



Universidad Nacional de Córdoba

Doctorado en Neurociencias

Mecanismos involucrados en la actividad aberrante de las interneuronas colinérgicas estriatales en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Neurociencias de la Universidad Nacional de Córdoba

Doctorando: Ing. Rodrigo Manuel Paz

Director: Dr. Gustavo Murer

Co-directores: Dra. Lorena Rela, Dr. Agustín Anastasía

Lugar de trabajo: IFIBIO Houssay, Grupo de Neurociencia de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y CONICET



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Gustavo Murer y Lorena Rela por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, porque con su dedicación e infinita paciencia me han brindado una gran formación científica en un ambiente de excelente calidad humana. Fue una suerte y un placer haber hecho el doctorado con ellos.

Gracias a Agustín Anastasía, Juan Belforte y Diego Pafundo por haber estado para ayudarme y por todas las discusiones sobre el trabajo que hicieron que sea lo mejor posible.

A Cecilia Tubert y Agostina Stahl, con quienes es realmente un placer trabajar día a día.

A Roberto Etchenique y Yimy Amarillo, porque con excelente predisposición colaboraron con recursos invaluable para esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, en especial Ceci, Dani, Agos y Ettl que hicieron del trabajo diario sea mas divertido y se convirtieron en grandes amigos.

A Vincent, a mis padres y al resto de mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

A Carolina Maldonado por haberme abierto las puertas al mundo de la ciencia al invitarme a su laboratorio en el segundo año de la carrera de ingeniería.

Y finalmente a todas las instituciones que hicieron posible este proyecto: la Universidad de Buenos Aires, la Universidad Nacional de Córdoba, el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Mecanismos involucrados en la actividad aberrante de las interneuronas colinérgicas estriatales en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo causado por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Por su desconocida etiología, las opciones terapéuticas apuntan a restaurar la estimulación de los receptores para dopamina en el estriado. La administración de L-DOPA es la terapia más utilizada dado que tiene importantes beneficios sintomáticos en etapas tempranas de la enfermedad. Sin embargo, con grados avanzados de neurodegeneración, comienzan a aparecer complicaciones motoras adicionales como discinesias inducidas por L-DOPA y fluctuaciones motoras. En este contexto, la identificación de nuevos blancos terapéuticos constituye un campo activo de investigación.

Además de la dopamina, la acetilcolina es otro importante neuromodulador de la actividad estriatal, cuya disponibilidad se ve afectada por la degeneración dopaminérgica y el tratamiento con L-DOPA. De hecho, la administración de anticolinérgicos (antagonistas de receptores muscarínicos), era la opción terapéutica preferida antes del descubrimiento de la L-DOPA, aunque su utilidad clínica se ve limitada por su acción sobre receptores colinérgicos extraestriatales que resulta en efectos secundarios adversos. Así, las nuevas terapias antiparkinsonianas basadas en sitios colinérgicos deberían dirigirse específicamente al estriado. La principal fuente de acetilcolina estriatal son las interneuronas colinérgicas estriatales (ICE), que exhiben actividad tónica intrínseca. Trabajos previos del laboratorio reportaron que las ICE se encuentran hiperexcitables en un modelo de roedor de la EP y estudios recientes encontraron que controlar selectivamente su actividad tiene efectos antiparkinsonianos y antidiscinéticos. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la actividad aberrante de las ICE en etapas avanzadas de la EP luego de un tratamiento con L-DOPA continúan desconocidos.

En esta tesis se utilizaron herramientas de electrofisiología *in vitro* para caracterizar los cambios en excitabilidad y actividad espontánea intrínseca de las ICE en ratones con parkinsonismo experimental tratados con L-DOPA, con el objetivo último de identificar blancos moleculares para modular su actividad. Se encontró que las ICE muestran aumentos de excitabilidad y actividad espontánea con patrones oscilatorios de tipo salva-pausa luego del tratamiento crónico con L-DOPA que son causados por cambios en la señalización del receptor para dopamina D5 que persisten durante el período "off" L-DOPA (cuando los niveles de L-DOPA en plasma y de dopamina estriatal son bajos). Las oscilaciones son mediadas por un aumento de la corriente de potasio *inward-rectifier* (Kir) y una disminución de una corriente de *leak*, que resulta en la aparición de una zona de pendiente negativa en la curva corriente-voltaje (I-V) que desestabiliza el potencial de membrana y causa la

oscilación. Por otro lado, se describió el rol de los canales de potasio *delayed-rectifier* Kv7 en la excitabilidad y actividad tónica de las ICE, dado que estos canales son un blanco atractivo para controlar la actividad de las ICE por ser modulados con farmacología aprobada clínicamente.

Los resultados de esta tesis permiten entender mejor los efectos de la señalización colinérgica estriatal en la EP luego del tratamiento crónico con L-DOPA y sugieren que terapias dirigidas a reestablecer su actividad normal podrían tener importantes beneficios terapéuticos. Así, los receptores D5, los canales Kir y canales de *leak* aparecen como potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de la EP, mientras que los canales Kv7 surgen como blancos moleculares alternativos para controlar la actividad de las ICE.

