraba que el GPe estaba conformado sólo por neuronas GABAérgicas que conectaban con el NST dando lugar a la vía indirecta de los GB (Smith et al., 1998; Baufreton et al., 2009). No obstante, en los últimos años el estudio del GPe ha puesto en evidencia una gran diversidad neuronal: está conformado por neuronas GABAérgicas y colinérgicas que expresan distintos perfiles moleculares y actividad electrofisiológica variada (Bevan et al., 1998; Bugaysen et al., 2010; Mallet et al., 2012; Hernández et al., 2015). Estas poblaciones neuronales, además, inervan prácticamente a todos los núcleos del circuito de los GB, y además a la Cx y al Tal (Mastro et al., 2014; Saunders et al., 2015b), formando bucles que posicionan al GPe como un núcleo receptor, procesador y modulador de la actividad de los GB. A continuación, se describen las interconexiones recientemente descubiertas.

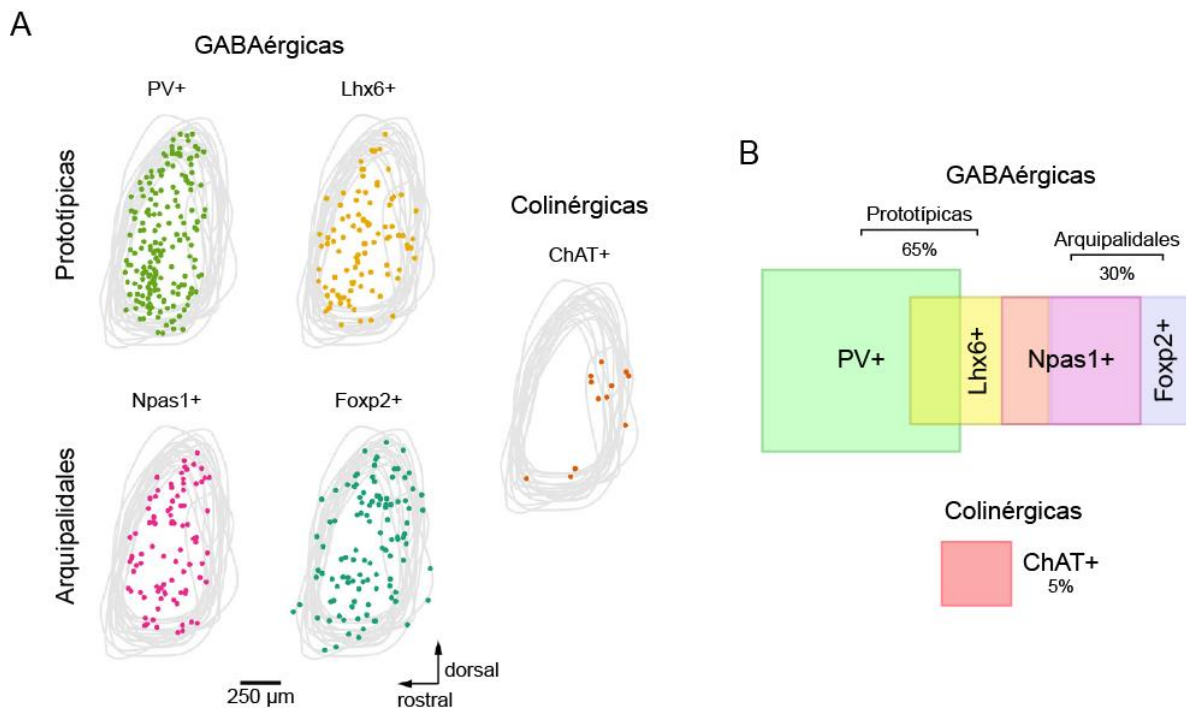


## **Neuronas palidales: conexiones dentro y fuera de los ganglios basales**

Las neuronas GABAérgicas del GPe se han subdividido en dos poblaciones principales: las prototípicas y las arquipalidales. Las neuronas prototípicas son las neuronas GABAérgicas más abundantes del GPe (65 - 70% de la población total) y las que se han descrito clásicamente como las que conectan con el NST (**Fig. 2A-B**; Kita et al., 2007; Mallet et al., 2012). Sin embargo, además de conectar con este núcleo, también pueden mandar proyecciones de regreso al Str, a la SNr, el GPi, a la SNc, y al Tal (Mallet et al 2012; Mastro et al., 2014; Saunders et al., 2016; Lillascharoen et al., 2021). También reciben aferencias del Str, principalmente de las iMSNs, así como del NST (Pamucku et al., 2020; Aristieta et al., 2021; Ketzef & Silberberg, 2021). Aún más, según evidencias anatómicas y optogenéticas, las neuronas prototípicas establecen conexiones mutuas, es decir, pueden ser inhibidas por colaterales axónicas de otras neuronas prototípicas dentro del mismo GPe (Mallet et al., 2012; Aristieta et al., 2021; Ketzef & Silberberg, 2021).

La otra subpoblación de neuronas GABAérgicas en el GPe es la de las neuronas arquipalidales. Se encuentran distribuidas en todo el GPe y representan aproximadamente el 30% de la población palidal (**Fig. 2A- B**; Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015). Las neuronas arquipalidales inervan masivamente al Str, estableciendo sinapsis tanto con las SPNs como con las interneuronas positivas a parvalbúmina (PV), a la sintasa del óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés) y a las interneuronas colinérgicas presentes en este núcleo (ChAT+; Bevan et al., 1998; Mallet et al, 2012; Glajch et al., 2016; Klug et al., 2018). Al igual que las neuronas prototípicas, las neuronas arquipalidales reciben aferencias del NST, aunque en menor medida e intensidad que las prototípicas, y del Str, principalmente de las dSPNs (Aristieta et al., 2021; Cui, et al., 2021; Ketzef & Silberberg, 2021; Johansson & Ketzef, 2023). Por otra parte, dentro del GPe, las neuronas arquipalidales no parecen establecer conexiones entre ellas, pero sí son inhibidas por las colaterales axónicas de las neuronas prototípicas (Aristieta et al., 2021; Ketzef & Silberberg, 2021).

Finalmente, la otra población palidal está menos estudiada: son las neuronas colinérgicas que proyectan a la Cx. Se ubican mayoritariamente en las porciones ventral y caudal del núcleo, y representan el 5% de la población (**Fig. 2A- B**; Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Abecassis et al., 2020). Las neuronas colinérgicas están inervadas tanto por las dMSNs y las iMSNs del Str, así como por el NST (Hernández et al., 2015; Saunders et al., 2015), lo que indica que forman parte del circuito de los GB. Su estudio se ha hecho relevante debido a que estas neuronas establecen conexión directa ipsilateral con interneuronas corticales, específicamente con aquellas ubicadas en la porción frontal, motora y premotora de la Cx en todas sus capas (Saunders et al., 2015b). Algunos registros recientes indican que las neuronas colinérgicas del GPe responden a la excitación optogenética de la Cx motora (Karube et al., 2019). De ser así, conformarían un bucle entre GPe-Cx, además de los bucles GPe-NST y GPe- Str.



**Figura 2. Diversidad neuronal del globo pálido externo.** A) Distribución espacial de las neuronas palidales según sus marcadores moleculares. Las neuronas GABAérgicas se encuentran en todo el núcleo y se subdividen en dos poblaciones principales: prototípicas y arquipalidales; también se encuentran las neuronas colinérgicas especialmente en la porción caudoventral del núcleo. B)

Proporción y coincidencia de los marcadores moleculares expresados por las neuronas palidales. La población más abundante es la de las neuronas prototípicas, seguida por las neuronas arquipalidales, ambas GABAérgicas, y la población más pequeña es las de las neuronas colinérgicas que representan el 5% del total de neuronas en el globo pálido externo del ratón. Modificado de Hernández et al., 2015.

Además de las neuronas colinérgicas, hay evidencia de que hay neuronas GABAérgicas del GPe, distintas de las prototípicas y de las arquipalidales, que proyectan hacia la Cx motora (Chen et al., 2016; Abecassis et al., 2020). Según su perfil molecular expresan Npas1- Nkx2.1, lo que supone una subpoblación neuronal independiente de las antes descritas (ver más adelante perfiles moleculares de las neuronas palidales). Estas neuronas GABAérgicas también inervan interneuronas corticales (Chen et al., 2016; Abecassis et al., 2020). Por lo tanto, las neuronas colinérgicas y las GABAérgicas positivas a Npas1- Nkx2.1 del GPe son el regreso más corto de los GB a la Cx, en contraste con la vía clásica que pasa por los núcleos de salida, GPi/SNr, y el tálamo.

### **Conexiones hacia el GPe: corteza y ganglios basales**

Las neuronas del GPe reciben inhibición del Str y excitación del NST (Kita, 1994; Kita et al., 2005; Hernández et al., 2015; Saunders et al. 2015; Okamoto et al., 2020; Pamucku et al., 2020; Ketzef & Silberberg, 2021) que a su vez recibe inervación directa de la Cx. Tanto las dSPNs como las iSPNs inervan las mismas regiones del GPe (Okamoto et al., 2020), pero la fuerza con la que contactan a sus células blanco es distinta: las dSPNs inhiben más a las neuronas arquipalidales y las iSPNs más a las prototípicas (Aristieta et al., 2021; Cui, et al., 2021; Ketzef & Silberberg, 2021; Johansson & Ketzef, 2023). De la misma forma, el NST excita a todas las células del GPe, pero manda sinapsis principalmente a las neuronas prototípicas (Saunders et al., 2015; Pamucku et al., 2020; Aristieta et al., 2021; Ketzef & Silberberg, 2021).

La Cx inerva recíprocamente al pálido a través de neuronas corticales del tracto piramidal provenientes de la Cx somatosensorial, la motora y la orbital (Naito & Kita,

1994; Abecassis et al., 2020; Jeon et al., 2022). Tanto la Cx frontal como la motora inervan al GPe en su porción rostral, mientras que la porción caudal es inervada por neuronas sensoriales (Karube et al., 2019; Abecassis et al., 2020). Evidencia reciente indica que la Cx motora contacta tanto a las neuronas arquipalidales como a las prototípicas, aunque como ya hemos mencionado, las neuronas colinérgicas también están inervadas por la Cx (Karube et al., 2019; Jeon et al., 2022). Por lo tanto, todas las neuronas del GPe reciben y/o mandan conexiones a los principales núcleos de los GB, la Cx y el Tal. Qué función tienen todas estas conexiones, es una interrogante por responder en investigaciones futuras. Sin embargo, es claro que al modelo de la vía directa e indirecta de los GB se le han añadido nuevas conexiones que complejizan entender su funcionamiento, pero que contribuyen al mismo.

## **Propiedades moleculares y electrofisiológicas de las neuronas del globo pálido externo**

Además del conectoma del GPe que clasifica a sus neuronas por sus blancos sinápticos, las neuronas de este núcleo se clasifican por sus características moleculares y electrofisiológicas (Kita, 1994; Mallet et al., 2012). Recientemente, el avance en técnicas moleculares ha permitido distinguir a más de dos poblaciones de neuronas palidales con blancos sinápticos diversos y huellas electrofisiológicas distintivas (Nóbrega-Pereira et al., 2010; Hernández et al., 2015; Abrahao & Lovinger, 2018).

Una explicación de la diversidad neuronal dentro del núcleo es el hallazgo de que distintos dominios progenitores participan en su formación. La evidencia experimental indica que tanto la eminencia ganglionar media (EGM), la lateral (EGL), y el área preóptica (APO) son sitios de origen de neuronas palidales (Flandin et al, 2010; Nóbrega-Pereira et al., 2010; Dodson et al., 2015; Nunnally et al., 2022). Las neuronas originadas en cada uno de estos sitios expresan diferentes factores de transcripción, entre los que se encuentran: Nkx2.1 (EGM y APO), Pax6 (EGL) y Dbx1 (APO), lo que ayuda al rastreo y distinción de las neuronas que allí se originaron. Como veremos más adelante, los factores de transcripción asociados a las neuronas prototípicas como Lhx6+ y Nkx2.1 emergen de la EGM, mientras que aquellos asociados a las neuronas arquipalidales como Npas1 y Foxp2 emergen de la EGL y el APO (Nóbrega-Pereira et al., 2010; Dodson et al, 2015; Nunnally et al. 2022). Por lo tanto, en el GPe estos tres dominios progenitores dan origen a diferentes poblaciones neuronales con marcadores moleculares específicos y actividad electrofisiológica distinta. A continuación, se describen dichas características.

### **Neuronas prototípicas**

Las neuronas prototípicas son aquellas que dan lugar a las proyecciones típicamente descritas para la vía indirecta de los GB. Estas neuronas se

caracterizan por expresar PV y/o los factores de transcripción Nkx2.1 y Lhx6 (Kita, 1994; Mallet et al., 2012; Abdi et al., 2015; Mizutani et al., 2017; Oh et al., 2017), característicos de las neuronas originadas en la EGM durante el desarrollo embrionario (Nóbrega-Pereira et al., 2010; Dodson et al., 2015; Nunnally et al., 2022).

Las neuronas prototípicas PV+ son las más abundantes del GPe, se encuentran distribuidas en todo el núcleo, aunque algunos estudios anatómicos indican que en su mayoría se encuentran en sus porciones laterales (**Fig. 2A**; Kita, 1994; Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Mastro et al., 2014). Estas neuronas, además, pueden expresar los factores de transcripción Lhx6 y/o Nkx2.1. Particularmente, el Lhx6 es utilizado como marcador de neuronas prototípicas; de hecho, a aquellas neuronas que no expresan PV, pero sí expresan Lhx6, se les considera una subpoblación de la población prototípica (**Fig. 2B**; Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Mastro et al., 2014; Abrahao & Lovinger, 2018). Entre estas dos poblaciones de neuronas prototípicas existen algunas diferencias en sus blancos sinápticos y sus características electrofisiológicas. Por ejemplo, las neuronas Lhx6 son las que más inervan a la SNc, mientras que las neuronas PV+ inervan preferencialmente a los núcleos de salida, al núcleo parafascicular del Tal y, en menor medida, al Str, en especial a las interneuronas PV+ y a las que expresan neuropéptido Y+ (NPY; Mallet et al., 2012; Mastro et al., 2014; Saunders et al., 2016; Lilascharoen et al., 2021).

En cuanto a sus características electrofisiológicas, las neuronas PV+ muestran disparo autónomo, regular y de alta frecuencia comúnmente descrito para las neuronas GABAérgicas del GPe y otras PV+ del cerebro (Mercer et al., 2007; Hernández et al., 2015; Abrahao & Lovinger, 2018). En comparación con otras neuronas del GPe, las neuronas PV+ muestran PA más rápidos y con post-potenciales hiperpolarizantes (AHP por sus siglas en inglés) más profundos, resistencia de entrada ( $R_N$ ) baja, y corrientes persistentes de  $Na^+$  grandes (Mercer et al., 2007; Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Abrahao & Lovinger, 2018). Por otra parte, las neuronas prototípicas Lhx6+ también muestran actividad marcapasos autónoma, pero de más baja frecuencia que las PV+ (Lhx6+ = 30 Hz

aprox; PV+ = 60Hz aprox; Mastro et al., 2014; Abrahao & Lovinger, 2018). A este respecto, se ha observado que las corrientes HCN y de K<sup>+</sup> sostenidas son más pequeñas en las neuronas Lhx6+ que en las PV+ (Mercer et al., 2007; Hernández et al, 2015). Estas corrientes se han relacionado con la actividad marcapasos de las neuronas del GPe (Mallet et al., 2019), lo que podría explicar por qué las neuronas Lhx6+ muestran actividad espontánea más irregular y menos frecuente que las PV+. De hecho, los PA de las neuronas Lhx6+ son más anchos y con AHPs más pequeños (Hernández et al; 2015; Abrahao & Lovinger, 2018).

Finalmente, comparadas con las neuronas arquipalidales, tanto en registros *in vivo* como *in vitro*, las neuronas prototípicas muestran actividad espontánea más alta y regular; *in vivo* la actividad de las prototípicas está asociada a la activación cortical, pero no a la actividad de ondas lentas, como es el caso de las arquipalidales (Mallet et al., 2008; Mallet et al, 2012; Abdi et al.; 2015). En resumen, las neuronas prototípicas son aquellas que principalmente conectan con los núcleos de salida de los GB y que muestran actividad espontánea con tasas de disparo altas y regulares.

### **Neuronas arquipalidales**

Las neuronas arquipalidales son las neuronas GABAérgicas del GPe que inervan masivamente el Str dorsal formando un bucle de retroalimentación inhibitorio. Molecularmente se pueden identificar por la expresión de preproencefalina, Foxp2 y Npas1 (**Fig. 2B**; Mallet et al, 2012; Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Glajch et al., 2016; Mizutani et al., 2017).

Anteriormente, describimos que Foxp2 y Npas1 se expresan en neuronas que emergen de la EGL y del APO, a diferencia de los marcadores de las neuronas prototípicas que se originan en la EGM. Sin embargo, la evidencia indica que existen coincidencias entre los factores de transcripción expresados tanto en neuronas prototípicas, como en neuronas arquipalidales. Es decir, existen neuronas con Npas1 que también expresan marcadores asociados a neuronas prototípicas como Nkx2.1 y Lhx6 (Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Abecassis et al., 2020), y

que no inervan al Str, como es el caso de las neuronas Npas1+ - Nkx2.1+ que inervan a la Cx directamente (Abecassis et al., 2020). Por otra parte, el factor de transcripción Foxp2 puede ser expresado junto con Npas1, pero no se expresa con otros marcadores prototípicos. (Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015). Por esta razón, el Foxp2 es utilizado como marcador preferente de neuronas arquipalidales, pues todas las neuronas que lo expresan inervan exclusivamente al Str (Abdi et al., 2015; Dodson et al., 2015; Hernández et al., 2015).

Esta complejidad molecular de las neuronas arquipalidales, también se ve reflejada en sus características electrofisiológicas, dificultando la identificación de un sólo componente que las distinga de las neuronas prototípicas. Sin embargo, existen algunos rasgos en su actividad que en su conjunto pueden ayudar a diferenciarlas dentro del GPe. Por ejemplo: en registros *in vitro* se ha observado que cuentan con  $R_N$  alta, capacitancia baja, sag amplio, tasa de disparo baja y PA más lentos que los observados en neuronas prototípicas (Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Abrahao & Lovinger, 2018; Abecassis et al., 2020). Así mismo, en registros *in vivo* las neuronas arquipalidales muestran actividad espontánea esporádica, irregular y de baja frecuencia, está influenciada por la activación cortical y por la actividad de ondas lentas (Mallet et al., 2008; Mallet et al., 2012; Abdi et al., 2015).

### **Neuronas colinérgicas**

Finalmente, las neuronas no GABAérgicas que también constituyen al GPe son las neuronas colinérgicas. A diferencia de las neuronas prototípicas y arquipalidales, su identidad molecular y electrofisiológica ha sido poco explorada, pues no se les consideraba parte de los GB, sino una extensión del núcleo basalis de Meynert (McKinney et al., 1983; Unal et al., 2012). No obstante, debido a que reciben proyecciones del Str y el NST, esta postura ha cambiado (Hernández et al., 2015; Saunders et al., 2015b).

Sobre su identidad molecular, se ha observado que, además de ser positivas a ChAT, estas neuronas coexpresan el factor de transcripción Nkx2.1 (Abdi et al.,



2015; Nóbrega-Pereira et al., 2010). Curiosamente, este factor también es expresado por las neuronas colinérgicas que se originan en la EGM y que emigran al Str (Marin et al., 2000; Flandin et al., 2010; Magno et al., 2011). Sin embargo, contrario a las interneuronas colinérgicas de este núcleo, las neuronas colinérgicas del GPe son neuronas de proyección que conectan al GPe con la Cx frontal (Saunders et al., 2015b).

Entonces, las neuronas colinérgicas son la vía más corta hacia la Cx desde los GB y ésta es modulada al menos por el Str y el NST. Esta conexión del GPe a la Cx es un hallazgo relevante para el entendimiento de la función motriz que es afectada por patologías como la EP en la que se cree que el GPe es fundamental para la propagación anormal del ritmo beta hacia la Cx (Hammond, et al., 2007; Quiroga-Varela et al., 2013; de la Crompe et al., 2020).

Respecto a sus propiedades electrofisiológicas, con registros *in vitro*, se ha observado que las neuronas ChAT+ tienen poca o nula actividad espontánea, y, comparadas con las neuronas GABAérgicas del GPe, sus PA son los más lentos y muestran acomodación como respuesta a pulsos de corriente despolarizante (Hernández et al., 2015; Saunders et al., 2015). En este trabajo se profundiza en su caracterización electrofisiológica y su respuesta al antagonismo agudo de DA, neurotransmisor que disminuye en la EP.

## **El globo pálido externo y la enfermedad de Parkinson**

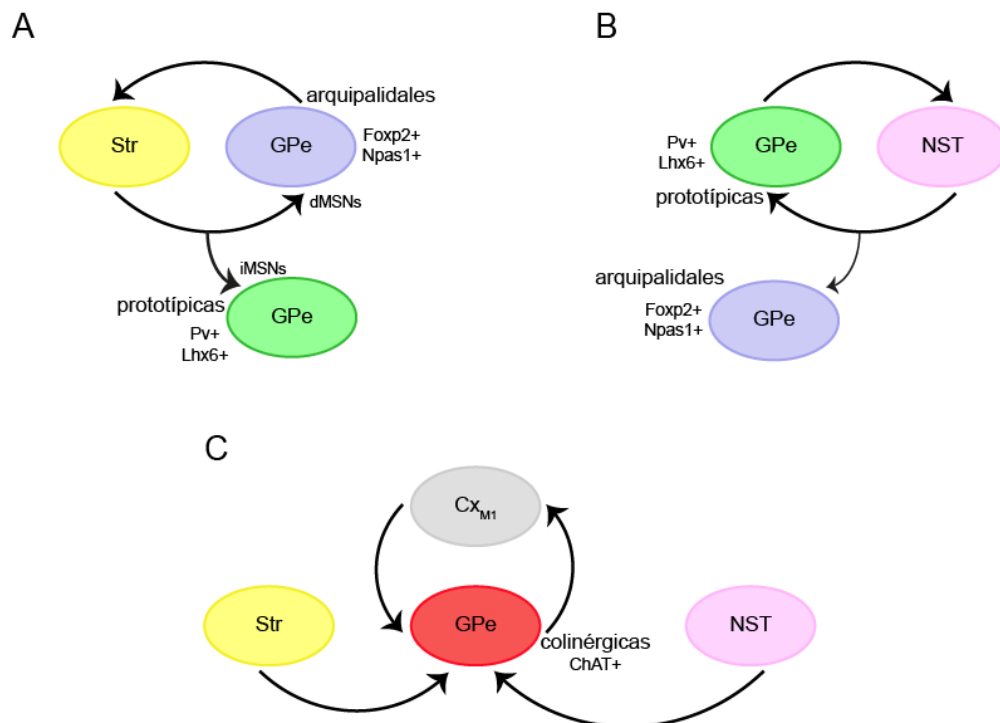
La EP es el segundo desorden neurodegenerativo más común (Balestrino & Schapira, 2020). Sus principales características anatómicas son la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína mal plegada (cuerpos de Lewy) en el citoplasma neuronal (Balestrino & Schapira, 2020; Tolosa, et al., 2021). Conductualmente se caracteriza por la presencia de rigidez, temblores en reposo, bradicinesia o acinesia y dificultad para iniciar movimientos (Sveinbjornsdottir, S., 2016; Balestrino & Schapira, 2020); todo esto acompañado por cambios en la neurofisiología de los GB. Por ejemplo: se incrementa la actividad sincrónica y correlacionada, así como la presencia de oscilaciones beta, y se genera un bucle persistente de actividad entre el NST y el GPe (Mallet et al., 2008a; Mallet et al., 2008b; Wilson, 2013; Nevado-Holgado, et al., 2018; McGregor & Nelson, 2019).

Hasta la fecha, no se cuenta con un tratamiento efectivo que evite la progresión de la enfermedad (Dong., et al., 2016; Balestrino & Schapira, 2020; Tolosa, et al., 2021), por lo que el estudio de los cambios en la actividad de los GB como consecuencia de la pérdida de la modulación dopaminérgica continúa. Dada la complejidad y la diversidad anatómica y sináptica del GPe, en las últimas décadas ha sido considerado como un blanco terapéutico novedoso para la EP (Vitek et al., 2004; Vitek et al., 2012; Mastro et al., 2017).

En el modelo clásico de los GB, el GPe se considera un núcleo central de la vía indirecta que propicia la inhibición del movimiento a través de sus proyecciones al NST (Albin et al., 1989; Bergman et al., 1990; Wichmann & DeLong, 1996; Smith et al., 1998; Gerfen & Surmeier, 2011). Sin embargo, la evidencia reciente indica que también participa en el inicio, mantenimiento y cancelación de acciones dirigidas a metas (Mallet et al., 2016; Schmidt & Berke, 2017; Gu et al., 2020; Goenner et al., 2021). Específicamente se ha asociado a la actividad de las neuronas arquipalidales con la cancelación de acciones (Glajch et al., 2016; Mallet et al., 2016; Goenner et al., 2021; Baker et al., 2023); y a las prototípicas con la ejecución de movimientos espontáneos (Dodson et al., 2015; Lilascharoen et al., 2021). Esta diferenciación de

la actividad de las neuronas del GPe obliga a un replanteamiento de su función dentro de los GB, pues parecería que puede diversificar sus influencias sobre el circuito al formar un bucle de retroalimentación con el Str, otro con el NST; y otro con la Cx (**Fig. 3**; Bogacz et al., 2016; Saunders et al., 2015b; Mallet et al., 2016; Aristieta et al., 2021).

Por lo tanto, todo cambio en la modulación de la actividad del GPe implicaría efectos motores importantes.



**Figura 3. Microcircuitos palidales formados por sus conexiones recíprocas con el estriado (A), el núcleo subtalámico (B) y la corteza (C).** Nótese que la conexión ipsilateral con la corteza sería la salida más corta de los ganglios basales hacia esta estructura. Str: núcleo estriado; GPe: globo pálido externo; NST: núcleo subtalámico; Cx: corteza; M1: corteza motora primaria.

### Depleción de dopamina: efectos en el GPe

Una de las principales características de la actividad del GPe es que es tónica, asincrónica y no correlacionada (Nini, et al., 1995; Bar-Gad, et al., 2003; Stanford,

2003; Deister, et al., 2012; Mallet, et al., 2008a). No obstante, bajo condiciones de privación de DA, las neuronas del GPe cambian su actividad a un modo sincrónico y enganchado en oscilaciones beta – 13-30 Hz (Nini, et al., 1995; Heimer, et al., 2002; Raz, et al., 2000; Mallet, et al., 2008a, 2008b; Chen et al., 2023). Estas oscilaciones también se presentan en el GPi, el NST y se extienden hacia la Cx (Deffains & Bergman, 2019; Mallet et al., 2008a Mallet et al., 2008b), aunque algunos autores postulan que el ritmo beta patológico de la EP parte de la Cx hacia estas estructuras (Arbutnott & Garcia-Muñoz, 2016). Todas estas estructuras reciben inervación del GPe. Hasta la fecha, sigue siendo tema de discusión en dónde se genera y quién propaga esta actividad anormal, aunque la mayoría piensa que fallas en las interconexiones palidales conllevan a la actividad correlacionada del núcleo, ya que la inhibición intrapalidal aumenta, junto con la presencia de ráfagas de rebote (Migueluez et al., 2012; Schwab et al., 2013; de la Crompe et al., 2020; Chen et al., 2023). A este respecto, un estudio reciente demostró con manipulaciones optogenéticas que el GPe puede generar y propagar las oscilaciones beta patológicas (de la Crompe et al., 2020) asociadas a la rigidez y el déficit motor.

Con la clasificación de las neuronas prototípicas y arquipalidales, y la identificación de sus marcadores moleculares específicos, surgió la posibilidad de estudiar los cambios que cada población sufría ante la depleción dopaminérgica. De acuerdo a los estudios *in vivo*, las neuronas prototípicas y arquipalidales están anormalmente asociadas a la actividad cortical de ondas lentas, aunque las primeras se enganchan a los valles de las ondas, mientras que las últimas lo hacen a las crestas (Abdi, et al., 2015; Kovaleski et al., 2020). Además, si se activa la Cx a través de un estímulo sensorial, la frecuencia de disparo de ambas poblaciones neuronales en el GPe incrementa (Abdi, et al., 2015); poniendo de manifiesto que estas dos estructuras están interrelacionadas.

