



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS COGNITIVAS

## **DETERMINANTES SINÁPTICOS DE LA HIPERACTIVIDAD DE LAS INTERNEURONAS COLINÉRGICAS DURANTE EL PARKINSONISMO**

### **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MONTSERRAT PADILLA OROZCO

DIRECTOR DE TESIS:

JOSÉ BARGAS DÍAZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR:

DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DR. SALVADOR LEONARDO HERNÁNDEZ LÓPEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX, MARZO 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*A Socorro Orozco Cortés*

*Esta y más victorias nuestras,*

*Siempre.*

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Al Dr. José Bargas por su apoyo en el desarrollo de este y otros proyectos en el laboratorio. Por su gran influencia en mi formación académica y humana. Por el amplio conocimiento en diversas disciplinas que ha contribuido a mi desarrollo. Mi respeto y admiración.

A la Dra. Esther Lara González y a la Dra. Mariana Duhne Ramírez por su tutoría experimental, académica y personal durante toda mi formación.

Al Dr. Ernesto Rendón Ochoa por su apoyo académico, y por su contribución en mi crecimiento personal.

A los miembros del laboratorio BL-101 y BL-103, Alejandra Fuentes Serrano, Martín García Mata, Aidán Ortega, Yohana Parrado Quintana, Héctor Vázquez Vázquez y Sagat Villafranca por su retroalimentación académica y apoyo en mi desarrollo en el laboratorio.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. A. Elizabeth Hernández Echeagaray y el Dr. Salvador Hernández López por su contribución académica y retroalimentación en el desarrollo de esta investigación.

Al Físico Juan Antonio Laville Conde por la colaboración académica y resolución de problemas técnicos en cada proyecto.

Al Biol. Dagoberto Tapia Ramírez por su apoyo técnico en el laboratorio.

A la Dra. Elvira Galarraga por el apoyo académico y técnico.

A la Dra. Yasmín Ramiro Cortés y la Unidad de Imagenología del IFC por su apoyo y asesoría.

Al personal encargado del cuidado, mantenimiento y manejo de los animales utilizados para este proyecto: M.V.Z Claudia V. Rivera, M.V.Z Héctor Malagón Rivero, M.C. Xóchitl Ayala Méndez y Dra. Ariadna Aparicio Juárez.

Por el apoyo técnico, a la Unidad de Cómputo del IFC, Ana María Escalante Gonzalbo y Francisco Pérez Eugenio. Así como al Taller de Mantenimiento del IFC por la asesoría para la operación y conservación de los equipos de investigación del laboratorio: Ing. Manuel Ortínez Benavides e Ing. Aurey Galván Lobato.

A los miembros del jurado por su aporte en la revisión de esta tesis: Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray, Dra. Leticia Verdugo Díaz, Dra. Magdalena Guerra Crespo, Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar y Dr. Freddy Cifuentes Navarro.

Al Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas de la UNAM y al “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP). Este trabajo se desarrolló con el apoyo de la beca 824244 otorgada por el CONAHCyT. Y de los proyectos PAPIIT IN 202920 y IN 203020.

# INDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>1.0 INTRODUCCION</b> .....	6
1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	7
1.2 MICROCIRCUITO ESTRIATAL .....	9
1.3 INTERNEURONAS COLINERGICAS Y SU IMPORTANCIA EN EL MICROCIRCUITO ESTRIATAL.....	11
1.4 IMAGENOLOGIA DE CALCIO COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR AL MICROCIRCUITO ESTRIATAL.....	16
<b>2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	18
<b>3.0 HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>4.0 OBJETIVOS</b> .....	19
4.1 GENERAL .....	19
4.2 PARTICULARES.....	19
<b>5.0 METODOLOGIA.</b> .....	20
5.1 ANIMALES.....	20
5.2 GENOTIPIFICACION.....	21
5.3 MODELO PARKINSONIANO 6-OHDA.....	21
5.4 EVALUACION DEL MODELO PARKINSONIANO 6-OHDA .....	21
5.5 INFECCIÓN VIRAL .....	22
5.6 PREPARACION DE REBANADAS, MICROSCOPIA E IMAGENOLOGÍA DE CALCIO.....	23
5.7 ELECTROFISIOLOGIA.....	24
5.8 FÁRMACOS UTILIZADOS .....	25
5.9 INMUNOHISTOQUÍMICA .....	25
5.10 ANÁLISIS DE DATOS.....	26
<b>6.0 RESULTADOS</b> .....	31
<b>7.0 DISCUSION</b> .....	53
<b>8.0 CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>9.0 BIBLIOGRAFIA</b> .....	60
<b>10.0 SUPLEMENTARIAS</b> .....	76

## RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson es una patología neurodegenerativa provocada por la privación de dopamina (DA) debida a la pérdida de terminales de este modulador en los ganglios basales. Esta se acompaña de un aumento en la acetilcolina (ACh) y una hiperactividad patológica de las neuronas del núcleo estriado durante el parkinsonismo. En esta tesis demostramos que la hipercolinergia se debe a modificaciones específicas en el patrón de disparo de las interneuronas colinérgicas (CINs) lo que lleva a una hiperactividad generalizada del circuito parkinsoniano. Para eso tuvimos que evaluar la actividad de docenas de interneuronas colinérgicas identificadas con resolución de célula única, simultáneamente y durante varios minutos utilizando imagenología de calcio *ex vivo*, así como registros electrofisiológicos en rebanadas de cerebro de ratones ChAT-Cre. En el modelo de depleción dopaminérgica (6-OHDA; parkinsonismo experimental en roedores), mostramos que las interneuronas colinérgicas exhiben hiperactividad y un patrón de disparo en ráfagas prolongadas interrumpidas por silencios. Verificamos que la hiperactividad de las CINs se debe en parte a la modificación de sus propiedades intrínsecas. Pero lo más importante es que demostramos que las entradas sinápticas glutamatérgica y GABAérgica que inervan a las CINs contribuyen en gran medida a su hiperactividad patológica modificando su patrón de disparo. Además, también participa la propia transmisión colinérgica a través de receptores nicotínicos, lo que sugiere que la actividad coordinada de las CINs impulsa el fenómeno parkinsoniano ya que las CINs estriatales expresan autorreceptores nicotínicos, no expresados en las neuronas de proyección (SPNs: *striatal projection neurons*). Concluimos que las entradas sinápticas a las CINs desempeñan un papel importante para que exhiban hiperactividad patológica, la cual parece impulsar la de todo el circuito parkinsoniano. Estos hallazgos sugieren que la modificación de las entradas sinápticas a las CINs puede ser un objetivo terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

## 1.0 INTRODUCCION

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una afección neurodegenerativa en la que se presenta la pérdida progresiva de los niveles de dopamina (DA) en el cerebro, principalmente en los ganglios basales, la corteza y el tálamo. Esto genera la aparición de síntomas motores como son bradicinesia, rigidez y temblor en las extremidades. Estos signos se acompañan de hiperactividad generalizada y sincrónica en el núcleo estriado, la cual subyace al origen de oscilaciones electroencefalográficas anormales vinculadas a los déficits motores. Las neuronas tónicamente activas (TANs), están involucradas en la aparición de estas oscilaciones en la banda de frecuencia  $\beta$  (13-30 Hz); signo patognomónico de la EP. Existen dos clases de TANs estriatales: interneuronas de bajo umbral (LTS; *low threshold spiking*) y las propias interneuronas colinérgicas (CINs). Las CINs tienen importancia ya que son la principal fuente del modulador acetilcolina (ACh) en el núcleo estriado. Al ser la hipercolinergia estriatal una característica fundamental del parkinsonismo, esto debe de originarse de una actividad alterada de las CINs; sin embargo, esto no se había demostrado antes del presente trabajo. Los trabajos previos exhiben un debate contradictorio sobre las modificaciones en la actividad de las CINs estriatales.

Estas diferencias en los resultados se deben a las diferentes aproximaciones experimentales de cada grupo de investigación (modelo de parkinsonismo, diferentes resoluciones temporales y espaciales de cada técnica de registro, presencia de antagonistas, temperatura y tiempo de registro, etc.), es por eso que en este trabajo utilizamos una técnica de multiregistro con imagenología de calcio para examinar la actividad espontánea de docenas de neuronas simultáneamente por largos periodos de tiempo y con resolución de célula única. Esta técnica en conjunto con registros electrofisiológicos de *patch-clamp* nos permitió identificar a las CINs, y observar los cambios en su actividad bajo distintas condiciones experimentales. Utilizamos antagonistas farmacológicos para identificar y evaluar las diferentes entradas sinápticas que tienen como blanco a las CINs para determinar su aporte a esta actividad.

## 1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) ocupa la segunda posición a nivel mundial como la enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia justo después de la enfermedad de Alzheimer (Instituto de las Persona Adultas Mayores, 2019). Afecta de manera crónica y progresiva las zonas del cerebro encargadas del control y coordinación del movimiento, del tono muscular y de la postura. Es una enfermedad multifactorial, es decir; su etiología consta de la suma de una gran variedad de factores como lo son: predisposición genética, envejecimiento, exposición a tóxicos del ambiente, así como toxinas provenientes de la flora intestinal patológica.

La primera descripción de la EP fue realizada por James Parkinson en el siglo XIX, los síntomas motores que incluía eran bradicinesia, rigidez muscular, temblor en reposo e impedimentos en la postura y la caminata (Kalia et al, 2015). También se presentan síntomas no motores como dificultades cognitivas, disfunción autonómica, dolor y fatiga. Particularmente, hay síntomas no motores que preceden a la aparición de síntomas motores en la enfermedad, a veces por décadas, y que tienen cierta capacidad predictiva respecto al desarrollo de la misma. Estos incluyen disfunción olfatoria, depresión, exceso de sueño durante el día, desorden en el sueño con movimientos oculares rápidos y estreñimiento (Kalia et al, 2015).

Uno de los principales mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de Parkinson es la pérdida pronunciada de neuronas productoras de dopamina (DA) que se localizan en la sustancia nigra compacta (SNc) y que proyectan al estriado (Bergman et al., 1998). Se plantea como causa de la muerte neuronal de las neuronas dopaminérgicas la acumulación de alfa-sinucleína, descrita en pacientes de EP en varias áreas cerebrales (Polymeropoulos et al. 1997). En algunos casos, debida a mutaciones puntuales. Sin embargo, son pocos los casos que se pueden explicar por causas genéticas (Wood-Kaczmar et al, 2006). Otro signo de la EP, detectado en pacientes no medicados es la presencia de oscilaciones anormales en frecuencia beta (15-30Hz) y gamma (60-80Hz) en registros de actividad cerebral (Brown et al, 2007). Estas ráfagas oscilatorias híper-sincrónicas (HO), se observan

tanto en los GB (particularmente en el núcleo subtalámico - STN y en el globo pálido externo - GPe) (Bevan et al, 2002), como en la corteza y el tálamo (Bergman et al, 2002; Rivlin-Etzion, et al., 2006).

Para la investigación experimental se han desarrollado y empleado una gran variedad de modelos animales para estudiar la enfermedad de Parkinson. Actualmente, se dividen en dos categorías: modelos genéticos y neurotóxicos. Dentro de los modelos genéticos predominan aquellos en los que se produce la delección de genes implicados en mecanismos potenciales para el desarrollo de la enfermedad, como son los genes que expresan parkinas (*PARK2*),  $\alpha$ -sinucleína (*PARK1/4*), las proteína PINK1 (*PARK6*) y DJ-1 (*PARK7*) principalmente. Estos modelos presentan la desventaja de que no siempre producen degeneración neuronal en los roedores y por tanto el desarrollo del fenotipo característico de la enfermedad no siempre ocurre (Bezard et al. 2011). Por ésta razón se recurre a los modelos con neurotoxinas que se inyectan en la SNc o fibras del haz medial, donde se induce neurotoxicidad de las neuronas dopaminérgicas. Los modelos más comunes son: la lesión por MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) en primates (Langston et al, 1984; 1989), la lesión unilateral de la SNc por 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina) en ratón (Ungerstedt, 1968) y rata (Schultz et al, 1982), y la administración sistémica de rotenona en roedores (Greenamyre et al., 2003).

La 6-OHDA es un análogo hidroxilado de la dopamina que induce degeneración de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas por la alta afinidad a sus transportadores de membrana (Luthman et al. 1989). Una vez en el citosol, esta molécula es oxidada, generando especies reactivas de oxígeno que llevan a la neurona a muerte por estrés oxidativo.

Los modelos animales con neurotoxinas coinciden en síntomas y signos con los pacientes con EP, como la presencia de HO en monos tratados con MPTP (Nini et al, 1995). En particular, el modelo murino de parkinsonismo por lesión de la SNc con 6-OHDA ha permitido estudiar las oscilaciones en la actividad eléctrica de los ganglios basales, principalmente en el STN y GPe (Bevan et al, 2002; Wichmann &

DeLong, 1999). Además, se ha reportado actividad espontánea sincronizada de las neuronas del estriado utilizando la preparación de rebanadas cerebrales mantenidas *in vitro* (Plata et al., 2008; Jaidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016).

La ausencia de dopamina en el estriado promueve alteraciones en el disparo de las neuronas tónicamente activas (presuntas CINs) así como la aparición de oscilaciones en la banda beta, sugiriendo mayor sincronización y ritmo (Bergman et al., 2016; Raz et al., 1996), además que su excitabilidad aumenta (Tubert et al., 2016). Mediante la estimulación de las interneuronas colinérgicas por optogenética y electrofisiología se mostró el aumento reversible de las oscilaciones alfa, beta y gamma en el estriado y las capas profundas de la corteza sensoriomotora (Kondabolu et al., 2016). De manera complementaria, estudios actuales han demostrado que la inhibición puntual de las interneuronas colinérgicas, alivia los síntomas motores en un modelo animal de parkinsonismo (Maurice et al., 2015) y reduce temporalmente las oscilaciones patológicas (Kondabolu et al., 2016). Lo que sugiere que una exacerbada actividad de estas interneuronas podría correlacionarse con la bradicinesia y rigidez presentes en los pacientes con enfermedad de Parkinson. Pero comprobar esta hiperactividad ha resultado controversial.

El aumento en la actividad de las CINs explicaría el incremento en las concentraciones de ACh reportadas en el núcleo estriado ante la pérdida de terminales dopaminérgicas; y por lo tanto, al desbalance entre los moduladores DA y ACh. Basándose en observaciones clínicas, está demostrado que los fármacos anticolinérgicos alivian el temblor (Lang, 2002) mientras que los agonistas de dopamina son efectivos para abatir los síntomas motores presentes en la enfermedad de Parkinson.

## *1.2 MICROCIRCUITO ESTRIATAL*

Un microcircuito neuronal se define como un conjunto mínimo de neuronas (o módulo) que interactúan entre sí de manera funcional; es decir, presentan actividad correlacionada o generan patrones temporales y espaciales de actividad

de manera espontánea o en respuesta a algún tipo de estímulo (Carrillo-Reid, 2008). En el estriado este microcircuito se conforma de las neuronas de proyección y de un pequeño grupo de interneuronas. Las interneuronas regulan dinámicamente las propiedades de los circuitos neuronales en cada una de las regiones del cerebro (Kruglikov et al., 2008). Hay una amplia diversidad de subtipos de interneuronas en el hipocampo, la corteza y el estriado.

En el estriado, un 5-7% de las células estriatales corresponden a interneuronas GABAérgicas, cuyas proyecciones locales inhibitorias tienen tres tipos de disparo: 1) disparo rápido (FS; *fast spiking*), que se distinguen por su expresión de parvalbúmina (proteína quelante de calcio), 2) de bajo umbral de disparo (LTS; *low threshold spiking*), que expresan neuropéptidos como somatostatina (SOM), neuropéptido Y (NPY) y la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) o bien calretinina. 3) de disparo variado que expresan el receptor 5HT<sub>3a</sub> o la enzima tirosina-hidroxilasa (TH) (Munoz-Manchado et al., 2016; Tepper et al., 2010). Las interneuronas restantes son las colinérgicas (CINs), que conforman aproximadamente del 1 al 3% y se distinguen por presentar tres tipos de patrón de disparo: en ráfagas, irregular y regular (Murer et al., 2011)

Estas poblaciones neuronales del estriado se encuentran finamente reguladas por los neuromoduladores: DA, ACh, serotonina (5-HT o 5-hidroxitriptamina), así como diversos neuropéptidos incluyendo a los ya mencionados y los opiáceos (Graybiel., 1990). Se estudia cómo estos moduladores afectan la actividad del microcircuito estriatal, en particular, Carrillo-Reid et al., 2009 muestran que la activación de los receptores muscarínicos para ACh incrementan significativamente la actividad de la red neuronal, acompañada por la formación de diversos ensambles neuronales e incremento en la coactividad de las neuronas. Debido a que en condiciones de privación dopaminérgica existe un aumento en los niveles de acetilcolina en estriado, se ha sugerido que la actividad de las CINs se modifica; sin embargo, no se ha demostrado cómo es que esta actividad cambia y cómo cambia la dinámica poblacional del microcircuito estriatal. La participación colinérgica en el circuito es robusta, se modula a través de receptores ionotrópicos (nicotínicos: nAChRs) y

metabotrópicos (muscarínicos: mAChRs) afectando la actividad de las diversas poblaciones neuronales del núcleo estriado. A su vez recibe gran número de sinapsis intraestriatales y extraestriatales que modulan su actividad, por lo que cualquier cambio puede obedecer fenómenos de red y de conectividad funcional del microcircuito.

### *1.3 INTERNEURONAS COLINÉRGICAS Y SU IMPORTANCIA EN EL MICROCIRCUITO ESTRIATAL.*

Hay tres sistemas colinérgicos principales: 1) Las motoneuronas situadas en la médula espinal y el rombencéfalo. 2) El sistema de proyección ubicado mayoritariamente en el prosencéfalo basal y en el tallo cerebral, desde el cual las neuronas colinérgicas proyectan principalmente a diferentes cortezas cerebrales, los GB, el hipocampo y el sistema límbico. 3) El sistema local hallado recientemente en corteza (Granger et al., 2020) y principalmente en el estriado, a cargo de las interneuronas colinérgicas (Zhou, 2002). El estriado recibe proyecciones de neuronas colinérgicas que provienen del núcleo pedunculopontino (PPN) y el núcleo tegmental laterodorsal (LDT) (Dautan et al., 2014).

Las interneuronas colinérgicas se identifican morfológicamente por el diámetro del soma que puede exceder 30  $\mu\text{m}$  mientras que el soma de las SPNs mide de 12 a 15  $\mu\text{m}$  aproximadamente (Kawaguchi, 1995). Las características electrofisiológicas incluyen disparo tónico de potenciales de acción en un rango de 3-10Hz, potencial de membrana en reposo de  $-64.5 \pm 1.4$  mV, resistencia de entrada de  $242 \pm 43$  M $\Omega$ , prominente corriente catiónica activada por hiperpolarización ( $I_h$ ), y amplia duración del potencial de acción ( $2.35 \pm 0.135$  ms) (Aosaki et al., 1998; Arias-García et al., 2017; Paz et al., 2021). Estas interneuronas liberan acetilcolina (ACh) como neurotransmisor principal, pero también algunas subpoblaciones pueden co-liberar glutamato y GABA (Gras et al., 2008; Higley et al., 2011; Guzmán et al., 2011; Nelson et al., 2014; Kljakic et al., 2021; Lozovaya et al., 2018; 2023)

La diversidad de receptores colinérgicos expresados en el estriado está localizada tanto presináptica como postsinápticamente, lo que sugiere que las interneuronas

colinérgicas ejercen una gran influencia en el funcionamiento estriatal (Goldberg et al., 2012). Los receptores muscarínicos (mAChRs) son una familia de receptores que se acoplan a distintas familias de proteínas G. Su activación conduce a la generación de segundos mensajeros que van a incrementar la excitabilidad neuronal o disminuirla dependiendo del tipo de proteína G al cual se acoplen. En general, los subtipos de receptores M1, M3 y M5 se acoplan a proteínas Gq e incrementan la actividad, mientras que los receptores M2 y M4 se acoplan a proteínas Gi/o, disminuyendo la actividad neuronal (Tao y Conn., 2014). Los receptores nicotínicos (nAChRs) son canales iónicos activados por ligando, implicados en los rápidos efectos fáscicos de la ACh.

Se ha descrito una gran diversidad de efectos de la modulación colinérgica tanto en los distintos tipos neuronales del núcleo estriado como en las entradas sinápticas, sugiriendo que las CINs moldean la actividad del microcircuito.

Las interneuronas colinérgicas incrementan la excitabilidad de las neuronas espinosas de proyección a través de la activación postsináptica de receptores muscarínicos (M1 expresados en las neuronas de proyección de las vías indirecta y directa: iSPNs y dSPNs; el M4 expresado únicamente en las dSPNs); regulan corrientes iónicas dependientes de voltaje (Carrillo-Reid et al., 2009b; Galarraga et al., 1999; Goldberg et al., 2012; Hernández-Flores et al., 2014; Perez-Rosello et al., 2005; Shen et al., 2005; Shen et al., 2007; Vilchis et al., 2002), entre las que sobresalen las corrientes persistentes de sodio (Carrillo-Reid et al., 2009b) facilitando los cambios en los patrones temporales de salida en función del entorno al que se debe responder (Prado et al., 2017). A nivel presináptico, se ha demostrado que la entrada glutamatérgica a las SPNs se inhibe por activación de los receptores muscarínicos M2 y M3 (Malenka y Kocsis, 1988; Sugita et al., 1991; Calabresi et al., 1998b; Hernández-Echeagaray et al., 1998).

La ACh también modula la actividad de las interneuronas GABAérgicas del núcleo estriado:

- La regulación ejercida hacia las interneuronas de disparo rápido (FS: *Fast-Spiking*) puede ser inhibitoria, a través de receptores muscarínicos

presinápticos; o excitatoria, a través de receptores nicotínicos postsinápticos (Koós and Tepper, 2002). Sin embargo, no existe conexión sináptica directa de las FS a las CINs (Chang and Kita, 1992).

- La modulación colinérgica sobre las interneuronas GABAérgicas neurogliformes (NFG) ocurre a través de dos mecanismos nicotínicos: 1) una conexión monosináptica (CINs-NGF) y 2) una conexión disináptica, que involucra la regulación presináptica de las terminales glutamatérgicas del núcleo parafascicular del Tálamo (Assous et al., 2017).
- Los mecanismos de modulación colinérgica ejercida sobre las interneuronas de bajo umbral de disparo LTS involucran inhibición y excitación a través de los receptores muscarínicos y nicotínicos, respectivamente (Elghaba et al., 2016; Melendez-Zaidi et al., 2019; Frost Nylén et al., 2021). Las interneuronas LTS, a su vez, liberan óxido nítrico que despolariza las interneuronas colinérgicas, proporcionando la base para un mecanismo de retroalimentación positiva entre los dos tipos de interneuronas (Elghaba et al., 2016).

Se ha descrito que las CINs están interconectadas funcionalmente entre sí, y que regulan su actividad poblacional a través de una conexión polisináptica inhibitoria que involucra la activación nicotínica de interneuronas TH GABAérgicas principalmente y de terminales dopaminérgicas provenientes de la SNc que liberan tanto dopamina como GABA (Dorst et al., 2021). También está implicada la función de los autoreceptores M2/M4 de esta población, que ejercen un control de retroalimentación negativa sobre la liberación de ACh, hiperpolarizando a las CINs a través de la inhibición de la corriente de calcio Cav2 y la apertura de las corrientes de potasio (Yan y Surmeier, 1996; Calabresi et al., 1998). Esta conexión entre CINs estriatales mejora la sincronía poblacional y transmite la señal de pausa característica en eventos relacionados con recompensa (Sullivan et al., 2008). En ausencia de DA, se describe la atenuación de la funcionalidad de este autorreceptor, por lo que la regulación negativa se suprime y se podría provocar un aumento en la actividad colinérgica (Ding et al., 2006).