ABREVIACIONES

5-HT: Serotonina

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

A2A: Receptor para Adenosina 2A

ACh: Acetilcolina

nACh: Receptor nicotínico para Acetilcolina

ACSF: *Artificial CerebroSpinal Fluid*

AINEs: Aintinflamatorios No Esteroideos

AIM: *Abnormal Involuntary Movement*

ANOVA: Análisis de la Varianza

ATP: adenosín trifosfato

AHP: *Afterhyperpolarization*

sAHP: *slow AHP*

mAHP: *medium AHP*

fAHP: *fast AHP*

BK: *Big conductance potassium channel*

cAMP: Adenosín Monofosfato cíclico

CBR: Receptor para Canabinoides

CBT: Corteza – Ganglios Basales – Tálamo

CM-Pf: Núcleos Centromedial y Parafascicular del tálamo

COX-1: ciclooxigenasa-1

CR: Calretinina

DA: Dopamina

eCB: endocannabinodes

EE: Error Estándar

EMA: *European Medicines Agency*

EP: Enfermedad de Parkinson

EPSP: Potencial Post-Sináptico Excitatorio

FDA: *Food and Drug Administration*

FFT: Transformada rápida de Fourier

GP: Globo pálido

GPe: Globo Pálido externo

GPi: Globo Pálido interno

HCN: *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*

ICE: Interneuronas Colinérgicas Estriatales

ISI: Intervalo inter espigas

L-DOPA: Levodopa

LID: Discinesias Inducidas por L-DOPA

LTD: Depresión duradera

LTP: Potenciación duradera

MAO-B: Monoaminoxidasa-B

MFA: Acido Meclofenámico

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina

NEM: Neuronas Espinosas Medianas

iNEM: NEM de la vía indirecta

dNEM: NEM de la vía directa

NRD: Núcleo del Rafe Dorsal

NST: Núcleo Subtalámico

PA: Potencial de Acción

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PV: Parvaalbúmina

RIC: Rango Inter Cuartil

RPE: *Reward Prediction Error*

SDF: *Spike Density Function*

SK: *Small conductance potassium channel*

SNc: Sustancia Nigra pars compacta

SNr: Sustancia Nigra pars reticulada

SOM: Somatostatina

TAN: Neurona Tónicamente Activa

TH: Tirosina Hidroxilasa

TMD: Dominio de Transmembrana

TTX: tetrodotoxina

INDICE

1	INTRODUCCION	11
1.1	Circuito de los ganglios de la base	11
1.1.1	Funciones de los ganglios basales	13
1.1.1.1	Circuito motor	13
1.1.1.2	Aprendizaje instrumental	13
1.2	Interneuronas colinérgicas estriatales	14
1.2.1	Señalización colinérgica en el estriado	17
1.2.1.1	Regulación muscarínica	17
1.2.1.2	Regulación nicotínica	18
1.2.2	Respuesta de pausa de las ICE ante estímulos salientes	19
1.3	Enfermedad de Parkinson	22
1.3.1	Generalidades	22
1.3.2	Tratamiento con L-DOPA	24
1.3.3	Alteraciones circuitales que siguen a la degeneración dopaminérgica	27
1.3.4	Alteraciones circuitales que siguen al tratamiento con L-DOPA	29
1.3.5	Anticolinérgicos	30
1.3.6	Alteraciones de las ICE en la EP y las LID	30
1.4	Canales de potasio <i>inward rectifier</i> (Kir)	32
1.4.1	Estructura	32
1.4.2	Regulación	35
1.4.3	Rol de Kir en las oscilaciones de membrana de las ICE	38
1.5	Mecanismos de regulación de la actividad intrínseca de las ICE	41
2	OBJETIVOS	44
3	MATERIALES & MÉTODOS	46
3.1	Métodos generales	46
3.1.1	Animales	46
3.1.2	Lesión por 6-hidroxidopamina	46
3.1.3	Obtención de rodajas	47
3.1.4	Registros electrofisiológicos	47
3.1.5	Manipulaciones farmacológicas	50
3.1.6	Reconstrucciones neuronales	50
3.1.7	Inmunohistoquímica	51
3.1.8	Adquisición de imágenes	51
3.2	Cuantificaciones y análisis estadístico	51
3.2.1	Evaluación de síntomas motores de parkinsonismo experimental	51
3.2.2	Administración de L-DOPA y puntuación de discinesias	52
3.2.3	Análisis de datos electrofisiológicos	52
3.2.3.1	Registros en modo current clamp	52
3.2.3.2	Registros en configuración cell attached	55
3.2.3.3	Registros en modo voltage clamp	55

3.2.4	Análisis estadísticos	56
4	CAPITULO I	59
	<i>Alteraciones electrofisiológicas de las ICE en un modelo animal de la EP tratado con L-DOPA</i>	59
4.1	Modelo animal de la EP	59
4.2	Las ICE de ratones discinéticos están hiperexcitables y oscilatorias	62
4.3	Las ICE oscilatorias amplifican respuestas a estímulos hiperpolarizantes	66
4.4	Las ICE de ratones discinéticos conservan su patrón salva-pausa en registros <i>cell attached</i>	67
4.5	La estimulación de receptores D1/D5 en ratones control reproduce los efectos del tratamiento con L-DOPA	69
4.6	Antagonizar los receptores D1/D5 en animales discinéticos no revierte los efectos de la L-DOPA	72
4.7	Una única dosis de L-DOPA causa oscilaciones, pero no hiperexcitabilidad	73
4.8	La exposición a la L-DOPA en animales sanos no altera la fisiología de las ICE	76
4.9	Conclusión Capítulo I	76
5	CAPITULO II	79
	<i>Corrientes subyacentes a la actividad oscilatoria de las ICE</i>	79
5.1	Las oscilaciones observadas en ICE de animales discinéticos o por estimulación de receptores D1/D5 dependen de I_{Kir} e I_h	79
5.2	Las ICE oscilatorias exhiben incrementos en I_{Kir} y decrementos en I_{leak} sin cambios en I_h	81
5.2.1	Evaluación de I_{Kir}	81
5.2.2	Evaluación de I_h	82
5.2.3	Evaluación de I_{Leak}	84
5.3	El tratamiento con L-DOPA no induce cambios morfológicos en las ICE	85
5.4	La estimulación D1/D5 incrementa I_{Kir} en ICE de ratones control	86
5.5	Manipular I_{Kir} y/o I_{Leak} en tiempo real permite modificar el patrón de disparo de las ICE	89
5.6	Conclusión Capítulo II	93
6	CAPITULO III	98
	<i>Canales K_v7 como potenciales blancos para disminuir la actividad de las ICE</i>	98
6.1	Las ICE expresan canales K_v7 , pero bloquearlos no tiene efecto sobre la actividad tónica y excitabilidad	99
6.2	Canales K_v7 limitan la sumación de EPSP en ICE mediante mecanismos postsinápticos	101
6.3	Las ICE poseen una gran reserva funcional de canales K_v7	103

6.4	Los AINEs disminuyen la excitabilidad de las ICE por un mecanismo independiente de K_v7	104
6.5	Conclusión Capítulo III	106
7	DISCUSION	108
7.1	Alteraciones intrínsecas de las ICE en la EP	108
7.2	Posibles consecuencias circuitales de los cambios intrínsecos de las ICE en la EP	111
7.2.1	Plasticidad córticoestriatal y excitabilidad de las NEM	111
7.2.2	Liberación de dopamina	112
7.2.3	Plasticidad estructural	112
7.2.4	Actividad anormal de la red	113
7.3	Reinterpretación del estado hipercolinérgico	113
7.3.1	Posibles sitios de acción de los anticolinérgicos	114
7.3.2	Restaurar la actividad de las ICE como alternativa terapéutica a la administración de anticolinérgicos	115
7.4	Canales K_v7 como blancos alternativos para regular la actividad de las ICE	116
8	REFERENCIAS	119

INTRODUCCION

1 INTRODUCCION

1.1 Circuito de los ganglios de la base

Los ganglios de la base son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que procesan la información proveniente de la corteza cerebral y retroalimentan a la corteza a través de un circuito que involucra al tálamo. El circuito está formado por el estriado (el principal núcleo de entrada de información), estructuras intermedias como el globo pálido (GP, globo pálido externo en primates –GPe–) y el núcleo subtalámico (NST) y los núcleos de salida: el núcleo entopeduncular (EP, globo pálido interno en primates –GPi–) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Los ganglios de la base están fuertemente regulados por densas proyecciones dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra pars compacta (SNc) que liberan dopamina en el estriado (Figura i1).