Por otra parte, con registros *in vitro* se pudo observar que las neuronas prototípicas mantienen su actividad espontánea, aunque en algunos casos incrementa; sin embargo, las neuronas arquipalidales están mucho menos activas que en

condiciones control (Hernández et al., 2015; Kovaleski et al., 2020). Otra vez, ambas poblaciones respondieron de forma distinta, lo que implicaría que su influencia sobre el resto de los núcleos de lo GB, también es diferente en condiciones patológicas. Se ha demostrado con manipulaciones optogenéticas que incrementar específicamente la actividad de las neuronas prototípicas aminora la inmovilidad de los roedores (Mastro, et al., 2017; Pamukcu, et al., 2020; Liu et al., 2021), y reduce la actividad patológica en ráfagas que se presenta en la SNr (Mastro, et al., 2017). No sería de sorprenderse que la manipulación contraria de las neuronas arquipalidales también tuviera efectos benéficos en la movilidad de ratones parkinsonianos, ya que inhiben a las iSPNs y en condiciones normales esta inhibición promueve el movimiento (Goenner et al., 2021). Además, se ha reportado que la fuerza sináptica de las neuronas arquipalidales hacia las iSPNs incrementa considerablemente en condiciones de depleción de DA (Glajch et al., 2016).

Finalmente, está pendiente de ser estudiado con mayor detalle el microcircuito cortico-pálido-cortical, tanto en condiciones fisiológicas normales como en condiciones de bloqueo o denervación dopaminérgica. Este circuito es de especial interés debido a la participación de la neurotransmisión colinérgica en la formación de oscilaciones gama en la Cx (Rodríguez et al., 2004; Mena-Segovia et al., 2008), relacionada con procesos de atención y funcionamiento sensoriomotor (Howe et al., 2017; Ulloa, 2021). De hecho, se ha observado que la sustitución progresiva de la actividad cortical en banda gama por la actividad en banda beta acompaña al surgimiento de los síntomas motores de la EP (Quiroga-Varela et al., 2013; Deffains & Bergman, 2019; Brazhnik et al., 2021). Si la conexión colinérgica proveniente del GPe hacia la Cx participa en este desbalance sigue siendo una interrogante. Sin embargo, se sabe que, en otros núcleos de los GB, como el núcleo Str, las neuronas colinérgicas están hiperactivadas y la modulación colinérgica se desbalancea a la alta, provocando hipercolinergia dentro del núcleo, afectando el funcionamiento del microcircuito estriatal (Galarraga et al., 1999; Tanimura et al., 2017; Padilla-Orozco et al., 2022). Por lo tanto, se puede esperar que también la actividad de las neuronas colinérgicas del GPe se vea afectada ante la falta de DA.

Con este trabajo, contribuimos a la caracterización electrofisiológica de las neuronas colinérgicas del GPe en condiciones fisiológicas normales y exploramos si el bloqueo de la señalización dopaminérgica afecta su actividad electrofisiológica.

## **Hipótesis**

Las neuronas colinérgicas del globo pálido externo cuentan con características electrofisiológicas distintas a las observadas en las subpoblaciones de neuronas GABAérgicas del mismo núcleo. Además, su actividad electrofisiológica está influenciada por la innervación dopaminérgica que recibe el globo pálido externo.

## **Objetivos**

Caracterizar las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas colinérgicas del globo pálido externo a través de registros de patch-clamp *in vitro*.

Determinar los cambios electrofisiológicos en las neuronas colinérgicas del globo pálido externo ante el bloqueo dopaminérgico agudo.

## **Métodos**

Todos los protocolos se realizaron de acuerdo a las normas del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (FTA-121-17; IFC- UNAM), y de acuerdo a las regulaciones para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio en México (NOM-062-ZOO-199). Se utilizaron ratones hembras y machos de 40- 50 días postnatales: B6; 129S6-Chat<sup>tm2(cre)</sup> Lowl/J (ChAT-cre; JAX stock: 006410), adquiridos en “The Jackson Laboratory” (<https://www.jax.org/>; Bar Harbor, ME, USA). Todos los animales se resguardaron con agua y alimento *ad libitum* en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Todos los experimentos se realizaron en la fase de luz.

## **Inyección de virus**

Con el objetivo de identificar a las neuronas colinérgicas, se inyectó intracranealmente el vector viral pAAV-FLEX-tdTomato (Addgene viral prep #28306-AAV1, RRID:Addgene 28306; Addgene, Watertown, MA, USA) en los ratones ChAT-Cre. Para ello, ratones ChAT-Cre de entre 21- 28 días de edad se colocaron en un aparato estereotáxico bajo anestesia con isofluorano. Después de la craneotomía, el virus fue inyectado en el GPe (AP: -0.1, ML: 2.0, DV: -4.3) a través de una micropipeta conectada a un nanoinyector (Drummond Scientific Company, USA) a una velocidad de 18 nL/s para un total de 0.22  $\mu$ L. Durante la cirugía estereotáxica se colocaron lágrimas artificiales en los ojos de los ratones. Antes de ser retraída, la micropipeta se dejó inmóvil durante 10 minutos para permitir que el virus difundiera al tejido cerebral. Los registros electrofisiológicos se realizaron 10 a 15 días después de la cirugía.

## **Preparación de las rebanadas de cerebro**

Los ratones ChAT-Cre fueron anestesiados profundamente con ketamina/xilacina (85/15, mg/Kg i. p.; Anesket, Pisa, Mexico/Rompun, Bayer, Argentina) para realizar una perfusión transcardiaca con “solución para corte” fría (en mM): 225 sacarosa, 2.5 KCl, 7 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 28 NaHCO<sub>3</sub>, 7 glucosa, 1 ácido ascórbico, y 3 piruvato (pH 7.4), saturada con 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se obtuvo el cerebro y se realizaron rebanadas parasagitales (250  $\mu$ m de ancho) con un ángulo de 10° para preservar las fibras de la vía indirecta (Cáceres-Chávez, et al., 2018). Las rebanadas se cortaron con un vibratomo (Pelco easiSlicer, Ted Pella, Redding, CA, USA) y se mantuvieron en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) (en mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12.5 glucosa, 0.2 ácido ascórbico, y 0.2 tiourea (pH 7.4, 310 mOsmol/L), burbujeado con carbógeno.

## **Registros electrofisiológicos de patch-clamp *in vitro***

Para los registros electrofisiológicos las rebanadas se sumergieron individualmente en una cámara de perfusión con LCRa burbujeadado constantemente con carbógeno (3.5 ml/min, 30-32 °C). Se realizaron registros de célula completa utilizando micropipetas (3-5 MΩ) hechas con un “puller” (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) a partir de tubos de vidrio de borosilicato con un diámetro externo de 1.5 mm (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Previo a cada registro, las pipetas se llenaron con solución interna que contenía (en mM): 120 KMeSO<sub>4</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, 10 NaCl, 2.0 MgCl<sub>2</sub>, 1.0 CaCl<sub>2</sub>, 2.0 ATP-Mg, 0.5 GTP-Na y 1% biocitina (pH 7.2, 290 mOsm/L). Las neuronas palidales se identificaron a través de un microscopio de contraste de interferencia diferencial y un filtro infrarrojo, usando un objetivo de inmersión 40X (Nikon Instruments, Melville, NY, USA) y una cámara CCD (Cool Snap ES2, Photometrics, Tucson AZ, USA). Las neuronas ChAT+ fueron seleccionadas con la ayuda de una lámpara LED de alta potencia HPX (Sutter Instruments, Petaluma, CA, USA) acoplada a un filtro de excitación/emisión (excitación: paso banda 535/550nm, emisión: paso alto 590 nm). Finalmente, la actividad de las neuronas se registró con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Los datos fueron adquiridos con el programa Im-Patch<sup>©</sup> (<http://impatch.ifc.unam.mx>).

## **Fármacos**

Los fármacos utilizados fueron preparados y almacenados para ser disueltos en sus concentraciones finales en la perfusión con LCRa: SCH 23390 (7-cholo-8-hidroxi-3metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzacepina), sulpiride (±-N-1-etil-pirrolidinil-2-ilmethyl-2-metoxi-5-sulfamoilbenzamida), bicuculina (1(S),9(R)-(-)-Bicuculina metiodida), APV (ácido D-(  )-2-amino-5-fosfonovalerico), CNQX (6-ciano-2,3-dixidroxil-7-nitro-quinoxalina sal disódica) (Sigma-Aldrich, USA), y XE-991 dihidroclorato (Tocris Biosciences, Minneapolis, MN, USA).



## **Marcaje de células y microscopía confocal**

Para visualizar a las neuronas cargadas con biocitina después del registro de patch-clamp, las rebanadas completas fueron incubadas toda la noche a 4 °C con conjugado de FITC-estreptavidina (3:500; Invitrogen, Waltham, MA, USA) en PBS con 0.3% Tritón X-100. Después, las rebanadas se incubaron en las mismas condiciones con anti-GAD 65/67 (1:500; Sigma-Aldrich, USA) para detectar la enzima descarboxilasa del ácido glutámico. Después, se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 por 1.5 hrs (1:50; Jackson ImmunoResearch, Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Las rebanadas fueron montadas en portaobjetos con el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Newark, CA, USA). Las fotografías de las neuronas fueron capturadas usando un microscopio confocal de barrido laser (LSM700, Zeiss, Gottingen, Germany).

## **Análisis de datos**

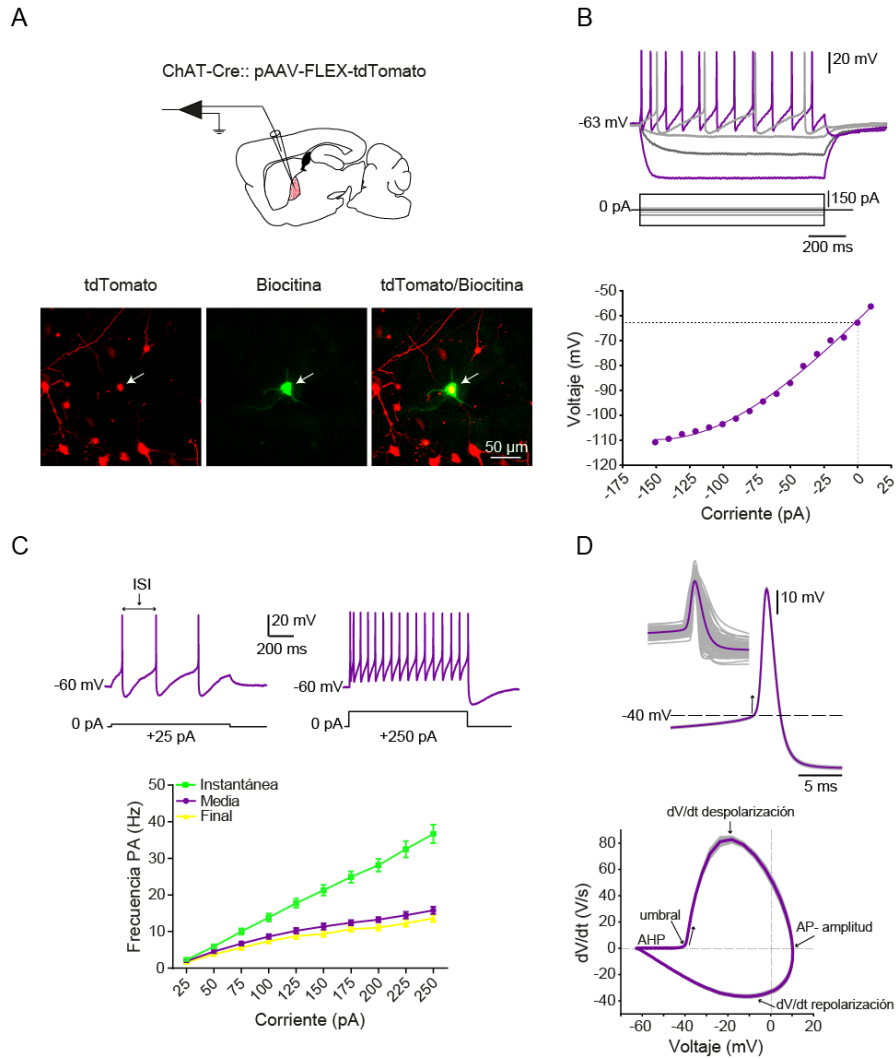
Los registros se realizaron en la modalidad de fijación de corriente (“current-clamp”) a corriente cero para evaluar las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas, tales como: resistencia de entrada ( $R_N$ ), potencial de membrana en reposo ( $V_m$ ), constante de tiempo de la membrana ( $\tau_m$ ), capacitancia de la membrana ( $C_N$ ), proporción del “Sag” y propiedades del potencial de acción (PA). Todas las mediciones se realizaron antes y después de los antagonistas dopaminérgicos, o cualquier otro fármaco. Para medir la  $R_N$  se construyeron curvas corriente-voltaje (curvas I-V) que se ajustaron a polinomios de tercer orden pues las curvas son no lineales. La pendiente a corriente cero ( $dV/dI$ ) se utilizó para obtener la  $R_N$ . Por otra parte, la  $\tau_m$  se calculó ajustando una función bi-exponencial a trazos hiperpolarizantes de voltaje obtenidos a partir del  $V_m$  donde la caída más lenta se toma como la más aproximada (Rall et al., 1992). La proporción de “sag” se calculó del trazo de voltaje obtenido a partir de un pulso hiperpolarizante (-150 pA, 1 s) dividiendo el valor de voltaje más negativo entre 0-300 ms (después del inicio del pulso) entre el plateau alcanzado entre 900-1000 ms (al final del pulso). Finalmente,

las características del PA se evaluaron con diagramas de fase de la tasa de cambio ( $dV/dt$  (V/s)) contra el voltaje (V(mV));  $dV/dt$  (V); Bean, 2007). Además de las propiedades pasivas, la mayoría de las muestras experimentales tuvieron un número limitado de neuronas para los diferentes fármacos probados. Por lo tanto, se realizaron diagramas de caja y se utilizó estadística no paramétrica para compararlas y evaluar las acciones de los fármacos. En consecuencia, los Resultados se reportan con medianas y rangos intercuartiles (25-75%, cuando no es así se indica en el lugar apropiado). Las muestras no pareadas se compararon con la prueba de suma de los rangos de U de Mann-Whitney (prueba de U de Mann-Whitney); las muestras pareadas con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (prueba de Wilcoxon), y las muestras con más de dos condiciones experimentales, con la prueba de Friedman seguida de una prueba post-hoc de Dunn. En el caso de las curvas intensidad-frecuencia (curvas I- F), se hicieron comparaciones con la prueba de ANOVA de dos vías con medidas repetidas, seguida de la prueba post-hoc de Sidak. En estos casos, antes de hacer las comparaciones, se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk.

## Resultados

### Propiedades de disparo de las neuronas colinérgicas del globo pálido externo

Para registrar la actividad eléctrica de las neuronas ChAT+, se utilizaron ratones ChAT-Cre previamente inyectados con el vector viral pAAV-FLEX-tdTomato en el GPe (**Fig. 4A, B superior**). Sólo aquellas neuronas dentro de los límites del GPe fueron blanco de registro, evitando aquellas en las zonas aledañas. En total, 110 neuronas (de 69 ratones distintos) fueron registradas, y sus propiedades electrofisiológicas pasivas se evaluaron a partir de sus curvas I-V (**Fig. 4B inferior**). De acuerdo con nuestras observaciones y cuantificaciones, las neuronas ChAT+ del GPe no mostraron “sag” prominente como respuesta a los pulsos de corriente hiperpolarizante que les fueron inyectados. Sin embargo, se pudo observar una rectificación entrante independiente de tiempo (**Fig. 4B superior**). Aunque esta observación contrasta con reportes anteriores sobre neuronas colinérgicas de otras zonas cerebrales (Wilson, 2005; McKenna et al., 2013; Hernandez et al., 2015), concuerda con lo observado en neuronas colinérgicas pertenecientes al sistema autónomo, el prosencéfalo basal y el GPe (Sah & McLachlan, 1995; Unal et al., 2012; Saunders et al., 2015b). Respecto al resto de propiedades pasivas (Tabla 1; media  $\pm$  EEM) el potencial de membrana en reposo ( $V_m$ ) fue de  $-64 \pm 0.8$  mV; y la resistencia de entrada ( $R_N$ ) de  $679 \pm 42$  M $\Omega$ , nótese que es mucho más alta que la de las neuronas GABAérgicas dentro del mismo GPe (Abraham & Lovinger, 2018). La constante de tiempo de la membrana ( $\tau_m$ ) fue de  $59 \pm 3$  ms, y la capacitancia total de la membrana ( $C_N = \tau_m / R_N$ ) fue de  $104 \pm 7$  pF.



**Figura 4. Propiedades de disparo de las neuronas ChAT+ del GPe.** A) Superior: esquema representativo de los registros de célula completa con patch-clamp en rebanadas de cerebro de ratón ChAT- Cre. Inferior: de izquierda a derecha: Las neuronas ChAT+ fueron identificadas por la expresión de tdTomato. La neurona ChAT+ indicada a la izquierda fue registrada y marcada con biocitina (en medio). La superposición de ambas figuras se ve a la derecha. B) De arriba abajo: trazos representativos de las respuestas de voltaje provocadas con pulsos rectangulares de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes de diferentes intensidades. Abajo se muestra una curva corriente-voltaje (I-V) representativa. C) Superior: trazos representativos de los potenciales de acción provocados por pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades. Inferior: curvas intensidad-frecuencia (I-F) mostrando la frecuencia de potenciales de acción instantánea (recíproco del 1<sup>er</sup> ISI), media (los potenciales de acción evocados por un pulso de 1 s), y final (recíproco del último ISI; n = 100 neuronas de 69 animales diferentes). D) Superior: Trazo medio  $\pm$  EEM del potencial de acción registrado en neuronas ChAT+. El inserto muestra los potenciales de acción superpuestos de todas las neuronas registradas. Inferior: diagrama de fase medio  $\pm$  EEM (dV/dt (V)).

Se indican las regiones de las cuales se tomaron las mediciones (n = 110 neuronas de 69 animales diferentes).

Para visualizar la respuesta de las neuronas a pulsos de corriente despolarizante de intensidad creciente se realizaron curvas I-F (**Fig. 4C**). Para ello, a partir de los intervalos inter-espiga (ISI) inicial y final se calcularon la frecuencia instantánea y final, mientras que todos los PAs evocados por cada pulso de corriente se utilizaron para calcular la frecuencia promedio. De acuerdo con nuestros resultados, la frecuencia media y la final tuvieron valores similares, lo que revela poca adaptación en la frecuencia de disparo de las neuronas ChAT+ del GPe. Por otra parte, los PA evocados se utilizaron para realizar diagramas de fase, representados como la  $dV/dt$  en función del V ( $dV/dt$  (V)), que nos permitieron extraer cuantitativamente las propiedades del PA (**Tabla 2**). La Figura 4D representa el promedio de los trazos de los PA y el promedio de los diagramas de fase utilizados para las mediciones (Bean et al., 2007). Los valores encontrados fueron (media  $\pm$  EEM): umbral de disparo de  $-39 \pm 0.37$  mV, amplitud del PA de  $53.7 \pm 0.74$  mV medido desde el umbral ( $77$  mV aproximadamente, medido a partir del  $V_m$ ), duración del PA medida a la mitad de la amplitud (“ancho”, Bean et al., 2007) fue de  $1.5 \pm 0.04$  ms, la despolarización y repolarización  $dV/dt$  máximas fueron de  $83.49 \pm 2.29$  V/s y  $-43.73 \pm 1.32$  V/s, respectivamente, el AHP midió  $26.09 \pm 0.53$  mV.

Tabla 1. Propiedades electrofisiológicas pasivas de las neuronas ChAT+

n = 110	Mediana (RIC 25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	Media $\pm$ EEM
SAG (u.a.)	1.0 (1.0 - 1.03)	1.03 $\pm$ 0.01
$V_m$ (mV)	-62.0 (-68.25 - -60.0)	-63.78 $\pm$ 0.77
$R_N$ (M $\Omega$ )	564.5 (348.8 - 879.3)	679.2 $\pm$ 42.21
$\tau_m$ (ms)	53.0 (36.0 - 73.0)	58.64 $\pm$ 3.14
$C_N$ (pF)	89.0 (63.0 - 118.5)	104.2 $\pm$ 6.9

**Tabla 1. Propiedades electrofisiológicas pasivas de las neuronas colinérgicas del GPe.** Se reportan tanto la mediana con sus rangos intercuartiles (RIC; 25- 75), como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM; n = 110 neuronas de 69 animales diferentes). SAG = voltaje inicial entre voltaje

final, después de un pulso de corriente hiperpolarizante (-150 pA).  $V_m$  medido en neuronas sin disparo autónomo a corriente 0 al inicio del registro.  $R_N = dV/dI$  en  $V_m$ .  $\tau_m =$  calculada de la caída exponencial más lenta de voltaje en función del tiempo.  $C_N = \tau_m/R_N$

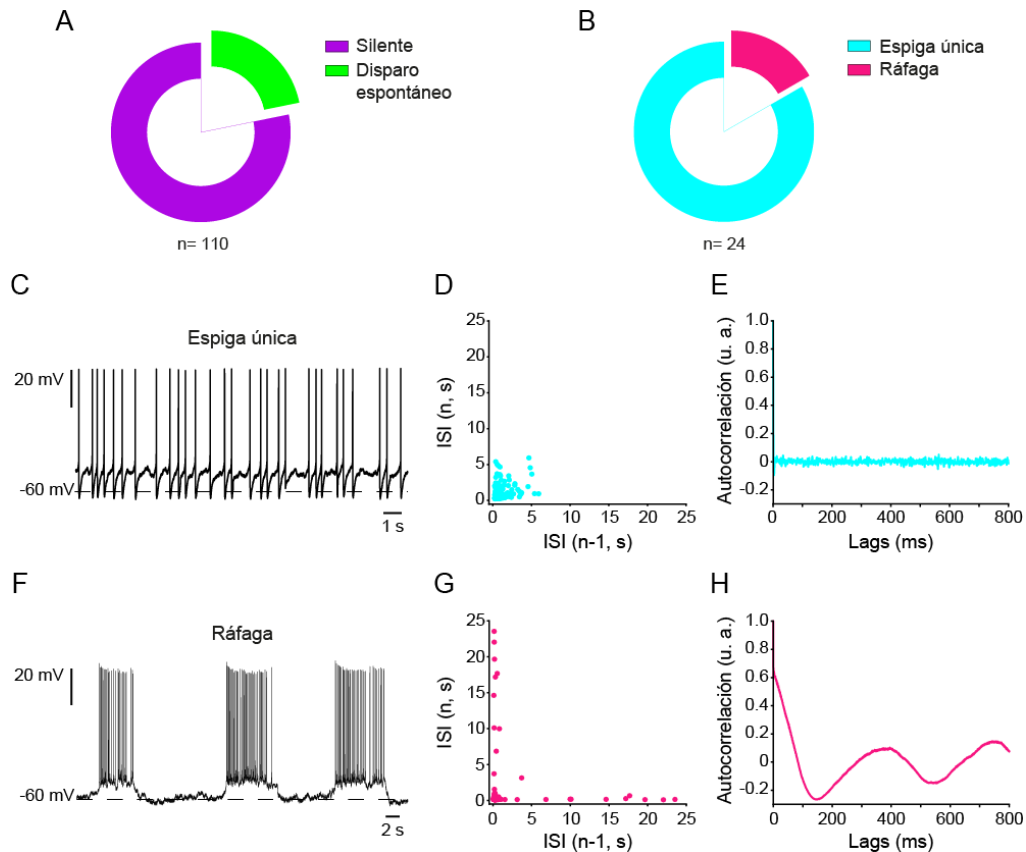
Se evaluó cuántas neuronas ChAT+ del GPe mostraron actividad espontánea: el 22%, mientras que el resto se mantuvo silente antes y después de que el registro comenzara (**Fig. 5A**). Respecto al 22% con actividad espontánea, el disparo más común fue en espigas únicas (**Figs. 5B, C- E**); mientras que el disparo en ráfaga sólo se presentó en 4 de las 24 neuronas con actividad espontánea (16% de las neuronas con actividad espontánea, **Figs. 5B, F-H**). La frecuencia de disparo para el disparo de espigas únicas fue de (mediana y rangos intercuartiles): 1.27 (0.70 - 2.29) Hz con un coeficiente de variación (CV) de 0.69 (0.55 - 1.02), y para el disparo en ráfaga (regular o irregular) fue: intrarráfaga 3.45 (1.67 - 4.83) Hz, e interráfaga 0.19 (0.06 - 0.32) Hz.

Tabla 2. Propiedades del PA de las neuronas ChAT+ del GPe

n = 110	Mediana (RIC 25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	Media +/- EEM
Umbral	-38.90 (-41.22 - -36.71)	-39.04 ± 0.37
Amplitude PA (mV)	53.78 (47.7 - 59.10)	53.70 ± 0.74
Duración PA (“ancho” en la amplitud media) (ms)	1.42 (1.24- 1.79)	1.55 ± 0.04
$dV/dt_{MAX}$ despolarización (V/s)	80.57 (68.35 - 98.21)	83.49 ± 2.29
$dV/dt_{MAX}$ repolarización (V/s)	-42.34 (-51.80 - -33.44)	-43.73 ± 1.32
Amplitud AHP (mV)	26.66 (23.37 - 30.35)	26.09 ± 0.53

**Tabla 2. Propiedades del PA de neuronas ChAT+ del GPe.** Se reportan tanto la mediana con sus rangos intercuartiles (RIC; 25- 75), como la media ± error estándar de la media (EEM; n = 110 neuronas de 69 animales diferentes). Todos los valores fueron tomados de los diagramas de fase representativos, excepto por la duración o “ancho” del PA. Umbral: medido en el “vértice” del PA

(Bean, B. P., 2007). Amplitud del PA: medido a partir del umbral. Duración del PA o “ancho”: medido a la mitad de la amplitud del PA.  $dV/dt_{MAX}$ : el punto más bajo y más alto del diagrama de fase, respectivamente. Amplitud del AHP: medido a partir del umbral como se señala en la Fig. 4D inferior.

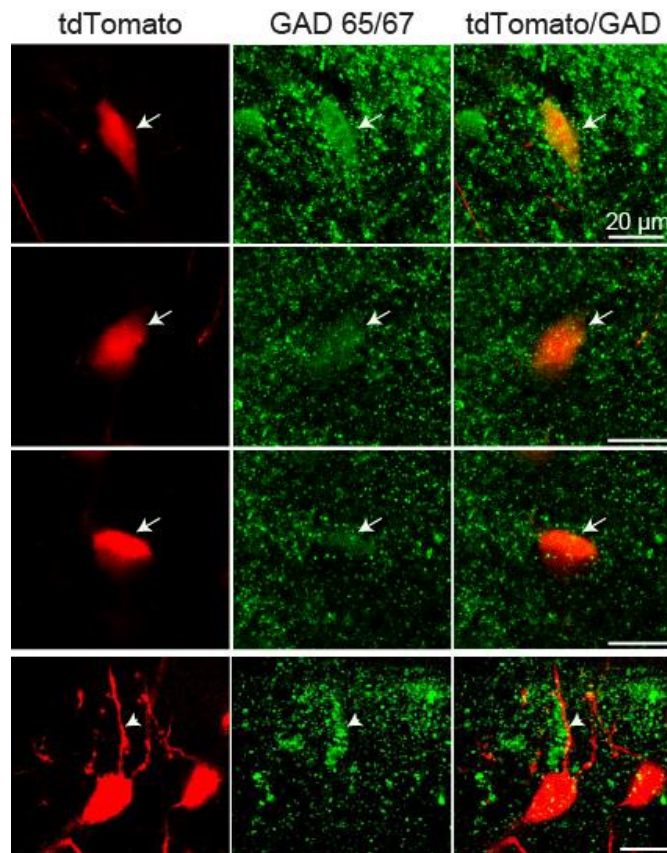


**Figura 5. Disparo espontáneo de las neuronas ChAT+ del GPe.** A) Proporción de neuronas ChAT+ del GPe con disparo espontáneo. La mayoría de las neuronas fueron silentes durante los registros *in vitro*. B) El disparo espontáneo fue dividido en disparo de espiga única y disparo en ráfaga (n = 24 neuronas de 20 animales distintos). C-E) Trazo representativo del disparo espontáneo de espiga única (C), con su respectiva gráfica de los ISI en función de los ISI previos (D), y su histograma de autocorrelación (E). F-H) Trazo representativo del disparo espontáneo en ráfaga (F) con su gráfica de los ISI en función de los ISI previos (G), y su histograma de autocorrelación (H). Nótese que el disparo en ráfaga parte de un potencial de membrana más polarizado.