Por último, las terminales dopaminérgicas que recibe el estriado expresan receptores M2/M4; que disminuyen la probabilidad de liberación de dopamina, y nicotínicos (subunidades  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 6\beta 2$ ), que por el contrario la aumentan (Exley y Cragg, 2008; Gonzales y Smith, 2015; Gotti et al., 2009; Jones et al., 2001; Salminen et al., 2004; Threlfell et al., 2012; Wada, 1989; Zoli et al., 2002).

Debido a la alta inervación de las CINs desde dentro y fuera del estriado, es muy probable que exista una modificación en la estructura sináptica que puede estar contribuyendo a la modificación de la actividad de las interneuronas colinérgicas cuando hay privación de dopamina.

Las interneuronas colinérgicas reciben diferentes tipos de entradas sinápticas: 1) Excitatorias glutamatérgicas, que provienen principalmente de la corteza y el tálamo (Bolam, 2000; Ding et al., 2010; Doig et al., 2014; Guo et al., 2015; Lapper y Bolam, 1992), mediadas por los receptores NMDA, AMPA y kainato (Calabresi et al., 1998b) La sustancia P, neuropéptido mayoritariamente co-liberado por las neuronas dSPN también aumenta la excitabilidad de las CINs (Aosaki y Kawaguchi, 1996; Bell et al., 1998; Perez et al., 2007; Govindaiah et al., 2010). 2) Inhibitorias, que provienen principalmente de las SPNs (Bolam et al., 1986; Gonzales et al., 2013; Gonzales y Smith, 2015; Jabourian et al., 2005; Le Moine et al., 1994; Mulder et al., 1984; Pickel et al., 2000; Ponterio et al., 2013), las interneuronas GABAérgicas intraestriatales (Assous et al., 2017; Elghaba et al., 2016; Straub et al., 2016), neuronas GABAérgicas extraestriatales tales como las neuronas arquipalidales del GPe y de terminales provenientes de SNc (Chuhma et al., 2014; Mallet et al., 2012; Straub et al., 2014), 3) Modulación dopaminérgica proveniente de la SNc mediada por los receptores D2, a través de los cuales se suprime su actividad marcapaso (Deng et al. 2007) y disminuye la liberación de acetilcolina (Surmeier, 2012); y receptores D5, que aumentan su excitabilidad promoviendo la apertura de canales catiónicos no selectivos y el cierre de canales de potasio (Yan et al., 1997). Las CINs muestran pausas durante la activación tónica en respuesta a estímulos sensoriales durante el aprendizaje *in vivo*, que se ha asociado a diversos mecanismos, entre los cuales se encuentra la activación del receptor D2. Por lo tanto una de las hipótesis que

explican la hipercolinergia es que la ausencia de dopamina anula la pausa y la actividad aumenta.

Se han descrito diversos mecanismos que pueden estar promoviendo la hipercolinergia; sin embargo, hasta este trabajo no se habían realizado estudios poblacionales que muestren la contribución neta de cada entrada sináptica al cambio en la actividad de las CINs, y cómo esta población estriatal influye en la hiperactividad patológica del núcleo estriado.

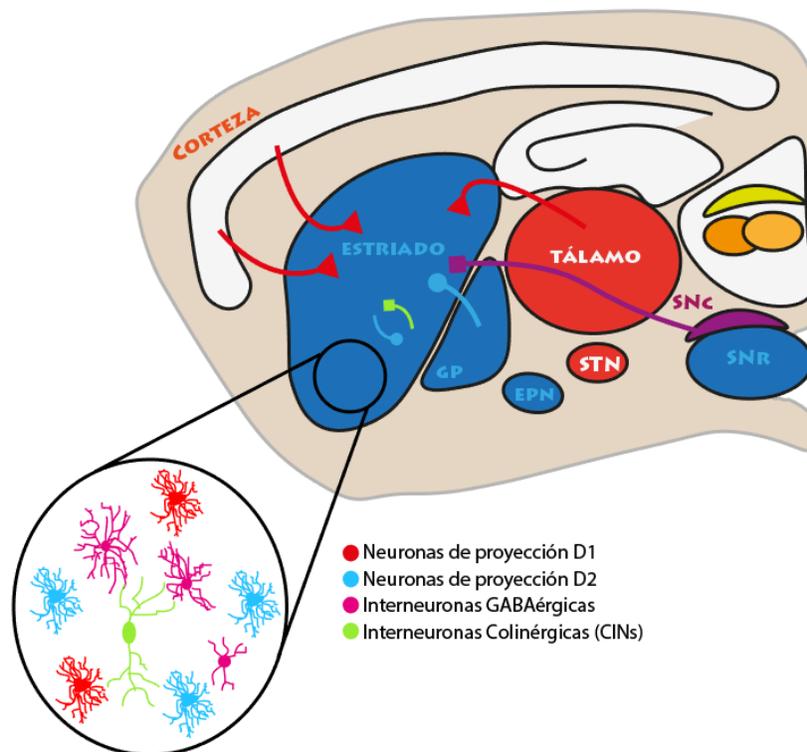


Figura complementaria. Esquema simplificado de los ganglios basales. Se muestran **las entradas sinápticas** glutamatérgicas (flechas rojas), GABAérgicas (flechas azules), nicotínicas (flecha verde) y dopaminérgicas (flecha morada) que reciben las interneuronas colinérgicas y que se ha demostrado que participan en la modulación de su actividad. En el acercamiento se representa la variedad poblacional del núcleo estriado. GP: *globo pálido externo*; EPN: *Núcleo entopeduncular*; STN: *Núcleo subtalámico*; SNr: *substancia nigra pars reticulata*; SNc: *Substancia nigra pars compacta*.

#### 1.4 IMAGENOLOGIA DE CALCIO COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR AL MICROCIRCUITO ESTRIATAL.

Actualmente existen herramientas de registro multicelular como: registros de campo y registros extracelulares con multielectrodos, que permiten el análisis simultáneo de cientos de células. La desventaja es que éstas técnicas de registro electrofisiológico no identifican a las células registradas y muchas veces no hay resolución de célula única.

La imagenología de calcio es una técnica de registro que utiliza indicadores de calcio para seguir de manera indirecta la actividad de decenas de neuronas identificadas en el tiempo con resolución de célula única. Un indicador de calcio es una proteína fluorescente acoplada a un agente quelante que puede formar complejos selectivos y reversibles con iones calcio. Al momento de unirse al ion libre, incrementa su señal de fluorescencia (fluoróforos no radiométricos), por lo tanto, permite detectar si ocurrió un cambio en la concentración de este catión dentro de una neurona (Göbel, 2007). En reposo, la concentración de calcio intracelular en una neurona es de 50-100 nM, que puede elevarse transitoriamente de 10 a 100 veces durante el disparo de potenciales de acción (Berridge, 2003). Por lo tanto, un aumento en la concentración de calcio intracelular libre es indicativo de actividad neuronal. Por lo tanto, la señal registrada con esta técnica representa una medición indirecta de la actividad eléctrica neuronal, a la cual podemos referirnos como "*actividad eléctrica inferida*". El uso de ratones transgénicos y sistemas de recombinación permite registrar selectivamente poblaciones de células tanto *in vivo* como *in vitro* (Göbel, 2007).

Los indicadores de calcio GCamp están conformados por una proteína verde fluorescente (EGFP) flanqueada en un extremo por la proteína de unión a calcio; calmodulina, y por el otro extremo por el péptido de unión a calmodulina M13 (Nakai et al., 2001). En presencia de calcio, la interacción de la calmodulina con M13 provoca un cambio conformacional que permite un incremento en la fluorescencia.

La variante modificada GCaMP6f (Kd~375 nM) puede emitir una señal fluorescente desde que se dispara un potencial de acción, la señal tarda ~50 ms para llegar al pico y su tiempo de caída media es de ~140 ms. Esta variante incorpora una mutación (A317E) que interrumpe la interacción M13/CaM, lo que afecta la unión y permite una liberación de calcio más rápida (Akerboom et al., 2012)

Con el uso de vectores virales (Virus Adeno-asociados: AAV) se puede realizar la infección local en la región cerebral de interés para la expresión del indicador de calcio (Kumar, 2001). Es importante asegurar la especificidad de la infección y marcar solamente las neuronas de interés, por esta razón se utilizan promotores específicos de cada tipo celular y estrategias como el uso del sistema Cre-Lox. En el caso de las neuronas colinérgicas, se utilizó un transgénico cuya Cre recombinasa estuviera regulada por la enzima ChAT. Este diseño experimental nos permite marcar y seguir selectivamente la actividad de las neuronas ChAT positivas o interneuronas colinérgicas.

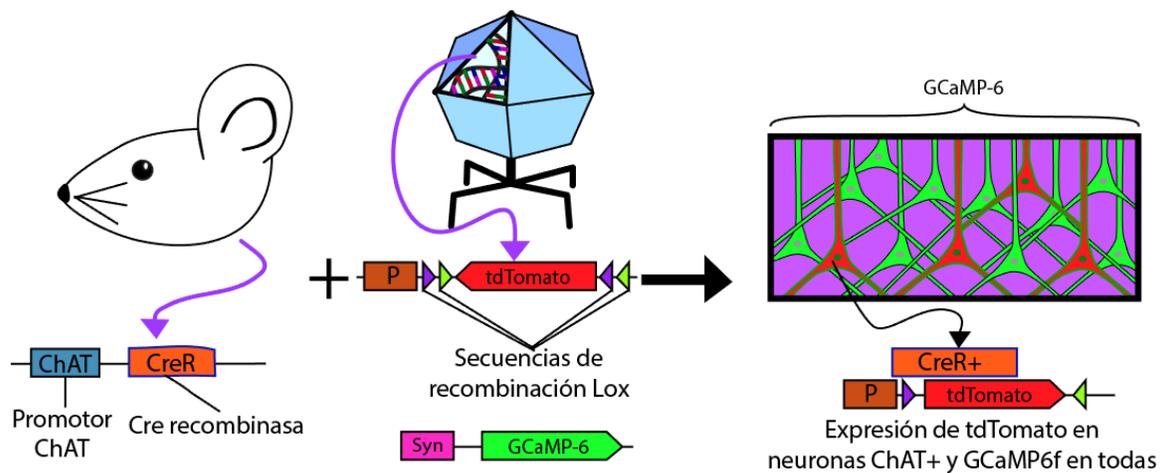


Figura complementaria. Esquema de la estrategia experimental utilizada para la expresión simultánea del indicador de calcio GCaMP6f y la proteína tdTomato para la identificación de las interneuronas colinérgicas.

## 2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la enfermedad de Parkinson, la pérdida de la regulación dopaminérgica se acompaña de un estado de hipercolinergia en el estriado (Galarraga et al., 1999; Schulz and Reynolds, 2013). También aparece una actividad oscilatoria en la banda beta en neuronas tónicamente activas, entre las que se encuentran las CINs. Estas oscilaciones son un signo patognomónico de la EP que sucede acompañado de síntomas motores como bradicinesia y rigidez. En la clínica, se utilizan fármacos anticolinérgicos para reducir los síntomas motores de la EP. Un estudio *in vivo* en un modelo murino de parkinsonismo mostró que el silenciamiento de las CINs con técnicas optogenéticas reduce la bradicinesia provocada por la depleción dopaminérgica (Maurice et al., 2015). En conjunto, esta evidencia sugiere que el cambio en la actividad de las CINs influye en gran medida en la presencia de hipercolinergia y la hiperactividad patológica y sincronización asociadas. Sin embargo, al iniciar este trabajo se desconocían los cambios en la actividad poblacional de las CINs a causa de la pérdida de regulación dopaminérgica en el estriado, siendo la literatura contradictoria a este respecto. Con un diseño experimental que nos permite evaluar la actividad neuronal poblacional, nos preguntamos ¿cómo contribuye la hiperactividad de las CINs, en caso de encontrarla, al subsecuente re-arreglo del microcircuito estriatal en un modelo murino de parkinsonismo?

## 3.0 HIPÓTESIS

Las interneuronas colinérgicas aumentarán su actividad (*actividad eléctrica inferida*) neta al disminuir la modulación dopaminérgica en el núcleo estriado, explicando así la hipercolinergia del parkinsonismo. Este aumento de actividad se acompañará de un cambio en su patrón temporal de disparo tanto por cambios en las propiedades intrínsecas de las CINs como por una reestructuración de sus entradas sinápticas.

## 4.0 OBJETIVOS

### 4.1 GENERAL

Caracterizar la actividad y participación de las interneuronas colinérgicas en el microcircuito estriatal en condiciones control y en un modelo parkinsoniano en el ratón.

Describir la contribución de las entradas sinápticas en la actividad de esta población neuronal en ambas condiciones.

### 4.2 PARTICULARES

- Identificar a las interneuronas colinérgicas mediante la infección con constructos virales para la expresión de tdTomato bajo el promotor de acetilcolintransferasa (ChAT) con el sistema Cre-Lox.
- Generar un modelo murino de parkinsonismo mediante la lesión unilateral de la sustancia nigra pars compacta (SNc) con la neurotoxina 6-OHDA y realizar su validación con conducta de giro e inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa en el estriado y la SNc.
- Caracterizar la actividad de las interneuronas colinérgicas mediante registros simultáneos de imagenología de calcio utilizando el indicador GCaMP6f y electrofisiológicos a través de la técnica de *patch clamp* en célula entera en condición control y en el modelo de parkinsonismo con 6-OHDA.
- Cuantificar la actividad de las interneuronas colinérgicas identificadas durante registros de imagenología de calcio en las condiciones control y en el modelo de parkinsonismo con 6-OHDA, y compararla con la actividad de las neuronas restantes del microcircuito estriatal no identificadas como CInS.

- Analizar la contribución de las entradas sinápticas glutamatérgicas, GABAérgicas y nicotínicas en la actividad de las CINs, mediante el uso de bloqueadores farmacológicos.

## **5.0 METODOLOGIA.**

### *5.1 ANIMALES.*

Los sujetos experimentales provienen de la cepa B6; 129S6-Chat<sup>TM2</sup>.cre/Lowl/J (ratones ChAT-cre; stock JAX: 006410) de los laboratorios Jackson. El apareamiento se lleva a cabo entre ratones homocigotos para la preservación y reproducción de la cepa. Un total de 144 animales machos y hembras se utilizaron para los grupos experimentales control y modelo de parkinsonismo con 6-OHDA. Los protocolos fueron diseñados y realizados según lo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM (NOM- 062-Z00-1999; protocolos de laboratorio JBD-59-15) de acuerdo con las normas internacionales para el uso ético de animales de experimentación establecidas en la Guía de los Institutos Nacionales de Salud de USA para el cuidado y uso de animales de laboratorio, octava edición (Consejo Nacional de Investigaciones, 2011). Los ratones fueron criados y alojados en nuestras instalaciones para animales en una habitación libre de patógenos y con temperatura controlada, en un ciclo de luz y oscuridad de 12:12h, con comida e ingesta de agua *ad libitum*. Se extrajeron muestras experimentales de animales que expresan Syn-GCaMP6f y tdTomato-FLEX para imagenología de calcio y ensayos de inmunohistoquímica (n = 18 animales), GCaMP6f-FLEX para registrar la actividad únicamente de las interneuronas colinérgicas con imagenología de calcio (n = 61 animales), o tdTomatoFLEX para registros electrofisiológicos (n = 65 animales). Se realizó una elección al azar de cada camada para diferentes experimentos.

## 5.2 GENOTIPIFICACION.

Para la genotipificación se realizó un análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el DNA genómico obtenido de la cola del ratón con el Kit REDEExtract-Sigma (No.Cat. R4775), utilizando los siguientes cebadores: *forward*, 5-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3 y *reverse*, 5-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3. La reacción de amplificación se llevó a cabo en 30 ciclos de 94°C-30 min para desnaturalización el DNA, 64°C-40 min para el alineamiento de los oligonucleótidos y para la fase de extensión del material genético 72°C- 5 min. La temperatura de enfriamiento utilizada fue de 4°C.

Las PCRs se realizaron en un termociclador iCycler Thermal (Bio-Rad), y los productos de PCR se visualizaron a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Finalmente, se obtuvo la imagen de los amplicones utilizando GelRed y un escáner digital con el sistema de adquisición Bio-Vision (Vilber-Lourmat).

## 5.3 MODELO PARKINSONIANO 6-OHDA

Para el modelo parkinsoniano se utilizaron 69 ratones a los que se les realizó una lesión unilateral en el hemisferio derecho con 0.6 µL de la neurotoxina 6-OHDA (10 mg/mL) en la SNc (Anteroposterior – 2.6 mm, ventrolateral -1.5 mm, y dorsomedial -4.7 mm, desde bregma). Después de 10 min de difusión, cada ratón se suturó, y fue colocado en rejillas calentadoras hasta que despertó. El estado de salud de los ratones fue monitoreado en los siguientes 15 días, durante los cuales se administraron cuidados postoperatorios, incluida la administración de antibióticos, analgésicos y antiinflamatorios. Cuando se detectó una pérdida de peso mayor al 20%, se realizó con una inyección diaria de 50 µL de glucosa al 2% en solución salina. Después de 10 días post-operatorios, se prosiguió a la evaluación de la conducta de giro.

## 5.4 EVALUACION DEL MODELO PARKINSONIANO 6-OHDA

Para la evaluación del modelo se siguió un protocolo de conducta de giro en el que se cuentan los giros dados por el sujeto experimental lesionado 10 días después de

la cirugía con el software RotaCount. Para la cuantificación de los giros se sujetó cada ratón a un arnés conectado al contador controlado por el software, y se administraron subcutáneamente 1ml/Kg de peso de apomorfina (concentración 0.5 mg/ml), agonista dopaminérgico no selectivo. Después de 15 minutos de la administración se realizó el conteo de los giros a 180° y 360° en ambas direcciones por 60 minutos. Los ratones se consideraron un modelo exitoso de privación dopaminérgica cuando exhibieron más rotaciones contralaterales que ipsilaterales (al menos 60 rotaciones contralaterales por hora y pocas o ninguna rotación ipsilateral). La eficacia de la lesión fue del 65 % según lo medido por esta prueba (Lara-González et al., 2019). En algunos de los experimentos descritos se utilizaron los hemisferios lesionados de ratones 6-OHDA. Los experimentos se realizaron en ratones bien lesionados de 3 a 4 semanas después de la evaluación de conducta de giro (Pollack et al., 1997). Se utilizaron como controles los ratones que no pasaron la prueba de conducta de giro debido a una lesión fallida, aquellos que no tenían lesión y aquellos que sólo recibieron inyección salina en vez de 6-OHDA. No se encontraron diferencias entre estos tres grupos y sus resultados se agruparon. Se eligieron los ratones con más de 70 giros completos en dirección contralateral a la lesión como bien lesionados.

### *5.5 INFECCIÓN VIRAL*

Se utilizaron vectores de virus adenoasociados (AAV) para expresar GCaMP6f en interneuronas colinérgicas (neuronas ChAT positivas) o co-expresar tdTomato en las CINs más GCaMP6f bajo el promotor de sinapsina para su expresión en todas las neuronas. Las diluciones de co-expresión fueron 1:1. Los vectores virales pAAV.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 y pAAV.Syn.Flex.GCaMP6f.WPRE.SV40 se obtuvieron del Proyecto de Efectores e Indicadores Neuronales Codificados Genéticamente (GENIE) y Douglas Kim (preparación viral Addgene n.º 100837-AAV12; RRID: Addgene\_100837; preparación viral Addgene n.º 100833-AAV13; RRID: Addgene\_100833, Dana et al., 2016). El vector viral AAV pCAG-FLEX-tdTomato-WPRE fue una donación de Hongkui Zeng (preparación viral Addgene n.º 51503-AAV14; RRID: Addgene\_51503). Los ratones fueron anestesiados mediante

inyección intraperitoneal de solución de ketamina (85 mg/kg) y xilazina (15 mg/kg) para posteriormente realizar cirugía estereotáxica inyectando 0,6 ml de vector viral (100 ml con un título  $\geq 1 \times 10^{13}$  vg/ml) en las coordenadas AP +0,9 mm, LM -1,7 mm y DV -2,8 mm de Bregma (correspondiente al cuerpo estriado dorsolateral) a una velocidad de 0,1 ml/min con una aguja dental. En este proceso, se colocaron lágrimas artificiales en los ojos de los ratones para evitar daños. La temperatura corporal fue monitoreada durante la operación y postoperatoriamente hasta la completa recuperación del animal. Los ratones se recuperaron en 3 semanas, durante las cuales se implementaron acciones de cuidado para minimizar el dolor y la incomodidad (ver arriba). Todos los experimentos *in vitro* se realizaron en 75 ratones control y 69 ratones hemiparkinsonianos.

#### *5.6 PREPARACION DE REBANADAS, MICROSCOPIA E IMAGENOLOGÍA DE CALCIO.*

Los animales se anestesiaron con: clorhidrato de ketamina (85 mg/kg ip)/ xilazina (15 mg/kg ip) (ANESKET®). Después, se sometieron a perfusión cardiaca con 5 mL de solución de sacarosa fría (que contiene: 234 mM sacarosa; 7 mM dextrosa; 28 mM NaHCO<sub>3</sub>; 2.5 mM KCl; 7 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.44 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>). Posteriormente se realizó la extracción del cerebro. Los hemisferios se separaron y se obtuvieron rebanadas parahorizontales de 250  $\mu$ m de grosor utilizando un vibratomo PELCO easiSlicer (Ted Pella, Redding, CA). Durante la obtención de rebanadas el cerebro se mantuvo embebido en solución de sacarosa fría. Las rebanadas se transfirieron a una solución de líquido cefalorraquídeo artificial con saturación del 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>; pH: 7.4, osmolaridad de 300  $\pm$  5 mOs/L, que contiene: 126 mM NaCl; 11 mM dextrosa; 26 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0.2mM tiourea; 0.2mM ac. ascórbico; 3 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 mM CaCl<sub>2</sub> donde se dejaron reposar por media hora a temperatura ambiente (22-30°C) antes de continuar.

Las rebanadas se transfirieron a una cámara de perfusión en el escenario de un microscopio vertical equipado con un objetivo de inmersión en agua 20X (Olympus XLUMPLFLN Objective, 1 NA, 2 mm WD; New York). Para los registros de imagenología de calcio, la estimulación de los fluoróforos se realizó con un

controlador LED Lambda HPX de alta potencia acoplado a filtros de emisión de excitación específicos según los parámetros GCaMP6f: excitación: 460–480 nm, emisión: 495–540 nm (Olympus, U MGFPHQ), y los correspondientes a tdTomato: excitación 565/20 nm (Chroma Technology Corporation, D565/20 m), emisión 610/75 nm (Chroma Technology Corporation, HQ610/75 m). Las grabaciones de imágenes se obtuvieron con una cámara CoolSnap K4 (6-7 cuadros por segundo), controlada por Im-Patch©, un software de acceso abierto (<http://impatch.ifc.unam.mx/>) hecho en el laboratorio. El campo de observación fue de 800 x 800  $\mu\text{m}$ . Se observó actividad neuronal de las neuronas identificadas como CINs en ratones ChAT-cre utilizando la señal GCaMP6f. Se administró una solución de KCl (15 mM) al final de todos los experimentos para determinar la viabilidad de las neuronas, analizando únicamente aquellos que presentaron más del 85% de células viables.