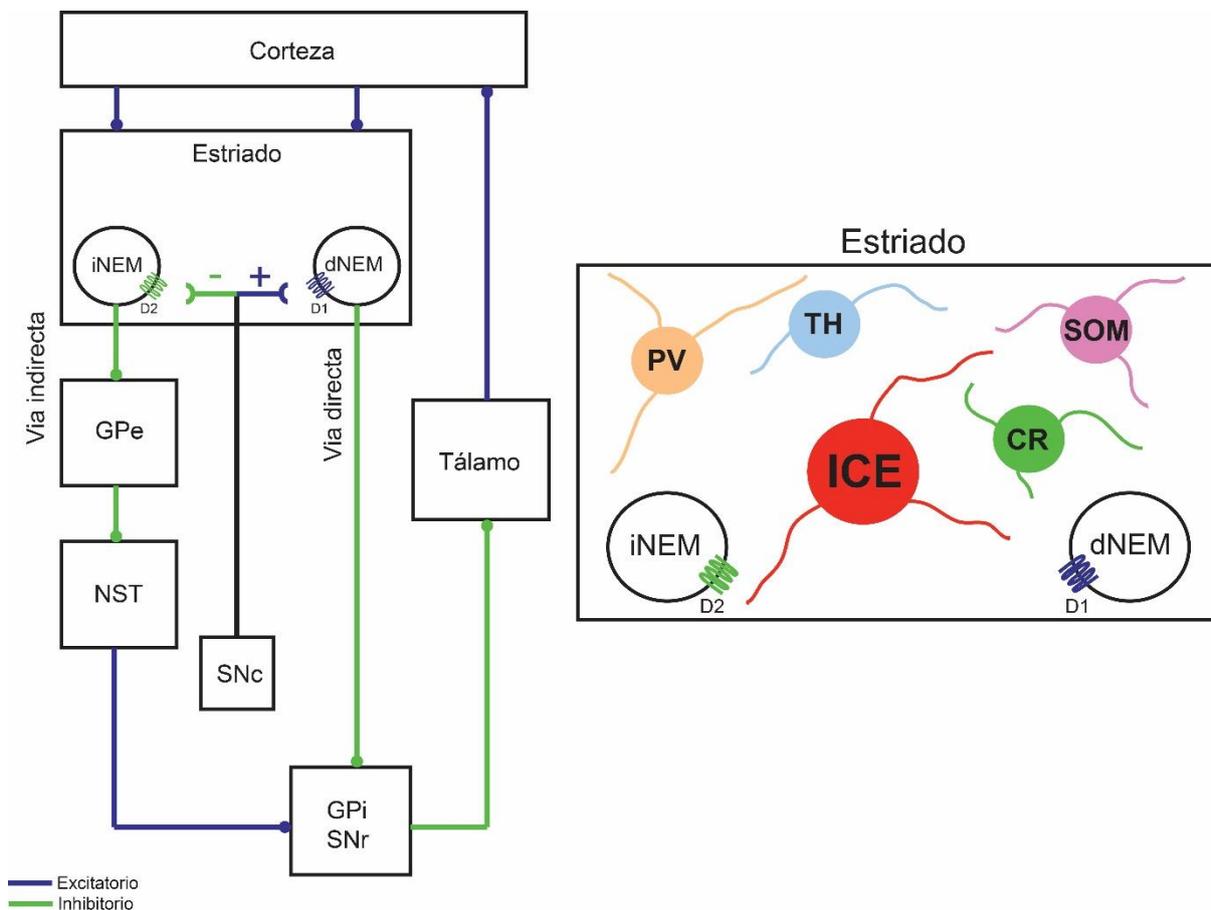


Figura i1. Izquierda: Circuito de los ganglios de la base. iNEM y dNEM: Neuronas espinosas medianas de la vía indirecta y directa respectivamente. Las iNEM expresan el receptor para dopamina D2, mientras que las dNEM expresan el receptor D1; GPe: Globo Pálido externo; NST: Núcleo Subtalámico; GPi: Globo Pálido interno; SNr; Sustancia Nigra pars reticulata; SNc; Sustancia Nigra pars compacta. **Derecha: Neuronas estriales.** Se esquematizan las neuronas de proyección (iNEM y dNEM) y algunas de las más estudiadas interneuronas

estriatales. Entre ellas las interneuronas GABAérgicas que expresan parvaalbúmina (PV), tirosina hidroxilasa (TH), somatostatina (SOM) o calretinina (CR) e interneuronas colinérgicas: ICE: Interneuronas Colinérgicas Estriatales.

El estriado está formado por un 95% de neuronas de proyección GABAérgicas, conocidas como neuronas espinosas medianas (NEM). El 5% restante está compuesto por distintas subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas (3 a 4%) y 1 a 2% de interneuronas colinérgicas (Figura i1). Si bien son reducidas en número, las interneuronas ejercen un importante control sobre la actividad local (Alcantara et al., 2001; Bolam et al., 1984; Gonzales y Smith, 2015; Kawaguchi et al., 1995; Mamaligas y Ford, 2016; Pisani et al., 2007; Tepper et al., 2018; Tepper y Bolam, 2004; Yan y Surmeier, 1996).

El procesamiento de información en los ganglios de la base ocurre a través de dos vías: la vía directa y la vía indirecta (Albin et al., 1989). Estas vías tienen origen en dos subtipos de neuronas de proyección estriatales, que se caracterizan por sus diferentes proyecciones axonales y patrones de expresión génica (Gerfen et al., 1990). La vía directa se origina en las NEM estriatonigrales (dNEM), que proyectan de manera monosináptica a los núcleos de salida y expresan principalmente el receptor excitatorio para dopamina D1. Los núcleos de salida envían proyecciones GABAérgicas hacia el tálamo, que, a su vez, envía proyecciones glutamatérgicas a la corteza. El efecto neto de la activación de esta vía es la desinhibición de las neuronas excitatorias tálamocorticales. En el circuito motor clásico, la activación de esta vía promueve el movimiento. La vía indirecta se origina en las NEM estriatopalidales (iNEM), que expresan principalmente el receptor de dopamina D2 (inhibitorio) y proyectan por una vía multisináptica involucrando al GPe y al NST hacia los núcleos de salida. El efecto neto de la activación de esta vía es la inhibición de las neuronas tálamocorticales, y en el circuito motor esto supone la inhibición del movimiento. La visión clásica propone que la dopamina (DA) excita a las dNEM e inhibe a las iNEM a través de la activación de los receptores D1 y D2 respectivamente (Gerfen et al., 1990). En base a este modelo, la liberación de dopamina en el estriado promovería el movimiento.