En conjunto, estos resultados distinguen electrofisiológicamente a las neuronas ChAT+ de la mayoría de las poblaciones de neuronas GABAérgicas del GPe; por ejemplo muestran resistencia y capacitancia más altas, y potenciales de acción más

largos (Abraham et al., 2018; Hernández et al., 2015). Sin embargo, nuestras neuronas ChAT+ también fueron positivas a la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD 65/67; **Fig. 6**; 56/60 neuronas positivas). Estos hallazgos respaldan reportes previos que sugieren que las neuronas ChAT+ del GPe pueden coliberar acetilcolina y GABA como neurotransmisores (Saunders et al., 2015a; Granger et al., 2016). En este sentido, nuestros resultados electrofisiológicos no muestran alguna distinción o segregación de dos o más subtipos de neuronas colinérgicas, por lo que inferimos que la mayoría de ellas coexpresan GABA. Además, es importante apuntar que en las muestras histológicas se pueden observar proyecciones de neuronas ChAT+ junto a otras neuronas GABAérgicas (**Fig. 6** hilera superior e inferior). Las interacciones intrapalidales respecto a las neuronas colinérgicas aún están pendientes de ser investigadas, pero no sería de extrañar que estén interconectadas con las neuronas GABAérgicas, especialmente con las prototípicas que son las más abundantes y que también inervan a las arquipalidales (Ketzef & Silberberg, 2021).





**Figura 6. Las neuronas ChAT+ del GPe co-expresan GABA.** Imágenes representativas de neuronas ChAT+ del GPe (columna izquierda) con inmunohistoquímica para identificar la enzima GAD 65/67 (columna de en medio) y su coincidencia (columna derecha). Las fotomicrografías de la primera hilera muestran una neurona ChAT+/GAD+ al lado de una neurona ChAT-/GAD+. La última hilera muestra dos neuronas ChAT+ al lado de lo que serían cuerpos o procesos neuronales ChAT-/GAD+. Nótese la neuropila GAD+ abundante y los procesos neuronales ChAT+ .

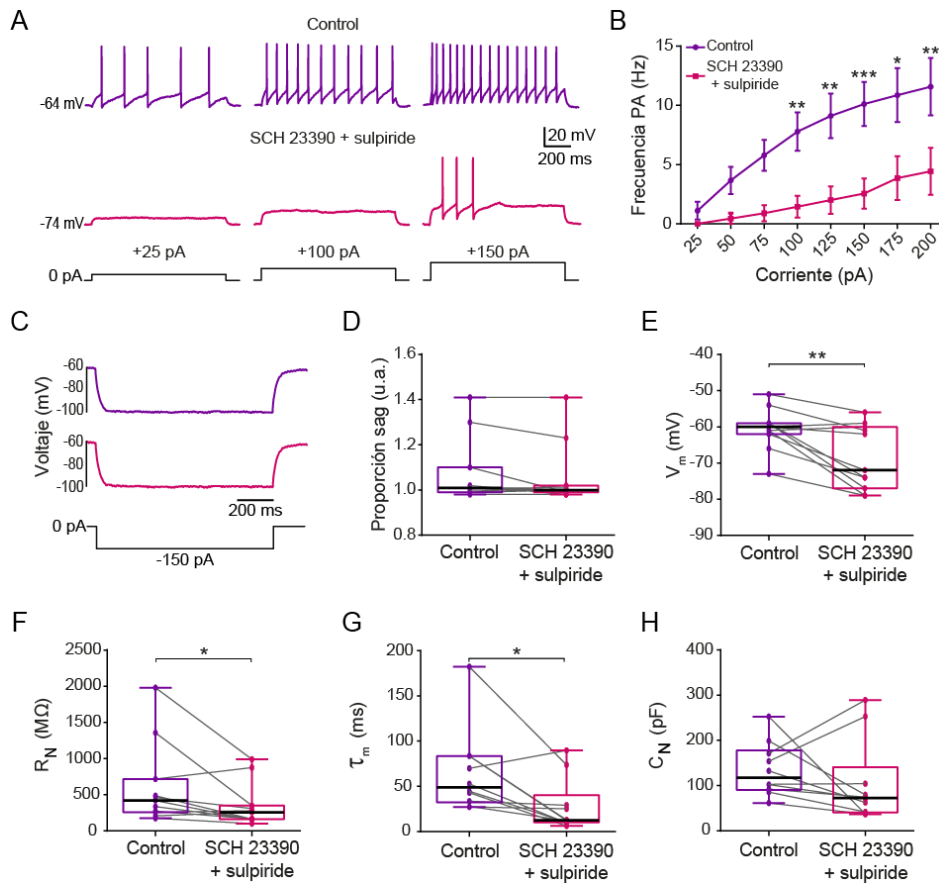
### **La inhibición de la señalización dopaminérgica inhibe el disparo de potenciales de acción en las neuronas ChAT+ del GPe**

Debido a la importancia que el GPe ha tomado en el estudio y entendimiento de la EP, y a la influencia que podrían tener las neuronas ChAT+ de este núcleo en la actividad cortical (Mena-Segovia et al., 2008; Mastro et al., 2017; Dong et al., 2021; Lillascharoen et al, 2021), nuestro objetivo fue explorar si el bloqueo de los receptores dopaminérgicos afectaba las propiedades electrofisiológicas de las neuronas ChAT+. Para ello, adicionamos antagonistas para los receptores de las

clases D<sub>1</sub> (1  $\mu$ M SCH 23390) y D<sub>2</sub> (1  $\mu$ M sulpiride) a la perfusión con LCRa, ya que reportes anteriores indican que las neuronas colinérgicas de otras áreas como el prosencéfalo basal (BFCN, por sus siglas en inglés) expresan receptores de la clase D<sub>1</sub> (Berlanga et al., 2005).

Previo al antagonismo dopaminérgico, las neuronas respondieron a los estímulos con pulsos de corriente creciente disparando trenes de PAs (1 s; **Fig. 7A superior**). La frecuencia de disparo incrementa en función de la intensidad de corriente de cada pulso de estimulación (**Fig. 7B**). En contraste, después de la aplicación de los antagonistas dopaminérgicos, las neuronas ChAT<sup>+</sup> se hiperpolarizaron (10 mV aproximadamente), redujeron su frecuencia de disparo, o dejaron de disparar PA a lo largo de todo el estímulo (**Fig. 7A inferior y Fig. 7B**; n = 9 de 6 animales diferentes; ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguida de la prueba post hoc de Sidak).

Adicionalmente, se compararon las propiedades electrofisiológicas pasivas antes y después de los antagonistas dopaminérgicos. De acuerdo con nuestros resultados, el sag (medido desde V<sub>m</sub>) no mostró cambios (**Fig. 7C, D**; mediana y rangos intercuartiles): Control = 1.01 (0.99 - 1.10); SCH 23390 + sulpiride = 1.00 (0.99 - 1.02; n = 11 de 11 animales diferentes, prueba de Wilcoxon). Sin embargo, las neuronas se hiperpolarizaron (**Fig. 7E**): Control = -60 (-62 - -59) mV; SCH 23390 + sulpiride = -72 (-77 - -60) mV (n = 11 de distintos animales; \*\*p  $\leq$  0.01; prueba de Wilcoxon). También, de acuerdo con la no linealidad de la curva I-V (**Fig. 4B**), la R<sub>N</sub> decrementó con la hiperpolarización: control = 420 (258 - 717) M $\Omega$ ; SCH 23390 + sulpiride = 258 (163 - 350) M $\Omega$  (**Fig. 7F**; n = 11 de 11 animales distintos; \*p  $\leq$  0.05; prueba de Wilcoxon), al igual que la  $\tau_m$ : Control: 48.69 (32.21 - 83.50) ms; SCH 23390 + sulpiride = 12.60 (10.16 - 40.28) ms (**Fig. 7G**; n = 11 de 11 animales distintos; \*p  $\leq$  0.05; prueba de Wilcoxon). Por último, es de resaltar que a pesar de estos cambios la C<sub>N</sub>, que en general refleja la superficie neuronal, se mantuvo sin cambios significativos (**Fig. 7H**): Control = 117.6 (90.39 - 178.10) pF y SCH 23390 + sulpiride = 72.80 (40.77 - 141.3) pF (N = 11 del mismo número de animales; p = 0.27; prueba de Wilcoxon).



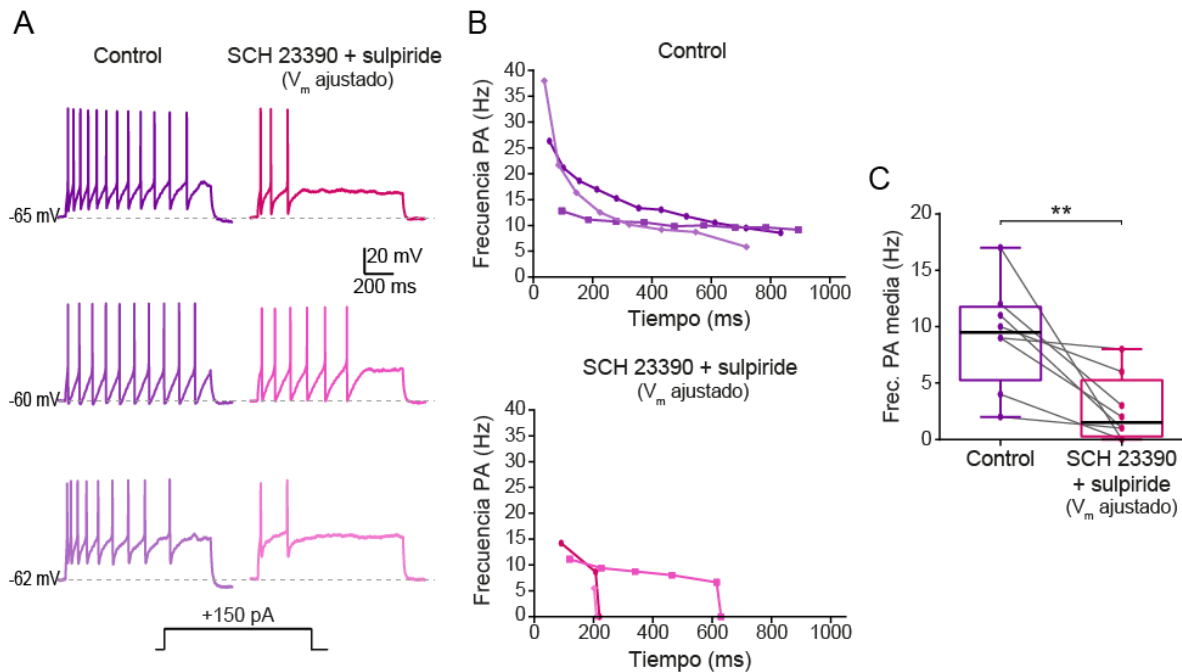
**Figura 7. El disparo de las neuronas ChAT+ del GPe se abate cuando se bloquea la señalización dopaminérgica.** A) Superior: trazos representativos de los potenciales de acción generados por pulsos de corriente despolarizante de distintas intensidades (25, 100 y 150 pA) antes/control, y después de la administración de antagonistas selectivos para ambas clases de receptor dopaminérgico: D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (1 μM SCH 23390 + 1 μM sulpiride). Nótese que la interrupción de la señalización dopaminérgica produce una hiperpolarización del V<sub>m</sub> y la inhibición del disparo. B) Curvas I-F antes y después del bloqueo dopaminérgico (n = 9 neuronas de 6 animales distintos; media ± EEM; ANOVA de dos vías para medidas repetidas, seguida de la prueba post-hoc de Sidak). El rango dinámico de disparo disminuye considerablemente después del bloqueo dopaminérgico. C- D) Trazos representativos provocados con un pulso de corriente hiperpolarizante (150 pA; C) para comparar la proporción del “sag” (rectificación dependiente del tiempo) antes y después de los antagonistas dopaminérgicos (D). E-H) Comparación de V<sub>m</sub>, R<sub>N</sub>, t<sub>m</sub> y C<sub>N</sub>. Los diagramas de caja muestran mediana y rango intercuartil 25-75, y los bigotes los percentiles 5 y 95 (n = 11 neuronas de 11 animales diferentes; prueba de Wilcoxon. \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001).

Nuestros resultados sugieren que tanto la excitabilidad de las neuronas como el potencial de membrana de las neuronas colinérgicas son mantenidos por la

actividad constitutiva y continua de la señalización intracelular generada por los receptores dopaminérgicos. Probablemente, la activación de estos receptores es, a su vez, mantenida por el tono dopaminérgico en el ambiente extracelular (por ejemplo, Cáceres-Chávez et al., 2018).

Para probar si los cambios en las propiedades electrofisiológicas estaban relacionados con los cambios en la excitabilidad de las neuronas provocados por la hiperpolarización debida a la aplicación de los antagonistas dopaminérgicos, se cuantificó la frecuencia de disparo de las neuronas en respuesta a un pulso de corriente intracelular (150 pA) en el mismo  $V_m$  en condiciones control y experimental. La **Figura 8A** muestra la respuesta de tres neuronas representativas. Como se puede observar, el decremento de la frecuencia de disparo y los efectos sobre su adaptación permanecieron aún después de corregir la hiperpolarización del  $V_m$  producida por el bloqueo dopaminérgico. La **Figura 8B** muestra cómo en las neuronas control hay dos componentes en la adaptación de la frecuencia de disparo: uno rápido y uno lento; mientras que después del bloqueo dopaminérgico, únicamente aparece el más lento. De hecho, algunas neuronas dejan de disparar PAs aún en la presencia del estímulo (bloqueo por despolarización). El decremento de la frecuencia de disparo como respuesta al mismo estímulo es estadísticamente significativo (mediana y rangos intercuartiles): Control = 9.50 (5.25 - 11.75) Hz; SCH 23390 + sulpiride = 1.50 (0.25 - 5.25) Hz (**Fig. 8C**; n = 8 neuronas de animales diferentes,  $**p \leq 0.01$ ; prueba de Wilcoxon).

Estos resultados sugieren que las modificaciones provocadas por el bloqueo dopaminérgico agudo son promovidas por corrientes iónicas que están activas y que afectan el modo de disparo, y no sólo por la hiperpolarización del  $V_m$  producida por el bloqueo. Por lo tanto, es necesaria más investigación de la o las corrientes iónicas que determinan el modo de disparo de las neuronas ChAT+ del GPe.



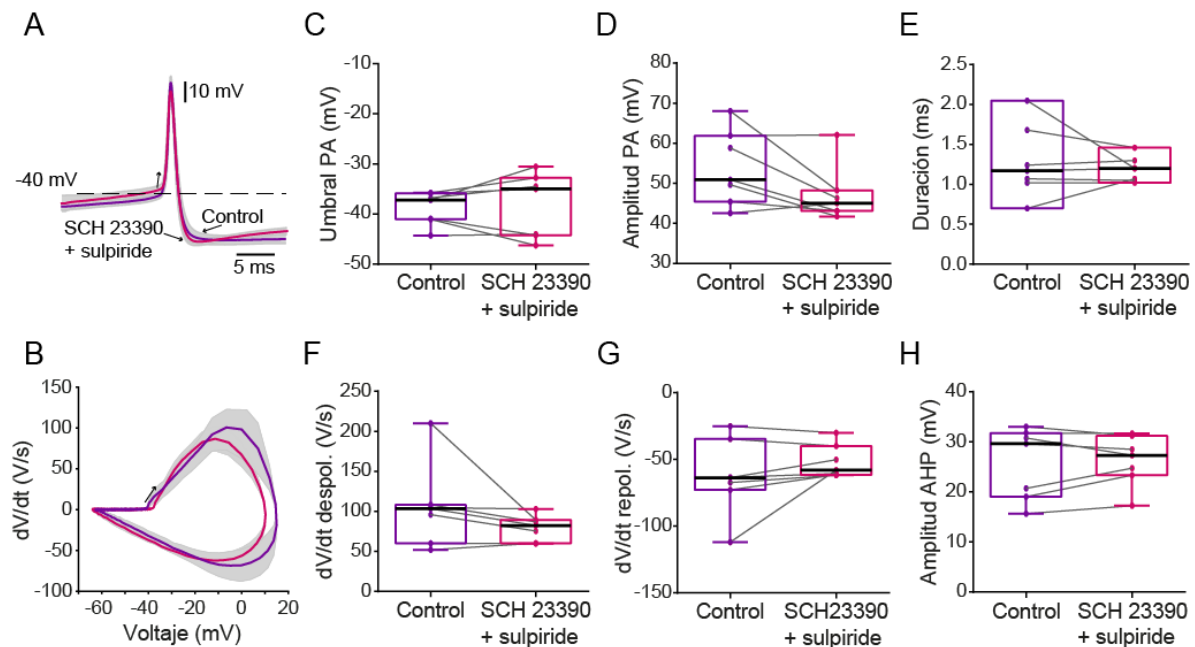
**Figura 8. Adaptación del disparo de las neuronas ChAT+ del GPe antes y después del bloqueo dopaminérgico.** A) Izquierda: Potenciales de acción provocados con un pulso de corriente intracelular (150 pA) a corriente cero en tres neuronas diferentes. Derecha: Potenciales de acción evocados en las mismas tres neuronas después del antagonismo dopaminérgico (1  $\mu$ M SCH 23390 más 1  $\mu$ M sulpiride) y de ajustar el  $V_m$  al observado en condiciones control. Los cambios en la adaptación de la frecuencia de disparo causados por los antagonistas permanecieron aun después de corregir la hiperpolarización producida por el bloqueo. B) Superior: Curvas de adaptación de la frecuencia de tres neuronas control representativas. Nótese que la adaptación de la frecuencia tiene dos componentes: uno rápido y uno lento. Después del bloqueo dopaminérgico, sólo permanece el componente lento y el disparo se bloquea ante la estimulación continua (bloqueo por despolarización). C) Comparación de la frecuencia de disparo provocada con estímulos de la misma intensidad antes y después del antagonismo dopaminérgico (n = 8 neuronas de 8 animales distintos; prueba de Wilcoxon; \*\*p  $\leq$  0.01).

### Las propiedades del potencial de acción permanecen sin cambios después del antagonismo dopaminérgico agudo

En este trabajo decidimos probar si las corrientes iónicas que generan los PA se modifican por efecto del antagonismo dopaminérgico agudo. Con este objetivo, utilizamos diagramas de fase ( $dV/dt$  (V)) para visualizar y extraer cuantitativamente las propiedades de los PA. En la **Figura 9** se puede observar que la aplicación

aguda de los antagonistas dopaminérgicos no causa cambios significativos en las propiedades de los PA (mediana y rangos intercuartiles): umbral Control = -37.2 (-41.1- -35.9) mV; SCH 23390 + sulpiride = -35.03 (-44.26 - -32.79) mV (**Figs. 9B, C**;  $p = 0.687$ ); amplitud (medida a partir del umbral): Control = 50.91 (45.43- 61.9) mV; SCH 23390 = 45.06 (43.11 - 48.21) mV (**Fig. 9D**;  $p = 0.109$ ); duración (medida a la amplitud media): Control = 1.17 (1.02 - 1.68) ms; SCH + sulpiride = 1.20 (1.05 - 1.30) ms (**Fig. 9E**;  $p = 0.999$ );  $dV/dt$  de despolarización máxima: Control = 103.4 (60.16 - 108.3) V/s; SCH 23390 + sulpiride = 82.47 (60.29 - 89.25) V/s (**Fig. 9F**;  $p = 0.078$ );  $dV/dt$  de repolarización máxima: Control = -63.67 (-72.82 - -34.65) V/s; SHC 23390 + sulpiride = -58.0 (-61.47 - -40.0) V/s (**Fig. 9G**;  $p = 0.156$ ); y el AHP (medido desde el umbral): Control = 29.66 (19.04 - 31.8) mV; SCH 23390 + sulpiride = 27.32 (23.36 - 31.22) mV (**Fig. 9H**;  $p = 0.812$ ; todas las comparaciones se hicieron con la Prueba de Wilcoxon,  $n = 7$  neuronas de diferentes animales).

Por lo tanto, con estos resultados podemos concluir que las corrientes que afectan directamente a la generación de los PA son distintas de aquellas que modulan el modo de disparo en las neuronas ChAT+ del GPe.



**Figura 9. Características del potencial de acción antes y después del antagonismo dopaminérgico.** A) Media  $\pm$  EEM de los potenciales de acción antes y después de la aplicación de los antagonistas dopaminérgicos (1  $\mu$ M SCH 23390 más 1  $\mu$ M sulpiride). B) Media  $\pm$  EEM de los diagramas de fase (dV/dt (V)); la flecha indica el comienzo del potencial de acción). C-H) Gráficas de caja comparando: umbral de disparo (C), amplitud del PA (D) y duración a la mitad de la amplitud del potencial de acción (E), dV/dt<sub>MAX</sub> de la despolarización (F) y la repolarización (G), así como la amplitud del post-potencial hiperpolarizante (H; n = 7 neuronas de 7 animales distintos; prueba de Wilcoxon).

### **El antagonismo dopaminérgico agudo es directamente responsable de los cambios en el modo de disparo de las neuronas ChAT+ del GPe**

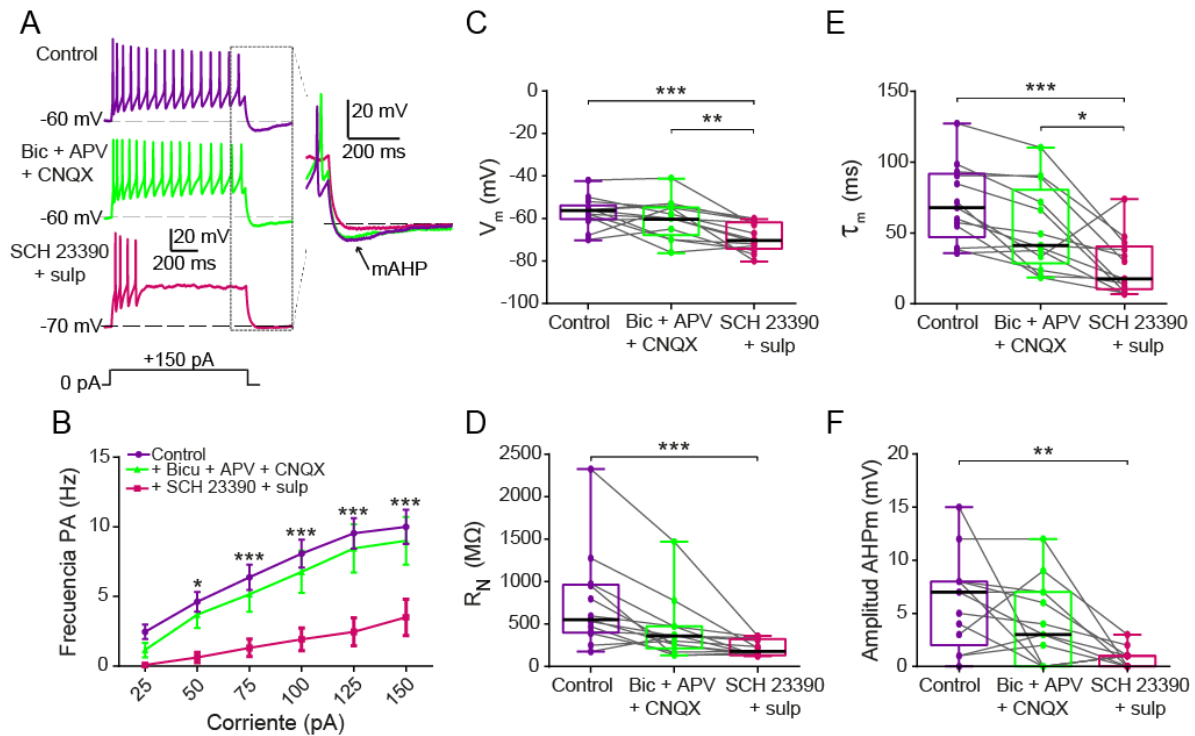
Para descartar que los cambios observados en el modo de disparo de las neuronas ChAT+ del GPe fueran por efectos indirectos de la innervación glutamatérgica y la GABAérgica que recibe este núcleo, se bloquearon estos receptores con 10  $\mu$ M de CNQX, 50  $\mu$ M de APV y 10  $\mu$ M de bicuculina. De acuerdo con nuestros resultados, el bloqueo glutamatérgico y GABAérgico no afectó significativamente la frecuencia de disparo de las neuronas colinérgicas del GPe (**Figs. 10A-B**; n = 13 del mismo número de animales; ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguida de la prueba post-hoc de Sidak). Sin embargo, al aplicar, los antagonistas dopaminérgicos (SCH 23390 + sulpiride) después del bloqueo sináptico, se pudo observar nuevamente la hiperpolarización del  $V_m$  (mediana y rangos intercuartiles): Control = -56 (-60 - -53.5) mV; + CNQX + APV + bicuculina = -60 (-67.5 - -54.5) mV; + SCH 23390 + sulpiride = -70 (-74 - -61.5) mV (**Fig. 10C**; \*\*p  $\leq$  0.01 entre los antagonistas glutamatérgicos + GABAérgicos y los dopaminérgicos; n = 13 de 13 animales distintos; Prueba de Friedman seguida de la prueba post-hoc de Dunn). Además, la misma tendencia siguieron la  $R_N$ : Control = 554 (401.5 - 963) M $\Omega$ ; + CNQX + APV + bicuculina = 359 (213.5 - 473) M $\Omega$ ; + SCH 23390 + sulpiride = 181 (135 - 323) M $\Omega$  (**Fig. 10D**; \*\*\*p  $\leq$  0.001; entre el control y los antagonistas dopaminérgicos); y la  $\tau_m$ : Control = 67.88 (47.04 - 91.85) ms; + CNQX + APV + bicuculina = 41.34 (28.5 - 80.55) ms; + SCH 23390 + sulpiride = 17.57 (10.39 - 40.62) ms (**Fig. 10E**; \*\*\*p  $\leq$  0.001 entre el control y los antagonistas

dopaminérgicos). A pesar de la tendencia de la  $R_N$  y de la  $\tau_m$  de disminuir con el bloqueo glutamatérgico y GABAérgico, las diferencias con el control no fueron estadísticamente significativas.

Por otra parte, se midió la amplitud del AHP medio (AHPm), presente inmediatamente después del tren de disparos evocado por la estimulación con un pulso de corriente. Nuestros resultados indican que la amplitud también disminuye significativamente por efecto del antagonismo dopaminérgico, a pesar de la tendencia de los antagonistas glutamatérgicos y GABAérgico a disminuirlo : Control = 7.0 (2.0 - 8.0) mV; + CNQX + APV + bicuculina = 3.0 (0.0- 7.0) mV; + SCH 23390 + sulpiride = 1.0 (0.0 - 1.0) mV (**Fig. 10F**; \*\* $p \leq 0.01$ ). Esta reducción en el AHPm podría estar explicada por la hiperpolarización del  $V_m$  que lo aproxima al potencial de equilibrio del  $K^+$ .

Con estos resultados podemos concluir que los cambios que observamos en el modo de disparo de las neuronas ChAT+ del GPe se deben a un efecto directo de la DA sobre estas neuronas y no por un efecto indirecto provocado por la DA en neuronas o terminales sinápticas aledañas (Cooper & Stanford, 2001; Hernández et al., 2006; Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Jijón-Lorenzo et al., 2018; Kovalski et al., 2020).