## 5.7 ELECTROFISIOLOGIA

Además de identificar las CINs de ratones ChAT-cre con transfecciones virales, se registró su actividad para identificar su perfil electrofisiológico, como se describió anteriormente, en ausencia de cualquier neurotransmisor o fármaco (Aosaki et al., 1994; Bennett y Wilson, 1998 , 1999; Bennett et al., 2000; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016), para comparar una serie de propiedades intrínsecas, como la tasa de disparo espontáneo, la resistencia de entrada y otros parámetros en condiciones de control y después de la privación de dopamina (DA). Registramos la actividad eléctrica inferida con imagenología de calcio (6 a 7 fotogramas por segundo) para verificar la eficiencia del indicador de calcio GCaMP6f para seguir, en la medida de lo posible, la activación de las neuronas durante diferentes tipos de activación. La actividad eléctrica inferida se realizó como en estudios previos (Carrillo-Reid et al., 2008; Jáidar et al., 2010, 2019; Pérez-Ortega et al., 2016), utilizando la derivada temporal de los transitorios del calcio. En ambos casos, la configuración de fijación de corriente (IClamp) en célula entera se llevó a cabo utilizando pipetas de borosilicato (3–6 M $\Omega$ ) llenas con una solución que contenía (en

mM) 115 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, 10 NaCl, 0,2 Mg<sup>2+</sup> + -ATP, y 0,2 Na-GTP, con pH = 7,24 y 290 ± 5 mOsm/L.

### 5.8 FÁRMACOS UTILIZADOS

En el desarrollo de este proyecto se utilizaron los siguientes fármacos: sal disódica de 6-ciano-2, 3-dihidroxi-7-nitro-quinoxalina (**CNQX**, Sigma-Aldrich C239-25MG), ácido D-(L)-2-amino-5-fosfonoaléico (**APV**, Sigma-Aldrich A8054-5MG) y bromuro de 2-(3-carboxipropil)-3-amino-6-(4 metoxifenil) piridazinio (**Gabazina**, Sigma-Aldrich S106-10MG) que se utilizaron para bloquear la transmisión sináptica glutamatérgica y GABAérgica. Se utilizó clorhidrato de **mecamilamina** (Sigma-Aldrich M9020-5MG) para bloquear los receptores nicotínicos. Se prepararon soluciones stock en agua desionizada y se agregaron al sistema de perfusión durante el experimento para obtener la concentración final requerida (gabazina, CNQX y mecamilamina = 10 µM; APV = 50 µM). APV se preparó con dimetilsulfóxido (0,01%).

### 5.9 INMUNOHISTOQUÍMICA

Después de los registros electrofisiológicos, las rebanadas cerebrales se fijaron con: solución buffer fosfato salina (PBS), 4 % de paraformaldehído, 1 % de ácido pícrico pH = 7,4 y se almacenaron para inmunohistoquímica. Las rebanadas se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS (pH = 7,2) durante 30 min. Se lavaron con PBS durante 10 min 3 veces. El anticuerpo primario se diluyó en 1:1000 en PBS, Tritón al 2,5% y se aplicó durante 24 h. Posteriormente, las rebanadas se lavaron nuevamente durante 10 min tres veces en PBS. Se aplicó un anticuerpo secundario (1:500 en PBS/tritón) durante 1.30 h y luego se lavó en PBS durante 10 minutos tres veces. Finalmente, las rebanadas se cubrieron con un medio de montaje DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Inc., H-1200). Las imágenes confocales se adquirieron en un microscopio Zeiss LSM-710 (objetivo: C-Apochroma 20X N.A.45, GCaMP6f: excitación 488nm / emisión de 493–533nm; tdTomato: excitación 543nm / emisión de 565–615nm; Alexa excitación 647–633nm / emisión de 658–704nm). Los anticuerpos se adquirieron de la siguiente manera:

ChAT (Millipore Cat# AB144P, RRID: AB\_2079751) y Antigoat Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 705-605-003, RRID: AB\_2340436) de Jackson Mice, Maine, EE. UU.)

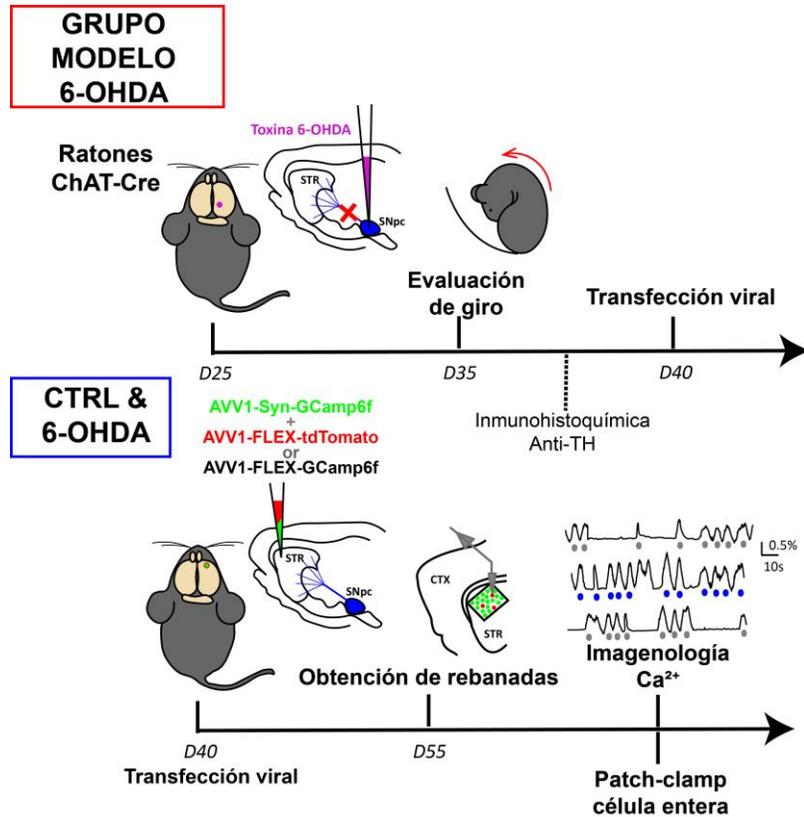


Figura complementaria. Esquema metodológico del protocolo experimental.

### 5.10 ANÁLISIS DE DATOS

Los registros de imágenes electrofisiológicas y de calcio se procesaron utilizando los ambientes Im-Patch© y MATLAB© (RRID: SCR\_001622). Para los registros electrofisiológicos, los datos digitalizados se importaron para análisis y gráficos en un software comercial: Origin 7 (Microcal, Northampton, MA, Estados Unidos); MatLab (Natick, MA, Estados Unidos); Graphpad Prism 5 (San José, CA, Estados Unidos) y Systat 11 (San José, CA, Estados Unidos).

Análisis de datos electrofisiológicos: las propiedades intrínsecas de la membrana nos permiten comparar diferentes muestras de neuronas. Para medir la resistencia de entrada (RN) de toda la célula, utilizamos relaciones corriente-voltaje (gráficos I-V). Como los gráficos I-V no eran lineales, ajustamos un polinomio de tercer orden a cada uno de ellos. La corriente de rebase se midió como la corriente mínima necesaria para generar un potencial de acción (AP) en 1 s. La respuesta hiperpolarizante o *sag* se calculó dividiendo la amplitud del cambio de voltaje en respuesta a un pulso de corriente hiperpolarizante de 1 s ( $-100$  pA) al comienzo del pulso dividido por su valor al final del pulso. Se midieron otros parámetros del potencial de acción (AP) a partir de picos espontáneos con potenciales y frecuencias de membrana similares tanto en las CINs de control como en las parkinsonianas, de modo que la estimulación eléctrica no introduzca un sesgo adicional mediante la activación/inactivación de diferentes conductancias iónicas debido a la privación de DA (Ding et al., 2006; Deng et al., 2007; Tubert et al., 2016). Sin embargo, los gráficos de intensidad-frecuencia (gráficos IF) en condiciones de control y de privación de DA ilustrados en la Figura 1 suplementaria respaldan los cambios descritos anteriormente en las propiedades intrínsecas (análisis estadístico con ANOVA de dos vías con pruebas de Tukey post hoc para comparaciones múltiples). Las propiedades del potencial de acción (AP) tales como: la velocidad de despolarización y repolarización, la amplitud del AP y la amplitud del potencial poshiperpolarizante (AHP), se midieron con gráficos de las 1as derivadas ( $dV/dt$ ) en función del voltaje [gráficos  $dV/dt(V)$  o espacios de fase]. La duración del ancho medio del AHP se calculó a la mitad de su amplitud durante el disparo espontáneo en un rango de voltaje similar (3–4 Hz) tanto en CINs del control como en CINs en parkinsonismo. Se calculó el número de APs durante la respuesta a pasos de corriente despolarizante de 1 s, 40 pA (frecuencia media). Los valores se reportan como media  $\pm$  SEM. La tasa media de disparo espontáneo y el coeficiente de variación de los intervalos inter-espigas se determinaron promediando registros de 2 minutos en CINs control y en CINs del modelo privado de DA. La cuantificación se realizó en un potencial de membrana similar, así como el análisis de la frecuencia

para comprobar si, bajo estas limitaciones, las diferencias en los parámetros intrínsecos todavía juegan un papel importante.

Análisis de datos de imagenología de calcio: cada grabación de video se filtró fuera de línea para mejorar el contraste y se reprodujo para detectar regiones de interés (ROIs) mediante inspección visual usando áreas circulares correspondientes a áreas somáticas que muestran fluctuaciones de fluorescencia de GCaMP6f usando una interfaz gráfica de usuario de ImPatch. Obtuvimos una lista de ROIs para cada experimento. Se utilizaron series temporales de GCaMP6f o señales de fluorescencia como una medida indirecta de la actividad neuronal; la activación de las neuronas del núcleo estriado induce transitorios intracelulares de calcio o eventos con rápidos aumentos de fluorescencia, seguidos de caídas lentas. Los registros electrofisiológicos simultáneos muestran que los potenciales de acción ocurren durante el rápido ascenso de la fluorescencia (Pérez-Ortega et al., 2016; García-Vilchis et al., 2018; Lara-González et al., 2019; Duhne et al., 2021). Los transitorios de calcio se definieron como  $\Delta F/F_0$ , donde  $\Delta F$  fue el aumento de la fluorescencia ( $F_i - F_0$ ) y la fluorescencia de fondo,  $F_0$ , es un área alrededor de cada ROI. La porción positiva de la derivada del tiempo,  $d(\Delta F/F_0)/dt$  indica el rápido aumento de la fluorescencia y se tomó como un indicador de la actividad neuronal para cualquier célula determinada siempre que excediera 2,5 desviaciones estándar (SD) de la señal inicial. (Pérez-Ortega et al., 2016). La actividad eléctrica inferida se utilizó para construir matrices de actividad (gráficos ráster) como filas binarias con unos en los cuadros, donde se detectaron picos y ceros en caso contrario (Figura 1 a continuación). Al juntar estas filas de actividad inferida, obtuvimos una matriz binaria cuyas dimensiones son  $R \times C$ , donde  $R$  es el número de células o ROIs activas (eje  $y$  o filas) y  $C$  es el número de fotogramas o cuadros (eje  $x$  o columnas / cuadros de video mostrados como tiempo) de la condición experimental. El histograma a la derecha de los gráficos ráster muestra la actividad por célula a lo largo del tiempo (% de fotogramas activos/tiempo total). Los histogramas de coactividad debajo de los gráficos de tipo ráster utilizaron vectores columna con la actividad celular sumada cuadro por cuadro. La significancia de los picos de

coactividad (línea discontinua) se obtuvo con simulaciones de Monte Carlo (ver Pérez-Ortega et al., 2016).

Se utilizaron dos métricas para cuantificar los experimentos de imagenología: 1) La tasa de acumulación de actividad o la sumatoria de los vectores de coactividad a lo largo del tiempo (ver Figura complementaria 2). Se aproximaron ajustes lineales a estas adiciones y sus pendientes (tasa de acumulación de actividad) se utilizaron en gráficos de caja tipo Tukey para comparar diferentes condiciones experimentales (Aparicio-Juárez et al., 2019). Se utilizó la prueba de suma de rangos T de Wilcoxon de distribución libre para muestras pareadas (antes y después de la administración de un fármaco), la prueba de suma de rangos U de Mann-Whitney para muestras no pareadas (control frente a rebanadas con privación de DA) y ANOVA de Friedman o Kruskal-Wallis para comparar la tasa de acumulación de actividad (ver arriba). 2) La función de distribución acumulada (CDF) utilizando muestras que incluían todas las neuronas de todos los experimentos en las mismas condiciones para ver si había una diferencia con la estadística de muestras más pequeñas (tasa de acumulación de actividad). Las probabilidades de las CDF se calcularon utilizando el porcentaje de cuadros activos: el número de cuadros activos dividido por el número total de cuadros multiplicado por 100. Las CDFs obtienen la probabilidad  $p$  o menor de que una determinada neurona esté activa durante determinada condición experimental. Para comparar las CDFs utilizamos la prueba de Kolmogorov-Smirnov, una estadística no paramétrica que no requiere independencia de las observaciones y que compara las distribuciones de manera directa. Los desplazamientos significativos hacia la derecha denotan aumentos en la actividad de la población neuronal.

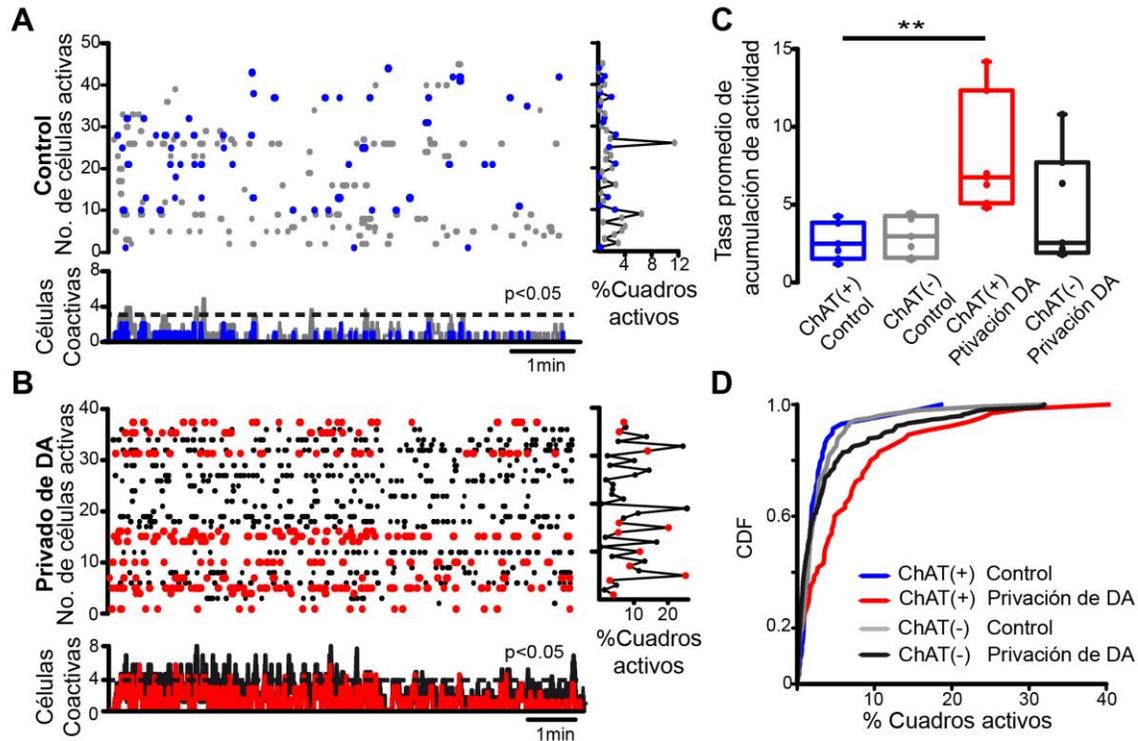


Figura 1. Actividad neuronal espontánea de los microcircuitos estriatales control y después de la depleción de dopamina (DA). (A) El gráfico tipo ráster muestra la actividad espontánea de varias neuronas registradas simultáneamente con imagenología de calcio en condiciones de control. Los puntos azules son CINs identificadas (tdTomato en ratones ChAT-cre) y los puntos grises son otros tipos de neuronas. El histograma de la derecha muestra la actividad por neurona (filas) y el histograma de la parte inferior muestra la coactividad (neuronas que se activan juntas en un vector columna o fotograma de video). La línea discontinua indica la significancia usando simulaciones de Monte Carlo ( $P < 0.05$ ). En control, los picos significativos de coactividad son escasos (en gris) y rara vez coinciden con los picos de CINs (en azul). (B) Gráficos ráster similares que muestran la actividad espontánea de varias neuronas registradas simultáneamente en el cuerpo estriado privado de DA: observe una mayor actividad en comparación con el control. Los puntos rojos son CINs identificadas. El histograma de la derecha muestra una mayor actividad por fila. El histograma de coactividad en la parte inferior muestra numerosos picos significativos de coactividad a lo largo del tiempo, que a menudo van acompañados de la actividad de las CINs. (C) Los diagramas estadísticos de caja muestran que la tasa de actividad acumulada de las CINs a lo largo del tiempo aumenta después de la privación de DA (consulte Material y métodos; Figura 2 complementaria; ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc: neuronas activas ChAT+ antes (control) y después de privación de DA:  $**P = 0,0087$ ). (D) Las funciones de distribución acumulada (CDFs) de la actividad de las neuronas ChAT+ y ChAT- antes y después de la privación de DA (control ChAT+ vs. control de

neuronas ChAT-:  $P = 0,76$ ; control ChAT+ vs. ChAT+ después de la privación de DA:  $P < 0,0001$ ; control ChAT- vs. ChAT- después de la privación de DA:  $P = 0,042$ ; ChAT+ vs. ChAT- después de la privación de DA:  $P < 0,0001$  (ChAT+ control  $n = 58$  neuronas; ChAT- control  $n = 146$  neuronas; ChAT+ después de la privación de DA = 65 neuronas, ChAT- después de la privación de DA = 222 neuronas; de 7 animales diferentes tanto en el control como después de la privación de DA; prueba de Kolmogorov-Smirnov).

## 6.0 RESULTADOS

La expresión específica del indicador de calcio GCamp6f permitió la identificación de las interneuronas colinérgicas estriatales, que de manera típica son diferenciadas morfológicamente por el diámetro de su soma que es aproximadamente 4 veces mayor que el de las demás neuronas existentes en este núcleo (Figura 2A). Se realizó la caracterización electrofisiológica de las neuronas identificadas a través de registros electrofisiológicos de *patch clamp* (Figura 1A) en configuración de célula entera y en fijación de corriente. Las propiedades electrofisiológicas exhibidas por las neuronas identificadas (Tabla 1) coinciden con las de las CINs en condición control previamente reportadas: potencial de membrana en reposo de alrededor de  $-60$  mV (cuando se encontraron sin actividad), la presencia de “sag” seguida de un rebote en respuesta a pulsos hiperpolarizantes, potenciales de acción (APs) con una mayor duración al ancho medio respecto a las neuronas de proyección estriatales ( $4.9 \pm 0.4$  ms), seguidos de una posthiperpolarización media notable (mAHP) y una posthiperpolarización lenta (sAHP) después de un paso de corriente despolarizante (Jiang y North, 1991; Bennett y Wilson, 1999; Maurice et al., 2004; Wilson, 2005; Sanchez et al., 2011). La ausencia de dopamina aumenta la respuesta de activación de las CIN a pasos de corriente despolarizantes de 1 s, 40 pA (Figura 2B y Figura 1 complementaria), control:  $2,6 \pm 0,58$  Hz,  $n = 21$  células de 9 animales diferentes vs. con privación de DA :  $5,7 \pm 0,86$  Hz,  $n = 21$  células de 11 animales diferentes;  $P = 0,0098$ ; Prueba U de Mann-Whitney), y aumenta la relación de “sag” en respuesta a un paso de corriente hiperpolarizante de 1 s ( $-100$  pA) en el control:  $1,019 \pm 0,009$ ;  $n = 33$  células de 14 animales diferentes vs. con privación de DA:  $1,053 \pm 0,009$ ;  $n = 32$  células de 15 animales diferentes (Figura 2D;  $P = 0,0045$ ; prueba U de Mann-Whitney). Se

construyeron gráficos de relación corriente-voltaje (I – V) para medir la resistencia de entrada neuronal (RN) de las CIN en ambas condiciones (Figuras 2C y 2D, primer panel), lo que muestra que la RN aumenta significativamente en las neuronas con privación de DA en comparación con las condiciones control  $235,6 \pm 21,4 \text{ M}\Omega$ ; Control n = 28 células de 11 animales diferentes frente a  $363,2 \pm 28,0 \text{ M}\Omega$ ; n = 29 células con privación de DA de 13 animales diferentes (P = 0,0008; prueba U de Mann-Whitney; ver: Paz et al., 2021). Los gráficos I – V confirman que la ausencia de DA modifica el perfil electrofisiológico de las CIN (Deng et al., 2007; Sanchez et al., 2011; Paz et al., 2021). El aumento en RN coincide con una reobase más baja: Control:  $54,9 \pm 7,8 \text{ pA}$ , n = 21 células de 9 animales diferentes vs. privado de DA:  $30,4 \pm 5,6 \text{ pA}$ , n = 21 células de 10 animales diferentes (Figura 2D, segundo panel; P = 0,0084; prueba U de Mann-Whitney; Fino et al., 2007), lo que explica, en parte, la hiperexcitabilidad de las CIN en ausencia de modulación de la dopamina. Finalmente, también encontramos una disminución significativa en la duración del ancho medio del AHP en CIN con privación de DA en comparación con los controles (analizados durante el disparo espontáneo), control:  $217 \pm 14 \text{ ms}$ , n = 16 células de 7 animales diferentes vs. privación de DA. :  $130 \pm 7 \text{ ms}$ , n = 31 células de 15 animales diferentes; Figura 2D, tercer panel; P < 0,0001; Prueba U de Mann-Whitney), lo que confirma que la dopamina (DA) es un modulador importante de las propiedades intrínsecas de las CIN, incluida la corriente catiónica activada por hiperpolarización o HCN, que se manifiesta por el “sag” durante la hiperpolarización (Aosaki et al., 1998; Maurice et al., 2004; Deng et al., 2007; Sanchez et al., 2011; Straub et al., 2014; Tubert et al., 2016; McKinley et al., 2019; Paz et al., 2021).