Si bien el conexionado esquematizado en la Figura i1 muestra la descripción clásica del circuito de los ganglios de la base, el panorama es bastante más complejo: por ejemplo, existen proyecciones directas de la corteza al NST (formando la vía hiperdirecta) (Nambu et al., 2002), proyecciones directas del GPe a los núcleos de salida (Bolam et al., 1993) y al estriado (Bevan et al., 1998; Mallet et al., 2016), proyecciones de las dNEM al GPe (Wei et al., 2013) y proyecciones de otras áreas subcorticales al estriado (Dautan et al., 2014), entre otras.

1.1.1 Funciones de los ganglios basales

1.1.1.1 Circuito motor

Como se mencionó, el modelo clásico del circuito de los ganglios basales propone que las dos vías de salida del estriado tienen efectos antagónicos entre sí: mientras que la activación de la vía directa promueve el movimiento, la activación de la vía indirecta lo inhibe. Este modelo se basa principalmente en la polaridad del efecto de activar selectivamente cada vía sobre la actividad neta de las neuronas excitatorias talamocorticales, y en resultados de estudios de las alteraciones funcionales de estas vías en condiciones patológicas. Por ejemplo, la sintomatología motora como la hipocinesia o la hipercinesia responderían a desbalances en la actividad de ambas vías (DeLong, 1990). Además, la manipulación farmacológica u optogenética selectiva de alguna de estas vías en modelos animales revela efectos diametralmente opuestos sobre el movimiento (Hikida et al., 2010; Kravitz et al., 2010; Tecuapetla et al., 2014). Sin embargo, estudios más recientes encontraron activación concurrente de ambas vías en la iniciación del movimiento o la ejecución de acciones aprendidas, lo que sugiere que en realidad las vías de salida del estriado tendrían efectos complementarios y que la activación coordinada de ambas es necesaria para la correcta iniciación y ejecución de acciones (Cui et al., 2013; Tecuapetla et al., 2016).

1.1.1.2 Aprendizaje instrumental

El circuito de los ganglios de la base, y en particular el estriado, tiene un rol clave en el aprendizaje instrumental (Graybiel, 2008; Yin et al., 2005). El aprendizaje instrumental es un tipo de aprendizaje asociativo en el cual el sujeto asocia las respuestas conductuales, que tengan consecuencias beneficiosas, con un estímulo contingente y por consiguiente ajusta su conducta de manera que estas respuestas tendrán mayor probabilidad de ocurrencia cuando el estímulo vuelva a aparecer (fenómeno conocido clásicamente como Ley de Efecto de Thorndike).

La recurrencia de acciones que obtuvieron consecuencias positivas está representada por patrones de actividad neuronal en regiones corticales, como en corteza motora primaria, y su reforzamiento depende de mecanismos de plasticidad que involucran a los circuitos córticoestriatales. De hecho, la desconexión córticoestriatal mediante la ablación selectiva de la subunidad NR1 del receptor glutamatérgico tipo NMDA (subunidad esencial para la función del receptor) en las NEM impide este tipo de aprendizaje (Koralek et al., 2012). Estos circuitos codifican las contingencias acción-consecuencia y proveen retroalimentación a la corteza necesaria para la recurrencia de las conductas apropiadas (Athalye et al., 2020; Yin et al., 2005, 2006, 2009).

En este contexto, la dopamina liberada en el estriado cumple un rol fundamental. De hecho, el bloqueo de la transmisión dopaminérgica en etapas tempranas de un aprendizaje

instrumental en animales de laboratorio impide la adquisición de estas conductas. Además, la administración de bloqueantes dopaminérgicos una vez que fue adquirida la conducta, debilita la acción, aunque los animales logren obtener la recompensa (Spyraki et al., 1982; Wise y Schwartz, 1981). Así, la dopamina estaría involucrada tanto en la obtención inmediata de una recompensa como en el refuerzo de una memoria que asocia una acción con la recompensa obtenida (Wise, 2004).

En registros electrofisiológicos en animales realizando tareas de tipo instrumental, se observó que las neuronas dopaminérgicas son activadas por la presencia de la recompensa, o por estímulos que la predicen (Pan et al., 2005; Schultz et al., 1997; Steinberg et al., 2013). Se ha propuesto que cambios fásicos en la actividad de estas neuronas codifican el “error en la predicción de la recompensa” (*Reward Prediction Error, RPE*) y que esta señal es importante para la adquisición de conductas dirigidas a metas. Así, un aumento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas señala una recompensa mayor a la esperada, mientras que una disminución en su actividad respondería a una recompensa menor a la esperada (Schultz, 2002). Cabe señalar que no siempre el disparo de potenciales de acción en el soma de estas neuronas correlaciona con la liberación de dopamina en sus terminales estriatales (Mohebi et al., 2019), posiblemente porque la liberación de dopamina puede ser regulada localmente a partir de receptores presinápticos localizados en las terminaciones dopaminérgicas (Kosillo et al., 2016; Threlfell et al., 2012).

La dopamina regula la plasticidad de las sinapsis córticoestriatales (Reynolds et al., 2001; Shen et al., 2008), mecanismo que sustentaría la adquisición de las conductas dirigidas a metas. El circuito cortico-basal está organizado topográficamente mediante un bucle reentrante (Alexander et al., 1986) de manera que la salida de los ganglios basales retroalimenta una determinada población de neuronas en la corteza. Así, cuando la dopamina refuerza sinapsis córticoestriatales de neuronas corticales que codifican acciones que resultaron inicialmente exitosas, la organización topográfica del estriado permitiría retroalimentar a dicha población de neuronas corticales (Athalye et al., 2020). De esta manera, la plasticidad córticoestriatal dependiente de dopamina es clave para la adquisición de estas conductas.

1.2 Interneuronas colinérgicas estriatales

Además de la dopamina, el microcircuito estriatal formado por las interneuronas estriatales también modula fuertemente la actividad de las NEM y en particular la plasticidad córticoestriatal. Dentro de esta población, las interneuronas colinérgicas estriatales (ICE) han sido más estudiadas por su conocido rol en patologías neurodegenerativas (Pisani et al., 2007). Las ICE son las únicas neuronas no GABAérgicas del estriado y por su gran tamaño se describieron como interneuronas gigantes y sin espinas (Bolam et al., 1984). Representan sólo el 1-2% del total de neuronas estriatales, y presentan extensas arborizaciones que abarcan grandes áreas del estriado (Kawaguchi et al., 1995).