**Figura 10. El antagonismo glutamatergico y GABAérgico no impide que ocurra la inhibición del disparo causado por el bloqueo agudo de dopamina en las neuronas ChAT+ del GPe.** A) Trazos representativos de los potenciales de acción evocados por la inyección de corriente despolarizante (150 pA) antes y después de la aplicación de antagonistas glutamatergicos y GABAérgico (10  $\mu$ M CNQX + 50  $\mu$ M APV + 10  $\mu$ M bicuculina), y después de los antagonistas dopaminérgicos (+1  $\mu$ M SCH 23390 + 1  $\mu$ M sulpiride). Recuadro: trazos del AHPm en todas las condiciones, el potencial de membrana fue corregido a -60mV en el trazo con los antagonistas dopaminérgicos. B) Curvas I- F de todas las condiciones (n = 13 neuronas de 13 animales diferentes; media  $\pm$  EEM; ANOVA de dos vías para medidas repetidas, seguida de la prueba post- hoc de Sidak). C- F) Diagramas de caja comparando:  $V_m$ ,  $R_N$ ,  $t_m$  y amplitud del AHPm (Prueba de Friedman seguida de la prueba post- hoc de Dunn; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

## Los receptores de la clase D<sub>2</sub> son determinantes para los efectos que la DA tiene sobre las neuronas ChAT+ del GPe

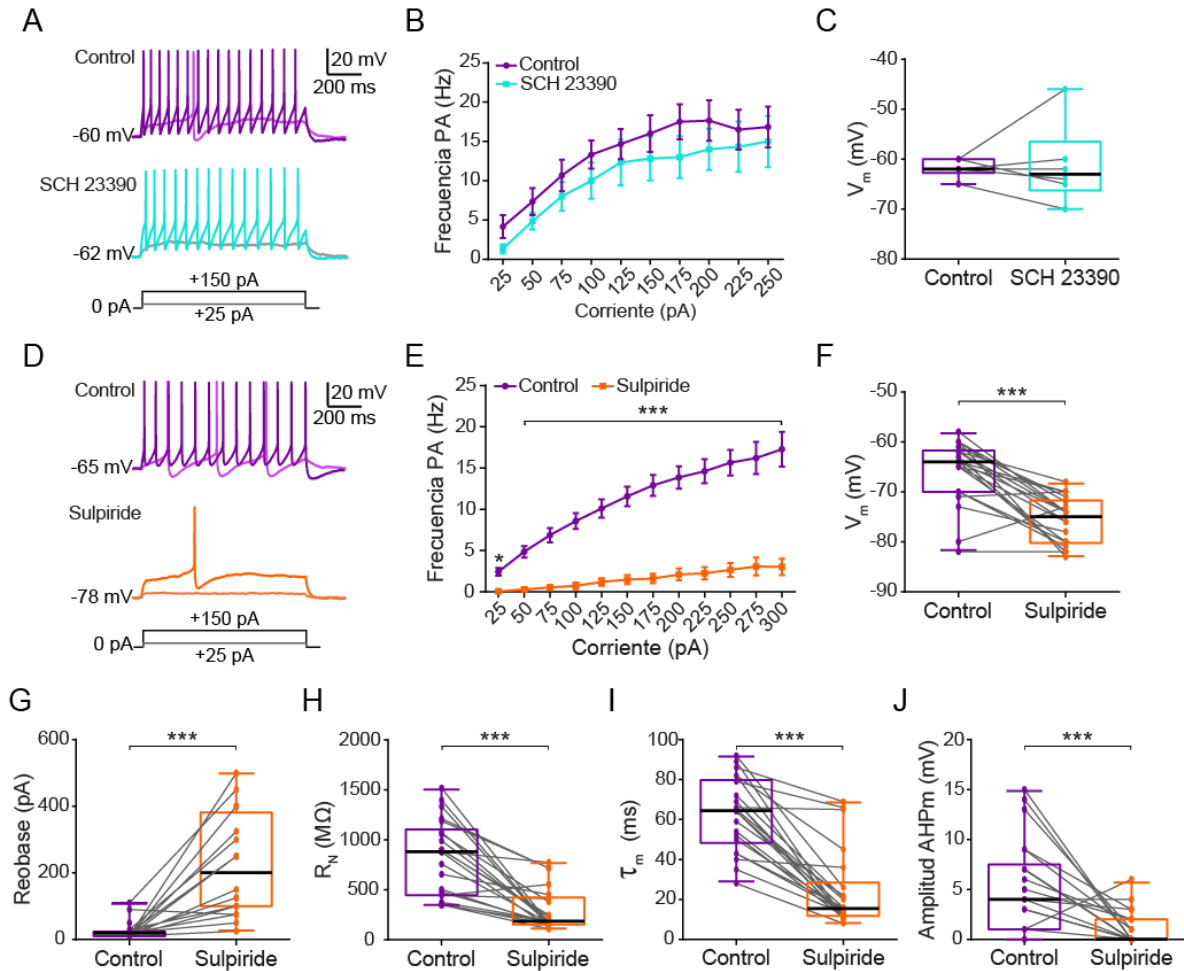
Ya que demostramos que el antagonismo dopaminérgico provoca hiperpolarización del  $V_m$ , cambios en el modo de disparo y en las propiedades electrofisiológicas pasivas de las neuronas ChAT+ del GPe, nos preguntamos qué receptor era el responsable de estos cambios. Con este fin, probamos primero si el antagonista

dopaminérgico de los receptores de la clase D<sub>1</sub> (1  $\mu$ M SCH 23390) era suficiente para replicar los cambios. En las **Figuras 11A, B y C**, se pueden observar los resultados representativos de esta manipulación. La frecuencia de disparo no disminuyó significativamente, y las neuronas siguieron respondiendo con trenes de PA durante toda la duración de la estimulación intracelular (n = 6 de diferentes animales; ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguida de la prueba post-hoc de Sidak). Además, otros parámetros relacionados con las propiedades electrofisiológicas pasivas tampoco fueron afectadas mayormente (no ilustradas): V<sub>m</sub> control: -62 (-62.75 - -60) mV vs. SCH 23390: -63 mV (-66.25 - -56.5) mV (**Fig. 11C**; p = 0.937), la R<sub>N</sub> fue de 700 (515.5 - 1237) M $\Omega$  vs. SCH 23390: 384 (329.3 - 569.3) M $\Omega$  (\*p  $\leq$  0.05),  $\tau_m$ : 52.5 (35.75 - 73.75) ms vs. SCH 23390: 48 (21.75 - 67.75) ms (p = 0.999), y la amplitud del AHP<sub>m</sub> fue de 5.0 (2.75 - 9.75) mV vs. SCH 23390: (1.0 - 7.5) mV (p = 0.281; n = 6 de animales diferentes; prueba de Wilcoxon para todas las comparaciones).

Por lo tanto, podemos concluir que los receptores dopaminérgicos de la clase D<sub>1</sub> no son los principales responsables de los cambios electrofisiológicos que observamos en las neuronas colinérgicas del GPe a causa del antagonismo dopaminérgico (a pesar de que la R<sub>N</sub> sí cambió significativamente).

En una muestra independiente de neuronas ChAT+, aplicamos el antagonista dopaminérgico de los receptores de la clase D<sub>2</sub> (1  $\mu$ M sulpiride) para evaluar sus efectos. Los resultados muestran que con este antagonista se indujo una gran inhibición del disparo y la curva I-F colapsó debido a la baja frecuencia de disparo inducida con los mismos estímulos que en el control (**Figs. 11D, E**; n = 21 neuronas de 19 animales distintos; \*\*\*p < 0.001; ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguida de la prueba post-hoc de Sidak). Estos efectos, también estuvieron acompañados por la hiperpolarización del V<sub>m</sub>: Control = -64 (-70 - -61.75) mV; sulpiride = -75 (-80.25 - -71.75) mV (**Fig. 11F**; \*\*\*p < 0.001;); el incremento en la intensidad de corriente necesaria para evocar un PA (reobase): Control = 20 (10 - 20) pA; sulpiride = 200 (100 - 381.3) pA (**Fig. 11G**; \*\*\*p  $\leq$  0.001); y la disminución de la R<sub>N</sub>, Control = 880.5 (446 - 1104) M $\Omega$ ; sulpiride = 186.5 (153 - 420.8) M $\Omega$  (**Fig. 11H**

\*\*\* $p \leq 0.001$ ); la  $\tau_m$  Control = 64.5 (48.25 - 79.75) ms; sulpiride = 15.50 (11.75 - 28.50) ms (**Fig. 11I**; \*\*\* $p \leq 0.001$ ); y la amplitud del AHPm Control = 4.0 (1.0 - 7.5) mV; sulpiride = 0.0 (0.0 - 2.0) mV (**Fig. 11J**; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; para todas las comparaciones:  $n = 22$  neuronas de 19 animales diferentes, prueba de Wilcoxon).



**Figura 11. El antagonismo del receptor tipo D<sub>2</sub> es el principal responsable de las acciones dopaminérgicas en las neuronas ChAT<sup>+</sup> del GPe.**

A) Trazos representativos de los potenciales de acción evocados por pulsos de corriente de 25 y 150 pA antes y después de la aplicación del antagonista del receptor tipo D<sub>1</sub> (1 μM SCH 23390). B) Curvas I- F correspondientes ( $n = 6$  neuronas de animales distintos; media  $\pm$  EEM; ANOVA de dos vías para medidas repetidas, seguida de la prueba post- hoc de Sidak). C) Diagramas de caja comparando  $V_m$  ( $n = 6$  neuronas de animales diferentes, prueba de Wilcoxon). D) Trazos representativos de los potenciales de acción evocados por pulsos de corriente de 25 y 150 pA antes y después de la aplicación del antagonista del receptor tipo D<sub>2</sub> (1 μM sulpiride). E) Curvas I- F correspondientes ( $n = 21$  neuronas de 19 animales distintos;

media  $\pm$  EEM; ANOVA de dos vías para medidas repetidas, seguida de la prueba post- hoc de Sidak). F- J) Diagramas de caja comparando  $V_m$ , reobase,  $R_N$ ,  $t_m$  y amplitud del AHPm (n = 22 neuronas de 19 animales diferentes; prueba de Wilcoxon; \*\*\* $p \leq 0.0001$ ).

Con estos resultados podemos concluir que la influencia dopaminérgica más importante para las neuronas ChAT+ del GPe es a través de la activación de los receptores de la clase  $D_2$ . ¿Qué tipo de receptor de esta clase ( $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$ ) es el que ejerce estos efectos? Es la pregunta que surge para investigaciones futuras; notemos que la respuesta podría ser crucial para la terapéutica. Mientras tanto, podemos decir que, al parecer, estos receptores están siendo activados de forma tónica por la DA presente en el espacio extracelular, ya que el bloqueo agudo con los antagonistas es suficiente para inducir los cambios más relevantes que fueron: hiperpolarización del  $V_m$ ; reducción de la  $R_N$  y la  $\tau_m$ , y el cambio en el modo de disparo.

## Discusión

El GPe es un núcleo con población neuronal diversa que, entre otras, recibe inervación directa de la Cx (Naito & Kita 1994; Yasukawa et al., 2004; Mastro et al., 2014; Milardi et al., 2015; Grewal et al., 2018; Abecassis et al., 2020; Jeon et al., 2022; Zheng & Monti, 2022), y que, a su vez, manda colaterales axónicas a ella (Abdi et al., 2015; Saunders et al., 2015b; Chen et al., 2016; Glajch et al., 2016; Mallet et al., 2016). Esto da lugar a la formación de un bucle cortico-palidal en el que las neuronas colinérgicas del GPe participan y que no ha sido suficientemente investigado (**Fig. 3C**).

Las neuronas colinérgicas representan el 5% de la población neuronal del GPe, y están particularmente ubicadas en la región caudo-ventral del núcleo (Nóbrega-Pereira et al., 2010; Hernández et al., 2015; Abecassis et al., 2020). A pesar de su pequeña proporción, las neuronas colinérgicas son de especial interés porque están invadidas por las SPNs (de las vías directa e indirecta), a la vez que inervan profusamente a la Cx motora (Hernández et al., 2015; Saunders et al., 2015b). Esta conexión representaría la vía más corta de los GB a la Cx y sería una alternativa a la vía mejor conocida de los GB-Tal-Cx (asas cortico-basales).

Por otra parte, algunos investigadores consideran a las neuronas colinérgicas del GPe como parte de las BFCNs (Gielow & Zaborszky, 2017; Carrasco et al., 2022; Dong et al., 2021), mientras que otros investigadores discrepan (Hernández et al., 2015; Ananth et al., 2023). Las neuronas ChAT+ del GPe cuentan con dos características que las hacen trascendentales para el circuito de los GB: reciben inervación del Str y la mayor parte de la inervación dopaminérgica que reciben es de la SNc (Bouali-Benazzouz et al., 2009; Eid & Parent, 2015) cuya degeneración es la causa directa de la EP.

En este trabajo de investigación hicimos una primera caracterización electrofisiológica a detalle de las neuronas colinérgicas del GPe con la finalidad de enriquecer nuestro conocimiento sobre ellas y dar lugar a investigaciones futuras que esclarezcan su participación en el circuito de los GB. Para ello, aprovechamos la expresión Cre- dependiente de la proteína fluorescente tdTomato a través de un

vector viral que se inyectó en el GPe de ratones ChAT-Cre. Una vez identificadas, se registró *in vitro* la actividad electrofisiológica de estas neuronas con la técnica de patch-clamp de célula completa en el modo de fijación de corriente. De acuerdo con nuestros resultados, las neuronas colinérgicas globo-palidales mostraron poca adaptación de su frecuencia de disparo, excepto por la frecuencia instantánea inicial. En este sentido, las curvas I-F mostraron una frecuencia máxima de 10Hz aproximadamente con la estimulación más alta. Estas propiedades, junto con la falta de activación de corrientes catiónicas dependientes de voltaje y de tiempo, y activadas por hiperpolarización ( $I_h$ , observadas como el “sag” hiperpolarizante) las asemejan a una población de las BFCNs clasificadas como “disparadoras tempranas” (Unal et al., 2012). Sin embargo, existen diferencias importantes: las BFCNs con disparo temprano muestran bloqueo por despolarización en condiciones control, mientras que las neuronas ChAT+ globo-palidales sólo responden a la estimulación de esta forma cuando la señalización dopaminérgica es interrumpida (ver más adelante). Respecto a su  $R_N$  y su  $\tau_m$ , ambas mostraron valores altos comparadas con otros tipos neuronales del GPe (Abraham & Lovinger, 2018). Además, los PA de las neuronas ChAT+ del GPe fueron más rápidos y con un AHP más grande que los observados en neuronas colinérgicas de otros núcleos como el Str (Sanchez et al., 2011; Padilla-Orozco et al., 2022).

Respecto a su actividad espontánea, casi el 80% de las neuronas colinérgicas registradas fueron silentes, mientras que el resto mostró actividad espontánea en forma de espiga única o de ráfaga. En conjunto, estos resultados indican que las neuronas colinérgicas del GPe cuentan con características electrofisiológicas que las distinguen de las neuronas GABAérgicas del mismo núcleo. Sin embargo, nuestros resultados inmunohistoquímicos corroboran hallazgos previos que sugieren que las neuronas ChAT+ podrían coliberar GABA (Saunders et al., 2015b), ya que también expresan la enzima GAD 65/67 (Saunders et al., 2015a; Granger et al., 2016).

Dada la inervación dopaminérgica hacia los GB y específicamente al GPe (Mamad et al., 2015; Smith & Villalba, 2008), nos propusimos estudiar cómo el antagonismo

dopaminérgico afectaba las características electrofisiológicas de las neuronas ChAT+. En los experimentos iniciales, no favorecimos a los receptores de ninguna clase (D<sub>1</sub> o D<sub>2</sub>) considerando que hay evidencia que indica que las BFCNs expresan a los receptores de la clase D<sub>1</sub> (Berlanga et al., 2005) y que la mayoría de las neuronas palidales son sensibles a los receptores de la clase D<sub>2</sub> (Mamad et al., 2015; Smith & Villalba, 2008). Por lo tanto, aplicamos antagonistas para ambas clases de receptores (D<sub>1</sub>, 1  $\mu$ M SCH 23390; D<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M sulpiride).

Nuestros resultados fueron imprevistos: el bloqueo dopaminérgico agudo provoca que el V<sub>m</sub> se hiperpolarice alrededor de 10mV, lo que sugiere que la activación continua de estos receptores sostiene al V<sub>m</sub> de las neuronas ChAT+ del GPe. Ya que el GPe recibe inervación dopaminérgica de la SNc, futuras investigaciones podrían estar encaminadas a responder si las concentraciones tónicas de DA en el GPe mantienen la activación constitutiva de estos receptores, y si la denervación dopaminérgica induce cambios similares (p. ej., Cáceres-Chávez et al., 2018).

Adicionalmente, la R<sub>N</sub> disminuyó, al igual que la  $\tau_m$ , mientras que la C<sub>N</sub> no mostró cambios significativos. Aunado a estos efectos, las neuronas colinérgicas del GPe disminuyeron su frecuencia de disparo considerablemente y exhibieron bloqueo por despolarización. En esencia, el bloqueo dopaminérgico provocó la pérdida de excitabilidad en las neuronas colinérgicas del GPe, y ni la hiperpolarización por sí misma, ni los cambios en sus propiedades electrofisiológicas pasivas son responsables de estos cambios. Aún más, también descartamos que estos cambios fueran provocados por efectos indirectos en las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas que recibe el GPe, o por las corrientes iónicas que generan los PA. Así que se necesita una investigación *ad hoc* destinada a averiguar qué corriente (s) iónica (s) es la causante de estos efectos (investigación que actualmente se está llevando al cabo).

Los resultados indican que la transmisión dopaminérgica es crucial para la comunicación cortico-palidal, lo que sería de gran significancia para la EP, el parkinsonismo inducido por drogas, las discinesias tardías y las inducidas por L-DOPA (Mallet et al., 2008; Chan et al., 2011; Quiroga-Varela et al., 2013; Cáceres-

Chávez et al., 2018; Solís & Moratalla, 2018; Surmeier et al., 2023). Esto resulta relevante si se toma en cuenta que la actividad cortical, específicamente la que genera las oscilaciones gama – 40-100 Hz, es generada por la inervación colinérgica de la Cx, y está correlacionada con el correcto funcionamiento cognitivo y sensoriomotor (Rodríguez et al., 2004; Mena-Segovia et al., 2008; Betterton et al., 2017). De acuerdo con Saunders et al (2015b), las neuronas colinérgicas del GPe inervan directa y profusamente a la Cx, por lo que esta entrada debe de contribuir a a la producción de las oscilaciones gama. La evidencia previa a este trabajo sugiere que el GPe puede ser importante para la expresión y propagación de las oscilaciones beta anormales, que reemplazan a las oscilaciones gamma, durante la EP (Mallet et al., 2008a; Mallet et al., 2008b; Nevado- Holgado, et al., 2018; Deffains & Bergman, 2019; de la Crompe et al., 2020; Brazhnik et al., 2021). Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se explora el efecto dopaminérgico sobre las neuronas ChAT+ del GPe; por lo que las repercusiones que tiene su deprivación dopaminérgica sobre la actividad cortical deben de ser el objetivo de un nuevo proyecto de investigación original y significativo.

Finalmente, nuestro hallazgo más relevante fue que gran parte de la sensibilidad a la DA, en las neuronas colinérgicas del GPe, es a través de los receptores de la clase D<sub>2</sub>, ya que el bloqueo de los receptores de la clase D<sub>1</sub> sólo fue responsable de algunos cambios en las propiedades electrofisiológicas pasivas de estas neuronas. Es decir, la señalización continua generada por los receptores de la clase D<sub>2</sub> mantienen el V<sub>m</sub>, el modo de disparo, la excitabilidad y gran parte de las características electrofisiológicas de las neuronas ChAT+ del GPe.

Anteriormente, se reportó que las neuronas colinérgicas del GPe recibían menor inhibición GABAérgica de las iSPNs cuando se aplicaba un agonista del receptor D<sub>2</sub>, y que este efecto era revertido con el antagonista sulpiride (Saunders et al., 2015b). Lo que sugirió que en condiciones de bloqueo del receptor de la clase D<sub>2</sub>, las neuronas colinérgicas recibirían más inhibición de la vía indirecta y estarían menos activas. Nosotros demostramos que, de hecho, las neuronas colinérgicas fueron menos excitables durante el bloqueo con sulpiride, sin necesidad de que



intervenga la inhibición GABAérgica. Se requiere de una investigación diseñada para identificar el tipo de receptor de la clase D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>) que es responsable de los cambios reportados en este trabajo.

## Referencias

- Abdi, A., Mallet, N., Mohamed, F., Y., Sharott, A., Dodson, P. D., Nakamura, K. C., Suri, S., Avery, et al. (2015) Prototypic and arkypallidal neurons in the dopamine-intact external globus pallidus. *J Neurosci.* 35: 6667-6688. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4662-14.2015
- Abecassis, Z. A., Berceau, B. L., Win, P. H., García, D., Xenias, H. S., Cui, Q., Pamucku, A., Cherian, S., et al. (2020) Npas1+ -Nkx2.1+ neurons are an integral part of the cortico-pallido-cortical loop. *J Neurosci*, 40: 743-768. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1199-19.2019
- Abrahamo, K. P. and Lovinger, D. M. (2018) Classification of GABAergic neuron subtypes from the globus pallidus using wild-type and transgenic mice. *J Physiol.* 596.17: 4219- 4235. doi: 10.1113/JP276079
- Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12: 366–375. doi: 10.1016/0166-2236(89)90074-x
- Ananth, M. R., Rajebhosale, P., Kim, R., Talmage, D. A., and Role, L. W. (2023) Basal forebrain cholinergic signalling: development, connectivity and roles in cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 24: 233- 251. doi: 10.1038/s41583-023-00677x
- Arbuthnott, G. W., and Garcia-Munoz, M. (2016) Are the Symptoms of Parkinsonism Cortical in Origin? *Comput Struct Biotechnol J.* 15: 21-25. doi: 10.1016/j.csbj.2016.10.006.
- Aristieta, A., Barresi, M., Lindi, S. A., Barrière, G., Courtand, G., de la Crompe, B., Guilhemsang, L., Gauthier, S., et al. (2021). A disynaptic circuit in the globus pallidus controls locomotion inhibition. *Curr Biol.* 31: 707- 721. doi: 10.1016/j.cub.2020.11.019
- Baker, M., Kang, S., Hong, S., Song, M., Yang, M. A., Peyton, L., Essa, H., Lee, A. W., and Choi, D. (2023) External globus pallidus input to the dorsal striatum

- regulates habitual seeking behavior in male mice. *Nat Commun.* 14: 4085. doi: 10.1038/s41467-023-39545-8
- Balestrino, R. and Schapira, A. H. V. (2020) Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 27: 27-42. doi: 10.1111/ene.14108
- Bar-Gad, I., Morris, G., and Bergman. (2003) Information processing, dimensionality reduction and reinforcement learning in the basal ganglia. *Prog Neurobiol.* 71: 439- 473. doi: 10.1016/j.pneurobio.2003.12.001
- Baufreton, J., Kirkham, E., Atherton, J. F., Menard, A., Magill, P. J., Bolam, J. P., and Bevan, M. D. (2009) Sparse but selective and potent synaptic transmission from the globus pallidus to the subthalamic nucleus. *J Neurophysiol.* 102: 532-545. doi: 10.1152/jn.00305.2009
- Bean, B. P. (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 454- 465. doi: 10.1038/nrn2148
- Bergman, H., Wichmann, T., and DeLong, M.R. (1990). Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*, 249: 1436–1438
- Berlanga, M. L., Simpson, T. K., and Alcantara, A. A. (2005) Dopamine D5 receptor localization on cholinergic neurons of the rat forebrain and diencephalon: a potential neuroanatomical substrate involved in mediating dopaminergic influences on acetylcholine release. *J. Comp. Neurol.* 492: 34- 49. doi: 10.1002/cne.20684
- Bevan, M. D., Booth, P. A., Eaton, S. A., Bolam, J. P. (1998) Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *J Neurosci.* 18: 9438 –9452. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-22-09438.1998
- Betterton, R. T., Broad, L. M., Tsaneva-Atanasova, K., and Mellor, J. R. (2017) Acetylcholine modulates gamma frequency oscillations in the hippocampus

- by activation of muscarinic M1 receptors. *Eur J Neurosci.* 45: 1570- 1585. doi: 10.1111/ejn.13582
- Bogacz, R., Moraud, E. M., Abdi, A., Magill, P. J., and Baufreton, J. (2016) Properties of neurons in external globus pallidus can support optimal action selection. *PLoS Comput Biol.* 12: e1005004. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005004
- Bouali-Benazzouz, R., Tai, C., Chetrit, J., and Benazzouz, A. (2009). Intrapallidal injection of 6-hydroxydopamine induced changes in dopamine innervation and neuronal activity of globus pallidus. *Neuroscience* 164: 588- 596. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.034
- Brazhnik, E., Novikov, N., McCoy, A. J., Ilieva, N. M., Ghraib, M. W., and Wlaters, J. R. (2021) Early decreases in cortical mid-gamma peaks coincide with the onset of motor deficits and precede exaggerated beta build-up in rat models for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 155: 105393. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105393
- Bugaysen, J., Bronfeld, M., Tischler, H., Bar-Gad, I., and Korngreen, A. (2010) Electrophysiological characteristics of globus pallidus neurons. *PLoS ONE*, 5: e12001; doi: 10.1371/journal.pone.0012001
- Cáceres-Chávez, V. A., Hernández-Martínez, R., Pérez-Ortega, J., Herrera-Valdez, M. A., Aceves, J. J., Galarraga, E. and Bargas, J. (2018) Acute dopamine receptor blockade in substantia nigra pars reticulata: a possible model for drug-induced Parkinsonism. *J. Neurophysiol.* 120: 2922- 2938. doi: 10.1152/jn.00579.2018
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., and Di Filippo, M. (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci.* 17: 1022- 1030. doi: 10.1038/nn.3743
- Carrasco, A., Oorschot, D. E., Barzaghi, P., and Wickens, J. R. (2022) Three-dimensional spatial analyses of cholinergic neuronal distributions across the mouse septum, nucleus basalis, globus pallidus, nucleus accumbens, and

caudate-putamen. *Neuroinformatics* 20: 1121- 1136. doi: 10.1007/s12021-022-09588-1

Chan, C. S., Glajch, K. E., Gertler, T. S., Guzman, J. N., Mercer, J. N., Lewis, A. S., Goldberg, A. B., Tkatch, T., et al. (2011) HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 14: 85- 92. doi: 10.1038/nn.2692

Chen, M. C., Ferrari, L., Sacchet, M. D., Foland-Ross, L. C., Qiu, M. H., Gotlib, I. H., Fuller, P. M., Arrigoni, E., and Lu, J. (2016) Identification of a direct GABAergic pallidocortical pathway in rodents. *Eur J Neurosci.* 41: 748-759. doi: 10.1111/ejn.12822

Chen, M., Zhu, Y., Zhang, R., Yu, R., Hu, Y., Wan, H., Yao, D., and Guo, D. (2023) A model description of beta oscillations in the external globus pallidus. *Cogn Neurodynamics.* 17: 477- 487. doi: 10.1007/s11571-022-09827-w

Cooper, A. J. and Stanford, I. M. (2001) Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA IPSCs in vitro. *Neuropharmacology.* 41: 62- 71. doi: 10.1016/s0028-3908(01)00038-7

Cui, Q., Du, X., Chang, I. Y. M., Pamucku, A., Lilascharoen, V., Berceau, B. L., García, D., Hong, D., et al. (2021). Striatal direct pathway targets Npas1+ pallidal neurons. *J Neurosci.* 41: 3966- 3987. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2306-20.2021

de la Crompe, B., Aristieta, A., Leblois, A., Elsherbiny, S., Boraud, T., and Mallet, N. P. (2020) The globus pallidus orchestrates abnormal network dynamics in a model of Parkinsonism. *Nat Commun,* 11: 1570. doi: 10.1038/s41467-020-15352-3

Deffains, M. and Bergman, H. (2019) Parkinsonian- related  $\beta$  oscillations in the primate basal ganglia networks- Recent advances and clinical implications. *Parkinsonism Relat Disord.* 59: 2- 8. doi: 10.1016/j.parkreldis.2018.12.015