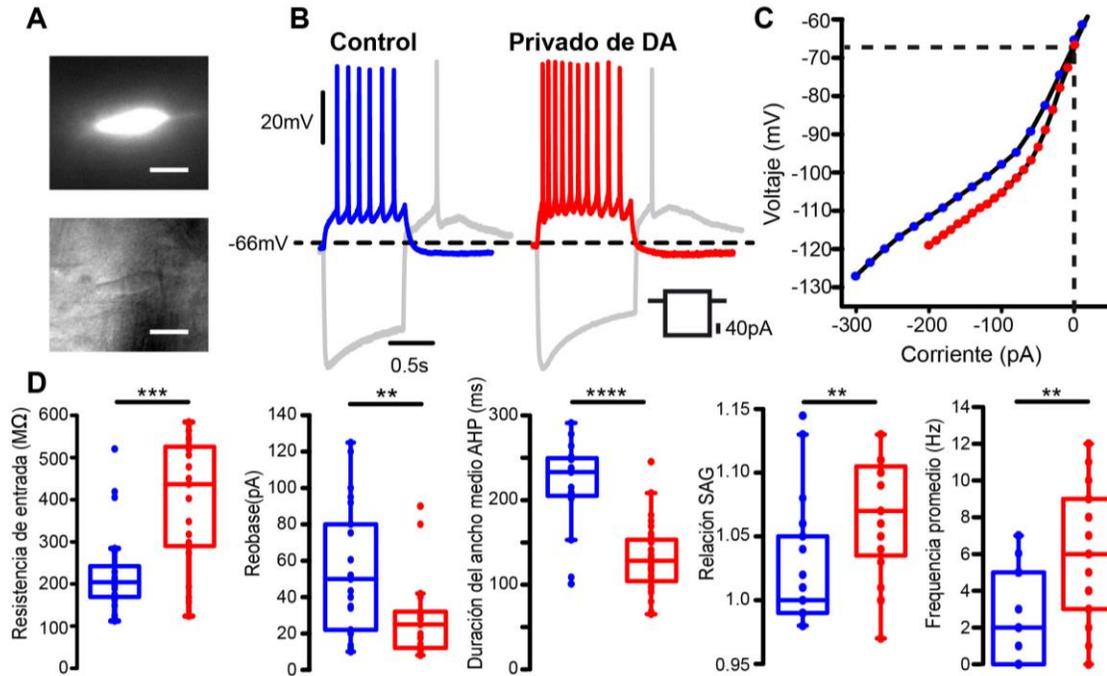


Figura 2. Aumento de la excitabilidad de las interneuronas colinérgicas identificadas en ausencia de dopamina (modelo 6-OHDA) (A) Arriba: microfotografía de una neurona ChAT positiva que expresa GCaMP6f. Abajo: la misma neurona vista con microscopía infrarroja (IR) (barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ ) (B) Registros de fijación de corriente en modalidad célula entera de una interneurona colinérgica (CIN) representativa del cuerpo estriado control (azul) y privado de dopamina (DA) (rojo). Se comparan las respuestas de voltaje provocadas por inyecciones de corriente hiperpolarizante y despolarizante. (C) Relaciones representativas de corriente-voltaje (gráfico I-V) de una CIN en cada condición. (D) Diagramas de caja que comparan la resistencia de entrada neuronal, la rebase, la duración del ancho medio del potencial posthiperpolarizante (AHP), la tasa del “sag” y la frecuencia media de disparo en 1 s, corriente despolarizante de 40 pA para muestras en ambas condiciones. La duración del ancho medio se midió durante el disparo espontáneo a frecuencias similares: 3–4 Hz (prueba U de Mann-Whitney: \*\*P < 0,01; \*\*\*P = 0,0008; \*\*\*\*P < 0,0001).

<b>PROPIEDADES</b>		<b>Control</b>	<b>Privación DA</b>
<b>Potencial de acción</b> <u>Control (n=16)</u>  <u>Endentado (n=6)</u> <u>Liso (n=10)</u>  <u>Privación DA (n=30)</u>  <u>Endentado (n=5)</u> <u>Liso (n=25)</u>	Umbral (mV) <i>Endentado</i> <i>Liso</i>	-41.23±2.29 -40.52±1.83	-39.88±3.90 -41.09±0.75
	Duración al ancho medio (ms) <i>Endentado</i> <i>Liso</i>	4.9 ±0.76 5.2 ±0.56	5.2±0.81 4.1±0.24
	Amplitud desde el umbral (mV) <i>Endentado</i> <i>Liso</i>	56.08±1.87 47.22±4.59	49.85±5.16 55.07±1.96
	Tasa máx. despolarización, dV/dt (mV/s) <i>Endentado</i> <i>Liso</i>	35.73±4.26 41.69±7.71	30.00±4.23 54.38±4.15
	Tasa máx. repolarización, dV/dt (mV/s) <i>Endentado</i> <i>Liso</i>	-12.37±1.17 -11.73±1.75	-10.08±1.95 -14.39±0.99
	Amplitud del mAHP (mV) <i>Endentado</i> <i>Liso</i>	7.18±0.78 9.54±1.38	4.61±0.65* 8.89±0.83
	<b>mAHP (ms)</b> <u>Control (n=16)</u> <u>Privación DA (n=30)</u>	Medido al ancho medio	216.9±13.61
<b>Freq. de disparo(Hz)</b> <u>Control (n=21)</u> <u>Privación DA (n=21)</u>	No. promedio de APs en respuesta a una inyección de corriente de 40 pA durante 1s.	2.6±0.58	5.71±0.86**
<b>Resistencia de entrada (MΩ)</b> <u>Control (n=28)</u> <u>Privación DA (n=29)</u>	Medido en -60 mV	235.6±21.4	363.2±28.02****
<b>Reobase (pA)</b> <u>Control (n=21)</u> <u>Privación DA (n=21)</u>	Mínima corriente requerida para generar un AP.	54.9±7.8	30.4±5.6**
<b>Relación SAG</b> <u>Control (n=33)</u> <u>Privación DA (n=32)</u>	Pico de voltaje al inicio / Pico de voltaje al final de un paso de corriente de 100pA, 1s.	1.019±0.009	1.053±0.009**
<b>Potencial de membrana (Vm)</b> <u>Control (n=28)</u> <u>Privación DA (n=12)</u>	Medido durante periodos de silencio (no actividad) (mV)	-64.96±1.01	-61.78±1.77

Tabla 1. Cambios en las propiedades intrínsecas de las CIN después de la privación de DA.

Comúnmente, las CIN que exhiben actividad espontánea durante el registro de *patch clamp* con célula adherida (ver Figura 3) siguen mostrándola después en el registro de célula entera, ya sea con modalidades de parche perforado o no perforado (Figura 4A). La excitabilidad aumentada de la población de CIN en condiciones de privación de DA también se manifiesta por un mayor porcentaje de neuronas que exhiben actividad espontánea (Figura 4A, derecha) ( $P = 0,0001$ ;  $df = 1$ ; prueba de  $\chi^2$ ). Al comparar la actividad espontánea sin ningún tipo de estímulo, las CIN con privación de DA mostraron tasas de frecuencia significativamente más altas (Figura 4B, izquierda): en control:  $1,88 \pm 0,40$  Hz;  $n = 16$  células de 7 animales diferentes; con depleción de DA:  $3,94 \pm 0,55$  Hz;  $n = 30$  células de 14 animales diferentes;  $P = 0,0061$ ; Prueba U de Mann-Whitney). El coeficiente de variación también aumentó en las neuronas privadas de DA (Figura 4B, derecha): control:  $0,76 \pm 0,08$ ,  $n = 16$  células de 7 animales diferentes; en privación de DA:  $1,45 \pm 0,11$ ,  $n = 30$  células de 7 animales diferentes ( $P = 0,001$ ; prueba U de Mann-Whitney). Como se vio anteriormente, algunas CIN con actividad espontánea pueden silenciarse y viceversa.

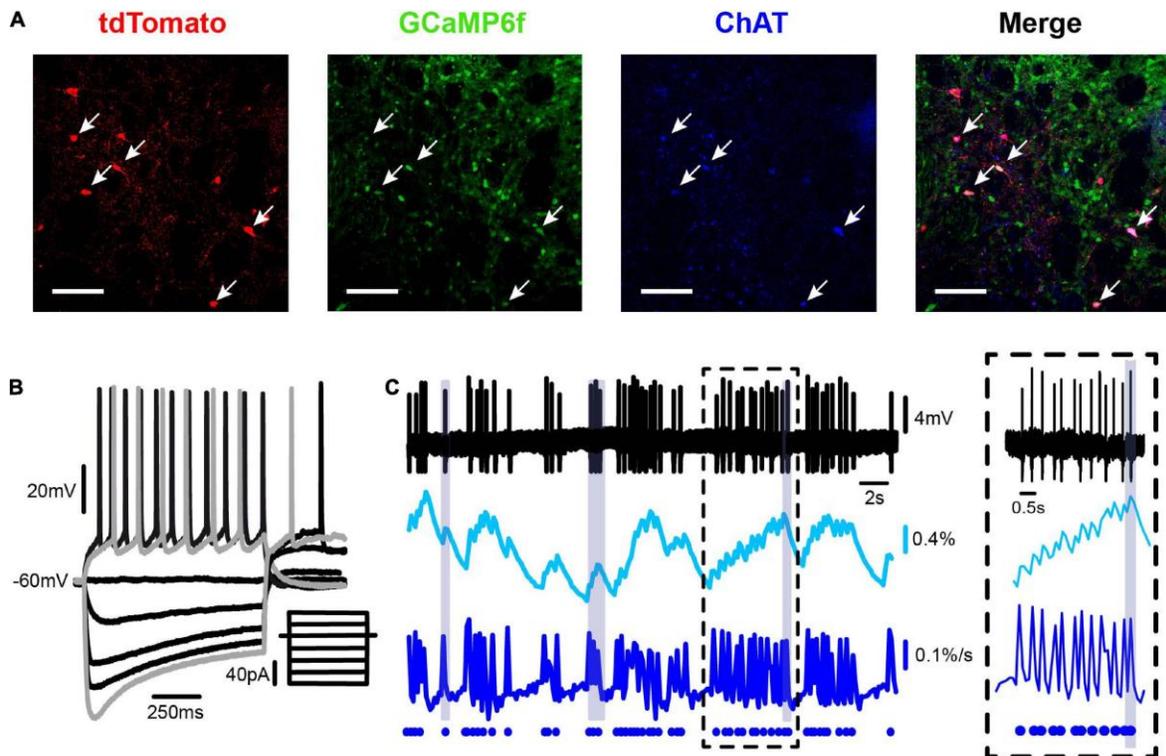


Figura 3. Registro simultáneo electrofisiológico y de imagenología de calcio de una interneurona colinérgica del núcleo estriado. (A) Los paneles de izquierda a derecha muestran: una micrografía de doble fotón de neuronas que expresan tdTomato (rojo), en el mismo campo que muestra neuronas que expresan GCaMP6f (verde; debajo del promotor de sinapsina), neuronas inmunorreactivas a anticuerpos anti-ChAT (azul), y la combinación de paneles anteriores que muestran que las neuronas ChAT corresponden a las de tdTomato. (B) Registro representativo de fijación de corriente en modalidad de célula entera de una CIN estriatal que muestra respuestas de voltaje a inyecciones de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes de 1s en el soma: disparo, rectificación interna (sag) y rebote (el recuadro ilustra estímulos de corriente de  $-80$  a  $30$  pA en pasos de  $10$  pA). (C) Registro extracelular simultáneo de una CIN con actividad espontánea (arriba), sus correspondientes transitorios de calcio ( $\Delta F/F_0$ ; segundo trazo) y actividad eléctrica inferida a partir de la 1ª derivada en el tiempo de la fluorescencia del calcio [ $d(\Delta F/F_0)/dt$ : tercer trazo]. Los puntos en el trazo inferior representan la forma en que se ilustra la actividad eléctrica inferida de los gráficos de tipo ráster como en la Figura 1. Se muestra una neurona con ráfagas y pausas para comparar la actividad real (arriba) con la inferida (abajo). Recuadro discontinuo: acercamiento del registro simultáneo.

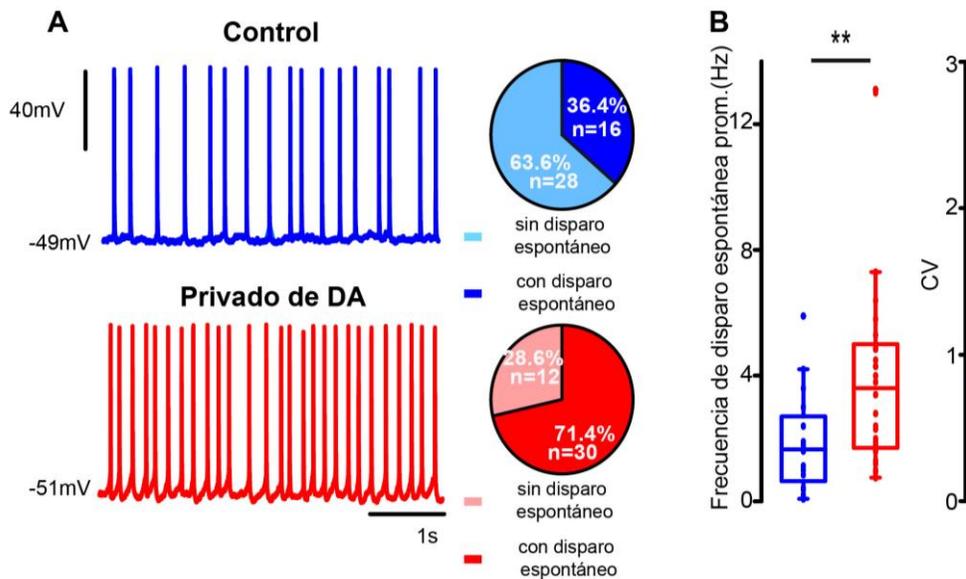


Figura 4. Las interneuronas colinérgicas con privación de DA muestran más actividad espontánea. (A) Arriba: un registro electrofisiológico representativo de *patch-clamp* en célula entera de una CIN que muestra disparo espontáneo (corriente cero) en condiciones control. Abajo: una CIN que muestra disparo espontáneo (corriente cero) en ausencia de dopamina. Los gráficos de pastel de la derecha muestran porcentajes de neuronas encontradas con y sin actividad espontánea en el momento del registro (\*\*\*\* $P < 0,0001$ ;  $df = 1$ ;  $\chi^2$ ). (B) Los diagramas de caja muestran la frecuencia media de disparo obtenida a partir de 1s de disparo espontáneo a partir de registros electrofisiológicos (\*\* $P =$

0,0061; Mann-Whitney U) y el coeficiente de variación (\*\*P = 0,001; Mann-Whitney U) durante el disparo espontáneo. Control n = 16 neuronas de 7 animales diferentes; n = 30 neuronas con privación de DA de 14 animales diferentes.

Nos preguntamos si las diferencias en las propiedades intrínsecas entre CINs control y CINs parkinsonianas se deben a corrientes iónicas que se activan diferencialmente en las distintas condiciones (Deng et al., 2007; Tubert et al., 2016). Por lo tanto, examinamos las características de los APs de las CINs control y parkinsonianas con gráficos  $dV / dt$  (V) (Bean, 2007). Encontramos un espectro de formas de onda de APs cuyos extremos se representan en las Figuras 5A, B. Las gráficas fueron promedios  $\pm$  SEM de varios AP de neuronas individuales con actividad espontánea elegidas por tener frecuencia y potenciales de membrana similares medidos en el disparo durante intervalos de 2 minutos (Control-endentado n = 6; Control- liso n = 10 células de 7 animales diferentes; privadas de DA-endentado n = 5; privado de DA-liso n = 25 neuronas de 14 animales diferentes). Los trazos promedio de las muestras control (arriba en azul) tienen una endentación clara durante la despolarización del AP, mientras que otros trazos exhiben un ascenso más suave hacia sus picos. Los trazos de las neuronas privadas de DA también muestran endentaciones durante la despolarización, mientras que otras neuronas tienen un ascenso más suave (Tabla 1). El color más claro muestra el porcentaje de AP con endentación durante la despolarización (la comparación de porcentajes con y sin endentación da como resultado  $P = 0,0001$ ;  $gl = 1$ ; prueba de  $\chi^2$ ), lo que sugiere que los aumentos en la frecuencia de disparo van acompañados del aumento en la velocidad de subida del AP, lo que respalda la hipótesis de un cambio en las propiedades intrínsecas (por ejemplo, redistribución de canales iónicos) debido a la ausencia de DA. La endentación se atribuye comúnmente a la generación de AP en el segmento inicial del axón (Chand et al., 2015). Las diferencias aparentes mostradas en la superposición de trazos promediados de las neuronas control y con privación de DA no fueron significativas, ya que los AP individuales muestran una gran variabilidad (Figuras 5C, D). Se encontró una diferencia significativa en las amplitudes de los AHPs en los espacios de fase de las CIN con endentación (Figura 5E;  $P = 0,03$ ; prueba U de Mann-Whitney). Varios

canales iónicos participan en la generación del AHP (Deng et al., 2007; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016).

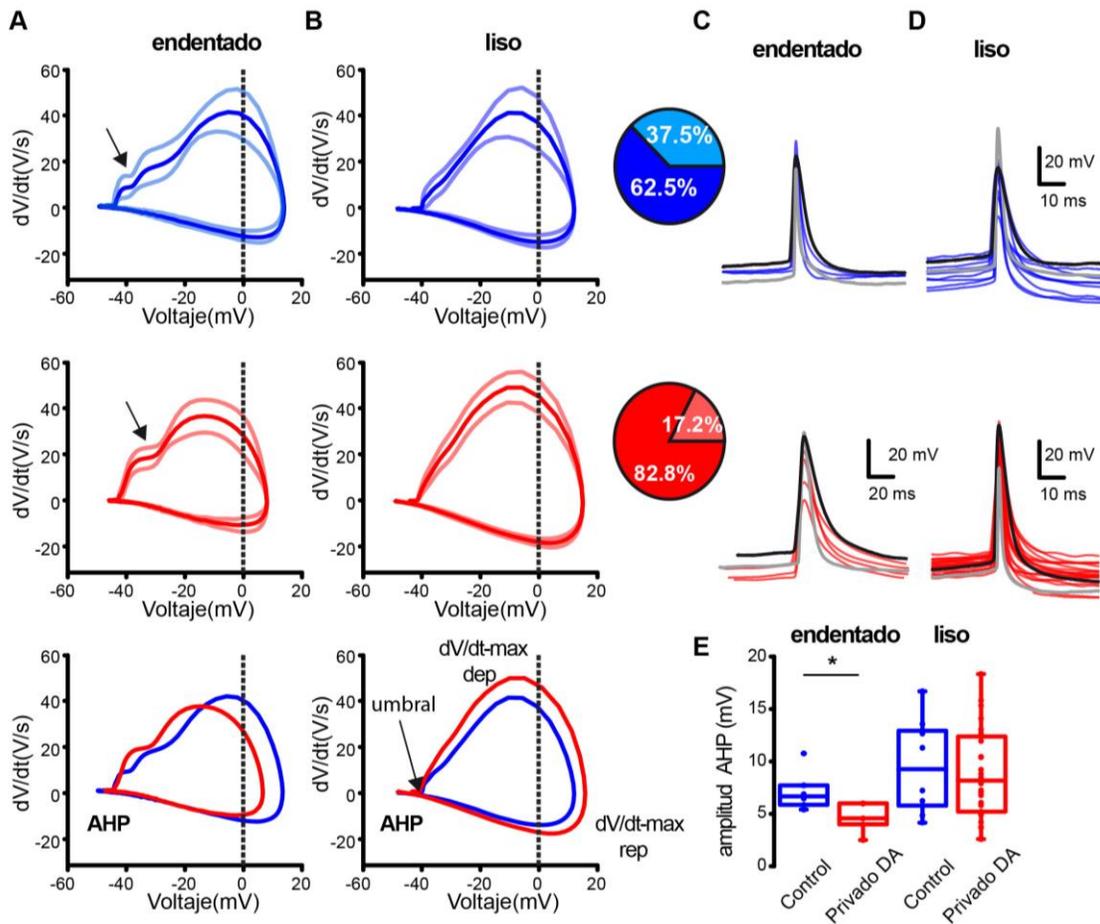


Figura 5. Los extremos de un espectro continuo de formas de onda de potenciales de acción (AP) dentro de la población estriatal de interneuronas colinérgicas. (A) CIN con endentación clara durante la despolarización del AP como lo revelan los diagramas de fase  $dV/dt(V)$  (flechas). (B) CIN con una despolarización más lisa o suave durante su AP. Los trazos superiores (azules) corresponden a AP en condiciones control y los trazos medios (rojos) corresponden a AP de neuronas privadas de DA. Los AP se eligieron durante el disparo espontáneo a una frecuencia similar y a un mismo potencial, medido en el umbral. Los gráficos  $dV/dt(V)$  se ilustran como medias  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los trazos inferiores en (A, B) superponen medias de neuronas control y de neuronas privadas de DA (Control-endentedo  $n = 6$ ; Control-liso  $n = 10$  células de 7 animales diferentes; privadas de DA-endentedo  $n = 5$ ; privadas de DA-liso  $n = 25$  células de 14 animales diferentes). Los gráficos circulares muestran el porcentaje de diagramas de fase con endentación durante la despolarización del AP en un color más pálido; en las condiciones de control hay más neuronas con endentación durante la despolarización de los AP ( $P = 0,0001$ ;  $df = 1$ ;  $\chi^2$ ). (C) Superposición de AP

promediados con endentación en la despolarización. Control (azul) y con privación de DA (rojo). (D) Superposición de AP promediados sin endentación o lisos. (E) Las diferencias mostradas no son significativas, excepto la amplitud de AHP en AP endentados (\*P = 0,03; prueba U de Mann-Whitney).

### **Actividad de las interneuronas colinérgicas del cuerpo estriado observadas con imagenología de calcio**

Para seguir simultáneamente la actividad de docenas de CINs dentro de microcircuitos estriatales de dimensiones histológicas, combinamos la infección adenoviral de FLEX-tdTomato en ratones ChAT-Cre para marcar CINs (células ChAT positivas; Figura 3A, primera imagen de izquierda a derecha) con Syn-GCaMP6f expresado en todas las neuronas dentro del área de infección (Figura 3A, segunda imagen de izquierda a derecha). La tercera imagen en la Figura 3A muestra que las neuronas marcadas con tdTomato también eran inmunorreactivas a los anticuerpos ChAT. La última imagen muestra la fusión de fotogramas anteriores, lo que confirma la correcta identificación de las interneuronas colinérgicas en este diseño experimental. Se identificaron los perfiles electrofisiológicos comúnmente reportados en interneuronas colinérgicas en todas las células positivas para tdTomato registradas (Figura 3B). La Figura 3C muestra de arriba a abajo: AP registrados extracelularmente de una CIN identificada, el registro simultáneo de señales de fluorescencia obtenidos con imagenología de calcio, la actividad eléctrica inferida de las señales de fluorescencia  $[d(\Delta F/F_0)/dt]$  y, finalmente, los puntos en la parte inferior del panel muestran cómo se representa la actividad inferida en los gráficos tipo ráster (Figura 1). Cada punto refleja el momento en el que la neurona presenta actividad. Nótese la estrecha similitud entre los potenciales de acción registrados y lo inferidos a partir de los transitorios de calcio. De esta manera, la actividad dentro de un microcircuito se puede ilustrar utilizando gráficos ráster (ver "Materiales y métodos"), en los que las filas en el eje "y" representan la actividad de cada neurona a lo largo del tiempo, mientras que el eje "x" se representan cuadros de video expresados en unidades de tiempo.

La Figura 1A muestra un gráfico tipo ráster en condiciones control. Los puntos en cada fila del gráfico muestran la actividad registrada de neuronas individuales que

pertenecen a diferentes poblaciones dentro del microcircuito estriatal a lo largo del tiempo. Los puntos azules indican CIN identificadas (ChAT+), mientras que los puntos grises muestran neuronas ChAT-. El histograma de la derecha muestra el porcentaje de actividad célula por célula (filas: cuadros con actividad/cuadros totales multiplicados por 100). El histograma en la parte inferior representa la actividad neuronal sumada columna por columna (cuadro por cuadro), que son las neuronas que se activan juntas (vectores columna de coactividad). La sumatoria de estos vectores a lo largo del tiempo denota la tasa de acumulación de actividad ("Materiales y métodos" y la Figura complementaria 2), representada con las pendientes de esta actividad (Figura 1C). Con esta métrica comparamos (Figura 1B) la actividad del núcleo estriado privado de DA. Los puntos rojos representan CINs identificadas, mientras que los puntos negros son neuronas no colinérgicas o ChAT-. El umbral para considerar un pico significativo de coactividad se determina usando simulaciones de Monte Carlo (Pérez-Ortega et al., 2016) y está representado por una línea punteada ( $P < 0,05$ ). En condiciones control, hay pocos picos de coactividad o no son significativos (Figura 1A, arriba;  $n = 7$  rebanadas de 7 animales diferentes; Carrillo-Reid et al., 2008). Por el contrario, en condiciones de privación de DA, la actividad neuronal aumenta mostrando picos significativos de coactividad espontánea (Figura 1B;  $n = 7$  rebanadas de 7 animales diferentes; Jáidar et al., 2010; Plata et al., 2013a; Aparicio-Juárez et al., 2019; Lara-González et al., 2019). En esta condición, las CINs identificadas se coactivan significativamente y subyacen a picos significativos de coactividad en el circuito (marcados en rojo en el histograma de coactividad) independientemente de representar a un pequeño porcentaje de las neuronas estriatales. La tasa de acumulación de actividad aumentó significativamente en las neuronas ChAT+ después de la privación de DA (Figura 1C;  $P = 0,0087$ ; ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc). Las funciones de distribución acumulativa (CDF) que considera todas las células de varios experimentos en cada condición experimental muestran diferencias significativas (Figura 1D): neuronas ChAT+ control frente a ChAT- control:  $P = 0,76$ ; control ChAT+ vs. ChAT+ privadas de DA:  $P < 0,0001$ ; control ChAT- vs. ChAT- privadas de DA:  $P = 0,042$ ; ChAT+ frente a ChAT- privadas de DA:  $P < 0,0001$

(ChAT+ control n = 58 neuronas; ChAT- control n = 146 neuronas; ChAT+ privadas de DA n= 65 neuronas, ChAT- privadas de DA n= 222 neuronas; de 7 animales diferentes tanto en el control como en ausencia de DA; prueba de Kolmogorov-Smirnov). Para concluir, la técnica de registro múltiple demuestra que las CINs aumentan su actividad después de la privación de DA, y que este aumento es relativamente mayor que el de las neuronas ChAT- (Ding et al., 2006; Sanchez et al., 2011; Tubert y Murer, 2020; Paz et al., 2021). Por este motivo, las siguientes figuras muestran los rásters únicamente de CINs identificadas en diferentes condiciones.