En relación a su fisiología, las ICE fueron identificadas originalmente como neuronas tónicamente activas (*Tonically Active Neurons*, TAN) ya que en registros en animales *in vivo* se observó que presentan actividad tónica espontánea de 3 a 10 Hz (Wilson et al., 1990). Posteriormente, mediante registros yuxtacelulares *in vivo* en ratas anestesiadas se encontró que las TAN corresponden a células colinérgicas dado que expresan Colina Acetil-Transferasa (ChAT) (Doig et al., 2014), aunque posteriormente se identificaron otras interneuronas estriatales con actividad tónica (Holly et al., 2019; Sharott et al., 2012). La actividad tónica de las ICE también se conserva en registros *ex vivo* en rodajas de estriado, incluso en presencia de bloqueantes de la transmisión GABAérgica, glutamatérgica, dopaminérgica y colinérgica (Bennett y Wilson, 1999), lo que sugiere que existen mecanismos intrínsecos que la generan.

En registros en rodajas de estriado de rata o ratón, las ICE presentan características electrofisiológicas distintivas. De hecho, antes del uso de técnicas genéticas que permitieron marcarlas, las ICE eran identificadas por sus propiedades electrofisiológicas, además de por su gran tamaño (Bennett y Wilson, 1999; Kawaguchi et al., 1995; Sanchez et al., 2011): en respuesta a un pulso sostenido de corriente despolarizante presentan adaptación de frecuencia de disparo a menudo seguida por una interrupción de los disparos. Este fenómeno se conoce como *acomodación*. Al finalizar el pulso despolarizante, las ICE presentan una pronunciada hiperpolarización post-pulso (*slow after hyperpolarization*, sAHP) que dura varios segundos. En respuesta a un pulso de corriente hiperpolarizante, las ICE exhiben una respuesta en “sag”: al comienzo del pulso, la membrana se hiperpolariza hasta determinado valor y luego se despolariza lentamente hasta estabilizarse. Esta respuesta depende de la activación de canales catiónicos lentos HCN (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels*) que median la corriente “h” (I_h). Cuando termina el pulso hiperpolarizante, aparece una despolarización “rebote” frecuentemente acompañada por uno o varios potenciales de acción, que resulta de la deactivación lenta de esta corriente (Figura i2).

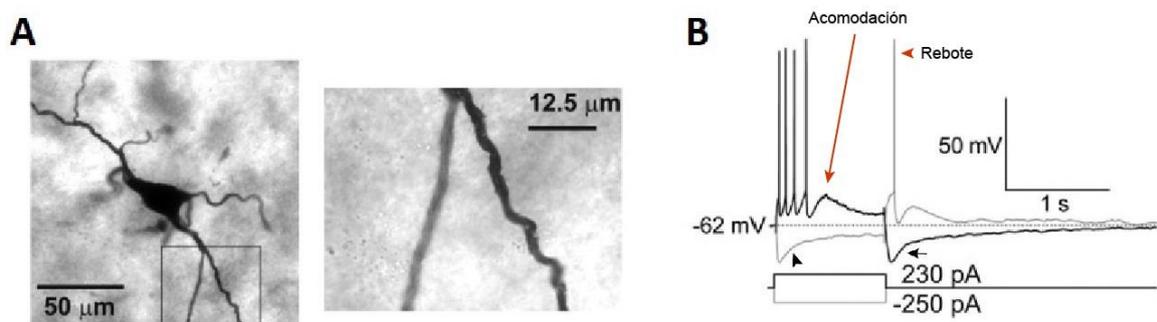


Figura i2. Características morfológicas y electrofisiológicas de las ICE. (A) Microfotografía de una ICE de rata adulta marcada con neurobiotina. Se observa la ausencia de espinas en la imagen aumentada. **(B)** Registro representativo de una ICE en respuesta a un pulso despolarizante de 230 pA y uno hiperpolarizante de -250 pA, en configuración *whole cell current clamp*. El pulso despolarizante genera una adaptación de frecuencia de disparo seguida de acomodación (flecha roja), y al finalizar se observa la sAHP (flecha negra). El pulso

hiperpolarizante genera la aparición de la respuesta “sag” (cabeza de flecha negra), y al finalizar se ve un potencial de acción de rebote (cabeza de flecha roja). Adaptado de Sanchez y col., 2011.

La actividad tónica espontánea de las ICE se presenta mayoritariamente con un patrón de disparos de potenciales de acción a intervalos regulares, aunque también pueden disparar en salvas de potenciales de acción, con amplias hiperpolarizaciones que dan lugar a un patrón en *salva-pausa*; o mediante disparos a frecuencias irregulares con salvas ocasionales y oscilaciones subumbrales (Bennett y Wilson, 1999; Sanchez et al., 2011) (Figura i3). El mecanismo subyacente a la generación de esta actividad tónica depende principalmente de la corriente despolarizante I_h que lleva a la membrana periódicamente hasta el umbral de disparo (Deng et al., 2007). Durante el potencial de acción, corrientes de calcio (Ca^{2+}) a través de canales $Ca_v2.1$ activan canales de potasio (K^+) dependientes de Ca^{2+} (K_{ca}) tipo BK (*big-conductance*), que repolarizan la membrana y producen una fAHP (*fast after hyperpolarization*). Por otro lado, la entrada de Ca^{2+} mediada por canales $Ca_v2.2$ durante el potencial de acción activa corrientes de K^+ de tipo SK (*small conductance*), resultando en una mAHP (*medium after hyperpolarization*) que hiperpolariza la membrana lo suficiente para reclutar a la corriente I_h , que a su vez despolariza la membrana y junto con la activación de la corriente persistente de sodio (Na^+) lleva a la célula nuevamente al umbral de disparo (Bennett et al., 2000; Goldberg y Wilson, 2005). Este mecanismo explica el patrón de disparo regular de las ICE (Figura i3A). Por otro lado, las salvas de potenciales de acción reclutan corrientes de K^+ adicionales y más lentas que las que median la fAHP y mAHP, resultando en una sAHP (*slow after hyperpolarization*). Esta sAHP interrumpe la salva y da lugar a una hiperpolarización prolongada que puede durar varios segundos (Wilson y Goldberg, 2006). Además, existen corrientes de K^+ que tienen mayor influencia en rangos de voltaje subumbrales, como las corrientes de rectificación entrante (*inward rectifier*, K_{ir}). Cuando la corriente K_{ir} es suficientemente grande, puede amplificar las hiperpolarizaciones iniciadas por las corrientes lentas que median la sAHP, resultando en prominentes hiperpolarizaciones que alcanzan valores de potencial muy negativos y reclutan aún más la corriente I_h , ocasionando un patrón en salva-pausa (Wilson, 2005) (Figura i3B). Las corrientes que median la sAHP pueden ser reclutadas por despolarizaciones subumbrales o incluso por un único potencial de acción, lo cual da lugar a patrones de disparo irregular, con oscilaciones subumbrales y salvas ocasionales (Wilson, 2005) (Figura i3C).