- Deister, C. A., Dodla, R., Barraza, D., Kita, H., and Wilson, C.J. (2013) Firing rate and pattern heterogeneity in the globus pallidus arise from a single neuronal population. *J Neurophysiol.* 109: 497-506. doi: 10.1152/jn.00677.2012
- Dodson, P. D., Larvin, J. T., Duffell, J. M., Garas, F. N., Doig, N. M., Kessar, N., Duguid, I. A., Bogacz, et al. (2015) Distinct developmental origins manifest in the specialized encoding of movement by adult neurons of the external globus pallidus. *Neuron*, 86: 501-513. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.007
- Dong, J. Cui., Y., Li, S., and Le, W. (2016) Current pharmaceutical treatments and alternative therapies of Parkinson's disease. *Curr Neuropharmacol.* 14: 339-355. doi: 10.2174/1570159x14666151120123025
- Dong, J., Hawes, S., Wu, J., Le, W., and Cai, H. (2021) Connectivity and functionality of the globus pallidus externa under normal conditions and Parkinson's disease. *Front Neural Circuits.* 15: 645287. doi: 10.3389/fncir.2021.645287
- Dunovan, K., Lynch, B., Molesworth, T., and Verstynen, T. (2015) Competing basal ganglia pathways determine the difference between stopping and deciding not to go. *eLife*, 4: e08723. doi: 10.7554/eLife.08723
- Eid, L., and Parent, M. (2015). Morphological evidence for dopamine interactions with pallidal neurons in primates. *Front. Neuroanat.* 9: 111. doi: 10.3389/fnana.2015.00111
- Flandin, P., Kimura, S., and Rubenstein, J. L. R. (2010) The progenitor zone of the ventral medial ganglionic eminence requires Nkx2-1 to generate most of the globus pallidus but few neocortical interneurons. *J Neurosci.* 30: 2812- 2823. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4228-09.2010
- Galarraga, E., Hernández-López, S., Reyes, A., Miranda, I., Bermudez-Rattoni, F., Vilchis, C., and Bargas, J. (1999) Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci.* 19: 3629- 3638. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-09-03629.1999

- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., and Sibley, D. R. (1990) D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*. 250: 1429-1432. doi: 10.1126/science.2147780
- Gerfen, C.R. and Surmeier, D.J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Revi Neurosci*. 34: 441- 466. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113641
- Gielow, M.R. and Zaborszky L. (2017) The input-output relationship of the cholinergic basal forebrain. *Cell Rep*. 18: 1817- 1830. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.060
- Glajch, K. E., Kever, D. A., Hegeman, D., J., Cui, Q., Xenias, H. S., Augustine, E. C., Hernández, V. M., Verma, et al. (2016) Npas1+ pallidal neurons target striatal projection neurons. *J. Neurosci*. 36: 5472- 5488. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1720-15.2016
- Goenner, L., Maith, O., Koulouri, I., Baladron, J., and Hamker, F. H. (2021) A spiking model of basal ganglia dynamics in stopping behavior supported by arky pallidal neurons. *Eur J Neurosci*. 53: 2296- 2321. doi: 10.1111/ejn.15082
- Granger, A. J., Mulder, N., Saunders, A., and Sabatini, B. L. (2016) Cotransmission of acetylcholine and GABA. *Neuropharmacology*, 100: 40- 46. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.07.031
- Graybiel, A. M. (1998) The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem*. 70: 119- 136. doi: 10.1006/nlme.1998.3843
- Graybiel, A. M. (2000) The basal ganglia. *Curr Biol*. 10: R509- R511. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00593-5
- Grewal, S. S., Holanda, V. M., and Middlebrooks, E. H. (2018) Corticopallidal connectome of the globus pallidus externus in humans: an exploratory study of structural connectivity using probabilistic diffusion tractography. *AJNR Am. J. Neuroradiol*. 39: 2120- 2125. doi: 10.3174/ajnr.A5816

- Gu, B., Schmidt, R., and Berke, J. (2020). Globus pallidus dynamics reveal covert strategies for behavioral inhibition. *eLife*, 9: e57215. doi: 10.7554/elife.57215
- Hammond, C., Bergman, H., and Brown, P. (2007) Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *TRENDS Neurosci.* 30: 357- 364. doi: 10.1016/j.tins.2007.05.004
- Heimer, G., Bar-Gad, I., Goldberg, J.A., and Bergman, H. (2002) Dopamine replacement therapy reverses abnormal synchronization of pallidal neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of parkinsonism. *J Neurosci.* 22: 7850-5. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-18-07850.2002
- Hernández, A., Ibanez-Sandoval, O., Sierra, A., Valdiosera, R., Tapia, D., Anaya, V., Galarraga, E., Bargas, J., et al. (2006) Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors. *J. Neurophysiol.* 96: 2877- 2888. doi: 10.1152/jn.00664.2006
- Hernández, V. M., D. A., Hegeman, D., J., Cui, Q., Kever, D. A., Fiske, M. P., Glajch, K. E., Pitt, J. E., Huang, et al. (2015) Parvalbumin+ neurons and Npas1+ neurons are distinct neuron classes in the mouse external globus pallidus. *J Neurosci.* 35: 11830- 11847. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4672-14.2015
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., and Galarraga, E. (1997) D<sub>1</sub> receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-Type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J Neurosci.* 17: 3334- 3342. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-09-03334.1997
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., Surmeier, D. J. (2000) D<sub>2</sub> dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC[β]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci.* 20: 8987- 8995. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-24-08987.2000
- Howe, W. M., Gritton, H. J., Lusk, N. A., Roberts, E. A. Hetrick, V. L., Berke, J. D., and Sarter, M. (2017) Acetylcholine release in prefrontal cortex promotes



- gamma oscillations and theta-gamma coupling during cue detection. *J Neurosci.* 37: 3215- 3230. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2737-16.2017
- Jeon, H., Lee, H., Kwon, D. H., Kim, J., Tanaka-Yamamoto, K., Yook, J. S., Feng, L., Park, H. R., et al. (2022) Topographic connectivity and cellular profiling reveal detailed input pathways and functionally distinct cell types in the subthalamic nucleus. *Cell Rep.* 38: 110439. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110439
- Jijón-Lorenzo, R., Caballero-Florán, I. H., Recillas-Morales, S., Cortés, H., Avalos-Fuentes, J. A., Paz-Bermúdez, F. J., Erij, D., and Florán, B. (2018) Presynaptic dopamine D2 receptors modulate [3H]GABA release at striatopallidal terminals via activation of PLC → IP3 → calcineurin and inhibition of AC → cAMP → PKA signaling cascades. *Neuroscience*, 372: 74-86. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.12.041
- Johansson, Y. and Ketzef, M. (2023) Sensory processing in external globus pallidus neurons. *Cell Rep.* 42: 111952. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111952
- Karube, F., Takahashi, S., Kobayashi, K., and Fujiyama, F. (2019) Motor cortex can directly drive the globus pallidus neurons in a projection neuron type-dependent manner in the rat. *eLife*, 8: e49511. doi: 10.7554/eLife.49511
- Ketzef, M. and Silberberg, G. (2021) Differential synaptic input to external globus pallidus neuronal subpopulations in vivo. *Neuron*, 109: 516-529. doi: 10.1016/j.neuron.2020.11.006
- Kita, H. (2004) Parvalbumin-immunopositive neurons in rat globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Brain Res.* 657: 31- 41. doi: 10.1016/0006-8993(94)90950-4
- Kita, H., Tachibana, Y., Nambu, A., and Chiken, S. (2005) Balance of monosynaptic excitatory and disynaptic inhibitory responses of the globus pallidus induced after stimulation of the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurosci.* 25: 8611- 8619. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1719-05.2005

- Kita, H. (2007) Globus pallidus external segment. *Prog Brain Res.* 160: 111–133. doi: 10.1016/S0079-6123(06)60007-1
- Klug, J. R., Engelhardt, M. D., Cadman, C. N., Li, H., Smith, J. B., Ayala, S., Williams, E. W., Hoffman, H., and Jin, X. (2018) Differential inputs to striatal cholinergic and parvalbumin interneurons imply functional distinctions. *eLife.* 7: e35657. doi: 10.7554/eLife.35657
- Kovaleski, R. F., Callahan, J. W., Chazalon, M., Wokosin, D. L., Baufreton, J., and Bevan, M. D. (2020) Dysregulation of the external globus pallidus-subthalamic nucleus network dynamics in parkinsonian mice during cortical slow-wave activity and activation. *J. Physiol.* 598: 1897- 1927. doi: 10.1113/JP279232
- Lilascharoen, V., Wang, E. H. J., Do, N., Pate, S. C., Tran, A. N., Yoon, C. D., Choi, J. H., Wang, X. Y., et al. (2021) Divergent pallidal pathways underlying distinct Parkinsonian behavioral deficits. *Nat Neurosci.* 24: 504- 515. doi: 10.1038/s41593-021-00810-y
- Liu, J., Shelkar, G. P., Sarode, L. P., Gawande, D. Y., Zhao, F., Clausen, R. P., Ugale, R. R., and Dravid S. M. (2021) Facilitation of GluN2C- containing NMDA receptors in the external globus pallidus increases firing of fast spiking neurons and improves motor function in a hemiparkinsonian mouse model. *Neurobiol Dis.* 150: 105254. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105254
- Magill, P. J., Bolam, J. P, and Bevan, M. D. (2001) Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience.* 106: 313- 330. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00281-0
- Magno, L., Kretz, O., Bert, B., Ersözlu, S., Vogt, J., Fink, H., Kimura, S., Vogt, A., et al. (2011) The integrity of cholinergic basal forebrain neurons depends on expression of Nkx2-1. *Eur J Neurosci.* 34: 1767- 1782. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07890.x
- Mallet, N., Pogosyan, A., Márton, L. F., Bolam, J. P., Brown, P., and Magill, P. J. (2008a) Parkinsonian beta oscillations in the external globus pallidus and their

- relationship with subthalamic nucleus activity. *J Neurosci.* 28: 14245- 14258. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4199-08.2008
- Mallet, N., Pogosyan, A., Sharott, A., Cscicsvari, J., Bolam, J. P., Brown, P., and Magill, P. J. (2008b) Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *J Neurosci.* 28: 4795- 4806. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0123-08.2008
- Mallet, N., Micklem, B. R., Henny, P., Brown, M. T., Williams, C., Bolam, J. P., Nakamura, K. C., and Magill, P. J. (2012) Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron*, 74: 1075- 1086. doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.027
- Mallet, N., Schmidt, R., Leventhal, D., Chen, F., Amer, N., Boraud, T., & Berke, J. (2016). Arkypallidal Cells Send a Stop Signal to Striatum. *Neuron*, 89: 308-316. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.017
- Mallet, N., Delgado, L., Chazalon, M., Miguelez, C., and Baufreton, J. (2019) Cellular and synaptic dysfunctions in Parkinson's disease: stepping out of the striatum. *Cells*, 8: 1005. doi: 10.3390/cells8091005
- Mamad, O., Delaville, C., Benjelloun, W., and Benazzouz, A. (2015) Dopaminergic control of the globus pallidus through activation of D2 receptors and its impact on the electrical activity of subthalamic nucleus and substantia nigra reticulata neurons. *PLoS One.* 10: e0119152. doi:10.1371/ journal.pone.0119152
- Marin, O., Anderson, S. A., and Rubenstein, J. L. (2000) Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci.* 20: 6063- 6076. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-16-06063.2000
- Mastro, K. J., Bouchard, R. S., Holt, H. A. K., and Gittis, A. H. (2014) Transgenic mouse lines subdivide external segment of the globus pallidus (GPe) neurons and reveal distinct GPe output pathways. *J. Neurosci.* 34: 2087- 2099. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4646-13.2014

- Mastro, K. J., Zitelli, K. T., Willard, A. M., Leblanc, K. H., Kravitz, A. V., and Gittis, A. H. (2017). Cell-specific pallidal intervention induces long-lasting motor recovery in dopamine-depleted mice. *Nat. Neurosci.* 20: 815–823. doi: 10.1038/nn.4559
- Milardi, D., Gaeta, M., Marino, S., Arrigo, A., Vaccarino, G., Mormina, E., Rizzo, G., Milazzo, C., et al. (2015) Basal ganglia network by constrained spherical deconvolution: a possible cortico-pallidal pathway? *Mov. Disord.* 30: 342- 349. doi: 10.1002/mds.25995
- McGregor, M. M. and Nelson, A. B. (2019) Circuit mechanisms of Parkinson's disease. *Neuron*, 101: 1042- 1056. doi: 10.1016/j.neuron.2019.03.004
- McKenna, J. T., Yang, C., Franciosi, S., Winston, S., Abarr, K. K., Matthew, S. R., Yanagawa, Y., McCarley, R. W., et al. (2013) Distribution and intrinsic membrane properties of basal forebrain GABAergic and parvalbumin neurons in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 521: 1225- 1250. doi: 10.1002/cne.23290
- McKinney, M., Coyle, J. T., and Hedreen, J. C. (1983) Topographic analysis of the innervation of the rat neocortex and hippocampus by the basal forebrain cholinergic system. *J Comp Neurol.* 217: 103- 121. doi: 10.1002/cne.902170109
- Mena-Segovia, J., Sims, H. M., Magill, P. J., and Bolam, P. (2008) Cholinergic brainstem neurons modulate cortical gamma activity during slow oscillations. *J Physiol.* 586: 2947- 2960. doi: 10.1113/jphysiol.2008.153874
- Mercer, J. N., Chan, C. S., Tkatch, T., Held, J., and Surmeier, D. J. (2007) Nav1.6 sodium channels are critical to pacemaking and fast spiking in globus pallidus neurons. *J Neurosci.* 27: 13552- 13566. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3430-07.2007
- Migueluez, C., Morin, S., Martinez, A., Goillandeau, M., Bezard, E., Bioulac, B., and Baufreton, J. (2012) Altered pallido-pallidal synaptic transmission leads to aberrant firing of globus pallidus neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Physiol.* 590: 5861- 5875. doi: 10.1113/jphysiol.2012.241331

- Mink, J. W. (1996) The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol.* 50: 381- 425. doi: 10.1016/s0301-0082(96)00042-1
- Mizutani, K., Takahashi, S., Okamoto, S., Karube, F., and Fujiyama, F. (2017) Substance P effects exclusively on prototypic neurons in mouse globus pallidus. *Brain Struct Funct.* 222: 4089- 4110. doi: 10.1007/s00429-017-1453-8
- Naito, A., and Kita, H. (1994) The cortico-pallidal projection in the rat: an anterograde tracing study with biotinylated dextran amine. *Brain Res.* 653: 251- 257. doi:10.1016/0006-8993(94)90397-2
- Nevado- Holgado, A. J., Mallet, N., Magill, P. J., and Bogacz, R. (2014) Effective connectivity of the subthalamic nucleus- globus pallidus network during Parkinsonian oscillations. *J Physiol.* 592.7: 1429- 1455. doi: 10.1113/jphysiol.2013.259721
- Nini, A., Feingold, A., Sloviter, H., and Bergman H. (1995). Neurons in the globus pallidus do not show correlated activity in the normal monkey, but phase-locked oscillations appear in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol.* 74: 1800- 1805. doi: 10.1152/jn.1995.74.4.1800
- Nóbrega-Pereira, S., Gelman, D., Bartolini, G., Pla, R., Pierani, A., and Marín, O. (2010) Origin and molecular specification of globus pallidus neurons. *J. Neurosci.* 30: 2824- 2834 doi: 10.1523/JNEUROSCI.4023-09.2010
- Nunnally, L. F., Campbell, M., Lee, D. I., Dummer, P., Gu, G., Menon, V. and Au, E. (2022) St18 specifies globus pallidus projection neuron identity in MGE lineage. *Nat Commun.* 13: 7735. doi: 10.1038/s41467-022-35518-5
- Oh, Y. M., Karube, F., Takahashi, S., Kobayashi, K., Takada, M., Uchigashima, M., Watanabe, M., Nishizawa, K., et al. (2017) Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations. *Brain Struct Funct.* 222: 2359- 2378. doi: 10.1007/s00429-016-1346-2

- Okamoto, S., Sohn, J., Tanaka, T., Takahashi, M., Ishida, Y., Yamauchi, K., Koike, M., Fujiyama, F., and Hioki, H. (2020) Overlapping projections of neighboring direct and indirect pathway neostriatal neurons to globus pallidus external segment. *iScience*. 23: 101409. doi: 10.1016/j.isci.2020.101409
- Padilla-Orozco, M., Duhne, M., Fuentes-Serrano, A., Ortega, A., Galarraga, E., Bargas, J. and Lara-González, E. (2022) Synaptic determinants of cholinergic interneurons hyperactivity during parkinsonism. *Front Synaptic Neurosci*. 14: 945816. doi: 10.3389/fnsyn.2022.945816
- Pamucku, A., Cui, Q., Xenias, H. S., Berceau, B. L., Augustine, E. C., Fan, I., Chalasani, S., Hantman, et al. (2020) Parvalbumin and Npas1 pallidal neurons have distinct circuit topology and function. *J Neurosci*. 40: 7855-7876. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0361-20.2020
- Quiroga-Varela, A., Walters, J. R., Brazhnik, E., Marin, C., and Obeso, J. A. (2013) What basal ganglia changes underlie the parkinsonian state? The significance of neuronal oscillatory activity. *Neurobiol Dis*. 58: 242- 248. doi: 10.1016/j.nbd.2013.05.010
- Rall, W., Burke, R. E., Holmes, W. R., Jack, J. J., Redman, S. J., and Segev, I. (1992) Matching dendritic neuron models to experimental data. *Physiol. Rev*. 72: S159- S186. doi: 10.1152/physrev.1992.72.suppl\_4.S159
- Raz, A., Vaadia, E., and Bergman, H. (2000) Firing patterns and correlations of spontaneous discharge of pallidal neurons in the normal and the tremulous 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine vervet model of parkinsonism. *J Neurosci*. 20: 8559- 8571. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-22-08559.2000
- Rodriguez, R., Kallenbach, U., Singer, W., and Munk, M. H. J. (2004) Short- and long-term effects of cholinergic modulation on gamma oscillations and response synchronization in the visual cortex. *J Neurosci*. 24: 10369-10378. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1839-04.2004
- Sah, P. and McLachlan, E. M. (1995) Membrane properties and synaptic potentials in rat sympathetic preganglionic neurons studied in horizontal spinal cord

- slices in vitro. *J. Auton. Nerv. Syst.* 53: 1- 15. doi: 10.1016/0165-1838(94)00161-c
- Sanchez, G., Rodriguez, M. J., Pomata, P., and Murer, M. G. (2011) Reduction of an afterhyperpolarization current increases excitability in striatal cholinergic interneurons in rat parkinsonism. *J. Neurosci.* 31: 6553- 6554. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6345-10.2011
- Saunders, A., Granger, A., and Sabatini, B. (2015a) Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *eLife*, 4: e06412. doi: 10.7554/eLife.06412
- Saunders, A., Oldenburg., I. A., Berezovskii, V. K., Johnson, C. A., Kingery, N. D., Elliott, H. L., Xie, T., Gerfen, C. R., and Sabatini, B. L. (2015b) A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex. *Nature.* 521: 85-89. doi: 10.1038/nature14179
- Saunders, A., Huang, K. W., and Sabatini, B. L. (2016) Globus pallidus externus neurons expressing parvalbumin interconnect the subthalamic nucleus and striatal interneurons. *PLoS ONE*, 11: 1- 20. doi: 10.1371/journal.pone.0149798
- Schmidt, R. and Berke, J. D. (2017) A pause- then- cancel model of stopping : evidence from basal ganglia neurophysiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 372: 20160202. doi: 10.1098/rstb.2016.0202
- Schwab, B. C., Heida, T., Zhao, Y., Marani, E., van Gils, S. A., and van Wezel, R. J. A. (2013) Synchrony in Parkinson's disease: importance of intrinsic properties of the external globus pallidus. *Front Syst Neurosci.* 7: 60. doi: 10.3389/fnsys.2013.00060
- Smith, Y., Bevan, M. D., Shink, E., and Bolam, J. P. (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neurosci.* 86: 353- 387. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00004-9

- Smith, Y. and Villalba, R. (2008). Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and parkinsonian brains. *Mov. Disord.* 23: S534- S47. doi: 10.1002/mds.22027
- Solíς, O. and Moratalla, R. (2018) Dopamine receptors: homomeric and heteromeric complexes in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neural Transm (Vienna)*. 125: 1187-1194. doi: 10.1007/s00702-018-1852-x
- Surmeier, D. J., Zhai, S., Cui, Q. and Simmons, D. V. (2023) Rethinking the network determinants of motor disability in Parkinson's disease. *Front. Synaptic Neurosci.* 15: 1186484. doi: 10.3389/fnsyn.2023.1186484
- Sveinbjornsdottir, S. (2016) The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1: 318- 324. doi: 10.1111/jnc.13691
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., and Poewe, W. (2021) Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 20: 385-397. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00030-2
- Tanimura, A., Pancani, T., Lim, S. A., Tubert, C., Melendez, A. E., Shen, W., and Surmeier, D. J. (2018) Striatal cholinergic interneurons and Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 47: 1148- 1158. doi: 10.1111/ejn.13638
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S. Q., and Costa, R. M. (2016) Complementary contributions of striatal projection pathways to action initiation and execution. *Cell.* 166: 703- 715. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.032
- Ulloa, J. L. (2021) The control of movements via motor gamma oscillations. *Front Hum Neurosci.* 15: 787157. doi: 10.3389/fnhum.2021.787157
- Unal, C. T., Golowasch, J. P., and Zaborszky, L. (2012) Adult mouse basal forebrain harbors two distinct cholinergic populations defined by their electrophysiology. *Front. Behav. Neurosci.* 6: 21. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00021
- Wilson, C. J. (2005) The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron.* 45: 575- 585. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.053



- Vitek, J. L., Hashimoto, T., Peoples, J., DeLong, M. R. and Bakay, R. A. E. (2004) Acute stimulation in the external segment of the globus pallidus improves parkinsonian motor signs. *Mov Disord.* 19: 907- 915. doi: 10.1002/mds.20137
- Vitek, J. L., Zhang, J., Hashimoto, T., Russo, G. S., and Baker, K. B. (2012) External pallidal stimulation improves parkinsonian motor signs and modulates neuronal activity throughout the basal ganglia thalamic network. *Exp Neurol.* 233: 581- 586. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.09.031
- Wichmann, T., and DeLong, M.R. (1996). Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol.* 6: 751- 758. doi: 10.1016/s0959-4388(96)80024-9
- Wilson, C. J. (2013) Active decorrelation in the Basal Ganglia. *J Neurosci.* 250: 467-482. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.07.032
- Yasukawa, T., Kita, T., Xue, Y., and Kita, H. (2004) Rat intralaminar thalamic nuclei projections to the globus pallidus: a biotinylated dextran amine anterograde tracing study. *J Comp Neurol.* 471: 153-167. doi: 10.1002/cne.20029
- Zheng, Z. S: and Monti, M. M. (2022) Cortical and thalamic connections of the human globus pallidus: implications for disorders of consciousness. *Front Neuroanat.* 16: 960439. doi: 10.3389/fnana.2022.960439.

## Artículo

## Dopaminergic Dependency of Cholinergic Pallidal Neurons

Janintzitic López-Niño, Montserrat Padilla-Orozco, Aidán Ortega, Verónica Alejandra Cáceres-Chávez,<sup>1</sup> Dagoberto Tapia Antonio Laville, Elvira Galarraga and José Bargas\*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

**Abstract**—We employed the whole-cell patch-clamp method and ChAT-Cre mice to study the electrophysiological attributes of cholinergic neurons in the external globus pallidus. Most neurons were inactive, although approximately 20% displayed spontaneous firing, including burst firing. The resting membrane potential, the whole neuron input resistance, the membrane time constant and the total neuron membrane capacitance were also characterized. The current–voltage relationship showed time-independent inward rectification without a “sag”. Firing induced by current injections had a brief initial fast adaptation followed by tonic firing with minimal accommodation. Intensity–frequency plots exhibited maximal average firing rates of about 10 Hz. These traits are similar to those of some cholinergic neurons in the basal forebrain. Also, we examined their dopamine sensitivity by acutely blocking dopamine receptors. This action demonstrated that the membrane potential, excitability, and firing pattern of pallidal cholinergic neurons rely on the constitutive activity of dopamine receptors, primarily D<sub>2</sub>-class receptors. The blockade of these receptors induced a resting membrane potential hyperpolarization, a decrease in firing for the same stimulus, the disappearance of fast adaptation, and the emergence of a depolarization block. This shift in physiological characteristics was evident even when the hyperpolarization was corrected with D.C. current. Neither the currents that generate the action potentials nor those from synaptic inputs were responsible. Instead, our findings suggest, that subthreshold slow ion currents, that require further investigation, are the target of this novel dopaminergic signaling. © 2023 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** external globus pallidus, cholinergic neurons, dopamine, dopamine receptors, ChAT-cre mice.

### INTRODUCTION

The external globus pallidus (GPe) is a key component within the basal ganglia (BG; Jaeger and Kita, 2011; Dong et al., 2021). Although once thought to be a homogenous nucleus with a single function in the BG's indirect pathway (Albin et al., 1989), it is now understood to be a diverse nucleus containing at least two types of GABAergic neurons, prototypic and arky pallidal, as well as a group of cholinergic neurons (Mallet et al., 2012; Hernández et al., 2015; Saunders et al., 2015b). The GPe receives direct inputs from the cortex and thalamus, in addition to the known striatal and subthalamic inputs (Naito and Kita, 1994; Yasukawa et al., 2004; Mastro

et al., 2014; Abecassis et al., 2020; Dong et al., 2021), and sends projections to various BG nuclei, cortex, thalamus, and other structures (Mallet et al., 2012; Saunders et al., 2015b; Glajch et al., 2016; Abecassis et al., 2020; Dong et al., 2021), providing an alternative route for BG-cortical connections apart from the more recognized BG-thalamo-cortical pathway. While nuclei such as the subthalamic nucleus, internal globus pallidus, and substantia nigra pars reticulata mostly receive inputs from prototypic neurons (Mallet et al., 2012; Mastro et al., 2014; Oh et al., 2017), arky pallidal neurons massively target the striatum (Mallet et al., 2012; Glajch et al., 2016; Mallet et al., 2016; Dong et al., 2021). And pallidal GABAergic and cholinergic neurons which may also synthesize and release GABA, project to the cortex (Saunders et al., 2015a,b; Chen et al., 2016).

Some electrical properties of prototypic and arky pallidal neurons, as well as their response to dopamine (DA) or DA depletion, have been documented (Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Kovaleski et al., 2020). However, the electrophysiological characteristics of pallidal cholinergic neurons and their sensitivity to DA remain unexplored. In this study, we present an initial electrophysiological analysis of GPe cholinergic neurons

\*Corresponding author.

E-mail address: [jbargas@ifc.unam.mx](mailto:jbargas@ifc.unam.mx) (J. Bargas).

<sup>1</sup> Present address: Laboratoire de Neurophysiologie, ULB, Route de Lennik 808, CP 601, 1070 Bruxelles, Belgium.

**Abbreviations:** AP, action potential; AHP, after hyperpolarizing potential; BFCN, basal forebrain cholinergic neuron; BG, basal ganglia; ChAT, choline acetyltransferase; C<sub>N</sub>, whole neuron membrane capacitance; DA, dopamine; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid, GAD, glutamic acid decarboxylase; GPe, external globus pallidus; IQR, interquartile range; ISI, inter-spike interval; mAHP, medium after hyperpolarizing potential; R<sub>N</sub>, whole neuron input resistance;  $\tau_m$ , membrane time constant; V<sub>m</sub>, resting membrane potential.

(choline acetyltransferase positive or ChAT+ neurons) and examine their response to acute DA receptor blockade. Our findings reveal that D<sub>2</sub>-class receptors primarily regulate their firing activity.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

All procedures were carried out in accordance with the Institutional Committee for Laboratory Animals Care and Use of the Instituto de Fisiología Celular (IFC-UNAM) and the regulations for the production, care, and use of laboratory animals in Mexico (NOM-062-ZOO-199, Laboratory Procedures Protocol JBD-59-15) in agreement with the international norms for the ethical use of experimental animals established in the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals Eighth Edition (NIH, 2010). We used B6; 129S6-Chat<sup>tm2(cre) Low/J</sup> (ChAT-cre mice; JAX stock: 006410) male and female mice that were acquired from The Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/>; Bar Harbor, ME, USA) at 40–50 postnatal days. All animals were kept in 12-hour light/dark cycles with unlimited access to food and water. Every experiment was run in the light phase.