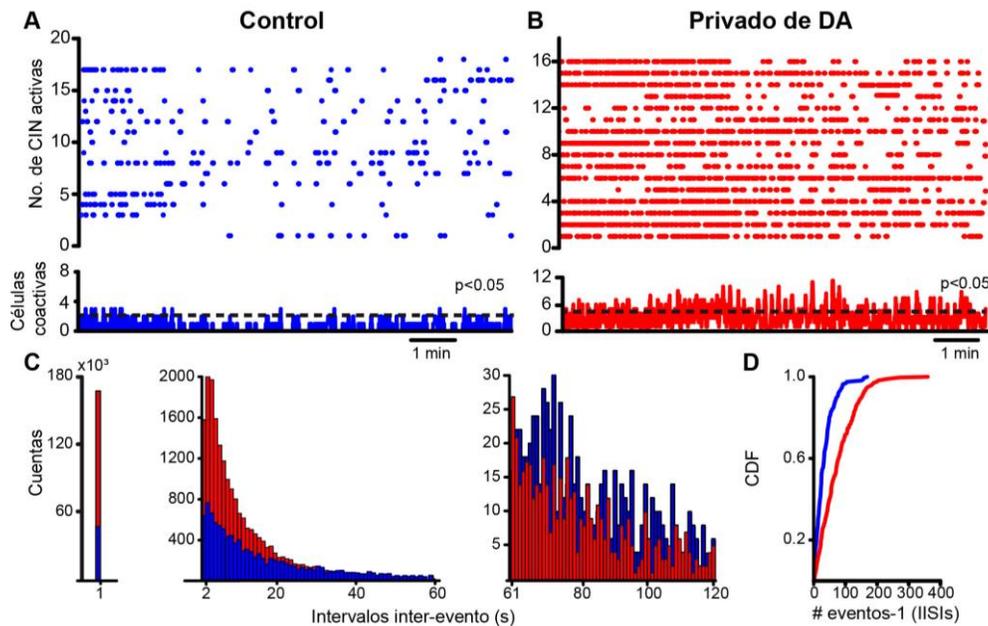


Figura 6. Las interneuronas colinérgicas del cuerpo estriado aumentan su actividad como lo muestra la densidad del ráster y modifican su patrón de actividad después de la privación de DA. (A) Gráfico tipo ráster que muestra la actividad de varias CIN identificadas en una rebanada de cerebro en condiciones control. Algunos picos de coactividad significativos tienen 3 o menos neuronas. (B) Gráfico tipo ráster que muestra la actividad de varias CIN identificadas en condiciones de privación de DA; El disparo aumentado es claro durante el registro simultáneo de CIN. Varios picos de coactividad significativos a lo largo del tiempo tienen 6 o más neuronas ( $P = 0,05$  después de simulaciones de Monte Carlo; ver Pérez-Ortega et al., 2016). (C) La distribución de todos los intervalos entre eventos ilustra las diferencias en la densidad del ráster en ambas condiciones (un evento, un punto, denota actividad neuronal; un intervalo entre eventos es el silencio entre eventos). La distribución está sesgada y debe mostrarse a diferentes escalas. El histograma de la izquierda

muestra intervalos de  $<1$  s que muestran que los CIN en ausencia de DA se activan con más frecuencia. El histograma del medio muestra eventos más prolongados  $<60$  s. Los CIN con privación de DA tienen más eventos de este tipo ya que los trenes de actividad van seguidos o precedidos por pausas. El histograma de la derecha muestra que los intervalos más prolongados de  $<120$  s pertenecen a CIN en condiciones control. (D) Agrupadas y normalizadas como funciones de distribución

Se realizó una infección adenoviral del indicador de calcio GCaMP6f bajo el promotor de ChAT. Esto nos permitió seguir exclusivamente la actividad de las CINs a lo largo del tiempo. La Figura 6A muestra un ráster representativo de la actividad de las CIN en condiciones control: los trenes o picos de actividad individuales están separados por períodos de silencio de varias duraciones. La Figura 6B muestra un gráfico ráster representativo de la actividad de CINs en condiciones de privación de DA. Como en resultados anteriores (Figura 1), la aparición de numerosos picos significativos de coactividad indica hiperactividad de CINs en ausencia de DA: se ven más trenes de actividad precedidos o seguidos de pausas, lo que aparentemente aumenta la densidad de disparo en las gráficas ráster. La Figura 6C muestra un histograma de todos los intervalos de silencio independientemente de la duración (densidad =  $1/\text{eventos en silencio o sin actividad de todas las duraciones}$ , la mayoría de los cuales se infieren como intervalos entre disparo). El histograma tiene una cola larga por lo que se ilustra dividido en paneles a tres escalas diferentes: a la izquierda, un histograma de todos los intervalos inferiores a 1s muestra que en las condiciones de privación de DA hay más intervalos entre eventos de esta duración en comparación con el control, lo que implica que las CINs se activan con más frecuencia. En medio, el histograma muestra pausas entre trenes de actividad entre 2 y 6s s. Estos intervalos aparecen con más frecuencia en condiciones de privación de DA, lo que refleja los numerosos trenes de disparo precedidos o seguidos de pausas. El histograma de la derecha muestra que los intervalos más prolongados entre eventos pertenecen a condiciones de control cuando las neuronas se activan en modos tónicos o irregulares. Para ver si estas diferencias reflejan un cambio en el patrón de disparo, normalizamos y agrupamos todos los intervalos inter- disparo inferidos (IISI) independientemente de su duración en funciones de distribución acumulativa (CDF); claramente se encuentran más

pausas en condiciones de privación de DA ( $P < 0,0001$ ; control,  $n = 163$  células de  $n = 10$  rebanadas de 10 animales diferentes; CIN con privación de DA,  $n = 285$  células de  $n = 13$  rebanadas de 12 animales diferentes; Prueba de Kolmogorov-Smirnov), que muestra un cambio en el patrón de disparo de tónico a trenes de disparo más irregulares o en forma de ráfagas con pausas. Claramente, el registro simultáneo de las CIN identificadas muestra el aumento de la actividad de la mayoría de las CIN en ausencia de DA, mientras que las neuronas individuales aumentan, disminuyen o pausan su actividad. Por lo tanto, las discrepancias reportadas pueden deberse a diferentes métodos de muestreo en neuronas individuales (Ding et al., 2006; Sanchez et al., 2011; McKinley et al., 2019; Choi et al., 2020; Tubert y Murer, 2020; Paz et al., 2021), lo que demuestra que los registros de población ofrecen una mejor ilustración del fenómeno. Nuestra siguiente pregunta fue si las CIN que se activan durante la ausencia de DA también dependen de entradas sinápticas extrínsecas que se sabe aumentan durante el parkinsonismo (Galarraga et al., 1987; Calabresi et al., 1996; Henderson et al., 2000; Zhang et al., 2013; Smith et al., 2014; Villalba et al., 2015; Glajch et al., 2016; Parker et al., 2016; Aceves-Buendia et al., 2017; Zhai et al., 2018).

### **Las entradas sinápticas contribuyen a la hiperactividad de las interneuronas colinérgicas en condiciones de depleción de dopamina.**

Investigamos si los cambios en las entradas sinápticas del cuerpo estriado también contribuyen a la hiperactividad patológica de las CIN. Con este fin, se administraron antagonistas glutamatérgicos y GABAérgicos (CNQX  $10 \mu\text{M}$  + APV  $50 \mu\text{M}$  y Gabazina  $10 \mu\text{M}$ ) en diferentes órdenes para observar la contribución de los aportes extrínsecos a la actividad de las CIN antes y después de la privación de DA. La Figura 7A muestra un gráfico tipo ráster con la actividad espontánea de las CIN en condiciones control mostrando escasos picos significativos de coactividad de las CIN (histograma en la parte inferior) así como la actividad de neuronas individuales (histograma a la derecha). La actividad en el control es escasa y la administración de antagonistas glutamatérgicos (+ CNQX + APV) produce cambios significativos. De hecho, ni la tasa acumulación de actividad (Figura 7B;  $P > 0,1$ ; prueba T de

Wilcoxon) ni las funciones de distribución acumulada (CDF; Figura 7C;  $P > 0,05$ ; prueba de Kolmogorov-Smirnov; Control CIN  $n= 116$  neuronas; CNQX + APV = 113 neuronas; más Gabazina = 129 neuronas; de  $n = 8$  rebanadas de 8 animales diferentes) muestran cambios significativos, lo que sugiere que las entradas glutamatérgicas excitadoras de la corteza y el tálamo son mínimas cuando el núcleo estriado control está en reposo y sin estímulo (Lara-González et al., 2019), a diferencia del núcleo estriado activado control (cf., Pérez-Ortega et al., 2016). Por el contrario, las CINs aumentan su actividad después de la depleción de DA (Figura 8), mostrando varios picos significativos de coactividad (histograma en la parte inferior). La adición de antagonistas glutamatérgicos reduce esta actividad, los picos de coactividad y la actividad celular individual (histograma a la derecha). La tasa de acumulación de actividad disminuye significativamente (Figura 8B;  $P = 0,03$ ; prueba T de Wilcoxon). La adición posterior del antagonista GABAérgico, Gabazina, tiene una tendencia no significativa a reducir aún más la actividad de las CIN en condiciones de privación dopaminérgica. Agrupando las neuronas de todos los experimentos en estas condiciones construimos funciones de distribución acumulada (CDF) que muestran significancia: CIN con privación de DA vs. CIN con privación de DA más CNQX + APV:  $P < 0,0001$ ; con adición de gabazina (Figura 7C;  $P < 0,0001$ ; prueba de Kolmogorov-Smirnov; CIN con privación de DA  $n= 159$  neuronas; CIN con privación de DA adicionando CNQX + APV = 145 neuronas; más Gabazina = 143 neuronas; de  $n = 6$  rebanadas de 6 animales diferentes). Concluimos que una gran parte de la hiperactividad de las CIN encontrada en ausencia de DA se debe a la transmisión glutamatérgica desde la corteza o el tálamo (p. ej., Arias-García et al., 2017). Debido a que en condiciones control sin estimular el bloqueo glutamatérgico tiene acciones no significativas, se infiere que un cambio en la transmisión glutamatérgica es debida a la ausencia de DA lo que afecta la actividad de las CIN (Villalba et al., 2015, 2019; Parker et al., 2016; Aceves-Buendía et al., 2017).

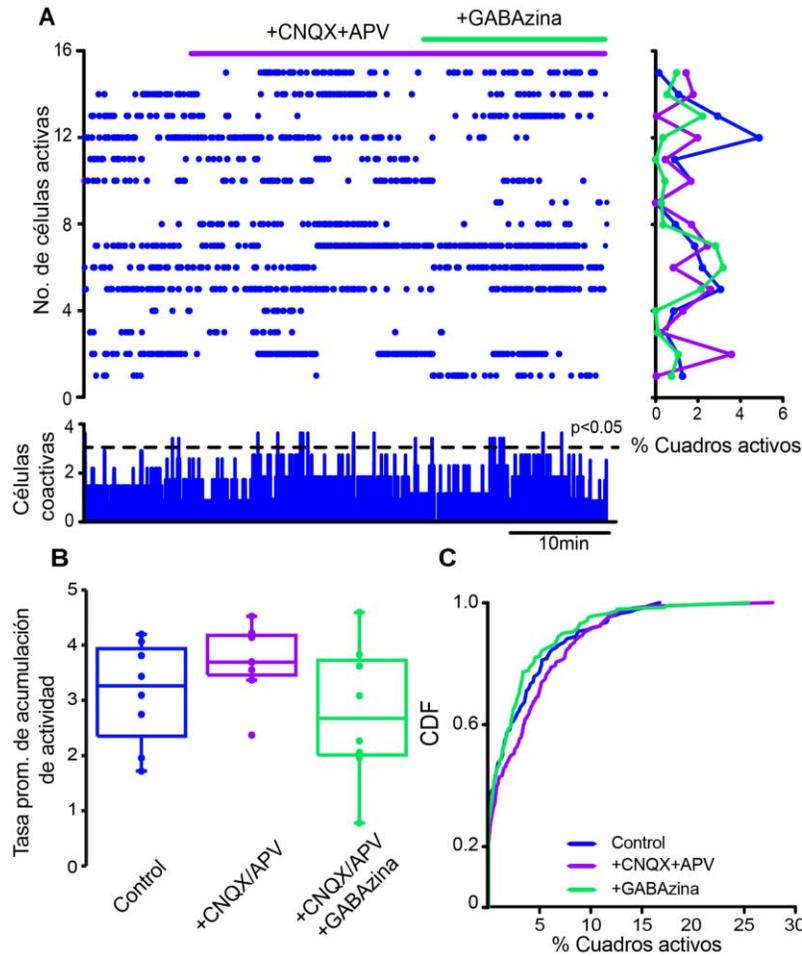


Figura 7. Influencia de los aportes glutamatérgicos en la actividad espontánea de las interneuronas colinérgicas en condiciones de control sin estimulación. (A) El gráfico ráster muestra la actividad espontánea de las CIN en condiciones control y después de aplicar 10  $\mu$ M CNQX y 50  $\mu$ M APV. Posteriormente se administraron 10  $\mu$ M gabazina. El histograma de la derecha muestra la actividad por neurona (filas), el histograma de la parte inferior muestra la actividad por columna (coactividad). (B) Los diagramas de caja muestran muestras de la tasa de acumulación de actividad con cambios no significativos (pruebas T de Wilcoxon o Friedman). (C) Funciones de distribución acumulada (CDF) de ChAT+ en condiciones de control y con los antagonistas: CIN control vs. CIN + CNQX + APV:  $P = 0,087$ ; + Gabazina:  $P = 0,24$  (prueba de Kolmogorov-Smirnov: control n-CINS = 116 células, + CNQX + APV = 113; + Gabazina = 129 células de  $n = 8$  rebanadas de 8 animales diferentes)

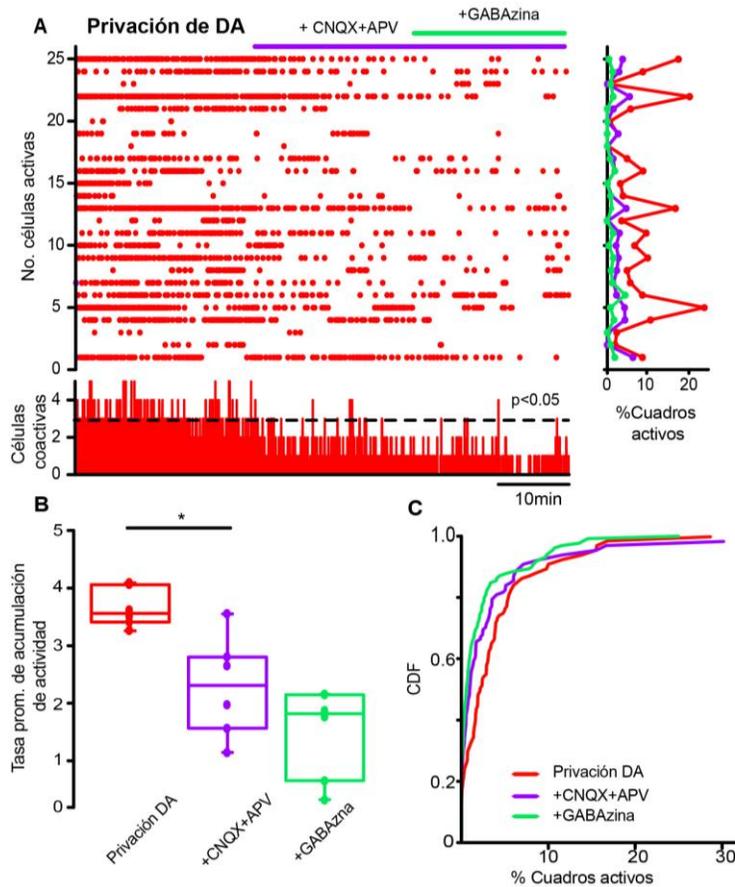


Figura 8. Las entradas glutamatergicas al microcircuito estriatal son esenciales para el aumento de la actividad de las interneuronas colinérgicas en el tejido privado de dopamina. (A) El gráfico tipo ráster representa la actividad de las CIN identificadas registradas simultáneamente en tejido privado de DA, antes y después de aplicar antagonistas glutamatergicos (CNQX 10  $\mu$ M y APV 50  $\mu$ M) y el antagonista GABAérgico (GABAzina 10  $\mu$ M). Tanto la actividad celular individual (derecha: filas) como los picos significativos de coactividad (abajo) disminuyen. (B) Los diagramas de caja muestran reducciones significativas en la tasa de acumulación de actividad después de los antagonistas (\* $P = 0,03$ ; prueba T de Wilcoxon: privación de DA vs. privación de DA con antagonistas glutamatergicos). La aplicación posterior de GABAzina tiende a reducir aún más la tasa de acumulación de actividad, pero esto no es significativo. (C) Funciones de distribución acumulativa (CDF) de las neuronas ChAT+: CIN con privación de DA frente a CIN más CNQX + APV ( $P < 0,0001$ ); con adición de GABAzina ( $P < 0,0001$ ; prueba de Kolmogorov-Smirnov; CIN con privación de DA  $n = 159$  neuronas; con CNQX + APV = 145 neuronas; más GABAzina = 143 neuronas de  $n = 6$  rebanadas de 6 animales diferentes).

A continuación, primero administramos un bloqueador de las sinapsis inhibitoras GABAérgicas: 10  $\mu$ M GABAzina para saber si la inhibición contribuye a la escasez

de actividad neuronal en el estriado control no estimulado. La Figura 9A muestra, como se esperaba, aumento en la actividad neuronal control reflejada en un aumento en la tasa de acumulación de actividad (Figura 9B;  $P = 0,039$ ; Wilcoxon T), lo que demuestra que la inhibición contribuye a una baja actividad estriatal. Además, la administración de antagonistas glutamatérgicos ( $10 \mu\text{M}$  CNQX +  $50 \mu\text{M}$  APV), restablece la actividad espontánea (Figura 9B;  $P = 0,0002$ ; ANOVA de Friedman con prueba de Dunn post hoc), lo que sugiere que las sinapsis GABAérgicas están controlando a la entradas excitadoras espontáneas; logrando así el equilibrio excitador-inhibidor de este núcleo. Las CDFs confirmaron los resultados: después de que se bloquea la inhibición con GABAzina, la actividad aumenta significativamente y se restablece después del bloqueo excitador (Figura 9C; control vs. + GABAzina;  $P = 0,0033$ ; Control vs. + GABAzina + CNQX + APV;  $P = 0,052$ ; y + GABAzina versus + GABAzina + CNQX + APV;  $P < 0,0001$  (n-control = 111 neuronas; + GABAzina = 133 células; + GABAzina + CNQX + APV = 116 células de  $n = 7$  rebanadas de 7 animales diferentes; prueba de Kolmogorov Smirnov).

Sorprendentemente, la Figura 10 muestra que la hiperactividad de las CIN durante condiciones de privación de DA disminuye después de la aplicación de gabazina (Figura 10B;  $P = 0,03$ ; prueba T de Wilcoxon). Las CDF muestran el resultado de agrupar todas las neuronas de diferentes muestras: CIN con privación de DA frente a CIN con adición de GABAzina:  $P = 0,0013$ ; y adición de CNQX + APV;  $P < 0,0001$ ; CIN + Gabazina vs CIN con adición de CNQX + APV:  $P = 0,0029$  (CIN con privación de DA  $n = 163$  neuronas; + GABAzina = 155 neuronas; + CNQX + APV = 149 neuronas de  $n = 6$  rebanadas de 6 animales diferentes; prueba de Kolmogorov-Smirnov). Concluimos que, paradójicamente, la transmisión inhibitoria también contribuye a la hiperactividad de las CIN en el circuito privado de DA; este resultado necesita una hipótesis de trabajo (ver sección "Discusión") en vista de que el bloqueo inhibitor del tejido control aumenta la actividad de las CIN como es de esperar. Por otro lado, el bloqueo de la transmisión glutamatérgica excitadora disminuye la actividad de las CIN como se espera. Estos resultados sugieren que la transmisión GABAérgica se ve alterada debido a la ausencia de DA (Nitsch y Riesenber, 1995; Sullivan et al., 2008; Dehorter et al., 2009; Gonzales et al., 2013;

López-Huerta et al., 2013; Sato et al., 2014; Glajch et al. al., 2016; Dorst et al., 2020; Dong et al., 2021), provocando un desequilibrio excitador-inhibidor que quizás explique la hiperactividad durante esta condición.

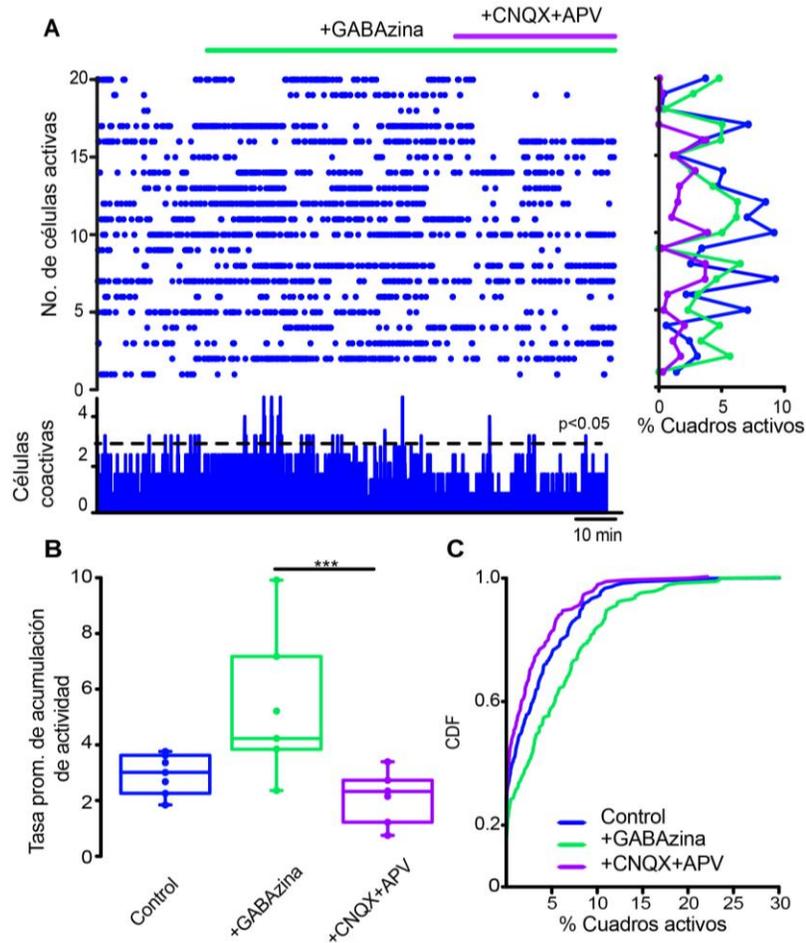


Figura 9. Acciones globales de las entradas GABAérgicas inhibitorias durante la actividad espontánea de las CIN en condiciones control. (A) El gráfico tipo ráster representa la actividad simultánea de las CIN antes y después de aplicar 10  $\mu$ M GABAzina: un aumento en la actividad se refleja célula por célula (actividad de las filas en el histograma a la derecha) y es significativo al nivel de los picos de coactividad (histograma en la parte inferior; \*P = 0,039; Wilcoxon T). La adición de 10  $\mu$ M CNQX + 50  $\mu$ M APV parece disminuir esta actividad. (B) Los gráficos de caja muestran la tasa de acumulación de actividad. El bloqueo de la transmisión glutamatérgica inhibe la actividad después de gabazina (\*\*P = 0,0002; ANOVA de Friedman con prueba de Dunn post hoc). (C) Funciones de distribución acumulada (CDF) de la actividad de las neuronas identificadas ChAT+ en condiciones control y durante antagonistas sinápticos: Control vs. + GABAzina: P = 0,0033; control vs. +

GABAzina + CNQX + APV:  $P = 0,052$ ; y GABAzina vs. + GABAzina + CNQX + APV:  $P < 0,0001$ . (n-control = 111 neuronas; + GABAzina = 133 células; + GABAzina + CNQX + APV = 116 células de n = 7 rebanadas de 7 animales diferentes; prueba de Kolmogorov Smirnov).