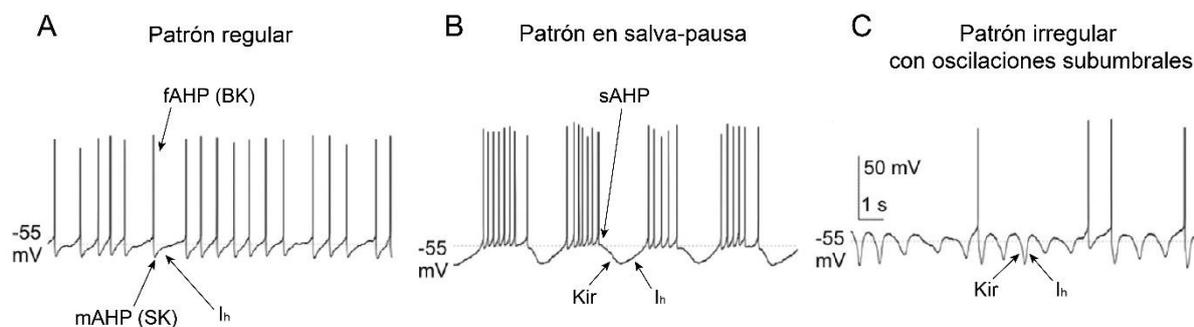


Figura i3. Corrientes involucradas en los patrones de disparo de las ICE. Registros de disparo espontáneo de ICE en rodajas de ratas. A: Se muestra un registro con un patrón de disparo regular y las corrientes que

intervienen: el potencial de acción recluta las corrientes BK y SK que producen la fAHP mAHP. La mAHP recluta a la corriente I_h que despolariza la membrana y vuelve a llevar a la célula al umbral de disparo. **B**: Una salva de potenciales de acción recluta corrientes adicionales que producen una sAHP que en ocasiones es amplificada por la corriente Kir generando un patrón en salva-pausa. **C**: Las oscilaciones pueden producirse de manera subumbral sin la generación de potenciales de acción, produciendo un patrón de disparo irregular con oscilaciones subumbrales y eventuales disparos. Adaptado de Sanchez y col., 2011.

Las ICE expresan receptores para dopamina de tipo D2 y D5 (Alcantara et al., 2003; Rivera et al., 2002). Mientras que la activación de los receptores D2 disminuye la actividad tónica de las ICE (Maurice et al., 2004), la administración sistémica de agonistas y antagonistas D2 reduce e incrementa respectivamente la liberación de acetilcolina en el estriado normal (DeBoer et al., 1996). Por otro lado, la activación de receptores D1/D5 aumenta la excitabilidad de las ICE (Aosaki et al., 1998) y la administración de agonistas de tipo D1/D5 promueve la liberación de acetilcolina en el estriado (DeBoer y Abercrombie, 1996). Si bien se acepta en general que los receptores D2 ejercen mayor influencia que los D5 en la fisiología normal de las ICE, la señalización mediada por receptores D5 podría tener mayor influencia en algunas condiciones (Castello et al., 2020; Ding et al., 2011).

1.2.1 Señalización colinérgica en el estriado

Aunque estudios recientes encontraron aferencias colinérgicas funcionales provenientes del cerebro medio (Dautan et al., 2014, 2020) las ICE son la principal fuente de acetilcolina estriatal. El estriado es la estructura cerebral con mayor densidad de marcadores colinérgicos y la acetilcolina modula la actividad de las neuronas de proyección estriatales a partir de mecanismos directos e indirectos por medio de receptores colinérgicos pre- y post-sinápticos. Aunque los efectos más estudiados son medidos por receptores muscarínicos (Abudukeyoumu et al., 2019; Moehle y Conn, 2019), la regulación colinérgica mediada por receptores nicotínicos adquirió importancia luego de que estudios recientes demostraran su rol principalmente en la modulación presináptica de la liberación de dopamina y glutamato en el estriado (Assous, 2021; Tanimura et al., 2019; Threlfell et al., 2012).

1.2.1.1 Regulación muscarínica

Los receptores muscarínicos se clasifican en dos subfamilias: los receptores tipo M1 (M1 y M5) acoplados a proteína $G_{q/11}$, y los receptores tipo M2 (M2, M3 y M4) que activan la proteína $G_{i/o}$. Uno de los mecanismos de regulación muscarínica más conocido es el mediado por receptores de tipo M1. La activación de receptores M1 localizados tanto en las dNEM como en las iNEM, pero con mayor influencia sobre las iNEM (Shen et al., 2007), reduce la corriente de K^+ mediada por canales Kir2 (Figura i4), elevando la excitabilidad somatodendrítica de estas células (Shen et al., 2007). La activación de receptores M1 también inhibe la corriente mediada por canales K_v7 (Shen et al., 2005), que son importantes reguladores del potencial de reposo y de la limitación de respuestas a entradas sinápticas excitatorias (Pérez-Ramírez et al., 2015). Además, la estimulación de receptores M1 en las NEM reduce corrientes de calcio tipo L (*L-type*), reduciendo la producción de

endocannabinoides (eCB) (Kreitzer y Malenka, 2005, 2007; Wang et al., 2006). La activación de receptores para cannabinoides produce depresión duradera (LTD) selectivamente en las iNEM, por lo que el efecto neto de la activación de receptores M1 es una reducción de la LTD de las sinapsis glutamatérgicas sobre las iNEM (Figura i4).

Por su parte, los receptores M4 (perteneciente al grupo M2) también presentan elevada expresión en el estriado y están selectivamente localizados en las dNEM (Kreitzer y Malenka, 2007; Yan et al., 2001). A través de estos receptores, la acetilcolina atenúa la respuesta de las dNEM a la dopamina (Nair et al., 2019). Mientras que la dopamina activa a las dNEM mediante su acción sobre los receptores D1 induciendo la acumulación intracelular de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), la acetilcolina bloquea el aumento de cAMP a través de su acción sobre receptores M4 (Figura i4) y se ha demostrado que mediante este mecanismo es posible revertir la hiperlocomoción causada por exceso de dopamina en modelos animales (Nair et al., 2019). Estos descubrimientos sugieren que la acetilcolina estriatal ejerce una inhibición tónica sobre la señalización por cAMP en las dNEM, y que las ICE deben pausar su actividad para permitir la transducción de la señal de dopamina en las dNEM. En estas condiciones, la activación de los receptores M4 en las dNEM tendría mayor relevancia fisiológica en presencia de dopamina en el circuito.

Las ICE también presentan mecanismos autoinhibitorios mediados principalmente por receptores muscarínicos M4 (Ding et al., 2006) que modulan su actividad inhibiendo canales de calcio $Ca_v2.2$ necesarios para la exocitosis de acetilcolina, o a través de la regulación de canales de K^+ (Calabresi et al., 1998; Yan y Surmeier, 1996).