### Virus injection

ChAT-Cre animals were injected with the pAAV-FLEX-tdTomato virus vector, a gift from Edward Boyden (Addgene viral prep #28306-AAV1, RRID:Addgene 28306), in order to identify cholinergic neurons (Addgene, Watertown, MA, USA). Mice between 21 and 28 days old were positioned in a stereotaxic frame after being given anesthesia with isoflurane. After craniotomy, virus was injected using a nanoject (Drummond Scientific Company, USA) at a rate of 18 nL/s for a total of 0.22  $\mu$ L into the GPe (AP:  $-0.1$ , ML: 2.0, DV:  $-4.3$ ). Artificial tears were placed into the mice's eyes throughout the procedure. After injecting the virus, the pipette was left in place for 10 min before being retracted. 15 days following the viral infection, patch-clamp recordings were made.

### Slice preparation

Mice were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (85/15, mg/kg, i.p.; Anesket, Pisa, Mexico/Rompun, Bayer, Argentina) and perfused transcardially with an ice-cold “cutting” solution (in mM): 225 sucrose, 2.5 KCl, 7 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 28 NaHCO<sub>3</sub>, 7 glucose, 1 ascorbic acid, and 3 pyruvate (pH 7.4), saturated with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Parasagittal brain slices (250  $\mu$ m thick) were obtained with an angle of 10° to get fibers from the indirect pathway (Cáceres-Chávez, et al., 2018). Brain slices were cut using a vibratome (Pelco easiSlicer, Ted Pella, Redding, CA, USA), and kept in carbogen-bubbled artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12.5 glucose, 0.2 ascorbic acid, and 0.2 thiourea (pH 7.4, 310 mOsm/L).

### In vitro patch-clamp recordings

Single slices were fully submerged in a recording chamber and superfused with carbogen-bubbled aCSF (3.5 ml/min, 30–32 °C). Whole-cell patch-clamp recordings were done using micropipettes (3–5 M $\Omega$ ; Sutter Instruments, Novato, CA, USA) pulled from 1.5 mm outer diameter borosilicate glass tubes (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Micropipettes were filled with internal solution containing (in mM): 120 KMeSO<sub>4</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, 10 NaCl, 2.0 MgCl<sub>2</sub>, 1.0 CaCl<sub>2</sub>, 2.0 ATP-Mg, 0.5 GTP-Na and 1% biocytin (pH 7.2, 290 mOsm/L). Pallidal neurons were identified with infrared differential interference contrast (DIC) microscopy using a 40X immersion objective (Nikon Instruments, Melville, NY, USA) and a CCD camera (Cool Snap ES2, Photometrics, Tucson AZ, USA). A Lambda HPX High power LED driver (Sutter Instruments, Petaluma, CA, USA) coupled to a specific excitation-emission filter (excitation: band-pass 535/50 nm, emission: high-pass 590 nm) was used to select ChAT+ neurons. Recordings were made with an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and data were acquired with Im-Patch© software (<https://impatch.ifc.unam.mx>).

### Drugs used

SCH 23390 (7-cholo-8-hydroxy-3methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine), sulpiride ( $\pm$ -N-1-ethyl-pyrrolidin-2-ylmethyl-2-methoxy-5-sulfamoylbenzamide), bicuculline (1(S),9(R)-(-)-Bicuculline methiodide), APV (D-(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid), CNQX (6-cyano-o-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline disodium salt) (Sigma-Aldrich, USA), and XE-991 dihydrochloride (Tocris Biosciences, Minneapolis, MN, USA), were stored in stock solutions to be dissolved in their final concentrations to add to the superfusion aCSF.

### Cell labeling and confocal microscopy

Slices of the recorded neurons were incubated overnight at 4 °C in 3:500 FITC-streptavidin conjugate (Invitrogen, Waltham, MA, USA) in PBS containing 0.3% Triton X-100 to visualize the biocytin-loaded neurons. Slices were treated overnight at 4 °C with 1:500 anti-GAD 65/67 to detect glutamic acid decarboxylase (Sigma-Aldrich, USA). A secondary antibody was then used for 1.5 h (1:50, Alexa Fluor 647; Jackson ImmunoResearch, Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Vectashield was used to mount the slices (Vector Laboratories, Newark, CA, USA). Using a Zeiss LSM700 confocal laser scanning microscope, pictures were taken (Zeiss, Gottingen, Germany).

### Data analysis

Recordings were done in current-clamp mode at zero current to assess intrinsic electrophysiological properties such as whole neuron input resistance (R<sub>N</sub>), resting membrane potential (V<sub>m</sub>), membrane time constant ( $\tau_m$ ), whole neuron membrane capacitance (C<sub>N</sub>), sag ratio and action potential (AP) properties, under control and

DA antagonism. To measure  $R_N$  we used current–voltage relationships (I–V plots), a third order polynomial was fitted to each I–V plot because none of these plots was linear. We used the slope at zero (dV/dI) current to assess  $R_N$ .  $\tau_m$  was approximated by fitting a bi-exponential function to hyperpolarizing voltage traces from  $V_m$  where the slowest decaying one was taken (Rall et al., 1992). By dividing the peak negative voltage measured at 0–300 ms after the current step onset, over the plateau voltage measured at 900–1000 ms after the current step onset, the sag ratio was computed using a hyperpolarizing current step (-150 pA, 1 s duration). Phase-plot graphs of the membrane voltage against its rate of change (dV/dt(V)) were used to get information on action potential features (Bean, 2007). Besides passive properties, most samples had a limited number of neurons, and drugs were tested in the same control, therefore, the Results were mostly reported using distribution-free statistics and box-plots, accordingly, medians and interquartile ranges (25–75%) were used to inform about most data (or indicated otherwise). Unpaired samples were compared with Mann-Whitney ranks sum test (Mann-Whitney's U test), paired samples with Wilcoxon matched-pairs signed rank test (Wilcoxon's T test), and more than two samples under different conditions were compared with the Friedman test followed by Dunn's post hoc test. Intensity-frequency relationships (I–F plots) were compared with a two-way ANOVA for repeated measures followed by a Sidak's post hoc test. In these cases, before performing the ANOVA, a Shapiro–Wilk's test of normality was applied.

## RESULTS

### Firing properties of cholinergic neurons of the external globus pallidus

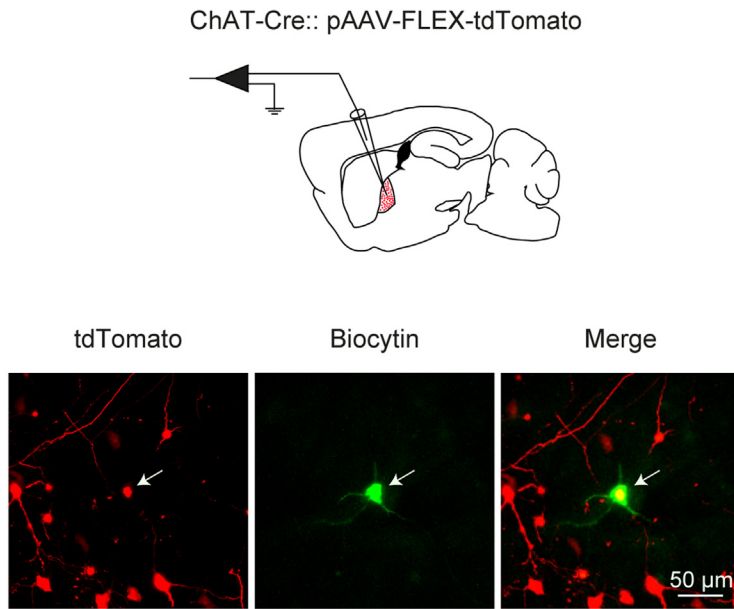
ChAT+ neurons were found using ChAT-Cre mice in the GPe, and their discharge characteristics were recorded (Fig. 1(A), B top). Neurons within the GPe were specifically targeted, rather than those in nearby structures. Current-voltage relationships (I–V plots) were created (Fig. 1(B) bottom), and the passive membrane properties of 110 neurons from 69 distinct animals were quantified. In our hands, ChAT+ neurons in the GPe did not exhibit an obvious “sag” during hyperpolarizing responses to current injections, in contrast to other previously described brain cholinergic neurons (Wilson, 2005; McKenna et al., 2013; Hernández et al., 2015) and in agreement with previous reports of autonomic, basal forebrain and GPe cholinergic neurons (Sah and McLachlan, 1995; Unal et al., 2012; Saunders et al., 2015b). However, a time independent inward rectification was present (Fig. 1(B) bottom). According to Table 1, their membrane resting potential ( $V_m$ ) was (mean  $\pm$  SEM):  $-64 \pm 0.8$  mV measured at zero current when autonomous firing was not present. Whole neuron input resistance ( $R_N$ ) was  $679 \pm 42$  M $\Omega$ , measured as dV/dI at zero current from the I–V plot fitted to a third order polynomial (Fig. 1(B) bottom); note a high value as compared with most GPe GABAergic neurons (Abrahao and Lovinger, 2018). Membrane time constant ( $\tau_m$ ) was

$59 \pm 3$  ms, as approximated from the slower exponential decay of a hyperpolarizing potential evoked from  $V_m$  (Rall et al., 1992). Whole neuron membrane capacitance ( $C_N = \tau_m / R_N$ ) was  $104 \pm 7$  pF. Depolarizing current pulses of different strength were applied to build Intensity-Frequency curves (I–F plots; Fig. 1(C)). Initial and final interspike intervals (ISIs) were used to depict initial and final instantaneous frequency and the number of action potentials (APs) after pulses of one second duration was used to illustrate the mean firing frequency. Note that instantaneous final frequency is similar to mean frequency (see below), revealing little frequency adaptation. The APs of several neurons were averaged to illustrate spike shape (Fig. 1(D) top) and the phase plot, dV/dt as a function of V, was used to measure AP main features (Fig. 1(D) bottom; Bean et al., 2007) in order to compare them after DAergic blockade. Approximately, pallidal ChAT+ neurons reached firing threshold at about  $-39$  mV (see Table 2 and below), they had an average AP amplitude around 53 mV, as measured from threshold (77 mV as measured from  $V_m$ ), AP duration at half amplitude (“Width”; Bean et al., 2007) was 1.5 ms, maximal dV/dt of depolarization and repolarization were around 80 and  $-40$  (V/s), respectively, and after hyperpolarizing potential (AHP) amplitude approximated 26 mV.

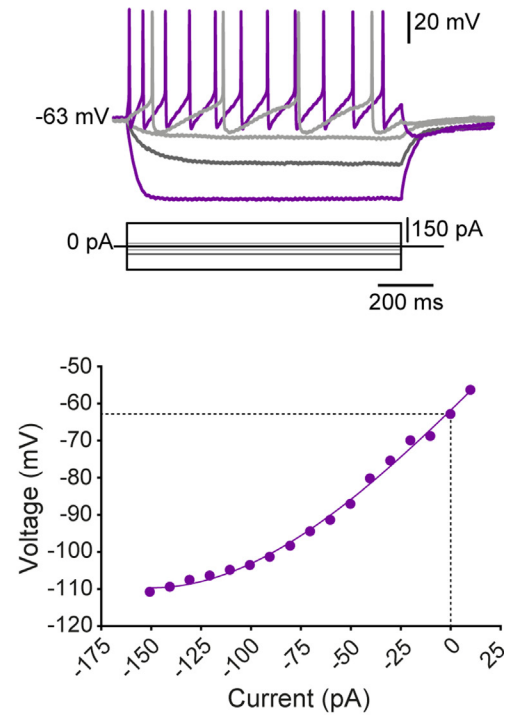
The bulk of pallidal ChAT+ neurons were silent both before and after whole cell recording began, but about 22% showed spontaneous firing (Fig. 2(A,B)). Single spikes from membrane potentials less negative than  $-60$  mV at zero current were the most common type of spontaneous discharge (Unal et al., 2012). In contrast, bursting was seen in 4% of all neurons (Fig. 2(C–F);  $n = 4$  of the 24 spontaneously active neurons; Alonso et al., 1996). Spontaneous firing rate in single spike mode was (median and interquartile range - IQR): 1.27 (0.70–2.29) Hz with a coefficient of variation (CV) of 0.69 (0.55–1.02). Bursting could be regular or irregular, Fig. 2 (F–H) illustrates a highly regular bursting firing mode. Intra-burst mean frequency was 3.45 (1.67–4.83) Hz and bursting frequency was 0.19 (IQR = 0.06–0.32) Hz. Combined, the passive membrane and AP properties point towards an electrophysiological differentiation of cholinergic neurons from most GABAergic neurons within the GPe.

Despite the foregoing, it was discovered that the majority of ChAT+ neurons in the GPe also express the glutamic acid decarboxylase enzyme (GAD 65/67; Fig. 3; 56/60 positive neurons), which supports the proposal that cholinergic pallidal neurons may release acetylcholine and GABA as neurotransmitters (Saunders et al., 2015a; Granger et al., 2016). A large number of ChAT+ neurons in the GPe may coexpress GABA because we did not detect segregation of electrophysiological characteristics in these neurons. In addition, according to our observations, ChAT+ projection neurons colocalize with other pallidal GABAergic neurons (Fig. 3 top and bottom rows), pointing to a possible interaction between cholinergic neurons and the other GABAergic neurons within the GPe (Hernández-Martínez et al., 2015). More investigation is needed to further characterize possible intrapallidal cholinergic connections.

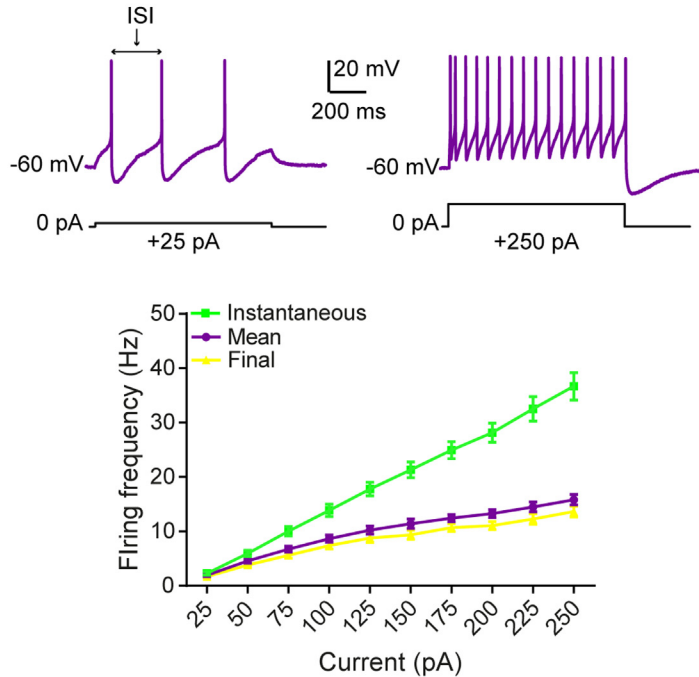
**A**



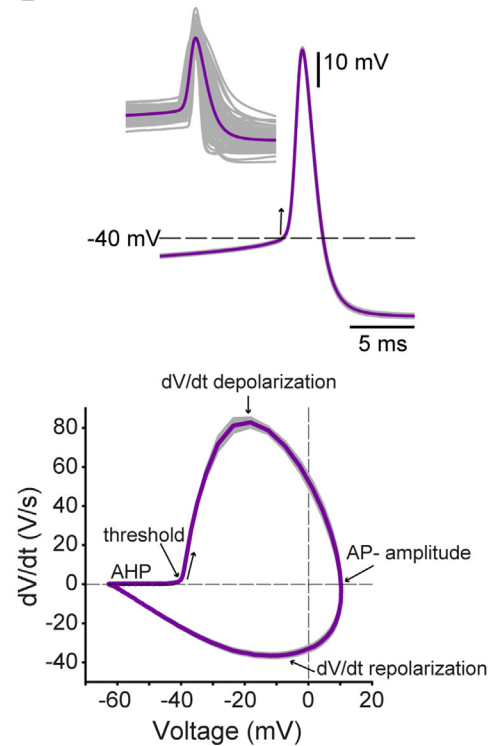
**B**



**C**



**D**



**Fig. 1.** Firing properties of ChAT+ neurons of the GPe. **(A)** Top: scheme representing whole-cell patch-clamp recordings in brain slices from ChAT-Cre mice previously injected in the GPe with a viral vector. Bottom: example images of ChAT Cre+ neurons from GPe (left) labeled with biocytin (middle) after whole-cell recording (merge). **(B)** Top: representative traces showing the voltage responses evoked by depolarizing and hyperpolarizing current steps of different strengths. Bottom: representative voltage-current relationship (I-V plot). **(C)** Top: exemplary traces of action potentials (APs) evoked by depolarizing current steps of different intensities. Bottom: current-frequency relationships (I-F plots) showing instantaneous firing frequency (reciprocal of 1st inter-spike interval, ISI), average frequency of the whole train of APs, and final frequency calculated from the last ISI ( $n = 100$  neurons from 69 different animals). **(D)** Top: Mean waveform of action potentials from recorded and identified ChAT+ neurons. Inset: superimposed action potentials waveforms of recorded neurons. Bottom: mean phase-plot with mean  $\pm$  SEM ( $dV/dt(V)$ ) pointing out the regions of measurements ( $n = 110$  neurons from 69 different animals).

**Table 1.** Passive electrophysiological properties of pallidal ChAT+ neurons

<i>n</i> = 110	Median (IQR 25th–75th)	Mean ± SEM
SAG (a.u.)	1.0 (1.0–1.03)	1.03 ± 0.01
$V_m$ (mV)	−62.0 (−68.25 to −60.0)	−63.78 ± 0.77
$R_N$ (MΩ)	564.5 (348.8–879.3)	679.2 ± 42.21
$\tau_m$ (ms)	53.0 (36.0–73.0)	58.64 ± 3.14
$C_N$ (pF)	89.0 (63.0–118.5)	104.2 ± 6.9

Passive electrophysiological properties of identified pallidal cholinergic neurons. Both median plus interquartile range 25–75 and mean ± SEM are reported. SAG = initial over final voltage after a hyperpolarizing intracellular current injection of −150 pA.  $V_m$  = resting membrane potential or membrane potential at zero current, measured in those neurons without autonomous firing at initial recording time or in silence.  $R_N$  = whole neuron input resistance, measured as  $dV/dI$  at  $V_m$ .  $\tau_m$  = membrane time constant, approximated from the slowest exponential voltage decay as a function of time.  $C_N$  = whole neuron membrane capacitance.

### Acute dopamine receptor blockade inhibits APs firing in ChAT+ neurons of the GPe

The GPe has become an important nucleus to understand movement disorders and Parkinson's disease (Mastro et al., 2017; Dong et al., 2021; Lilascharoen et al., 2021), we aimed to investigate how DA antagonism acutely affects electrophysiological characteristics of ChAT+ neurons in this nucleus, thus, initially, we applied both  $D_1$ -class (1  $\mu$ M SCH 23390) plus  $D_2$ -class (1  $\mu$ M sulpiride) receptor antagonists to the bath saline not presupposing any particular receptor class, since some basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs) express  $D_1$ -class receptors (Berlanga et al., 2005). In control conditions, pallidal ChAT+ neurons respond to current steps of increasing intensity by firing trains of APs that last throughout the duration of the stimulus (Fig. 4(A) top) and firing frequency rises as a function of current strength (Fig. 4(B)). Following DA receptor antagonism, ChAT+ GPe neurons hyperpolarize by about 10 mV, reduce their firing frequency for the same stimulus intensities (Fig. 4(A) bottom), and some neurons even cease firing during the stimulus period (Fig. 4(B); I-F plots;  $n$  = 9 from six different animals; two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's post hoc test).

Passive properties were examined while DA-receptors were blocked to determine whether a shift in these properties accompanied the actions of DA-receptors antagonism. Measured at the same membrane potential the sag ratio did not change (Fig. 4(C,D);

median, IQR): Control = 1.01 (0.99–1.10); SCH 23390 + sulpiride = 1.00, (0.99–1.02;  $n$  = 11 from 11 different animals, Wilcoxon T test). Nevertheless, a significant hyperpolarization ensued in most recorded neurons (Fig. 4(E)): Control = −60 (−62 to −59) mV; SCH 23390 + sulpiride = −72 (−77 to −60) mV ( $n$  = 11 from the same number of animals;  $**p \leq 0.01$ ; Wilcoxon T test). In agreement with the non-linearity of the I-V plot (Fig. 1(B)),  $R_N$  decreased from 420 (258–717) MΩ to 258 (163–350) MΩ in the presence of SCH 23390 + sulpiride (Fig. 4(F);  $n$  = 11 from 11 different animals;  $*p \leq 0.05$ ; Wilcoxon T test), as well as  $\tau_m$ , from 48.69 (32.21–83.50) ms to 12.60 (10.16–40.28) ms in the presence of the antagonists (Fig. 4(G);  $*p \leq 0.05$ ; Wilcoxon T test). Note that in spite of these drastic changes,  $C_N$ , which largely reflects neuronal membrane surface, did not change significantly: 117.6 (90.39–178.1) pF and SCH 23390 + sulpiride: 72.80 (40.77–141.3) pF (Fig. 4(H);  $n$  = 11 from 11 different animals;  $p = 0.27$ ; Wilcoxon T test).

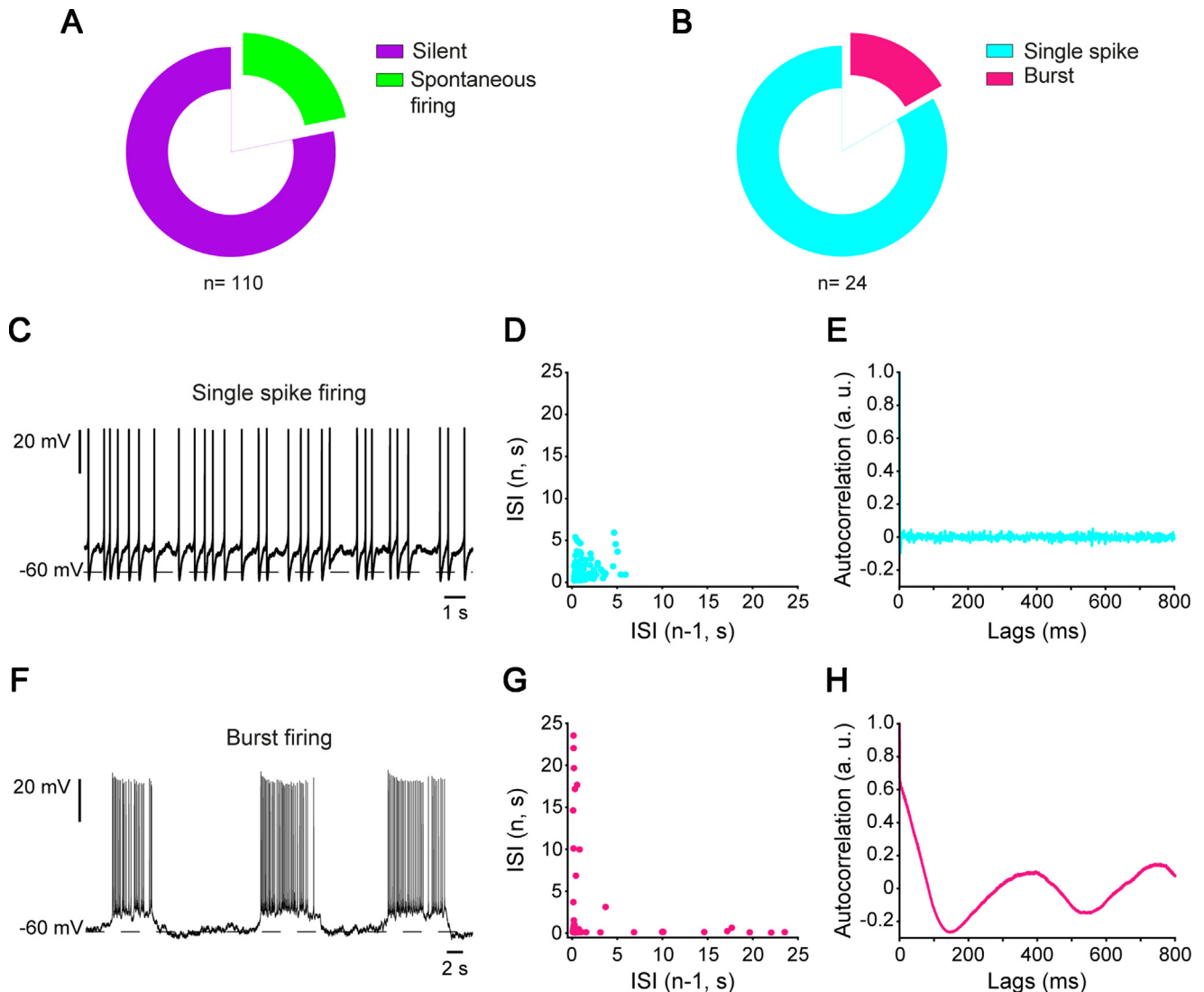
These findings suggest that continuous activity of DA-receptors maintains the membrane potential and the excitability of GPe cholinergic projection neurons, continuous receptors activity is probably maintained by the existence of tonic DA concentrations in the extracellular environment (e.g., Cáceres-Chávez et al., 2018).

To test whether passive properties associated with hyperpolarization were responsible for the changes brought about by DAergic blockade, we corrected the membrane potential to its previous (control) state with D.C. current. Afterwards, we stimulated a sample of ChAT+ neurons with intracellular current injections (150 pA) before and after DA receptor blockade. Three representative neurons from this sample are shown in Fig. 5(A). It was discovered that the decrease in firing frequency and modifications in frequency adaptation remained even after the antagonist-induced hyperpolarization was corrected. Additionally, Fig. 5(B) shows that control neurons adapt their frequency with fast and slow processes. Blocking DA receptors prevents the rapid process, leaving only the slowly adapting process. Some neurons even cease firing while the stimulus is present (depolarization block). These findings suggest that the modifications are brought on by active ion currents that affect the firing mode besides the hyperpolarization. The decrease in

**Table 2.** Action potential properties of pallidal ChAT+ neurons

<i>n</i> = 110	Median (IQR 25th–75th)	Mean ± SEM
Threshold	−38.90 (−41.22 to −36.71)	−39.04 ± 0.37
AP - amplitude (mV)	53.78 (47.7–59.10)	53.70 ± 0.74
Width (AP – duration at half amplitude) (ms)	1.42 (1.24–1.79)	1.55 ± 0.04
$dV/dt_{MAX}$ depolarization (V/s)	80.57 (68.35–98.21)	83.49 ± 2.29
$dV/dt_{MAX}$ repolarization (V/s)	−42.34 (−51.80 to −33.44)	−43.73 ± 1.32
AHP - amplitude (mV)	26.66 (23.37–30.35)	26.09 ± 0.53

Action potential properties of identified pallidal cholinergic neurons. Both median plus IQR range and mean ± SEM are reported ( $n$  = 110 neurons from 69 different animals). Measurements taken from phase plots ( $dV/dt$  (V)) except for width. Threshold measured at the "kink" (Bean, 2007). AP amplitude measured from threshold. Width is the AP duration measured at half amplitude.  $dV/dt_{MAX}$  = maximum and minimum from phase plot, respectively. AHP amplitude measured from threshold as signaled in the phase plot (Fig. 1D bottom).



**Fig. 2.** Spontaneous firing characteristics of pallidal ChAT+ neurons at zero current. **(A)** Proportion of pallidal cholinergic neurons with spontaneous firing. Most neurons were silent in vitro. **(B)** Spontaneous firing is divided in single spikes or burst firing ( $n = 24$  neurons from 20 different animals). **(C–E)** Representative trace showing spontaneous single spike firing **(C)**, a plot of the ISIs as a function of previous ones **(D)** and the corresponding autocorrelation histogram **(E)**. **(F–H)** Representative trace showing spontaneous burst firing **(F)**, a plot of ISIs as a function of previous ones **(G)** and the corresponding autocorrelation histogram **(H)**. Note that bursting departs from more polarized membrane potential.