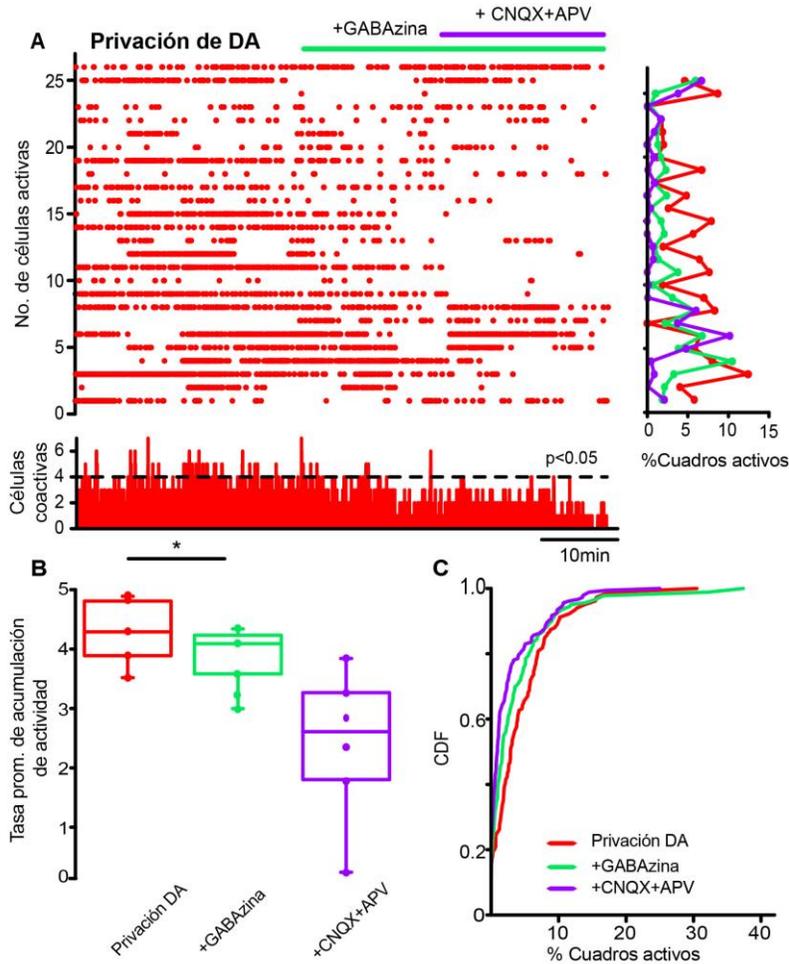


Figura 10. Las entradas GABAérgicas inhibitorias contribuyen a la hiperactividad de las interneuronas colinérgicas en el tejido privado de dopamina. (A) El gráfico ráster representa la actividad de las CIN identificadas registradas simultáneamente en un corte estriado privado de DA (modelo 6-OHDA). La aplicación de 10  $\mu\text{M}$  gabazina disminuye la hiperactividad en contraste con el tejido de control (cf., Figura 9), donde el bloqueo de la inhibición aumenta la actividad neuronal como es de esperar. En el tejido privado de DA, la actividad disminuye célula por célula (filas en el histograma de la derecha) y en los picos significativos de coactividad (histograma en la parte inferior). La adición de 10  $\mu\text{M}$  CNQX y 50  $\mu\text{M}$  APV parece disminuir aún más esta actividad como se espera que lo haga el bloqueo de la excitación. (B) Los diagramas de caja muestran que la tasa de acumulación de actividad disminuye significativamente con gabazina ( $*P = 0,03$ ; Wilcoxon T). (C) CDF antes y después de la adición de antagonistas sinápticos sobre la hiperactividad de las CIN

después de la privación de DA: CIN con privación de DA frente a CIN con adición de GABAzina:  $P = 0,0013$ ; además, adición de CNQX + APV:  $P < 0,0001$ ; CIN + GABAzina vs. CIN con adición de CNQX + APV:  $P = 0,0029$  (CIN con privación de DA  $n = 163$  neuronas; + GABAzina = 155 neuronas; + CNQX + APV = 149 neuronas de  $n = 6$  rebanadas de 6 animales diferentes; prueba de Kolmogorov-Smirnov).

Finalmente, decidimos estudiar otras de las sinapsis rápidas activadas por ligando presentes en el cuerpo estriado: las sinapsis nicotínicas colinérgicas. Los receptores nicotínicos no se expresan en las neuronas de proyección estriatales pero si en las CIN, en otros tipos de interneuronas, en terminales las cortico-estriatales y tálamo-estriatales. Resulta importante evaluar las modificaciones en estas sinapsis debido a que se ha descrito recientemente una red inhibitoria polisináptica entre las CIN, formada indirectamente mediante receptores nicotínicos expresados en interneuronas gabaérgicas y que es modulada por receptores dopaminérgicos de la clase D2 (Sandor et al., 1991; Sullivan et al., 2008; Abudukeyoumu et al., 2018; Dorst et al., 2020).

El gráfico tipo ráster de la Figura 11A muestra la actividad de las CIN en el tejido control antes y después de la adición de  $10 \mu\text{M}$  mecamilamina, un antagonista no específico de receptores nicotínicos, a la cámara de perfusión: la actividad no cambia, lo que sugiere que estas sinapsis no desempeñan un papel relevante en ausencia de estimulación. Las CDF muestran un valor de  $p = 0,063$  (prueba de Kolmogorov-Smirnov: control CIN = 77 neuronas; con mecamilamina = 97 células; de  $n = 6$  rebanadas de 6 animales diferentes).

Esto contrasta con lo que sucede durante la depleción de DA: la Figura 12 muestra que la mecamilamina disminuye la actividad celular individual, así como la coactividad después de la privación de DA. La tasa de acumulación de actividad y las CDF de las CIN privadas de DA muestran una reducción significativa después del bloqueo de los receptores nicotínicos (Figura 12B;  $P = 0,05$ ; prueba T de Wilcoxon; Figura 12C;  $P < 0,0001$ ; prueba de Kolmogorov-Smirnov; CIN con privación de DA  $n = 163$  neuronas; CIN con privación de DA más mecamilamina  $n = 141$  neuronas, de  $n = 6$  rebanadas de 6 animales diferentes). En conclusión, las

sinapsis nicotínicas colinérgicas también contribuyen a la hiperactividad de las CIN cuando hay ausencia de DA, y es una pregunta abierta si esta transmisión también se altera durante el parkinsonismo (Kaiser y Wonnacott, 2000; Azam et al., 2003; Bohr et al., 2005; Quik et al., 2009; Luo et al., 2013; Abudukeyoumu et al., 2018; Licheri et al., 2018).

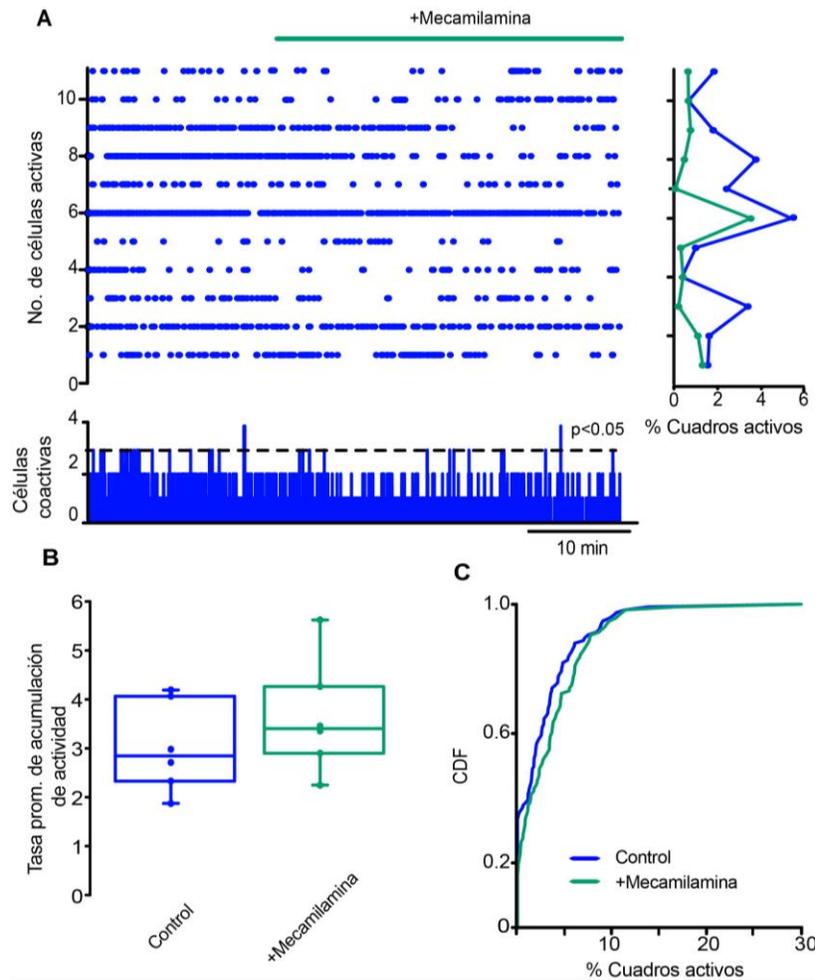


Figura 11. El bloqueo de los receptores nicotínicos no tiene una influencia obvia sobre la actividad de las CIN en condiciones control. (A) El gráfico tipo ráster muestra la actividad simultánea de las CIN antes y después de aplicar el antagonista del receptor nicotínico mecamilamina (10  $\mu$ M). (B) Gráficos de caja mostrando la tasa de acumulación de actividad. (C) Función de distribución acumulada de la actividad de las interneuronas ChAT+ con y sin mecamilamina:  $P = 0,063$  (prueba de Kolmogorov-Smirnov: control CIN  $n = 77$  neuronas; con mecamilamina  $n = 97$  células; de  $n = 6$  rebanadas de 6 animales diferentes).

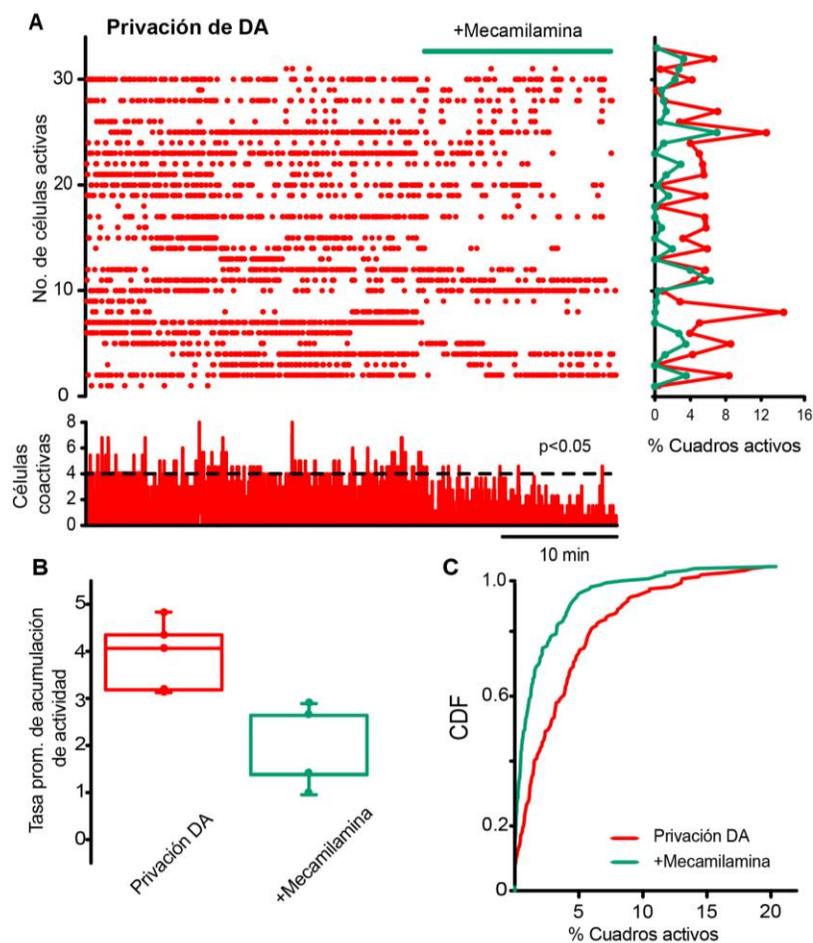


Figura 12. La transmisión sináptica colinérgica a través de receptores nicotínicos es importante para mantener la hiperactividad de las interneuronas colinérgicas en el tejido carente de DA. (A) El gráfico ráster muestra la hiperactividad de las CIN en condiciones de privación de DA. La adición de 10  $\mu\text{M}$  de mecamilamina, un antagonista de los receptores nicotínicos parece disminuir esta hiperactividad neurona por neurona (histograma a la derecha) y en los picos significativos de coactividad (histograma abajo). (B) Los diagramas de caja muestran que la tasa de acumulación de actividad a lo largo del tiempo disminuye ( $n = 6$ ;  $P = 0,05$ ; prueba T de Wilcoxon). (C) Las CDF muestran diferencias entre la actividad de las CIN durante condiciones de privación de DA antes y después de la mecamilamina:  $P < 0,0001$  (CIN privación de DA  $n = 148$  neuronas; más mecamilamina  $n = 141$  neuronas, de  $n = 6$  rebanadas de 6 animales diferentes: Prueba de Kolmogorov-Smirnov).

En conjunto, los resultados reportados muestran que las sinapsis rápidas activadas por ligando del circuito estriatal contribuyen a la hiperactividad de las CIN después de la privación de DA.

## 7.0 DISCUSION

La alteración en la actividad de las interneuronas colinérgicas durante el Parkinsonismo es relevante debido a que se ha reportado que la pérdida de la modulación dopaminérgica está acompañada de hipercolinergia (Barbeau, 1962; Aosaki et al., 1994, 1998; Yan et al., 1997; Galarraga et al., 1999; Pisani et al., 2000; Tanimura et al., 2017, 2019) y no sabemos cuántos de los signos del parkinsonismo se deben a la hipercolinergia y cuántos a la hipodopaminergia misma. Es un hecho que los fármacos anticolinérgicos se usan como coadyuvantes en muchos casos, pero es la fecha en que no se cuenta con fármacos para receptores muscarínicos específicos. El desbalance de ambos moduladores, DA y ACh, subyace a la aparición de la actividad oscilatoria anormal que correlaciona los síntomas motores de la EP como la bradicinesia y el temblor en reposo (Magill et al., 2001; Courtemanche et al., 2003; Brown, 2007; Hammond et al., 2007; Moran et al., 2011; Helmich et al., 2012; Lemaire et al., 2012; Cai et al., 2021; Iskhakova et al., 2021).

Estudios anteriores demostraron que cuando son registradas individualmente las neuronas de proyección del estriado no muestran grandes diferencias en su actividad cuando son privadas de dopamina, en cambio las neuronas tónicamente activas (TAN) muestran una frecuencia preferente en la banda beta (Deffanis et al., 2016; Deffanis and Bergman, 2019). La inhibición directa de las interneuronas colinérgicas (un tipo de TAN estriatal) mejora los síntomas motores en un modelo de parkinsonismo animal (Maurice et al., 2015), mientras que su activación incrementa los ritmos beta patológicos (Kondabolu et al., 2016). Esta evidencia señala que las CIN podrían estar hiperactivas cuando hay ausencia de la modulación dopaminérgica. Sin embargo, la literatura está plagada de discrepancias en este respecto: mientras hay autores que reportan un aumento en la actividad de las CIN, otros reportan una disminución (Ding et al., 2006; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016; McKinley et al., 2019; Choi et al., 2020; Tubert and Murer, 2020; Paz et al., 2021).

Creemos que las diferencias encontradas se solventan con el presente trabajo, ya que logramos registrar decenas de neuronas simultáneamente durante largos periodos de tiempo en el tejido parkinsoniano comparándolo con el tejido control; algo que no se había hecho. Los registros se realizaron sin ningún tipo de estimulación para poder contrastar la actividad espontánea de estas neuronas. Esto nos permitió observar que este tipo de neuronas se alternan entre periodos de actividad y periodos de silencio. A pesar de esta alternancia, la actividad espontánea global de la población de CIN aumenta significativamente cuando hay disminución de dopamina en el microcircuito. Además, la distribución de las pausas entre disparos es significativamente mayor en ausencia de DA, sobre todo entre los trenes prolongados de disparo. Sumado al aumento de la frecuencia de los trenes de disparo y los disparos individuales totales durante periodos más largos de tiempo respecto del control, observamos que la densidad del ráster aumenta (ver sección “Resultados”; Figura 6). Estos resultados indican que las CINs no solo están más activas sino que también cambiaron su patrón de disparo de tónico a disparo en ráfagas.

Como se describió anteriormente, las propiedades intrínsecas de las CIN contribuyen a su aumento de la actividad y en consecuencia a la hipercolinergia (Galarraga et al., 1999): una mayor resistencia a la entrada y una disminución de la reobase en ausencia de modulación de la dopamina (Fino et al., 2007) inducen una mayor excitabilidad. Los gráficos de intensidad-frecuencia muestran que estas diferencias influyen en la respuesta de CIN ante estímulos similares y, a pesar de evitar la estimulación en potenciales de mantenimiento arbitrarios, se observa una reducción en la duración de la mitad del ancho del AHP en las CIN en la condición privada de DA, medida durante la actividad espontánea, con el disparo a potenciales y frecuencias de membrana similares en condiciones control y en privación de DA (Wilson, 2005; Deng et al., 2007; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016; Paz et al., 2021). Finalmente, la endentación durante la despolarización de AP, que sugiere la generación de potenciales de acción en el segmento inicial, se redujo en condiciones de privación de DA (Bennett y Wilson, 1998). Todas estas observaciones respaldan la hipótesis de que la modificación de las propiedades

intrínsecas contribuye a la hiperactividad de las CIN durante la ausencia de la modulación de DA.

Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado a detalle el efecto de las entradas sinápticas rápidas activadas por ligando sobre las CIN. El objetivo principal de este trabajo es puntualizar la importancia de la investigación de esta reestructuración sináptica en los modelos de parkinsonismo, y los desafíos que conlleva para futuras investigaciones. Aquí explicamos y discutimos nuestros resultados proponiendo hipótesis de trabajo, quizás útiles para futuras investigaciones. En este sentido, a continuación, se detallan los hallazgos originales de este trabajo.

### **Acciones de las aferencias glutamatérgicas sobre la hiperactividad de las interneuronas colinérgicas con privación de DA.**

El bloqueo de la transmisión glutamatérgica disminuye significativamente la hiperactividad patológica de las CIN; cuando en condiciones control, no parece alterar la actividad espontánea de las CIN (cf. Figuras 7, 8). Las fuentes glutamatérgicas involucran principalmente a la corteza y al tálamo (Lapper y Bolam, 1992; Consolo et al., 1996; Bernard et al., 1997; Bolam et al., 2000; Matsumoto et al., 2001; Minamimoto y Kimura, 2002; Ellender et al., 2013; Smith et al., 2014; Kosillo et al., 2016; Assous y Tepper, 2019) de los cuales, el aporte talámico es el más fuerte en condiciones de control (Sidibé y Smith, 1999; Ding et al., 2010; Guo et al., 2015). Anteriormente se ha informado de un aumento de la actividad glutamatérgica durante el estado parkinsoniano (Galarraga et al., 1987; Calabresi et al., 1996; Henderson et al., 2000; Zhang et al., 2013; Smith et al., 2014; Zhai et al., 2018), quizás, debido a una disfunción de la plasticidad de las entradas glutamatérgicas del cuerpo estriado (Villalba et al., 2015, 2019; Parker et al., 2016; Aceves-Buendia et al., 2017). La hiperactivación colinérgica puede promover la activación de las terminales glutamatérgicas presinápticas (corticales y talámicas) a través de receptores nicotínicos (Abudukeyoumu et al., 2018). Formando así, un ciclo de retroalimentación positiva entre CIN y terminales glutamatérgicas.

Numerosos fármacos antiparkinsonianos propuestos, como la amantadina y la ketamina, tienen como objetivo reducir estas entradas glutamatérgicas al núcleo estriado (Allers et al., 2005; Bartlett et al., 2020). Aquí, demostramos que un importante blanco de estas entradas son, de hecho las CIN (Lapper y Bolam, 1992; Calabresi et al., 1996; Consolo et al., 1996; Bernard et al., 1997; Sidibé y Smith, 1999; Matsumoto et al., 2001; Williams et al., 2002; Costa et al., 2006; Parr-Brownlie et al., 2009; Ellender et al., 2013; Doig et al., 2014), dejando la pregunta de cuál fuente de estas entradas es más importante en la situación patológica: talámica o cortical (Arias-García et al., 2017), y si las CIN son el blanco principal de estas entradas en comparación con las neuronas espinosas de proyección o los otros tipos de interneuronas estriatales.

### **Acciones de las entradas GABAérgicas sobre la hiperactividad de las interneuronas colinérgicas con privación de DA.**

Sorprendentemente, el bloqueo de las entradas GABAérgicas también disminuye significativamente la hiperactividad patológica de las CIN. En la condición control, el bloqueo GABAérgico hace lo que se supone que debe hacer: un aumento en la actividad debido al desequilibrio entre las entradas excitadoras e inhibitoras (ver Figuras 9, 10). ¿Cómo se puede explicar el resultado contrario en el parkinsonismo? La evidencia indica que el parkinsonismo genera un desequilibrio en los niveles de excitación e inhibición que moldean la actividad del microcircuito. Al bloquear la entrada GABAérgica lo que puede estar ocurriendo en el microcircuito es alguna de las siguientes alternativas o varias de ellas al mismo tiempo.

- Desinhibición: que el bloqueo gabaérgico desinhiba a sinapsis excitadoras, esto podría ser presinápticamente, o bien, bloquear mayoritariamente la inhibición de una interneurona que tiene como uno de sus papeles principales inhibir a las CIN (Quián et al., 2022).