1.2.1.2 Regulación nicotínica

Los receptores nicotínicos pertenecen al grupo de receptores ionotrópicos y tienen localizaciones principalmente presinápticas en las terminales glutamatérgicas y dopaminérgicas, y postsinápticas en las interneuronas positivas para parvalbúmina (PV), aunque están ausentes en las NEM (Zhou et al., 2002). Uno de los mecanismos de regulación nicotínica estriatal más estudiado es su rol en la liberación de dopamina. La activación de receptores nicotínicos localizados en las terminales dopaminérgicas es capaz de inducir la liberación de dopamina localmente (Figura i4) (Exley y Cragg, 2008; Threlfell et al., 2012; Wang et al., 2014). Esta liberación puede ser inducida por la activación de las ICE en respuesta a aferencias glutamatérgicas corticales o talámicas en registros electrofisiológicos en rodajas de estriado (Kosillo et al., 2016). Aunque el rol de esta forma de liberación de dopamina no ha sido esclarecido *in vivo*, un trabajo reciente encontró una disociación entre la dopamina liberada por el disparo de las neuronas dopaminérgicas y la liberada por mecanismos intraestriatales en animales que realizan una tarea recompensada (Mohebi et al., 2019). Mientras que la actividad de las neuronas dopaminérgicas señala el RPE y sería importante para el aprendizaje reforzando conductas futuras, la dopamina liberada por mecanismos intraestriatales tendría un rol en la motivación, favoreciendo conductas actuales (Mohebi et al., 2019; Mohebi y Berke, 2020). No obstante, resta

esclarecer si esta liberación depende de la activación de receptores nicotínicos presinápticos.

Los receptores nicotínicos localizados en las terminales glutamatérgicas también controlan la liberación de glutamato estriatal (Tanimura et al., 2019), mientras que las aferencias estriatales serotoninérgicas provenientes del núcleo del rafe dorsal también presentan receptores nicotínicos que promueven la liberación de serotonina (5-HT) (Takahashi et al., 1998) (Figura i4).

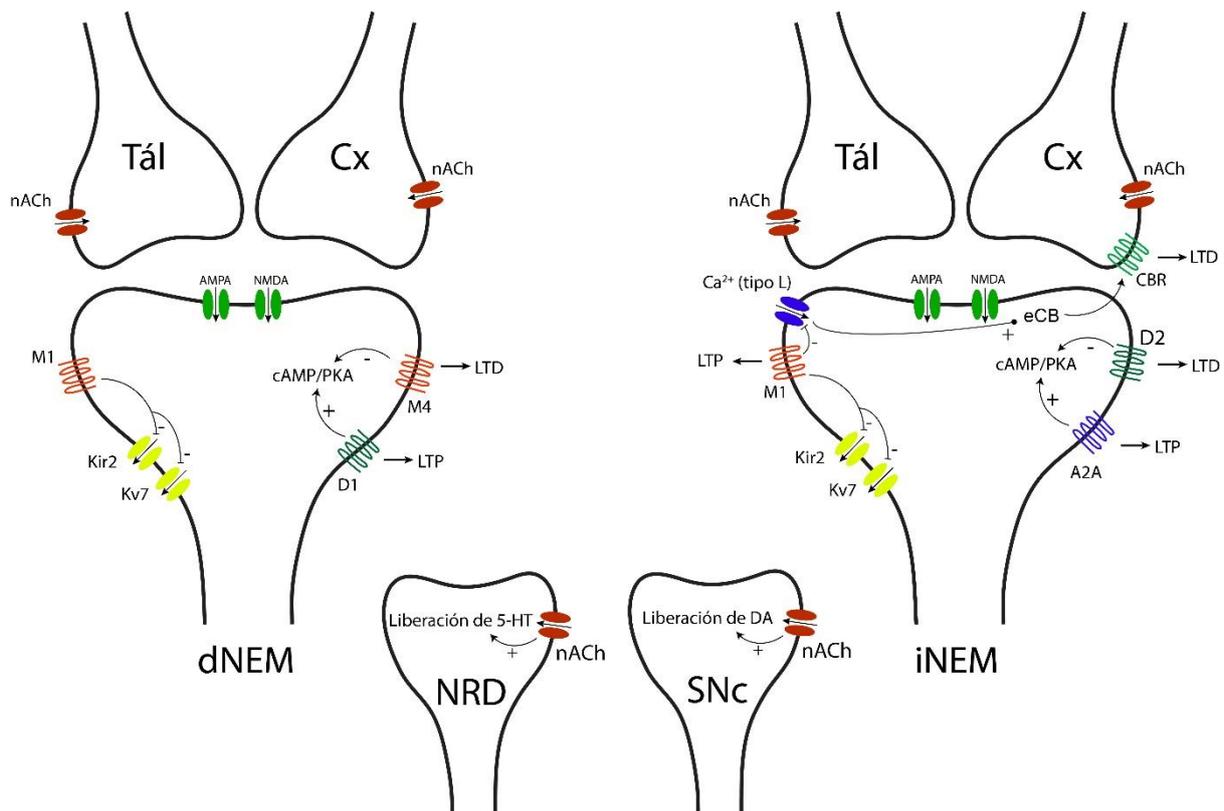


Figura i4. Resumen de los mecanismos de regulación colinérgica estriatal. dNEM e iNEM: neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta respectivamente; SNc: aferencias dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars compacta; NRD: aferencias serotoninérgicas del Núcleo del Rafe Dorsal; Tál: aferencias talámicas; Cx: aferencias corticales; nACh: receptor colinérgico nicotínico; LTP: potenciación duradera; LTD: depresión duradera; eCB: endocannabinoides; CBR: receptor para cannabinoides; M1 y M4: receptores muscarínicos; Kir2 y Kv7: canales de potasio; D1 y D2: receptores para dopamina; cAMP/PKA: vía de señalización por adenosina monofosfato cíclico/proteína quinasa A; 5-HT: serotonina; DA: dopamina; AMPA y NMDA: receptores ionotrópicos de glutamato; A2A: receptor para adenosina; Ca²⁺ (tipo L): canal de calcio tipo L.

1.2.2 Respuesta de pausa de las ICE ante estímulos salientes

Las TAN, consideradas como el equivalente registrado in vivo de las ICE, responden de manera coordinada con las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ante recompensas y estímulos sensoriales contingentes con las mismas enviando una señal homogénea al estriado (Morris et al., 2004). Registros realizados en monos encontraron que las TAN responden ante la recompensa o ante el estímulo sensorial asociado con la recompensa con

una característica interrupción de su actividad conocida como “respuesta en pausa” de aproximadamente 200-300 ms (Figura i5) (Aosaki et al., 1994a; Apicella, 2002; Kimura et al., 1984). De hecho, si la asociación entre el estímulo y la recompensa desaparece, la respuesta en pausa también lo hace (Aosaki et al., 1994a). A diferencia de las neuronas dopaminérgicas cuya respuesta refleja la discordancia entre la recompensa esperada y la recibida (RPE), la respuesta de las TAN permanece invariable en función de la predictibilidad de la recompensa (Morris et al., 2004). Actualmente se sabe que esta pausa ocurre como respuesta a estímulos ambientales salientes.