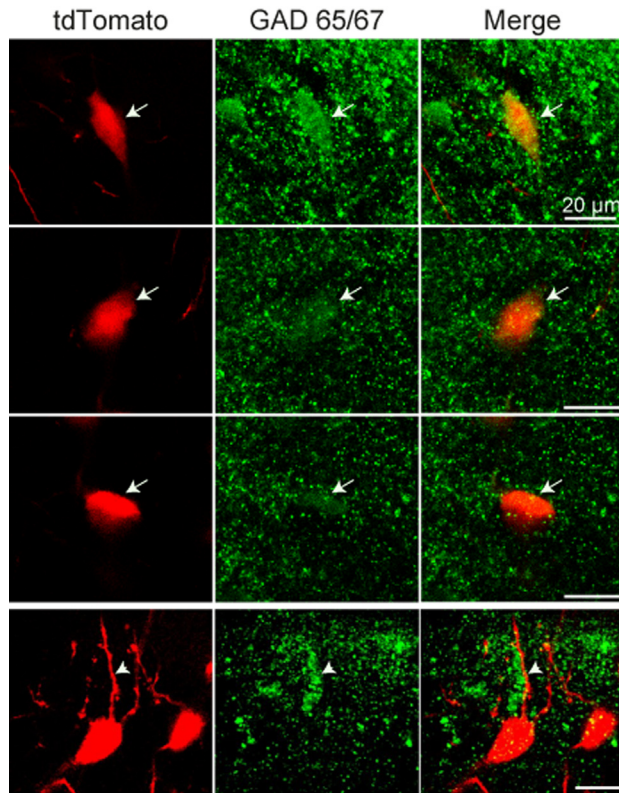
firing frequency in response to the same stimulus is significant (Fig. 5(C);  $n = 8$  neurons from eight different animals,  $**p \leq 0.01$ ; Wilcoxon T test). Therefore, the identification of the ion current or currents that change the firing mode in this way needs further investigation, as well as other potential neurotransmitters that, uncompensated by DA action, may modulate these currents. In this work we decided to test whether ion currents that generate APs are involved, by using phase plots ( $dV/dt(V)$ ) to visualize changes in the APs.

#### Action potential properties remain after acute dopamine receptor antagonism

Fig. 6 illustrates that no properties of APs were significantly altered after acute DAergic antagonism:

threshold:  $-37.2$  ( $-41.1$ – $-35.9$ ) mV vs.  $-35.03$  ( $-44.26$  to  $-32.79$ ) mV in the presence of SCH 23390 + sulpiride (Fig. 6(B,C);  $p = 0.687$ ); APs-amplitude:  $50.91$  ( $45.43$ – $61.9$ ) mV, as measured from threshold, while in the presence of DA-receptor antagonists it was  $45.06$  ( $43.11$ – $48.21$ ) mV (Fig. 6(D);  $p = 0.109$ ); width (AP-duration at half amplitude): control =  $1.17$  ( $1.02$ – $1.68$ ) ms vs.  $1.20$  ( $1.05$ – $1.30$ ) ms after DA-receptors blockade (Fig. 6(E);  $p = 0.999$ ); largest  $dV/dt$  of depolarization:  $103.4$  ( $60.16$ – $108.3$ ) V/s vs.  $82.47$  ( $60.29$ – $89.25$ ) V/s (Fig. 6(F);  $p = 0.078$ ); maximal  $dV/dt$  of repolarization:  $-63.67$  ( $-72.82$  to  $-34.65$ ) V/s vs.  $-58.0$  ( $-61.47$  to  $-40.0$ ) V/s (Fig. 6(G);  $p = 0.156$ ) and AHP amplitude, as measured from threshold:  $29.66$  ( $19.04$ – $31.8$ ) mV vs.  $27.32$  ( $23.36$ – $31.22$ ) mV (Fig. 6(H);  $p = 0.812$ ; all comparisons used





**Fig. 3.** ChAT+ neurons of the GPe co-express GABA. Example images of ChAT+ neurons from GPe (left column) immunostained for GAD 65/67 (middle column) and merge (right column). Top pictures show a ChAT+/GAD+ neuron neighboring a ChAT-/GAD+ neuron. Bottom pictures show two ChAT+/GAD+ neurons neighboring a ChAT-/GAD+ neuron (middle arrowhead). Note abundant GAD+ neuropile and ChAT+ neurons processes.

Wilcoxon's T test,  $n = 7$  neurons from seven different animals). Therefore, it is concluded that ion currents directly affecting APs firing generation are mostly different than those acting as firing modulators. Thus, further investigation is necessary to identify such currents.

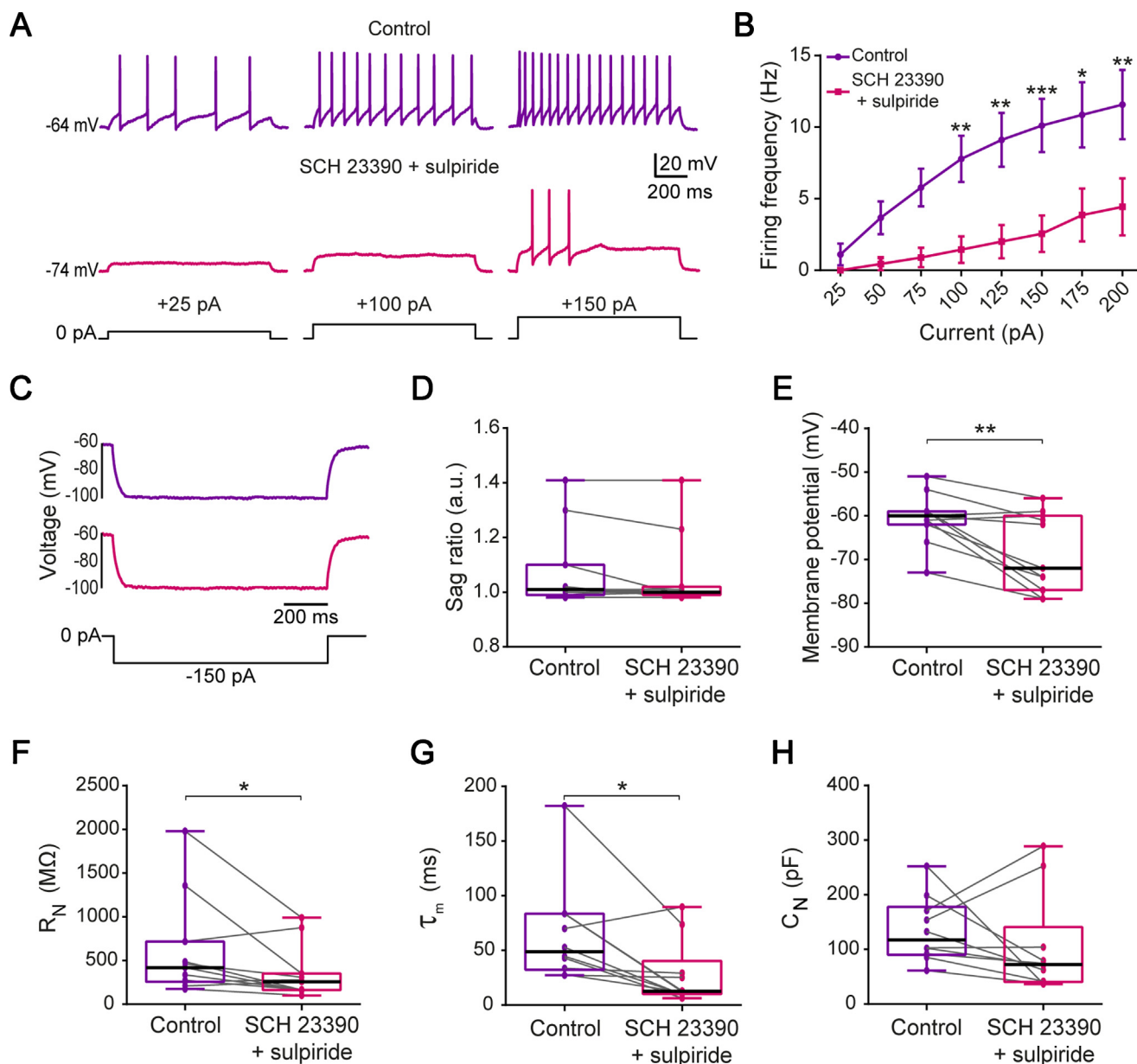
### Changes in firing mode of ChAT+ GPe neurons are directly caused by DA-receptors antagonism

To test whether the changes in firing mode of ChAT+ GPe neurons were not due to indirect effects of DAergic actions on neighboring neurons or synaptic terminals, we blocked glutamatergic and GABAergic receptors with 10  $\mu$ M CNQX plus 50  $\mu$ M APV plus 10  $\mu$ M bicuculline. Fig. 7(A,B) show that acute glutamatergic and GABAergic blockade did not cause significant changes in the firing mode or the I-F plot of cholinergic GPe neurons ( $n = 13$  from 13 different animals; two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's post hoc test). However, the posterior application of DA-receptors antagonists (SCH 23390 + sulpiride) still caused membrane potential hyperpolarization. Controls:  $-56$  ( $-60$  to  $-53.5$ ) mV,  $-60$  ( $-67.5$  to  $-54.5$ ) mV in the presence of CNQX, APV and bicuculline, and  $-70$  ( $-74$  to  $-61.5$ ) mV when SCH 23390 + sulpiride were

added (Fig. 7(C);  $**p \leq 0.01$  between fast-ligand gated synaptic blockers and DA-receptors antagonists;  $n = 13$  from 13 different animals; Friedman test followed by Dunn's post hoc test in these and other measurements from these experiments). Similar findings were found for  $R_N$ : 554 (401.5–963) M $\Omega$ , 359 (213.5–473) M $\Omega$  and 181 (135–323) M $\Omega$  (Fig. 7(D);  $***p \leq 0.001$ ; between control and DA-receptors antagonists), and  $\tau_m$ : 67.88 (47.04–91.85) ms, 41.34 (28.5–80.55) ms and 17.57 (10.39–40.62) ms (Fig. 7(E);  $***p \leq 0.001$  between controls and DA-receptors antagonism). Note that despite a tendency to fall after glutamatergic and GABAergic blockade, the differences in  $R_N$  and  $\tau_m$  with respect to the controls were not significant. In addition, we measured the amplitude of the AHP that followed the evoked train of APs, medium AHP (mAHP), since the AHP that follows single APs was already compared (Fig. 6). The amplitude decreased due to DA-receptors antagonists from 7.0 (2.0–8.0) mV; to 3.0 (0.0–7.0) mV in the presence of glutamatergic and GABAergic blockers, and to 1.0 (0.0–1.0) mV when DA-receptors antagonists were added (Fig. 7(F);  $**p \leq 0.01$ ). Again, statistical significance was only found between controls and DA-receptors antagonists, even when glutamatergic and GABAergic antagonism did show a tendency to decrease these values. However, the hyperpolarization caused by the DAergic antagonists makes  $V_m$  to approximate  $E_K$ , explaining the reduction in mAHP amplitude. These results suggest that modifications in the firing mode of pallidal ChAT+ neurons are mostly due to a direct DA-receptors blockade in these neurons and not to potential indirect effects provoked by DAergic actions on either neighboring neurons or synaptic terminals (Cooper and Stanford, 2001; Hernández et al., 2006; Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Jijón-Lorenzo et al., 2018; Kovaleski et al., 2020).

### D<sub>2</sub>-class receptors are the main determinants of dopaminergic actions on ChAT+ GPe neurons

Following the demonstration that acute DA-receptors blockade causes a hyperpolarization, a change in passive properties, and modifications in the firing mode of ChAT+ neurons, we asked what DA-receptor class was mainly responsible for these actions. First, we applied the D<sub>1</sub>-class receptor antagonist (1  $\mu$ M SCH 23390) alone to evaluate its actions. Fig. 8(A,B) illustrate representative experiments showing that firing frequency does not decrease significantly and neurons keep firing along the duration of the current stimulus in the presence of this antagonist ( $n = 6$  from different animals; two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's post hoc test). Other parameters were not significantly affected (not illustrated):  $V_m$  control:  $-62$  ( $-62.75$  to  $-60$ ) mV vs. SCH 23390:  $-63$  mV ( $-66.25$  to  $-56.5$ ) mV (Fig. 8(C);  $p = 0.937$ ),  $R_N$  was 700 (515.5–1237) M $\Omega$  vs. with SCH 23390: 384 (329.3–569.3) M $\Omega$  ( $*p \leq 0.05$ ),  $\tau_m$ : 52.5 (35.75–73.75) ms vs. with SCH 23390: 48 (21.75–67.75) ms; ( $p = 0.999$ ) and mAHP amplitude was: 5.0 (2.75–9.75) mV vs. SCH 23390: 3 (1.0–7.5) mV; ( $p = 0.281$ ;  $n = 6$ ) from different animals; Wilcoxon's T test for all comparisons).

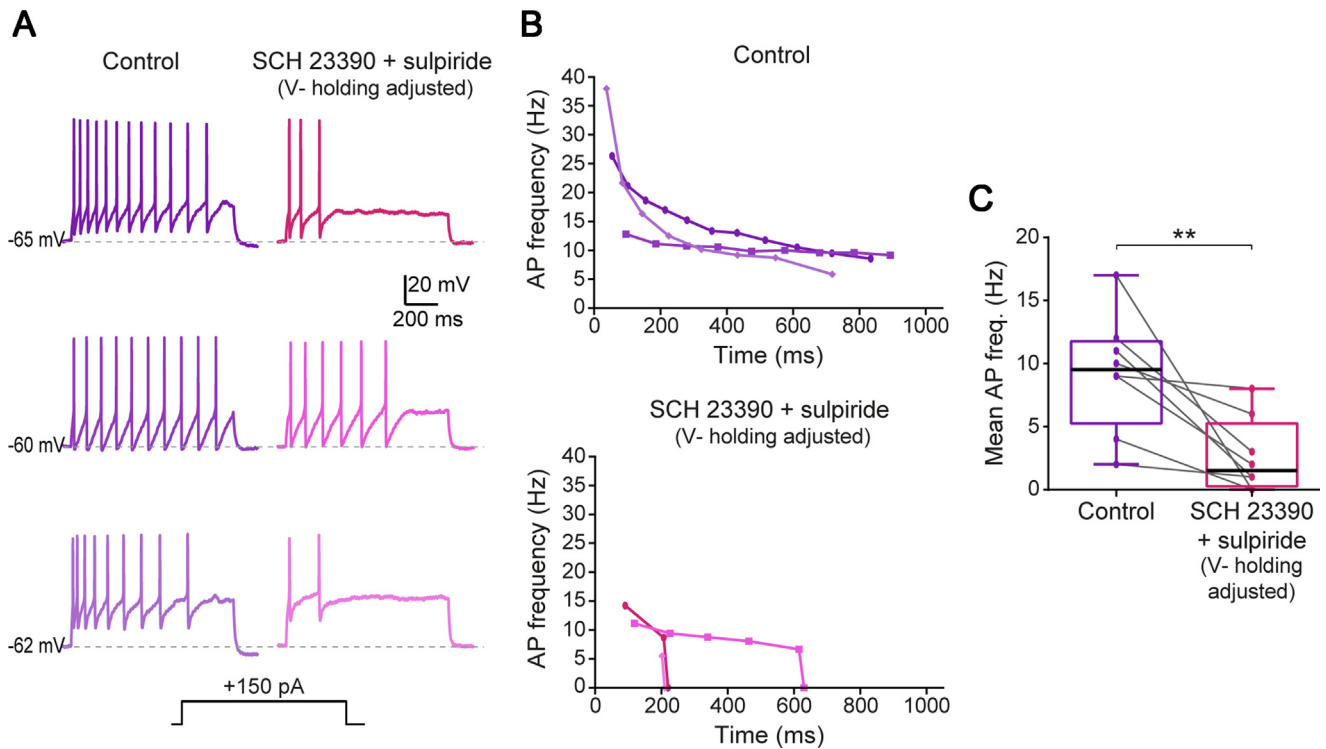


**Fig. 4.** Evoked firing of ChAT+ GPe neurons before and after acute blockade of dopamine receptors. **(A)** Top, representative traces showing APs evoked by intracellular injections of depolarizing current of different strength (25, 100 and 150 pA) before/control, and bottom, after administration of dopamine (DA) antagonists for both D1 and D2 class receptors (1  $\mu$ M SCH 23390 plus 1  $\mu$ M sulpiride). Note strong hyperpolarization and inhibition of firing. **(B)** I-F plots before and after DA receptors blockade ( $n = 9$  neurons from 6 different animals; mean  $\pm$  SEM; two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's post hoc test). Note that the dynamic range of firing is greatly diminished after DA receptors blockade. **(C-D)** Representative traces evoked by a hyperpolarizing current pulse of 150 pA and sag ratio comparison before and after DA block. **(E-H)** Box plots comparing  $V_m$ ,  $R_N$ ,  $\tau_m$ , and  $C_N$ . Box plots show median and interquartile ranges, whiskers show 5th and 95th percentiles in this and other figures ( $n = 11$  neurons from 11 different animals; Wilcoxon T test. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

We conclude that D<sub>1</sub>-class receptors are not the main responsible for most electrophysiological changes observed in pallidal ChAT+ neurons after acute DAergic blockade, even though  $R_N$  changes were significantly modified.

Next, we applied the D<sub>2</sub>-class receptor antagonist (1  $\mu$ M sulpiride) alone to evaluate its actions. D<sub>2</sub>-class receptor blockade induced a great inhibition of firing frequency and a collapse of the I-F plot dynamic range, achieving significantly less discharge for similar stimuli (Fig. 8(D,E);  $n = 21$  neurons from 19 different animals;

\*\*\* $p < 0.001$ ; two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's post hoc test). These actions were accompanied with a significant membrane potential hyperpolarization: from  $-64$  ( $-64$  to  $-61.75$ ) mV in the controls to  $-75$  ( $-80.25$  to  $-71.75$ ) mV after sulpiride blockade of D<sub>2</sub>-class receptors (Fig. 8(F);  $n = 22$  neurons from 19 different animals; \*\*\* $p < 0.001$ ; Wilcoxon's T test). Current stimulus (1 s) to achieve the firing of a single AP (rheobase) increased significantly from 20 (10–20) pA to 200 (100–381.3) pA after D<sub>2</sub>-receptor blockade (Fig. 8(G); \*\*\* $p \leq 0.001$ ; Wilcoxon T



**Fig. 5.** Examples of firing adaptation in ChAT+ GPe neurons before and after DA receptors blockade. **(A)** Left: Evoked firing with an intracellular current step (150 pA) at zero current in three different control neurons. Right: Evoked firing in the same representative neurons after pharmacological DA receptors blockade (1  $\mu$ M SCH 23390 plus 1  $\mu$ M sulpiride) during adjustment of the holding potential to match that recorded in the controls. Changes in frequency adaptation remain even if the hyperpolarization induced by the antagonists is corrected. **(B)** Top: Frequency adaptation (F-A) plots in three representative control neurons. Note that firing frequency adaptation has fast and slow processes in control neurons. After DA receptors blockade only the slow process remains and firing stops during continuous stimulation (depolarization block). **(C)** Decrease in firing frequency was significant for the same stimulus strength in a sample of ChAT + neurons after DA receptors blockade. ( $n = 8$  neurons from 8 different animals; Wilcoxon T test;  $**p \leq 0.01$ ).

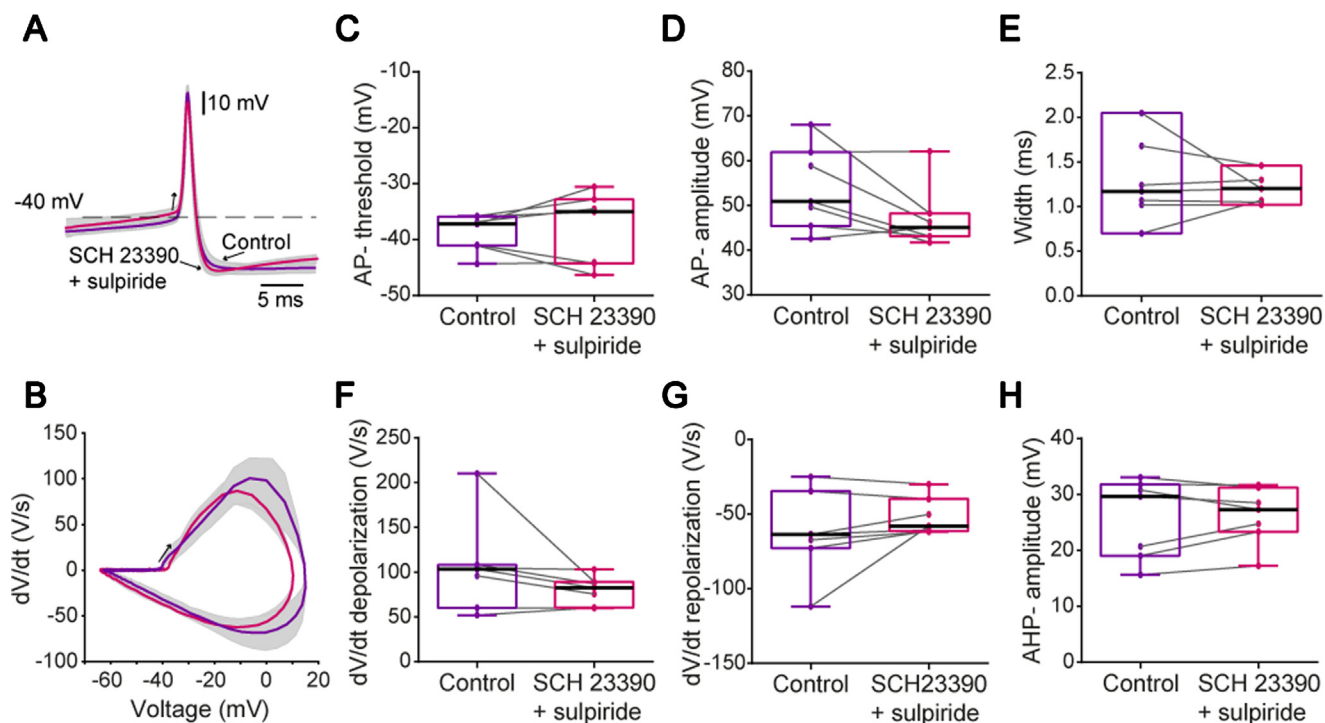
test).  $R_N$  and  $\tau_m$  also decreased:  $R_N$  control: 880.5 (446–1104) M $\Omega$  vs. sulpiride: 186.5 (153–420.8) M $\Omega$  (Fig. 8(H)  $***p \leq 0.001$ ).  $\tau_m$  control: 64.5 (48.25–79.75) ms vs. sulpiride: 15.50 (11.75–28.50) ms (Fig. 8(I);  $***p \leq 0.001$ ). Finally, the AHP amplitude after an evoked train of spikes (mAHP) decreased considerably: control: 4.0 (1.0–7.5) mV vs. sulpiride: 0.0 (0.0–2.0) mV (Fig. 8(J);  $***p \leq 0.001$ ;  $n = 22$  neurons from 19 different animals in all cases). These results made us to conclude that the main DAergic influence on ChAT+ GPe neurons is due to  $D_2$ -class receptors activation, specifically which particular receptor ( $D_{2-4}$ ) is responsible, will need further investigation. Apparently, these receptors are acting tonically with DA present in the extracellular milieu, because their acute blockade is enough to induce most relevant changes: hyperpolarization of the membrane potential, most changes in  $R_N$  and  $\tau_m$ , and modification of the firing mode.

## DISCUSSION

The GPe obtains direct connections from the cortex, as reported in multiple studies (Naito and Kita 1994; Yasukawa et al., 2004; Mastro et al., 2014; Milardi et al., 2015; Grewal et al., 2018; Abecassis et al., 2020; Jeon et al., 2022; Zheng and Monti, 2022), and it also provides direct inputs to the cortex (Abdi et al., 2015; Saunders et al., 2015b; Chen et al., 2016; Glajch et al.,

2016; Mallet et al., 2016), composing a cortico-pallidal loop which has not been thoroughly investigated. Of these projections to the cortex, 5% involve cholinergic neurons (Nóbrega-Pereira et al., 2010; Hernández et al., 2015; Abecassis et al., 2020), which may also release GABA (Saunders et al., 2015a; Granger et al., 2016). A special interest derives because they are innervated by medium spiny neurons of the striatum, predominantly from the indirect pathway, and make a direct projection to the cortex (Hernández et al., 2015; Saunders et al., 2015b), making the GPe a critical hub in the BG (Dong et al., 2021). This cortico-pallidal loop is an alternative to the more known BG-thalamo-cortical loop. Both GABAergic (Npas1 - Nkx2.1-expressing) and cholinergic neurons in the pallidum might provide the shortest route to the cortex from the BG (Hernández et al., 2015; Abecassis et al., 2020).

Here we explore the DAergic sensitivity of pallidal cholinergic neurons to investigate novel research venues, the importance of this study is validated by knowing that cortical entrainment into gamma oscillations, essential for many cognitive and sensorimotor functions, is generated by its cholinergic modulation (e.g., Rodriguez et al., 2004; Mena-Segovia et al., 2008; Betterton et al., 2017). According to Saunders et al. (2015b), cholinergic neurons from the GPe produce a direct modulatory input to the cortex, which may contribute to the production of gamma oscillations.



**Fig. 6.** Action potential features before and after DA receptors blockade. **(A)** Mean  $\pm$  SEM APs waveforms before/control and after administration of DA receptor antagonists (1  $\mu$ M SCH 23390 plus 1  $\mu$ M sulpiride). **(B)** Mean  $\pm$  SEM phase-plots (dV/dt (V); arrow indicates the beginning of the action potential). **(C–G)** Box plots comparing: AP threshold **(C)**, AP amplitude **(D)**, AP Width **(E)**, duration at half-amplitude), maximal dV/dt of depolarization **(F)**, maximal dV/dt of repolarization **(G)** and afterhyperpolarization (AHP) amplitude **(H)**;  $n = 7$  neurons from seven different animals, Wilcoxon T test). Changes in firing mode due to DA-receptors blockade appear not to significantly modify ion currents that generate the action potentials themselves.

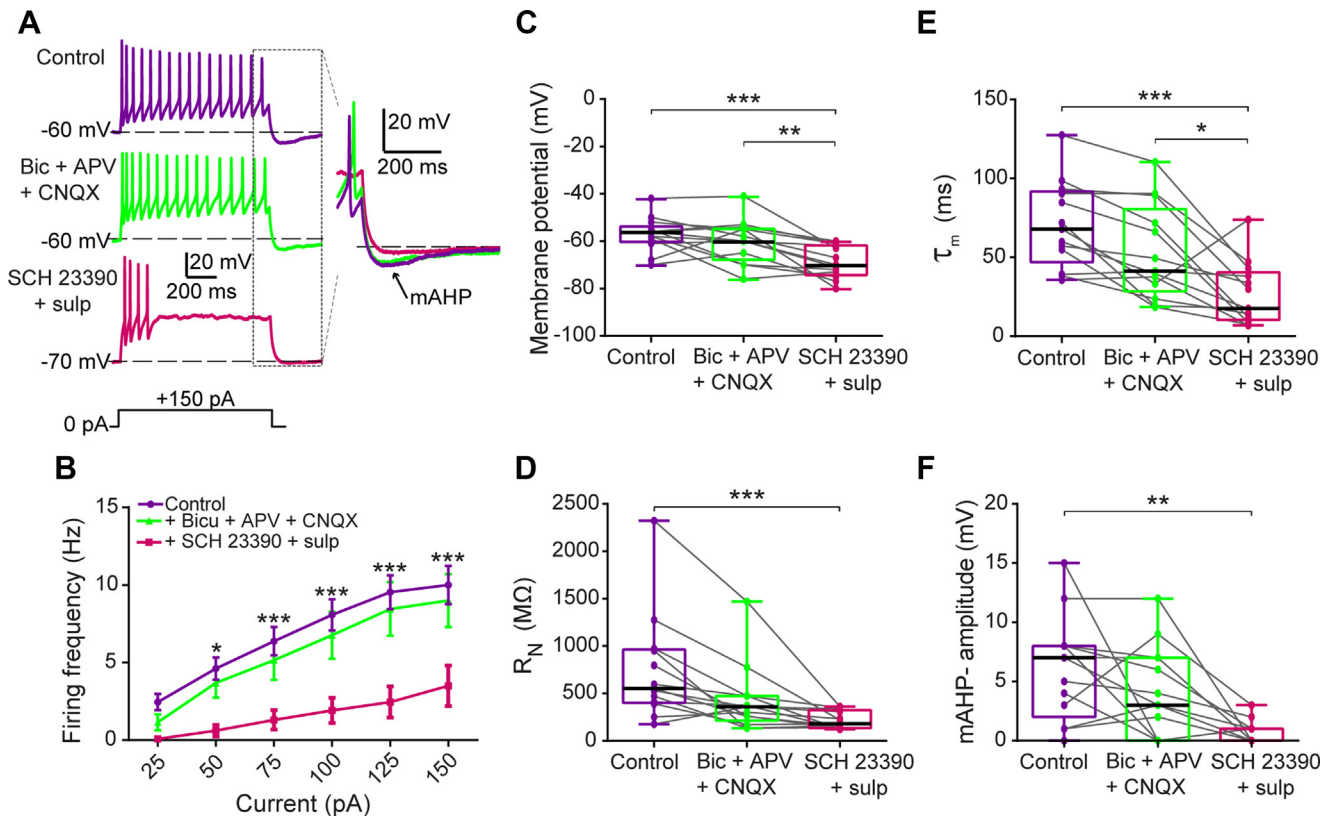
tory activity. The reduction of gamma band activity and an increase in beta band activity that promotes motor impairment are characteristics of parkinsonism (e.g., Mallet et al., 2008; Deffains and Bergman, 2019; Brazhnik et al., 2021). How DA deficiency results in aberrant neuronal synchronization in the beta band is still a topic of discussion. Here, we highlight a novel working hypothesis: the lack of DAergic regulation onto cortical cholinergic input. Whether the DA sensitivity found here extends to other cortical cholinergic inputs is another research question raised by the present experimental work.