Una fuente de desinhibición serían las neuronas GABAérgicas del GPe que regresan al estriado – neuronas arquipalidales, que recae principalmente sobre las interneuronas GABAérgicas estriatales (Raz et al., 2001; Mallet et

al., 2012, 2016; Abdi et al., 2015; Fujiyama et al., 2015; Glajch et al., 2016; Aristieta et al., 2021; Cui et al., 2021).

- Cambio de efecto inhibitorio a excitatorio: las interneuronas GABAérgicas LTS pueden excitar a las CIN a través de la coliberación de óxido nítrico generando despolarizaciones prolongadas (Elghaba et al., 2016). Así, los pesos de las diferentes entradas GABAérgicas no tienen por qué ser los mismos en el parkinsonismo que en el control. Si las interneuronas LTS aumentan su actividad y aumenta la concentración de óxido nítrico, aumentaría la actividad de las CIN; por lo tanto, bloquear la transmisión de estas estas interneuronas podría disminuir la actividad de las CIN.
- Bloqueo de la transmisión de volumen GABAérgica: las entradas GABAérgicas de las interneuronas que expresan NPY+ o TH+ pueden inducir una fuerte inhibición a través de la transmisión de volumen de las entradas glutamatérgicas (Tepper et al., 2018; Dorst et al., 2020). Este desequilibrio ampliamente reportado en condiciones parkinsonianas, provoca no solo hiperactividad sino también un cambio en el patrón de disparo de las CINs (véase Figura 6) de disparo tónico regular a ráfagas pues el incremento de la inhibición hiperpolariza la membrana de las CINs lo suficiente como para activar la corriente catiónica “I<sub>h</sub>” de esta población neuronal que inicia fuertes despolarizaciones de rebote al salir de la hiperpolarización, lo que puede estar promoviendo secuencias de disparos con pausas.

El bloqueo GABAérgico puede estar impidiendo que se desencadene la actividad en ráfaga y por tanto que la actividad disminuya.

Todas estas propuestas pueden explicar el resultado del bloqueo GABAérgico en el parkinsonismo; todas son hipótesis que pueden comprobarse en el futuro.

## **Acciones de los aportes nicotínicos colinérgicos sobre la hiperactividad de las interneuronas colinérgicas con depleción de DA.**

El bloqueo de la transmisión colinérgica a través de los receptores nicotínicos (nAChR) también puede reducir la hiperactividad de las CIN (véanse las Figuras 11, 12). Las acciones de los nAChR en el microcircuito estriatal son extensas. Diferentes tipos de nAChR se expresan presinápticamente en aferentes dopaminérgicas y glutamatérgicas que provienen de la SNc, el tálamo y la corteza, respectivamente (Hill et al., 1993; Kaiser y Wonnacott, 2000; Zhou et al., 2001; Parker et al. ., 2004; Rice y Cragg, 2004; Zhang y Sulzer, 2004; Bohr et al., 2005; Campos et al., 2010; Licheri et al., 2018; Tanimura et al., 2019; Assous, 2021). En las terminales corticoestriatales, promueven la liberación y transmisión de glutamato. Por lo tanto, una hipótesis de trabajo parsimoniosa para explicar las acciones de los antagonistas de los receptores nicotínicos es que reducen la liberación de glutamato de las aferencias hiperactivas. Esto necesita demostración mediante investigaciones futuras. No obstante, también pueden estarse llevando a cabo otros mecanismos. Los nAChR son expresados por las propias CIN (Azam et al., 2003; Abbondanza et al., 2022) y están ausentes en las SPN, así, una red de CINs reclutadas a través de nAChR puede brindar un fuerte apoyo al estado patológico altamente recurrente que se encuentra durante la privación dopaminérgica (Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016). Esta hipotética red de CINs también debe demostrarse. La Figura 5 muestra un aumento en el acoplamiento de la actividad de las CIN con la hiperactividad parkinsoniana observada en el microcircuito en general (Jáidar et al., 2010; Plata et al., 2013a), y este acoplamiento parece estar ausente en las condiciones control. Además, Dorst et al., 2021 demostraron la existencia de una red de CINs que se comunica de manera polisináptica a través de nAChRs.

En la Figura 12 mostramos que el bloqueo de los receptores nicotínicos disminuye la actividad parkinsoniana de las CIN. Esta acción ya se había reportado: Plata et al., 2013 muestran que la acción de la nicotina en el tejido estriatal hiperactivo por estimulación con NMDA, y en el tejido parkinsoniano hiperactivo, es el de disminuir

la actividad de todo el circuito. Sin embargo, el mismo trabajo muestra que este efecto nicotínico es indirecto pues no sólo se bloquea con antagonistas de los nAChR si no también con antagonistas GABAérgicos, esto es, la acción de la nicotina es indirecta a través de interneuronas GABAérgicas como se ha demostrado con otros métodos (Koós y Tepper, 2002; Luo et al., 2013; Plata et al., 2013b; Ibáñez-Sandoval et al., 2015; Faust et al., 2016; Assous & Tepper, 2019; Assous, 2021; Abbondanza et al., 2022).

Sin embargo, nuestro diseño experimental muestra la actividad únicamente de las CINs. Lo que abre paso a otra hipótesis de trabajo que involucra evaluar si ocurrieron cambios morfofuncionales en los nAChRs después de la depleción dopaminérgica, debido a que la exposición prolongada a niveles elevados de acetilcolina puede generar mecanismos de desensibilización y pérdida funcional de los receptores nAChRs y probablemente de aquellos más afines entre los mAChRs, que serían los receptores M4 o autorreceptores.

La combinación especial de CIN con interneuronas LTS merece atención, porque los trenes de actividad sincronizados de LTS pueden acompañar a los trenes de actividad generados por CIN (Dehorter et al., 2009; Elghaba et al., 2016). La activación del receptor nicotínico de las interneuronas LTS por las CIN es correspondida por la activación del óxido nítrico de las CIN por las LTS (Elghaba et al., 2016). La activación nicotínica colinérgica puede ser la causante de enganchar otras aferencias y fuentes GABAérgicas; que como se mencionó anteriormente, promuevan los trenes de disparo intercalados por pausas que se observan en la condición parkinsoniana. Además, la Figura 1 muestra que, aunque un aumento en la tasa de acumulación de actividad de las neuronas ChAT- o “no colinérgicas” no es significativo, la variación en la actividad de estas neuronas aumenta y las CDF entre ellas fueron significativamente diferentes, lo que sugiere que otras clases de neuronas dentro de este grupo también pueden participar en la hiperactividad de los microcircuitos durante el estado parkinsoniano.

## 8.0 CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo experimental confirman que la hiperactividad parkinsoniana de la población colinérgica estriatal se explica por: 1) Cambios en las propiedades intrínsecas de las neuronas, lo que las vuelve más excitables, y 2) Una remodelación sináptica que modifica la dinámica del microcircuito estriatal, y con ello la actividad de las CIN. Describimos con nuestros resultados, la participación de las sinapsis rápidas activadas por ligando en la hiperactividad de las CIN. Sin embargo, investigaciones futuras decidirán si alguno de estos mecanismos es la causa principal de la generación del ensamble altamente recurrente que causa la hiperactividad estriatal durante el parkinsonismo. Finalmente, estos resultados en conjunto señalan a las CIN estriatales y sus entradas sinápticas, como posibles objetivos principales para los procedimientos terapéuticos de la EP.

## 9.0 BIBLIOGRAFIA

- Abdi, A., Mallet, N., Mohamed, F. Y., Sharott, A., Dodson, P. D., Nakamura, K. C., 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.
- Abbondanza, A., Ribeiro Bas, I., Modrak, M., Capek, M., Minich, J., Tyshkevich, A., et al. (2022). Nicotinic acetylcholine receptors expressed by striatal interneurons inhibit striatal activity and control striatal-dependent behaviors. *J. Neurosci.* 42, 2786–2803. doi:10.1523/jneurosci.1627-21.2022.
- Abudukeyoumu, N., Hernandez-Flores, T., Garcia-Munoz, M., and Arbuthnott, G. W. (2018). Cholinergic modulation of striatal microcircuits. *Eur. J. Neurosci.* 49, 604–622. doi:10.1111/ejn.13949
- Aceves-Buendia, J. de, Tiroshi, L., Chiu, W. H., and Goldberg, J. A. (2017). Selective remodeling of glutamatergic transmission to striatal cholinergic interneurons after dopamine depletion. *Eur. J. Neurosci.* 49, 824–833. doi:10.1111/ejn.13715.

- Allers, K. A., Bergstrom, D. A., Ghazi, L. J., Kreiss, D. S., and Walters, J. R. (2005). MK801 and amantadine exert different effects on subthalamic neuronal activity in a rodent model of parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 191, 104–118. doi:10.1016/j.expneurol.2004.08.030.
- Aosaki, T., Tsubokawa, H., Ishida, A., Watanabe, K., Graybiel, A. M., and Kimura, M. (1994). Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J. Neurosci.* 14, 3969-3984. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-06-03969.1994.
- Aosaki, T., Kiuchi, K., and Kawaguchi, Y. (1998). Dopamine D1-like receptor activation excites rat striatal large aspiny neurons *in vitro*. *J. Neurosci.* 18, 5180–5190. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-14-05180.1998
- Aosaki, T., Miura, M., Suzuki, T., Nishimura, K., and Masuda, M. (2010). Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: An update. *Geriatr. Gerontol. Int.* 10. doi:10.1111/j.1447-0594.2010.00588.x.
- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., et al. (2019). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 49, 834–848. doi: 10.1111/ejn.13806.
- Arias-García, M. A., Tapia, D., Laville, J. A., Calderón, V. M., Ramiro-Cortés, Y., Bargas, J., et al. (2017). Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Struct. Funct.* doi:10.1007/s00429-017-1536-6.
- Aristieta, A., Barresi, M., Azizpour Lindi, S., Barrière, G., Courtand, G., de la Crompe, B., et al. (2021). A disynaptic circuit in the globus pallidus controls locomotion inhibition. *Curr. Biol.* 31. doi:10.1016/j.cub.2020.11.019.
- Assous, M., and Tepper, J. M. (2019). Cortical and thalamic inputs exert cell type-specific feedforward inhibition on striatal GABAergic interneurons. *J. Neurosci. Res.* doi:10.1002/jnr.24444.
- Assous, M., & Tepper, J. M. (2019). Excitatory extrinsic afferents to striatal interneurons and interactions with striatal microcircuitry *Eur. J. Neurosci.* 49(5), 593–603. <https://doi.org/10.1111/ejn.13881>
- Assous, M. (2021). Striatal cholinergic transmission. focus on nicotinic receptors' influence in striatal circuits. *Eur. J. Neurosci.* 53, 2421–2442. doi:10.1111/ejn.15135.

- Azam, L., Winzer-Serhan, U., and Leslie, F. M. (2003). Co-expression of  $\alpha 7$  and  $\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience* 119, 965–977. doi:10.1016/s0306-4522(03)00220-3.
- Barbeau, A. (1962) The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can. Med. Assoc. J.* 87, 802–807.
- Bartlett, M. J., Flores, A. J., Ye, T., Smidt, S. I., Dollish, H. K., Stancati, J. A., et al. (2020). Preclinical evidence in support of repurposing sub-anesthetic ketamine as a treatment for L-DOPA-induced dyskinesia. *Exp. Neurol.* 333, 113413. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113413.
- Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 451–465. doi:10.1038/nrn2148.
- Belić, J. J., Halje, P., Richter, U., Petersson, P., and Hellgren Kotaleski, J. (2016). Untangling cortico-striatal connectivity and cross-frequency coupling in L-DOPA-induced dyskinesia. *Front. Syst. Neurosci.* 10. doi:10.3389/fnsys.2016.00026.
- Bennett, B. D., and Wilson, C. J. (1998). Synaptic regulation of action potential timing in neostriatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 18, 8539–8549. doi:10.1523/jneurosci.18-20-08539.1998.
- Bennett, B. D., and Wilson, C. J. (1999). Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons *in vitro*. *J. Neurosci.* 19, 5586–5596. doi:10.1523/jneurosci.19-13-05586.1999.
- Bennett, B. D., Callaway, J. C., and Wilson, C. J. (2000). Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 20, 8493–8503. doi:10.1523/jneurosci.20-22-08493.2000.
- Bernard, V., Somogyi, P., and Bolam, J. P. (1997). Cellular, subcellular, and subsynaptic distribution of AMPA-type glutamate receptor subunits in the neostriatum of the rat. *J. Neurosci.* 17, 819–833. doi:10.1523/jneurosci.17-02-00819.1997.
- Bergman, H., Feingold, A., Nini, A., Raz, A., Slovin, H., Abeles, M., Vaadia, E. (1998). Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci.* 21(1), 32–38. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01151-x](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01151-x)

- Bohr, I., Ray, M., McIntosh, J., Chalon, S., Guilloteau, D., McKeith, I., et al. (2005). Cholinergic nicotinic receptor involvement in movement disorders associated with Lewy body diseases. an autoradiography study using [<sup>125</sup>I]α-conotoxinMII in the striatum and thalamus. *Exp. Neurol.* 191, 292–300. doi:10.1016/j.expneurol.2004.10.004.
- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A., and Bevan, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196, 527–542. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x
- Bonsi, P., Cuomo, D., Martella, G., Madeo, G., Schirinzi, T., Puglisi, F., et al. (2011). Centrality of striatal cholinergic transmission in basal ganglia function. *Front. Neuroanat.* 5. doi:10.3389/fnana.2011.00006.
- Brown, P. (2007). Abnormal oscillatory synchronization in the motor system leads to impaired movement. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 656–664. doi:10.1016/j.conb.2007.12.001.
- Brown, M. T., Tan, K. R., O'Connor, E. C., Nikonenko, I., Muller, D., and Lüscher, C. (2012). Ventral tegmental area GABA projections pause accumbal cholinergic interneurons to enhance associative learning. *Nature* 492, 452–456. doi:10.1038/nature11657.
- Butcher, S. G., and Butcher, L. L. (1974). Origin and modulation of acetylcholine activity in the neostriatum. *Brain Res.* 71, 167–171. doi:10.1016/0006-8993(74)90202-9.
- Cai, Y., Nielsen, B. E., Boxer, E. E., Aoto, J., and Ford, C. P. (2021). Loss of nigral excitation of cholinergic interneurons contributes to Parkinsonian motor impairments. *Neuron* 109. doi:10.1016/j.neuron.2021.01.028.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N. B., and Bernardi, G. (1996). The corticostriatal projection: From synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 19, 19–24. doi:10.1016/0166-2236(96)81862-5.
- Campos, F., Alfonso, M., and Durán, R. (2010). In vivo modulation of α7 nicotinic receptors on striatal glutamate release induced by anatoxin-A. *Neurochem. Int.* 56, 850–855. doi:10.1016/j.neuint.2010.03.010.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., et al. (2008). Encoding network states by Striatal Cell Assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435–1450. doi:10.1152/jn.01131.2007.

- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibáñez-Sandoval, O., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., andargas, J. (2009a). Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 101, 737–749. doi:10.1152/jn.90975.2008.
- Chand, A. N., Galliano, E., Chesters, R. A., and Grubb, M. S. (2015). A distinct subtype of dopaminergic interneuron displays inverted structural plasticity at the axon initial segment. *J. Neurosci.* 35, 1573–1590. doi:10.1523/jneurosci.3515-14.2015.
- Choi, S. J., Ma, T. C., Ding, Y., Cheung, T., Joshi, N., Sulzer, D., et al. (2020). Alterations in the intrinsic properties of striatal cholinergic interneurons after dopamine lesion and chronic L-DOPA. *eLife* 9, e56920. doi:10.7554/eLife.56920.
- Consolo, S., Baldi, G., Giorgi, S., and Nannini, L. (1996). The cerebral cortex and parafascicular thalamic nucleus facilitate *in vivo* acetylcholine release in the rat striatum through distinct glutamate receptor subtypes. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2702–2710. doi:10.1111/j.1460-9568.1996.tb01565.x.
- Costa, R. M., Lin, S.-C., Sotnikova, T. D., Cyr, M., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., et al. (2006). Rapid alterations in corticostriatal ensemble coordination during acute dopamine-dependent motor dysfunction. *Neuron* 52, 359–369. doi:10.1016/j.neuron.2006.07.030.
- Courtemanche, R., Fujii, N., and Graybiel, A. M. (2003). Synchronous, focally modulated  $\beta$ -band oscillations characterize local field potential activity in the striatum of awake behaving monkeys. *J. Neurosci.* 23, 11741–11752. doi:10.1523/jneurosci.23-37-11741.2003.
- Cui, Q., Pamukcu, A., Cherian, S., Chang, I. Y., Berceau, B. L., Xenias, H. S., et al. (2021). Dissociable roles of Pallidal neuron subtypes in regulating motor patterns. *J. Neurosci.* 41, 4036–4059. doi:10.1523/jneurosci.2210-20.2021.
- Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease. *Neuron* 39, 889–909. doi:10.1016/s0896-6273(03)00568-3.
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I. B., Deisseroth, K., Bolam, J. P., Gerdjikov, T., et al. (2014). A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *J. Neurosci.* 34, 4509–4518. doi:10.1523/jneurosci.5071-13.2014.

- Deffains, M., Iskhakova, L., Katabi, S., Haber, S. N., Israel, Z., & Bergman, H. (2016). Subthalamic, not striatal, activity correlates with basal ganglia downstream activity in normal and parkinsonian monkeys. *eLife*, 5, e16443. <https://doi.org/10.7554/eLife.16443>
- Deffains, M., and Bergman, H. (2019). Parkinsonism-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.
- Dehorter, N., Guigoni, C., Lopez, C., Hirsch, J., Eusebio, A., Ben-Ari, Y., et al. (2009). Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 29, 7776–7787. doi:10.1523/jneurosci.1527-09.2009.
- Deng, P., Zhang, Y., and Xu, Z. C. (2007). Involvement of Ih in dopamine modulation of tonic firing in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 27, 3148–3156. doi:10.1523/jneurosci.5535-06.2007.
- Ding, J., Guzman, J. N., Tkatch, T., Chen, S., Goldberg, J. A., Ebert, P. J., et al. (2006). RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat. Neurosci.* 9, 832–842. doi:10.1038/nn1700.
- Ding, J. B., Guzman, J. N., Peterson, J. D., Goldberg, J. A., and Surmeier, D. J. (2010). Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron* 67, 294–307. doi:10.1016/j.neuron.2010.06.017.
- Doig, N. M., Magill, P. J., Apicella, P., Bolam, J. P., and Sharott, A. (2014). Cortical and thalamic excitation mediate the multiphasic responses of striatal cholinergic interneurons to motivationally salient stimuli. *J. Neurosci.* 34, 3101–3117. doi:10.1523/jneurosci.4627-13.2014.
- 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. doi:10.3389/fncir.2021.645287.
- Dorst, M. C., Tokarska, A., Zhou, M., Lee, K., Stagkourakis, S., Broberger, C., et al. (2020). Polysynaptic inhibition between striatal cholinergic interneurons shapes their network activity patterns in a dopamine-dependent manner. *Nat. Commun.* 11. doi:10.1038/s41467-020-18882-y.

- Duhne, M., Lara-González, E., Laville, A., Padilla-Orozco, M., Ávila-Cascajares, F., Arias-García, M., et al. (2020). Activation of parvalbumin-expressing neurons reconfigures neuronal ensembles in murine striatal microcircuits. *Eur. J. Neurosci.* 53, 2149–2164. doi:10.1111/ejn.14670.
- Elghaba, R., Vautrelle, N., and Bracci, E. (2016). Mutual control of cholinergic and low-threshold spike interneurons in the striatum. *Front. Cell. Neurosci.* 10. doi:10.3389/fncel.2016.00111.
- Ellender, T. J., Harwood, J., Kosillo, P., Capogna, M., and Bolam, J. P. (2013). Heterogeneous properties of central lateral and parafascicular thalamic synapses in the striatum. *J. Physiol.* 591, 257–272. doi:10.1113/jphysiol.2012.245233.
- Faust, T. W., Assous, M., Tepper, J. M., and Koós, T. (2016). Neostriatal GABAergic interneurons mediate cholinergic inhibition of spiny projection neurons. *J. Neurosci.* 36, 9505–9511. doi:10.1523/jneurosci.0466-16.2016.
- Feingold, J., Gibson, D. J., DePasquale, B., and Graybiel, A. M. (2015). Bursts of beta oscillation differentiate postperformance activity in the striatum and motor cortex of monkeys performing movement tasks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 112, 13687–13692. doi:10.1073/pnas.1517629112.
- Fino, E., Glowinski, J., and Venance, L. (2007). Effects of acute dopamine depletion on the electrophysiological properties of striatal neurons. *Neurosci. Res.* 58, 305–316. doi:10.1016/j.neures.2007.04.002.
- Frost Nylén, J., Carannante, I., Grillner, S., & Hellgren Kotaleski, J. (2021). Reciprocal interaction between striatal cholinergic and low-threshold spiking interneurons - A computational study. *Eur. J. Neurosci.* 53(7), 2135–2148. <https://doi.org/10.1111/ejn.14854>
- Fujiyama, F., Nakano, T., Matsuda, W., Furuta, T., Udagawa, J., and Kaneko, T. (2015). A single-neuron tracing study of Arkypallidal and prototypic neurons in healthy rats. *Brain Struct. Funct.* 221, 4733–4740. doi:10.1007/s00429-015-1152-2.
- Galarraga, E., Bargas, J., Martínez-Fong, D., and Aceves, J. (1987). Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neurosci. Lett.* 81, 351–355. doi:10.1016/0304-3940(87)90409-5.

- Galarraga, E., Hernández-López, S., Reyes, A., Miranda, I., Bermudez-Rattoni, F., Vilchis, C., et al. (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.
- Garcia-Munoz, M., Patino, P., Wright, A. J., and Arbuthnott, G. W. (1983). The anatomical substrate of the turning behaviour seen after lesions in the nigrostriatal dopamine system. *Neuroscience* 8, 87–95. doi:10.1016/0306-4522(83)90027-1.
- García-Vilchis, B., Suárez, P., Serrano-Reyes, M., Arias-García, M., Tapia, D., Duhne, M., et al. (2018). Differences in synaptic integration between direct and indirect striatal projection neurons: Role of CaV3 channels. *Synapse* 73. doi:10.1002/syn.22079.
- Gerfen, C. R., and Bolam, J. P. (2016). The neuroanatomical organization of the basal ganglia. *Handb. Behav. Neurosci.* 3–32. doi:10.1016/b978-0-12-802206-1.00001-5.
- Glawch, K. E., Kever, D. A., Hegeman, D. J., Cui, Q., Xenias, H. S., Augustine, E. C., et al. (2016). Npas1+ pallidal neurons target striatal projection neurons. *J. Neurosci.* 36, 5472–5488. doi:10.1523/jneurosci.1720-15.2016.
- Goldberg, J. A., and Wilson, C.J. (2005). Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 25, 10230–10238. doi:10.1523/jneurosci.2734-05.2005.
- Gonzales, K. K., Pare, J.-F., Wichmann, T., and Smith, Y. (2013). GABAergic inputs from direct and indirect striatal projection neurons onto cholinergic interneurons in the primate putamen. *J. Comp. Neurol.* 521, 2502–2522. doi:10.1002/cne.23295.
- Guo, Q., Wang, D., He, X., Feng, Q., Lin, R., Xu, F., et al. (2015). Whole-brain mapping of inputs to projection neurons and cholinergic interneurons in the dorsal striatum. *PLoS One* 10. doi:10.1371/journal.pone.0123381.
- 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.
- Henderson, J. M., Carpenter, K., Cartwright, H., and Halliday, G.M. (2000). Degeneration of the centred median–parafascicular complex in Parkinson's

disease. *Ann. Neurol.* 47: 345-352. doi:10.1002/1531-8249(200003)47:3<345::AID-ANA10>3.0.CO;2-V

- Hill, J. A., Zoli, M., Bourgeois, J. P., and Changeux, J. P. (1993). Immunocytochemical localization of a neuronal nicotinic receptor: The beta 2-subunit. *J. Neurosci.* 13, 1551–1568. doi:10.1523/jneurosci.13-04-01551.1993.
- Ibáñez-Sandoval, O., Xenias, H. S., Tepper, J. M., and Koós, T. (2015). Dopaminergic and cholinergic modulation of striatal tyrosine hydroxylase interneurons. *Neuropharmacology* 95, 468–476. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.03.036.
- Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores (2019) Parkinson, Segunda Enfermedad Neurodegenerativa Más frecuente en personas mayores de 50 años, gob.mx. Available at: <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/parkinson-segunda-enfermedad-neurodegenerativa-mas-frecuente-en-personas-mayores-de-50-anos?idiom=es> (Accessed: 19 October 2023).
- Iskhakova, L., Rappel, P., Deffains, M., Fonar, G., Marmor, O., Paz, R., et al. (2021). Modulation of dopamine tone induces frequency shifts in cortico-basal ganglia beta oscillations. *Nat. Commun.* 12. doi:10.1038/s41467-021-27375-5.
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colin, R., Bargas, J., and Hernández-Cruz, A. (2010). Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: Entrainment into a dominant network state. *J. Neurosci.* 30, 11326–11336. doi:10.1523/jneurosci.1380-10.2010.
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Nakano, Y., Lopez-Huerta, V. G., Hernandez-Cruz, A., Bargas, J., et al. (2019). Synchronized activation of striatal direct and indirect pathways underlies the behavior in unilateral dopamine-depleted mice. *Eur. J. Neurosci.* 49, 1512–1528. doi:10.1111/ejn.14344.
- Jiang, Z. G., and North, R. A. (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *J. Physiol.* 443, 533–553. doi:10.1113/jphysiol.1991.sp018850.
- Kaiser, S., and Wonnacott, S. (2000).  $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors indirectly modulate [ $^3$ H]dopamine release in rat striatal slices via glutamate release. *Mol. Pharmacol.* 58, 312–318. doi:10.1124/mol.58.2.312.

- Kalia, L. V., and Lang, A. E. (2016). Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. *Nature reviews. Neurology*, 12(2), 65–66. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.249>
- Kondabolu, K., Roberts, E. A., Bucklin, M., McCarthy, M. M., Kopell, N., and Han, X. (2016). Striatal cholinergic interneurons generate beta and gamma oscillations in the corticostriatal circuit and produce motor deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 113. 3159-3168. doi:10.1073/pnas.1605658113.
- Koós, T., and Tepper, J. M. (2002). Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the Neostriatum. *J. Neurosci.* 22, 529–535. doi:10.1523/jneurosci.22-02-00529.2002.
- Kosillo, P., Zhang, Y.-F., Threlfell, S., and Cragg, S. J. (2016). Cortical control of striatal dopamine transmission via striatal cholinergic interneurons. *Cereb. Cortex* 26, 4160–4169. doi:10.1093/cercor/bhw252.
- Lapper, S. R., and Bolam, J. P. (1992). Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience* 51, 533–545. doi:10.1016/0306-4522(92)90293-b.
- Lara-González, E., Duhne, M., Ávila-Cascajares, F., Cruz, S., and 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. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.04.058.
- Lemaire, N., Hernandez, L. F., Hu, D., Kubota, Y., Howe, M. W., and Graybiel, A. M. (2012). Effects of dopamine depletion on LFP oscillations in striatum are task- and learning-dependent and selectively reversed by L-DOPA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 109, 18126–18131. doi:10.1073/pnas.1216403109.
- Lemos, J. C., Friend, D. M., Kaplan, A. R., Shin, J. H., Rubinstein, M., Kravitz, A. V., et al. (2016). Enhanced GABA transmission drives Bradykinesia following loss of dopamine D2 receptor signaling. *Neuron* 90, 824–838. doi:10.1016/j.neuron.2016.04.040.
- Licheri, V., Lagström, O., Lotfi, A., Patton, M. H., Wigström, H., Mathur, B., et al. (2018). Complex control of striatal neurotransmission by nicotinic acetylcholine receptors via excitatory inputs onto medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 38, 6597–6607. doi:10.1523/jneurosci.0071-18.2018.

- Little, S., and Brown, P. (2014). The functional role of beta oscillations in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20. doi:10.1016/s1353-8020(13)70013-0.
- Luo, R., Janssen, M. J., Partridge, J. G., and Vicini, S. (2013). Direct and GABA-mediated indirect effects of nicotinic ACh receptor agonists on striatal neurones. *J. Physiol.* 591, 203–217. doi:10.1113/jphysiol.2012.241786.
- 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.
- Maiti, P., Manna, J., and Dunbar, G. L. (2017). Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl. Neurodegener.* 6. doi:10.1186/s40035-017-0099-z.
- Mallet, N., Micklem, B. R., Henny, P., Brown, M. T., Williams, C., Bolam, J. P., et al. (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., et al. (2016). Arky pallidal cells send a stop signal to striatum. *Neuron* 89, 308–316. doi:10.1016/j.neuron.2015.12.017.
- Mallet, N., Leblois, A., Maurice, N., and Beurrier, C. (2019). Striatal cholinergic interneurons: How to elucidate their function in health and disease. *Front. Pharmacol.* 10. doi:10.3389/fphar.2019.01488.
- Matsumoto, N., Minamimoto, T., Graybiel, A. M., and Kimura, M. (2001). Neurons in the thalamic CM-PF complex supply striatal neurons with information about behaviourally significant sensory events. *J. Neurophysiol.* 85, 960–976. doi:10.1152/jn.2001.85.2.960.
- Maurice, N., Mercer, J., Chan, C. S., Hernandez-Lopez, S., Held, J., Tkatch, T., et al. (2004). D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 24, 10289–10301. doi:10.1523/jneurosci.2155-04.2004.
- Maurice, N., Liberge, M., Jaouen, F., Ztaou, S., Hanini, M., Camon, J., et al. (2015). Striatal cholinergic interneurons control motor behavior and basal ganglia function in experimental parkinsonism. *Cell Rep.* 13, 657–666. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.034.

- McGeer, P. L., McGeer, E. G., Fibiger, H. C., and Wickson, V. (1971). Neostriatal choline acetylase and cholinesterase following selective brain lesions. *Brain Res.* 35, 308–314. doi:10.1016/0006-8993(71)90625-1.
- McKinley, J. W., Shi, Z., Kawikova, I., Hur, M., Bamford, I. J., Sudarsana Devi, S. P., et al. (2019). Dopamine deficiency reduces striatal cholinergic interneuron function in models of Parkinson's disease. *Neuron* 103. 1056-1072. doi:10.1016/j.neuron.2019.06.013.
- Melendez-Zaidi, A. E., Lakshminarasimhan, H., & Surmeier, D. J. (2019). Cholinergic modulation of striatal nitric oxide-producing interneurons. *The European journal of neuroscience*, 50(11), 3713–3731. <https://doi.org/10.1111/ejn.14528>
- Minamimoto, T., and Kimura, M. (2002). Participation of the thalamic CM-Pf complex in attentional orienting. *J. Neurophysiol.* 87, 3090–3101. doi: 10.1016/S0168-0102(02)00087-1
- Moran, R. J., Mallet, N., Litvak, V., Dolan, R. J., Magill, P. J., Friston, K. J., et al. (2011). Alterations in brain connectivity underlying beta oscillations in Parkinsonism. *PLoS Comput. Biol.* 7. doi:10.1371/journal.pcbi.1002124.
- Nitsch, C., and Riesenberger, R. (1995). Synaptic reorganisation in the rat striatum after dopaminergic deafferentation: An ultrastructural study using glutamate decarboxylase immunocytochemistry. *Synapse* 19, 247–263. doi:10.1002/syn.890190404.
- Parker, S. L., Fu, Y., McAllen, K., Luo, J., McIntosh, J. M., Lindstrom, J. M., et al. (2004). Up-regulation of brain nicotinic acetylcholine receptors in the rat during long-term self-administration of nicotine: Disproportionate increase of the  $\alpha 6$  subunit. *Mol. Pharmacol.* 65, 611–622. doi:10.1124/mol.65.3.611.
- Parker, P. R. L., Lalive, A. L., and Kreitzer, A. C. (2016). Pathway-specific remodeling of thalamostriatal synapses in Parkinsonian Mice. *Neuron* 89, 734–740. doi:10.1016/j.neuron.2015.12.038.
- Parr-Brownlie, L. C., Poloskey, S. L., Bergstrom, D. A., and Walters, J. R. (2009). Parafascicular thalamic nucleus activity in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 217, 269–281. doi:10.1016/j.expneurol.2009.02.010.
- Paz, R. M., Tubert, C., Stahl, A. M., Amarillo, Y., Rela, L., and Murer, M. G. (2021). Levodopa causes striatal cholinergic interneuron burst-pause activity in Parkinsonian Mice. *Mov. Disord.* 36, 1578–1591. doi:10.1002/mds.28516.

- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., et al. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in Parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol. Dis.* 91, 347–361. doi:10.1016/j.nbd.2016.02.023.
- Phelps, P. E., Houser, C. R., and Vaughn, J. E. (1985). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: A correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J. Comp. Neurol.* 238, 286–307. doi:10.1002/cne.902380305.
- Pisani, A., Bonsi, P., Centonze, D., Calabresi, P., and Bernardi, G. (2000). Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 20. doi:10.1523/jneurosci.20-07-j0003.2000.
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J. E., Barroso-Flores, J., Galarraga, E., and Bargas, J. (2013a). Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of Parkinsonian Tissue in Vitro. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–7. doi:10.1155/2013/519184.
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J., Hernández-Martinez, R., Rueda-Orozco, P., Galarraga, E., et al. (2013b). Global actions of nicotine on the striatal microcircuit. *Front. Syst. Neurosci.* 7. doi:10.3389/fnsys.2013.00078.
- Quik, M., Huang, L. Z., Parameswaran, N., Bordia, T., Campos, C., and Perez, X. A. (2009). Multiple roles for nicotine in Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 78, 677–685. doi:10.1016/j.bcp.2009.05.003.
- Raz, A., Feingold, A., Zelanskaya, V., Vaadia, E., and Bergman, H. (1996). Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and Parkinsonian primates. *J. Neurophysiol.* 76, 2083–2088. doi:10.1152/jn.1996.76.3.2083.
- Raz, A., Frechter-Mazar, V., Feingold, A., Abeles, M., Vaadia, E., and Bergman, H. (2001). Activity of pallidal and striatal tonically active neurons is correlated in MPTP-treated monkeys but not in normal monkeys. *J. Neurosci.* 21. RC128. doi:10.1523/jneurosci.21-03-j0006.2001.
- Rice, M. E., and Cragg, S. J. (2004). Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nat. Neurosci.* 7, 583–584. doi:10.1038/nn1244.
- Sanchez, G., Rodriguez, M. J., Pomata, P., Rela, L., and Murer, M. G. (2011). Reduction of an afterhyperpolarization current increases excitability in striatal

- cholinergic interneurons in rat parkinsonism. *J. Neurosci.* 31, 6553–6564. doi:10.1523/jneurosci.6345-10.2011.
- Sandor, N. T., Zelles, T., Kiss, J., Sershen, H., Torocsik, A., Lajtha, A., et al. (1991). Effect of nicotine on dopaminergic-cholinergic interaction in the striatum. *Brain Res.* 567, 313–316. doi: 10.1016/0006-8993(91)90810-I
- Sato, A., Sasaoka, T., Nishijo, T., and Momiyama, T. (2014). GABAergic synaptic transmission onto striatal cholinergic interneurons in dopamine D2 receptor knock-out mice. *Neuroscience* 263, 138–147. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.010.
- Schulz, J. M., and Reynolds, J. N. J. (2013). Pause and rebound: Sensory control of cholinergic signaling in the striatum. *Trends Neurosci.* 36, 41–50. doi:10.1016/j.tins.2012.09.006.
- Sidibé, M., and Smith, Y. (1999). Thalamic inputs to striatal interneurons in monkeys: Synaptic organization and co-localization of calcium binding proteins. *Neuroscience* 89, 1189–1208. doi:10.1016/s0306-4522(98)00367-4.
- Simola, N., Morelli, M., and Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 11, 151–167. doi:10.1007/bf03033565.
- Smith, Y., Galvan, A., Ellender, T. J., Doig, N., Villalba, R. M., Huerta-Ocampo, I., et al. (2014). The thalamostriatal system in normal and diseased states. *Front. Syst. Neurosci.* 8:5. doi: 10.3389/fnsys.2014.00005
- Straub, C., Tritsch, N. X., Hagan, N. A., Gu, C., and Sabatini, B. L. (2014). Multiphasic modulation of cholinergic interneurons by nigrostriatal afferents. *J. Neurosci.* 34, 8557–8569. doi:10.1523/jneurosci.0589-14.2014.
- Suárez, L. M., Solís, O., Caramés, J. M., Taravini, I. R., Solís, J. M., Murer, M. G., et al. (2014). L-DOPA treatment selectively restores spine density in dopamine receptor D2-expressing projection neurons in dyskinetic mice. *Biol. Psychiatry* 75, 711–722. doi:10.1016/j.biopsych.2013.05.006.
- Sullivan, M. A., Chen, H., and Morikawa, H. (2008). Recurrent inhibitory network among striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 28, 8682–8690. doi:10.1523/jneurosci.2411-08.2008.

- Tan, C. O., and Bullock, D. (2008). A dopamine–acetylcholine cascade: Simulating learned and lesion-induced behavior of striatal cholinergic interneurons. *J. Neurophysiol.* 33 100, 2409–2421. doi:10.1152/jn.90486.2008.
- Tanimura, A., Pancani, T., Lim, S. A., Tubert, C., Melendez, A. E., Shen, W., et al. (2017). Striatal cholinergic interneurons and Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 47, 1148–1158. doi:10.1111/ejn.13638.
- Tanimura, A., Du, Y., Kondapalli, J., Wokosin, D. L., and Surmeier, D. J. (2019). Cholinergic interneurons amplify thalamostriatal excitation of striatal indirect pathway neurons in Parkinson's disease models. *Neuron* 101. doi:10.1016/j.neuron.2018.12.004.
- Tubert, C., Taravini, I. R. E., Flores-Barrera, E., Sánchez, G. M., Prost, M. A., Avale, M. E., et al. (2016). Decrease of a current mediated by K v 1.3 channels causes striatal cholinergic interneuron hyperexcitability in experimental parkinsonism. *Cell Rep.* 16, 2749–2762. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.016.
- Tubert, C., and Murer, M. G. (2020). What's wrong with the striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease? Focus on intrinsic excitability. *Eur. J. Neurosci.* 53, 2100–2116. doi:10.1111/ejn.14742.
- Villalba, R. M., Mathai, A., and Smith, Y. (2015). Morphological changes of glutamatergic synapses in animal models of Parkinson's disease. *Front. Neuroanat.* 9. doi:10.3389/fnana.2015.00117.
- Villalba, R. M., Pare, J.-F., Lee, S., Lee, S., and Smith, Y. (2019). Thalamic degeneration in MPTP-treated Parkinsonian Monkeys: Impact upon glutamatergic innervation of striatal cholinergic interneurons. *Brain Struct. Funct.* 224, 3321–3338. doi:10.1007/s00429-019-01967-w.
- Williams, D., Tijssen, M., van Bruggen, G., Bosch, A., Insola, A., Di Lazzaro, V., et al. (2002). Dopamine-dependent changes in the functional connectivity between basal ganglia and cerebral cortex in humans. *Brain* 125, 1558–1569. doi:10.1093/brain/awf156.
- Wilson, C. J., Chang, H. T., and Kitai, S. T. (1990). Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* 10, 508–519. doi: 10.1523/jneurosci.10-02-00508.1990

- 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.
- Wilson, C. J., and Goldberg, J. A. (2006). Origin of the slow afterhyperpolarization and slow rhythmic bursting in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurophysiol.* 95, 196–204. doi:10.1152/jn.00630.2005.
- Yan, Z., Song, W.-J., and Surmeier, D. J. (1997). D2 dopamine receptors reduce N-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat Neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J. Neurophysiol.* 77, 1003–1015. doi:10.1152/jn.1997.77.2.1003.
- Zhai, S., Tanimura, A., Graves, S. M., Shen, W., and Surmeier, D. J. (2018). Striatal synapses, circuits, and Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 48, 9–16. doi:10.1016/j.conb.2017.08.004.
- Zhang, H., and Sulzer, D. (2004). Frequency-dependent modulation of dopamine release by Nicotine. *Nat. Neurosci.* 7, 581–582. doi:10.1038/nn1243.
- Zhang, Y., Meredith, G. E., Mendoza-Elias, N., Rademacher, D. J., Tseng, K. Y., and Steece-Collier, K. (2013). Aberrant restoration of spines and their synapses in L-DOPA-induced dyskinesia: Involvement of corticostriatal but not thalamostriatal synapses. *J. Neurosci.* 33, 11655–11667. doi:10.1523/jneurosci.0288-13.2013.
- Zhou, F.-M., Liang, Y., and Dani, J. A. (2001). Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat. Neurosci.* 4, 1224–1229. doi:10.1038/nn769.
- Zhou, F.-M., Wilson, C. J., and Dani, J. A. (2002). Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J. Neurobiol.* 53, 590–605. doi:10.1002/neu.10150.

## 10.0 SUPLEMENTARIAS



FigS0. Genotipificación de ratones ChAT-Cre. Se realizó la extracción de DNA de la cola de cada raton utilizando el kit REEXTRACT para la posterior amplificación con PCR y determinación de la presencia del gen de la Cre-Recombinasa. (Izq. A Der) Marcador de peso molecular DNA Ladder. Escalera de 100 pb (Rango 100 – 3000 pares de bases)

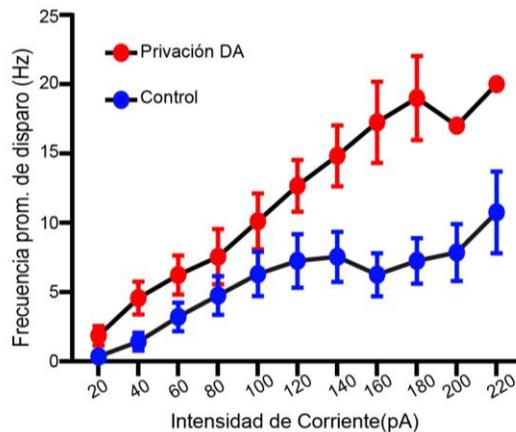


Figura S1. Gráficos de intensidad-frecuencia de interneuronas colinérgicas en control y después de la privación de DA (modelo de parkinsonismo 6-OHDA). La frecuencia media de disparo al mismo

estímulo de 1s aumenta significativamente ( $n = 14$  neuronas de diferentes animales para cada muestra;  $P < 0,0001$ ; ANOVA de dos vías con pruebas de Tukey post hoc para comparaciones múltiples).

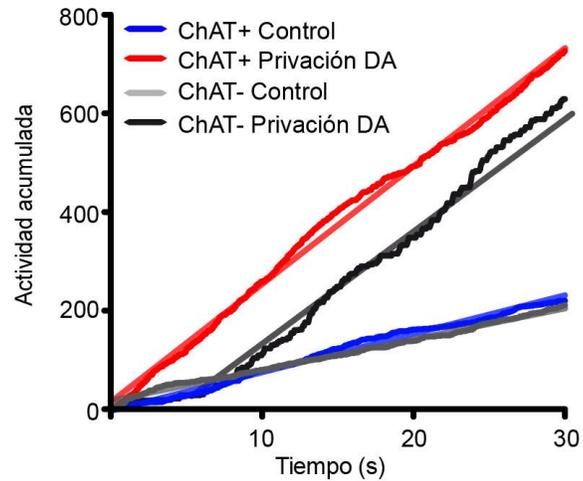


Figura S2. Trazos representativos que muestran que las interneuronas colinérgicas exhiben una mayor tasa de acumulación de actividad después de la privación de DA. Los gráficos estadísticos de caja que muestran la tasa de acumulación de experimentos individuales se construyeron agregando la actividad de los vectores de columna a lo largo del tiempo a partir de los histogramas de coactividad (en la parte inferior de los diagramas ráster). Las pendientes de las líneas rectas ajustadas se representan en diagramas de caja como tasa de acumulación de actividad (por ejemplo: Fig. 5).

# PORTADA DEL ARTÍCULO CIENTÍFICO PUBLICADO CON RESULTADOS DE ESTE PROYECTO DE TESIS.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.945816>

 Frontiers in Synaptic Neuroscience

TYPE Original Research  
PUBLISHED 06 September 2022  
DOI 10.3389/fnsyn.2022.945816



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Roman A. Romanov,  
Medical University of Vienna, Austria

REVIEWED BY  
Hong-Yuan Chu,  
Van Andel Institute, United States  
M. Gustavo Murer,  
University of Buenos Aires, Argentina  
Rebekah Evans,  
Georgetown University Medical  
Center, United States

\*CORRESPONDENCE  
José Bargas  
jbargas@fnc.unam.mx  
Esther Lara-González  
e.lara@northwestern.edu

RECEIVED 17 May 2022  
ACCEPTED 21 July 2022  
PUBLISHED 06 September 2022

CITATION  
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

COPYRIGHT  
© 2022 Padilla-Orozco, Duhne,  
Fuentes-Serrano, Ortega, Galarraga,  
Bargas and Lara-González. This is an  
open-access article distributed under  
the terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution  
or reproduction is permitted which  
does not comply with these terms.

## Synaptic determinants of cholinergic interneurons hyperactivity during parkinsonism

Montserrat Padilla-Orozco<sup>1</sup>, Mariana Duhne<sup>1,2</sup>,  
Alejandra Fuentes-Serrano<sup>1</sup>, Aidán Ortega<sup>1</sup>, Elvira Galarraga<sup>1</sup>,  
José Bargas<sup>1\*</sup> and Esther Lara-González<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>División Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup>Department of Neurology, University of California, San Francisco, San Francisco, CA, United States, <sup>3</sup>Department of Neuroscience, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, United States

Parkinson's disease is a neurodegenerative ailment generated by the loss of dopamine in the basal ganglia, mainly in the striatum. The disease courses with increased striatal levels of acetylcholine, disrupting the balance among these modulatory transmitters. These modifications disturb the excitatory and inhibitory balance in the striatal circuitry, as reflected in the activity of projection striatal neurons. In addition, changes in the firing pattern of striatal tonically active interneurons during the disease, including cholinergic interneurons (CINs), are being searched. Dopamine-depleted striatal circuits exhibit pathological hyperactivity as compared to controls. One aim of this study was to show how striatal CINs contribute to this hyperactivity. A second aim was to show the contribution of extrinsic synaptic inputs to striatal CINs hyperactivity. Electrophysiological and calcium imaging recordings in Cre-mice allowed us to evaluate the activity of dozens of identified CINs with single-cell resolution in *ex vivo* brain slices. CINs show hyperactivity with bursts and silences in the dopamine-depleted striatum. We confirmed that the intrinsic differences between the activity of control and dopamine-depleted CINs are one source of their hyperactivity. We also show that a great part of this hyperactivity and firing pattern change is a product of extrinsic synaptic inputs, targeting CINs. Both glutamatergic and GABAergic inputs are essential to sustain hyperactivity. In addition, cholinergic transmission through nicotinic receptors also participates, suggesting that the joint activity of CINs drives the phenomenon; since striatal CINs express nicotinic receptors, not expressed in striatal projection neurons. Therefore, CINs hyperactivity is the result of changes in intrinsic properties and excitatory and inhibitory inputs, in addition to the modification of local circuitry due to cholinergic nicotinic transmission. We conclude that CINs are the main drivers of the pathological hyperactivity present in the striatum that is depleted of dopamine, and this is, in part, a result of