Some researchers classify cholinergic neurons in the GPe as part of the BFCNs (Gielow and Zaborszky, 2017; Carrasco et al., 2022; see Dong et al., 2021), while others disagree (Ananth et al., 2023). Striatal synapses (Saunders et al., 2015a, b) do not differentiate between these cholinergic neurons and those in the basal forebrain nuclei, as BFCNs also receive substantial striatal input (Gielow and Zaborszky, 2017). The primary distinguishing feature may be DAergic innervation, as most dopaminergic inputs to the GPe originate from the substantia nigra compacta (Bouali-Benazzouz et al., 2009; Eid and Parent, 2015), while most DAergic input to BFCNs comes from the ventral tegmental and retrorubral areas (Hu et al., 2016; Gielow and Zaborszky, 2017).

In this context, our initial electrical activity study of GPe cholinergic neurons reveals that under normal circumstances, the majority of these neurons are inactive, with only about 22% exhibiting self-generating activity, and an even smaller fraction showing burst

activity. When stimulated, their activity shows minimal adaptation despite an initial quick adaptation at the start of firing. Their current-to-frequency (I-F) curves peak at average firing rates of approximately 10 Hz under maximum stimulation. These properties somewhat mirror those of “early firing” neurons among the BFCNs (Unal et al., 2012), including the lack of a noticeable “sag” during hyperpolarization in the presence of a time-independent inward rectification. However, some differences are important: early firing BFCNs exhibit depolarization block while GPe cholinergic neurons only show this feature when DAergic signaling is disrupted. Owing to their high  $R_N$  and membrane time constant ( $\tau_m$ ), they can be easily distinguished from neighboring GABAergic neurons (Abraham and Lovinger, 2018). Nevertheless, our immunocytochemistry findings affirm previous suggestions that they might also produce GABA since they coexpress GAD 65/67 enzyme (Saunders et al., 2015a; Granger et al., 2016).

Given the significant difference in the source of dominant DAergic innervation between GPe cholinergic neurons and BFCNs, we conducted acute experiments to examine their primary DAergic sensitivity under normal conditions. We initially did not favor either D<sub>1</sub>-class receptors (D<sub>1</sub>R) or D<sub>2</sub>-class receptors (D<sub>2</sub>R), considering the reported presence of D<sub>1</sub>R in BFCNs (Berlanga et al., 2005) and the predominant sensitivity to D<sub>2</sub>R in most pallidal neurons (Mamad et al., 2015; Smith and Villalba, 2008). Thus, we acutely administered antagonists for both D<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R classes.



**Fig. 7.** Glutamatergic and GABAergic antagonism does not impede firing inhibition caused by dopaminergic antagonism in ChAT + GPe neurons. (A) Representative traces showing the action potentials evoked by an intracellular depolarizing current injection of 150 pA before/control and after glutamatergic and GABAergic antagonism (10  $\mu$ M CNQX + 50  $\mu$ M APV + 10  $\mu$ M bicuculline), and after dopaminergic antagonism (+ 1  $\mu$ M SCH 23390 + 1  $\mu$ M sulpiride). Inset: traces showing mAHP in all conditions, membrane potential was corrected to  $-60$  mV for the trace with DA receptor antagonists. In part because DA antagonists elicit hyperpolarization that is close to  $E_K$ , the mAHP appears to be diminished. (B) I-F plots ( $n = 13$  neurons from 13 different animals; data are mean  $\pm$  SEM; two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's post hoc test). (C-F) Box plots comparing:  $V_m$ ,  $R_N$ ,  $\tau_m$  and mAHP amplitude (Friedman test followed by post hoc Dunn's test; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).  $R_N$  and  $\tau_m$  may also decrease due to inward rectification during hyperpolarization, Fig. 1(B).

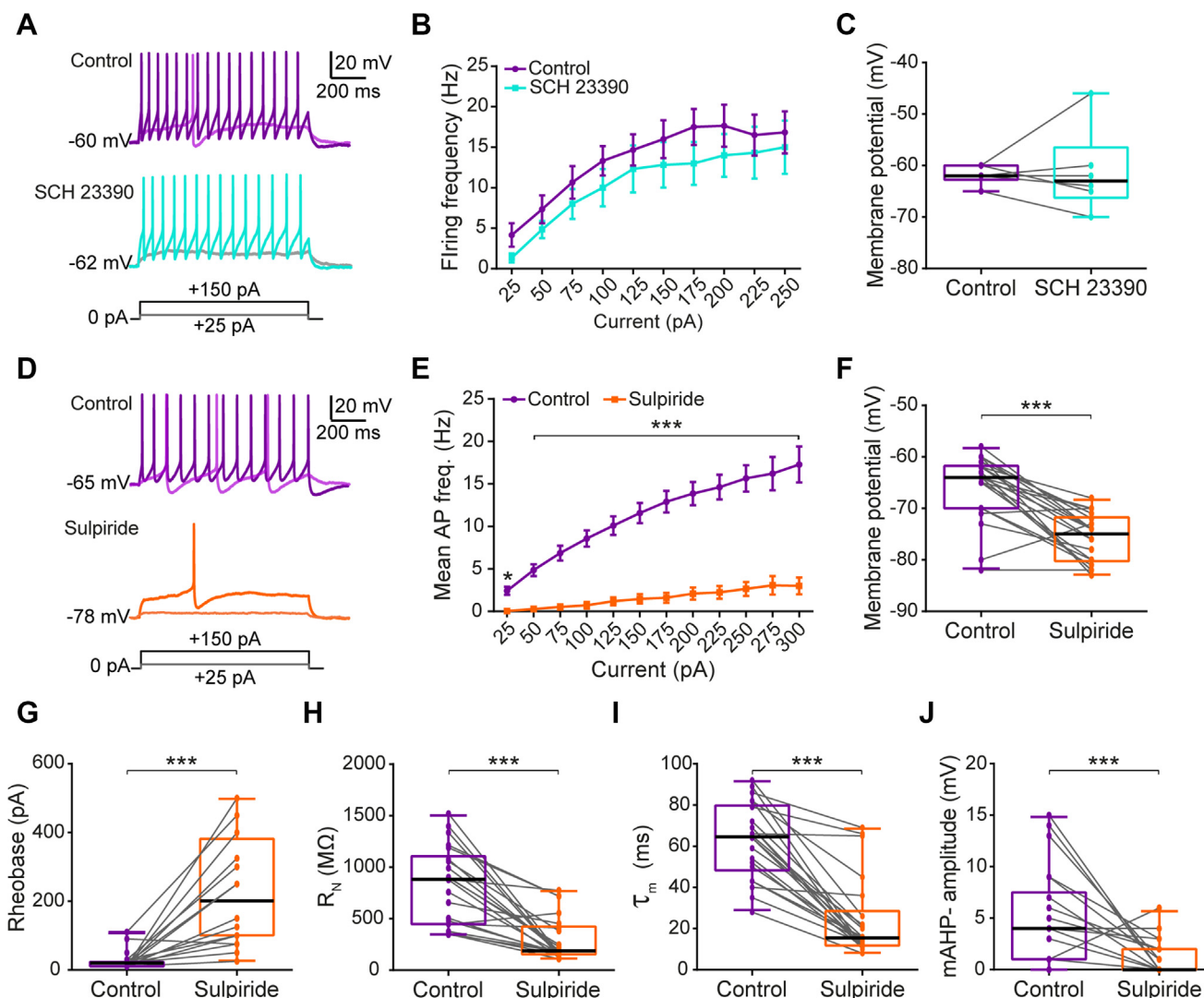
The outcomes of these experiments were unexpected. Firstly, blocking DA receptors triggered a hyperpolarization of about 10 mV in all observed neurons, indicating that the continuous activity of DA signaling supports the resting membrane potential ( $V_m$ ) of these neurons. Given the DAergic innervation to the GPe (Mamad et al., 2015; Smith and Villalba, 2008), the simplest working hypothesis for future research is that tonic DA concentrations in the GPe maintain the constitutive activation of these receptors. Therefore, it would be expected that DA denervation induces similar changes (e.g., Cáceres-Chávez et al., 2018).

In essence, excitability is substantially decreased, and neither the hyperpolarization itself nor the resulting change in passive membrane properties are responsible. Because DA transmission resulted crucial for GPe-cortical communication, significant implications for Parkinson's disease, drug induced Parkinsonism, tardive and L-DOPA-induced dyskinesias are expected (Mallet et al., 2008; Chan et al., 2011; Quiroga-Varela et al., 2013; Cáceres-Chávez et al., 2018; Solís and Moratalla, 2018; Surmeier et al., 2023). To our knowledge, this is the first time the actions of acute DA receptors blockade in cholinergic neurons of the GPe are reported.

GPe cholinergic neurons exhibit APs that are faster and with larger AHP amplitudes than those reported for cholinergic interneurons in the striatum (Sanchez et al., 2011; Padilla-Orozco et al., 2022). Our findings also indicate that neither the ion currents that generate the APs nor the excitatory and inhibitory inputs that affect these neurons are accountable for the shift in firing pattern. This revelation paves the way for future research to identify the responsible ion currents, most likely slow subthreshold ion currents that are sensitive to DAergic signaling cascades.

Finally, the most important finding of the present work was that most DA sensitivity of GPe cholinergic neurons involves the  $D_2R$  class, the  $D_1R$  class was only responsible for small changes in passive properties. That is, the receptors activity that maintains  $V_m$ , firing pattern, excitability and most physiological features of GPe cholinergic neurons belong to the  $D_2R$  class, the main target of the most used anti-parkinsonian drugs, including L-DOPA (Lara-González et al., 2019).

Previously, it was suggested that GPe cholinergic neurons receive reduced GABAergic inhibition from striatal neurons of the indirect pathway when a  $D_2R$ -class agonist is present, an effect that sulpiride was found to reverse (Saunders et al., 2015b). This suggested that during  $D_2R$ -class antagonism, GPe cholinergic



**Fig. 8.** D<sub>2</sub>-class receptor antagonism is mainly responsible for dopaminergic actions in ChAT + GPe neurons. (A) Representative traces showing APs evoked by current steps of 25 and 150 pA before/control and after bath application of the D<sub>1</sub>-class receptors antagonist, 1 μM SCH 23390. (B) Corresponding I-F-plots (mean ± SEM; n = 6 neurons from different animals, two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's post hoc test). (C) Box plots comparing resting membrane potential (n = 6 neurons from different animals, Wilcoxon T test). (D) Representative traces showing APs elicited by current steps of 25 and 150 pA before/control and after administration of the D<sub>2</sub>-class receptors antagonist, 1 μM sulpiride. (E) Corresponding I-F plots (n = 21 neurons from 19 different animals, two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's post hoc test). (F–J) Box plots compare resting membrane potential, rheobase current, R<sub>N</sub>, τ<sub>m</sub> and mAHP-amplitude (n = 22 neurons from 19 different animals, Wilcoxon T test; \*\*\*p ≤ 0.0001).

neurons may be less excitable due to increased inhibition from the indirect pathway. However, our study presents a contrasting mechanism: cholinergic neurons become more silent in the presence of sulpiride, as direct antagonism of D<sub>2</sub>R-class receptors triggers intrinsic electrophysiological changes in GPe cholinergic neurons. This mechanism operates independently from inhibition by the indirect pathway. Future research is needed to precisely identify which receptor subtypes are mainly responsible for the different changes (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub>).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L.-N. and J. B. conceived and designed the experiments. J. L.-N., M. P.-O and V. A. C.-C. performed *in vitro*

experiments. D. T. performed cell labeling and immunohistochemistry. J. L.-N., A. L. and A. O. analyzed data and prepared figures. J. L.-N., E. G. and J. B. analyzed data and interpreted results. J. L. N., E. G. and J. B. edited and revised manuscript; all authors approved the final version of manuscript.

#### FUNDING

This work was supported by grants from DGAPA-UNAM IN 205023 (JB), IN 204623 (EG) and CONAHCyT (México) F003-154039 to JB. López-Niño J. had a CONAHCyT doctoral scholarship 630672. Data in this work are part of her doctoral dissertation in the

“Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas”, at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Xóchitl Ayala, Ariadna Aparicio- Juárez, Claudia Rivera- Cerecedo and Héctor Alfonso Malagón-Rivero for animal care and facility; and María Escalante and Francisco Pérez for computational support.

## REFERENCES

- Abdi A, Mallet N, Mohamed FY, Sharott A, Dodson PD, Nakamura KC, Suri S, Avery SV, et al. (2015) Prototypic and arky pallidal neurons in the dopamine-intact external globus pallidus. *J Neurosci* 35:6667–6688. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4662-14.2015>.
- Abecassis ZA, Berceau BL, Win PH, García D, Xenias HS, Cui Q, Pamucku A, Cherian S, et al. (2020) Npas1+ -Nkx2.1+ neurons are an integral part of the cortico-pallido-cortical loop. *J Neurosci* 40:743–768. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1199-19.2019>.
- Abraham KP, Lovinger DM (2018) Classification of GABAergic neuron subtypes from the globus pallidus using wild-type and transgenic mice. *J Physiol* 596(17):4219–4235. <https://doi.org/10.1113/JP276079>.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-x](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-x).
- Alonso A, Khateb A, Fort P, Jones BE, Mühlethaler M (1996) Differential oscillatory properties of cholinergic and noncholinergic nucleus basalis neurons in guinea pig brain slice. *Eur J Neurosci* 8:169–182. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01178.x>.
- Ananth MR, Rajebhosale P, Kim R, Talmage DA, Role LW (2023) Basal forebrain cholinergic signalling: development, connectivity and roles in cognition. *Nat Rev Neurosci* 24:233–251. <https://doi.org/10.1038/s41583-023-00677-x>.
- Bean BP (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8:454–465. <https://doi.org/10.1038/nrn2148>.
- Berlanga ML, Simpson TK, Alcantara AA (2005) Dopamine D5 receptor localization on cholinergic neurons of the rat forebrain and diencephalon: a potential neuroanatomical substrate involved in mediating dopaminergic influences on acetylcholine release. *J Comp Neurol* 492:34–49. <https://doi.org/10.1002/cne.20684>.
- Betterton RT, Broad LM, Tsaneva-Atanasova K, Mellor JR (2017) Acetylcholine modulates gamma frequency oscillations in the hippocampus by activation of muscarinic M1 receptors. *Eur J Neurosci* 45:1570–1585. <https://doi.org/10.1111/ejn.13582>.
- Bouali-Benazzouz R, Tai C, Chetrit J, Benazzouz A (2009) Intrapallidal injection of 6-hydroxydopamine induced changes in dopamine innervation and neuronal activity of globus pallidus. *Neuroscience* 164:588–596. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.034>.
- Brazhnik E, Novikov N, McCoy AJ, Ilieva NM, Ghraib MW, Walters JR (2021) Early decreases in cortical mid-gamma peaks coincide with the onset of motor deficits and precede exaggerated beta build-up in rat models for Parkinson’s disease. *Neurobiol Dis* 155. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105393> 105393.
- Cáceres-Chávez VA, Hernández-Martínez R, Pérez-Ortega J, Herrera-Valdez MA, Aceves JJ, Galarraga E, Bargas J (2018) Acute dopamine receptor blockade in substantia nigra pars reticulata: a possible model for drug-induced Parkinsonism. *J Neurophysiol* 120:2922–2938. <https://doi.org/10.1152/jn.00579.2018>.
- Carrasco A, Oorschot DE, Barzaghi P, Wickens JR (2022) Three-dimensional spatial analyses of cholinergic neuronal distributions across the mouse septum, nucleus basalis, globus pallidus, nucleus accumbens, and caudate-putamen. *Neuroinformatics* 20:1121–1136. <https://doi.org/10.1007/s12021-022-09588-1>.
- Chan CS, Glajch KE, Gertler TS, Guzman JN, Mercer JN, Lewis AS, Goldberg AB, Tkatch T, et al. (2011) HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson’s disease. *Nat Neurosci* 14:85–92. <https://doi.org/10.1038/nn.2692>.
- Chen MC, Ferrari L, Sacchet MD, Foland-Ross LC, Qiu MH, Gotlib IH, Fuller PM, Arrigoni E, et al. (2016) Identification of a direct GABAergic pallidocortical pathway in rodents. *Eur J Neurosci* 41:748–759. <https://doi.org/10.1111/ejn.12822>.
- Cooper AJ, Stanford IM (2001) Dopamine D<sub>2</sub> receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA<sub>A</sub> IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41:62–71. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(01\)00038-7](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(01)00038-7).
- Deffains M, Bergman H (2019) Parkinsonism-related  $\beta$  oscillations in the primate basal ganglia networks - Recent advances and clinical implications. *Parkinsonism Relat Disord* 59:2–8. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.12.015>.
- Dong J, Hawes S, Wu J, Le W, Cai H (2021) Connectivity and functionality of the globus pallidus externa under normal conditions and Parkinson’s disease. *Front Neural Circuits* 15. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.645287> 645287.
- Eid L, Parent M (2015) Morphological evidence for dopamine interactions with pallidal neurons in primates. *Front Neuroanat* 9:111. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00111>.
- Gielow MR, Zaborszky L (2017) The input-output relationship of the cholinergic basal forebrain. *Cell Rep* 18:1817–1830. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.060>.
- Glajch KE, Kelper DA, Hegeman DJ, Cui Q, Xenias HS, Augustine EC, Hernández VM, Verma N, et al. (2016) Npas1+ pallidal neurons target striatal projection neurons. *J Neurosci* 36:5472–5488. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1720-15.2016>.
- Granger AJ, Mulder N, Saunders A, Sabatini BL (2016) Cotransmission of acetylcholine and GABA. *Neuropharmacology* 100:40–46. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.031>.
- Grewal SS, Holanda VM, Middlebrooks EH (2018) Corticopallidal connectome of the globus pallidus externus in humans: an exploratory study of structural connectivity using probabilistic diffusion tractography. *AJNR Am J Neuroradiol* 39:2120–2125. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5816>.
- Hernández VM, Hegeman DJ, Cui Q, Kelper DA, Fiske MP, Glajch KE, Pitt JE, Huang TY, et al. (2015) Parvalbumin+ neurons and Npas1+ neurons are distinct neuron classes in the mouse external globus pallidus. *J Neurosci* 35:11830–11847. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4672-14.2015>.
- Hernández A, Ibanez-Sandoval O, Sierra A, Valdiosera R, Tapia D, Anaya V, Galarraga E, Bargas J, et al. (2006) Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 96:2877–2888. <https://doi.org/10.1152/jn.00664.2006>.
- Hernández-Martínez R, Aceves JJ, Rueda-Orozco PE, Hernández-Flores T, Hernández-González O, Tapia D, Galarraga E, Bargas J (2015) Muscarinic presynaptic modulation in GABAergic pallidal synapses of the rat. *J Neurophysiol* 113:796–807. <https://doi.org/10.1152/jn.00385.2014>.
- Hu R, Jin S, He X, Xu F, Hu J (2016) Whole-brain monosynaptic afferent inputs to basal forebrain cholinergic system. *Front Neuroanat* 10:98. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00098>.
- Jaeger D, Kita H (2011) Functional connectivity and integrative properties of globus pallidus neurons. *Neuroscience* 198:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.050>.
- Jeon H, Lee H, Kwon DH, Kim J, Tanaka-Yamamoto K, Yook JS, Feng L, Park HR, et al. (2022) Topographic connectivity and cellular profiling reveal detailed input pathways and functionally distinct cell types in the subthalamic nucleus. *Cell Rep* 38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110439> 110439.
- Jijón-Lorenzo R, Caballero-Florán IH, Recillas-Morales S, Cortés H, Avalos-Fuentes JA, Paz-Bermúdez FJ, Erijl D, Florán B (2018) Presynaptic dopamine D2 receptors modulate [<sup>3</sup>H]GABA release at striatopallidal terminals via activation of PLC → IP3 → calcineurin and inhibition of AC → cAMP → PKA signaling

- cascades. *Neuroscience* 372:74–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.12.041>.
- Kovaleski RF, Callahan JW, Chazalon M, Wokosin DL, Baufreton J, Bevan MD (2020) Dysregulation of the external globus pallidus-subthalamic nucleus network dynamics in parkinsonian mice during cortical slow-wave activity and activation. *J Physiology* (London) 598:1897–1927. <https://doi.org/10.1113/JP279232>.
- Lara-González E, Duhne M, Ávila-Cascajares F, Cruz S, Bargas J (2019) Comparison of actions between L-DOPA and different dopamine agonists in striatal DA-depleted microcircuits in vitro: pre-clinical insights. *Neuroscience* 410:76–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.058>.
- Lilasharoen V, Wang EHJ, Do N, Pate SC, Tran AN, Yoon CD, Choi JH, Wang XY, et al. (2021) Divergent pallidal pathways underlying distinct parkinsonian behavioral deficits. *Nat Neurosci* 24:504–515. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00810-y>.
- Mallet N, Pogosyan A, Sharott A, Csicsvari J, Bolam JP, Brown P, Magill PJ (2008) Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *J Neurosci* 28:4795–4806. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0123-08.2008>.
- Mallet N, Micklem BR, Henny P, Brown MT, Williams C, Bolam JP, Nakamura KC, Magill PJ (2012) Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron* 74:1075–1086. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.027>.
- Mallet N, Schmidt R, Leventhal D, Chen F, Amer N, Boraud T, Berke J (2016) Arky pallidal cells send a stop signal to striatum. *Neuron* 89:308–316. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.017>.
- Mamad O, Delaville C, Benjelloun W, Benazzouz A (2015) Dopaminergic control of the globus pallidus through activation of D2 receptors and its impact on the electrical activity of subthalamic nucleus and substantia nigra reticulata neurons. *PLoS One* 10:e0119152.
- Mastro KJ, Bouchard RS, Holt HAK, Gittis AH (2014) Transgenic mouse lines subdivide external segment of the globus pallidus (GPe) neurons and reveal distinct GPe output pathways. *J Neurosci* 34:2087–2099. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4646-13.2014>.
- Mastro KJ, Zitelli KT, Willard AM, Leblanc KH, Kravitz AV, Gittis AH (2017) Cell-specific pallidal intervention induces long-lasting motor recovery in dopamine-depleted mice. *Nat Neuroscience* 20:815–823. <https://doi.org/10.1038/nn.4559>.
- McKenna JT, Yang C, Franciosi S, Winston S, Abarr KK, Matthew SR, Yanagawa Y, McCarley RW, et al. (2013) Distribution and intrinsic membrane properties of basal forebrain GABAergic and parvalbumin neurons in the mouse. *J Comp Neurol* 521:1225–1250. <https://doi.org/10.1002/cne.23290>.
- Mena-Segovia J, Sims HM, Magill PJ, Bolam JP (2008) Cholinergic brainstem neurons modulate cortical gamma activity during slow oscillations. *J Physiol* 586:2947–2960. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.153874>.
- Milardi D, Gaeta M, Marino S, Arrigo A, Vaccarino G, Mormina E, Rizzo G, Milazzo C, et al. (2015) Basal ganglia network by constrained spherical deconvolution: a possible cortico-pallidal pathway? *Mov Disord* 30:342–349. <https://doi.org/10.1002/mds.25995>.
- Naito A, Kita H (1994) The cortico-pallidal projection in the rat: an anterograde tracing study with biotinylated dextran amine. *Brain Res* 653:251–257. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90397-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90397-2).
- Nóbrega-Pereira S, Gelman D, Bartolini G, Pla R, Pierani A, Marin O (2010) Origin and molecular specification of globus pallidus neurons. *J Neurosci* 30:2824–2834. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4023-09.2010>.
- Oh YM, Karube F, Takahashi S, Kobayashi K, Takada M, Uchigashima M, Watanabe M, Nishizawa K, et al. (2017) Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations. *Brains Struct Funct* 222:2359–2378. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1346-2>.
- Padilla-Orozco M, Duhne M, Fuentes-Serrano A, Ortega A, Galarraga E, Bargas J, Lara-González E (2022) Synaptic determinants of cholinergic interneurons hyperactivity during parkinsonism. *Front Synaptic Neurosci* 14. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.945816> 945816.
- Quiroga-Varela A, Walters JR, Brazhnik E, Marin C, Obeso JA (2013) What basal ganglia changes underlie the parkinsonian state? The significance of neuronal oscillatory activity. *Neurobiol Dis* 58:242–248. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.05.010>.
- Rall W, Burke RE, Holmes WR, Jack JJ, Redman SJ, Segev I (1992) Matching dendritic neuron models to experimental data. *Physiol Rev* 72:S159–S186. [https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.suppl\\_4.S159](https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.suppl_4.S159).
- Rodríguez R, Kallenbach U, Singer W, Munk MH (2004) Short- and long-term effects of cholinergic modulation on gamma oscillations and response synchronization in the visual cortex. *J Neurosci* 24:10369–10378. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1839-04.2004>.
- Sah P, McLachlan EM (1995) Membrane properties and synaptic potentials in rat sympathetic preganglionic neurons studied in horizontal spinal cord slices in vitro. *J Auton Nerv Syst* 53:1–15. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(94\)00161-c](https://doi.org/10.1016/0165-1838(94)00161-c).
- Sanchez G, Rodríguez MJ, Pomata P, Murer MG (2011) Reduction of an afterhyperpolarization current increases excitability in striatal cholinergic interneurons in rat parkinsonism. *J Neurosci* 31:6553–6554. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6345-10.2011>.
- Saunders A, Granger A, Sabatini B (2015a) Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06412> e06412.
- Saunders A, Oldenburg IA, Berezovskii VK, Johnson CA, Kingery ND, Elliott HL, Xie T, Gerfen CR, et al. (2015b) A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex. *Nature* 521:85–89. <https://doi.org/10.1038/nature14179>.
- Smith Y, Villalba R (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and parkinsonian brains. *Mov Disord* 23:S534–S547. <https://doi.org/10.1002/mds.22027>.
- Soñis O, Moratalla R (2018) Dopamine receptors: homomeric and heteromeric complexes in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neural Transm* (Vienna) 125:1187–1194. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1852-x>.
- Surmeier DJ, Zhai S, Cui Q, Simmons DV (2023) Rethinking the network determinants of motor disability in Parkinson's disease. *Front Synaptic Neurosci* 15:1186484. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2023.1186484>.
- Unal CT, Golowasch JP, Zaborszky L (2012) Adult mouse basal forebrain harbors two distinct cholinergic populations defined by their electrophysiology. *Front Behav Neurosci* 6:21. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00021>.
- Wilson CJ (2005) The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron* 45:575–585. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.053>.
- Yasukawa T, Kita T, Xue Y, Kita H (2004) Rat intralaminar thalamic nuclei projections to the globus pallidus: a biotinylated dextran amine anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 471:153–167. <https://doi.org/10.1002/cne.20029>.
- Zheng ZS, Monti MM (2022) Cortical and thalamic connections of the human globus pallidus: Implications for disorders of consciousness. *Front Neuroanat* 16. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.960439> 960439.