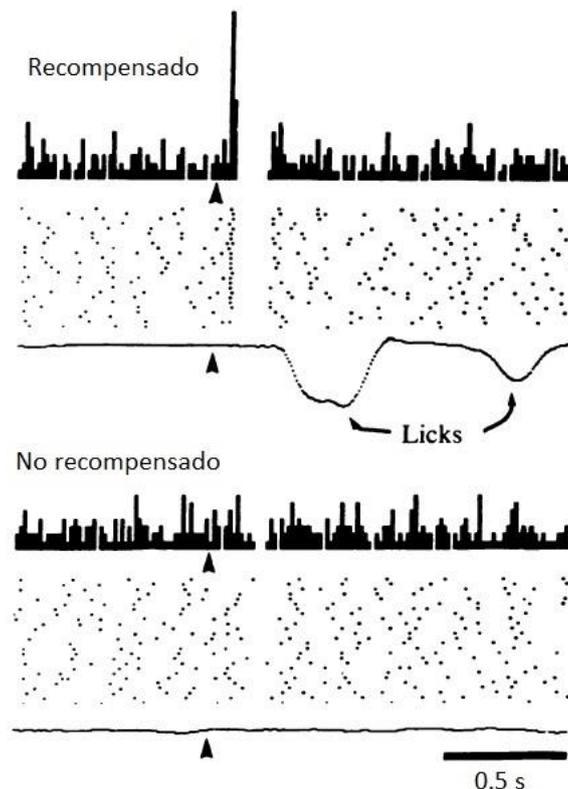


Figura i5. Respuesta de una TAN a estímulos asociados a recompensas. Respuesta de una TAN registrada *in vivo* en estriado de monos ante presentaciones de un estímulo (cabeza de flecha) asociado a una recompensa (recompensado) o en una tarea en la que el estímulo no está asociado a la llegada de la recompensa (no recompensado). Los registros se realizaron en monos entrenados para asociar sonido con una recompensa (jugo) y otro sonido con la ausencia de recompensa. Cada punto representa el disparo de una misma TAN en el tiempo para diferentes ensayos y se muestran los histogramas periestímulo para cada caso (ensayos recompensados y no recompensados). Se observa como la TAN responde al estímulo asociado a la recompensa con una respuesta de excitación-pausa-excitación. Adaptado de Kimura y col., 1984.

La respuesta de las TAN a recompensas y estímulos salientes consiste típicamente en tres fases: una excitación o salva inicial, una pausa de 200-300 ms y una excitación o “rebote” final (Aosaki et al., 1994b, 1994a; Morris et al., 2004), aunque estudios recientes encontraron respuestas heterogéneas dependiendo de su localización estriatal (Chuhma et al., 2014). Si bien el mecanismo fisiológico que media la pausa aún es sujeto de debate, se describen a continuación las hipótesis más influyentes que intentan explicarlo (Figura i6) (Tubert y Murer, 2020).

Las proyecciones excitatorias de los núcleos intralaminares del tálamo (Lapper y Bolam, 1992) ejercen una fuerte modulación sobre las ICE (Ding et al., 2010). De hecho, la respuesta de las TAN a estímulos ambientales salientes coincide con la descarga de neuronas glutamatérgicas de los núcleos centro-medial y parafascicular (CM-Pf) del tálamo (Matsumoto et al., 2001). Si bien en paradigmas de aprendizaje operante las TAN responden de manera preferencial ante estímulos asociados a la recompensa y las neuronas de los núcleos CM-Pf responden al estímulo independientemente de que éste se asocie a la recompensa, la inactivación farmacológica de las neuronas talámicas bloquea la respuesta en pausa de las TAN (Matsumoto et al., 2001). Estudios posteriores realizados en rodajas de estriado encontraron que la estimulación de aferencias talámicas induce una respuesta de salva-pausa en las ICE (Ding et al., 2010). Este fenómeno puede resultar del reclutamiento de interneuronas GABAérgicas por un mecanismo di-sináptico (Figura i6A) (Suzuki et al., 2001), aunque otros estudios demostraron que la respuesta en pausa se conserva en presencia de antagonistas GABAérgicos (Oswald et al., 2009). Otra interpretación involucra a los mecanismos intrínsecos de las TAN, tal que ante una excitación inducida por la descarga talámica, se reclutarían corrientes que median la sAHP (IsAHP) y éstas contribuirían a generar la pausa (Figura i6B) (Reynolds et al., 2004; Tubert et al., 2016; Wilson y Goldberg, 2006; Zhang et al., 2018). Finalmente, se ha demostrado que la dopamina ejerce un rol clave en la generación de la respuesta en pausa. Así, la pausa coincide temporalmente con la descarga de las neuronas dopaminérgicas (Morris et al., 2004) y desaparece en modelos animales de la enfermedad de Parkinson, donde las neuronas dopaminérgicas degeneran (Aosaki et al., 1994b). Además, estudios en rodajas de estriado encontraron que la pausa desaparece en presencia de antagonistas de los receptores D2 para dopamina (Wieland et al., 2014) o en ratones con ablación selectiva de este receptor en células colinérgicas (Kharkwal et al., 2016). En este sentido, la activación fásica de aferencias dopaminérgicas mesencefálicas podría generar respuestas heterogéneas en las ICE de excitación-pausa-excitación a través de la co-liberación de dopamina y glutamato actuando con diferente temporalidad y cinética sobre receptores para glutamato y para dopamina localizados en las ICE (Figura i6C) (Chuhma et al., 2014; Straub et al., 2014; Wieland et al., 2014). Asimismo, la dopamina podría contribuir a la respuesta en pausa de las ICE modulando directamente las corrientes intrínsecas que la generan (Schulz y Reynolds, 2013; Tubert et al., 2016). En este sentido, la inervación dopaminérgica sería necesaria para la conservación de los mecanismos intrínsecos que contribuyen a la pausa dado que luego de la denervación dopaminérgica, la corriente que media la sAHP se ve reducida en las ICE (Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016). Mediante estimulación optogénica de las aferencias talámicas que generan respuestas subumbrales en las ICE, Tubert et al. (2016) demostraron que una corriente mediada por canales Kv1.3 contribuye a la sAHP que sigue a la excitación talámica y propusieron que este mecanismo podría contribuir a la generación de la pausa que sigue a respuestas supraumbrales. Por otro lado, la dopamina modula la corriente I_h necesaria para recuperar el potencial de

membrana hiperpolarizado (Deng et al., 2007) y que es responsable de la excitación de “rebote” que sigue a una hiperpolarización sostenida (Figura i6D).

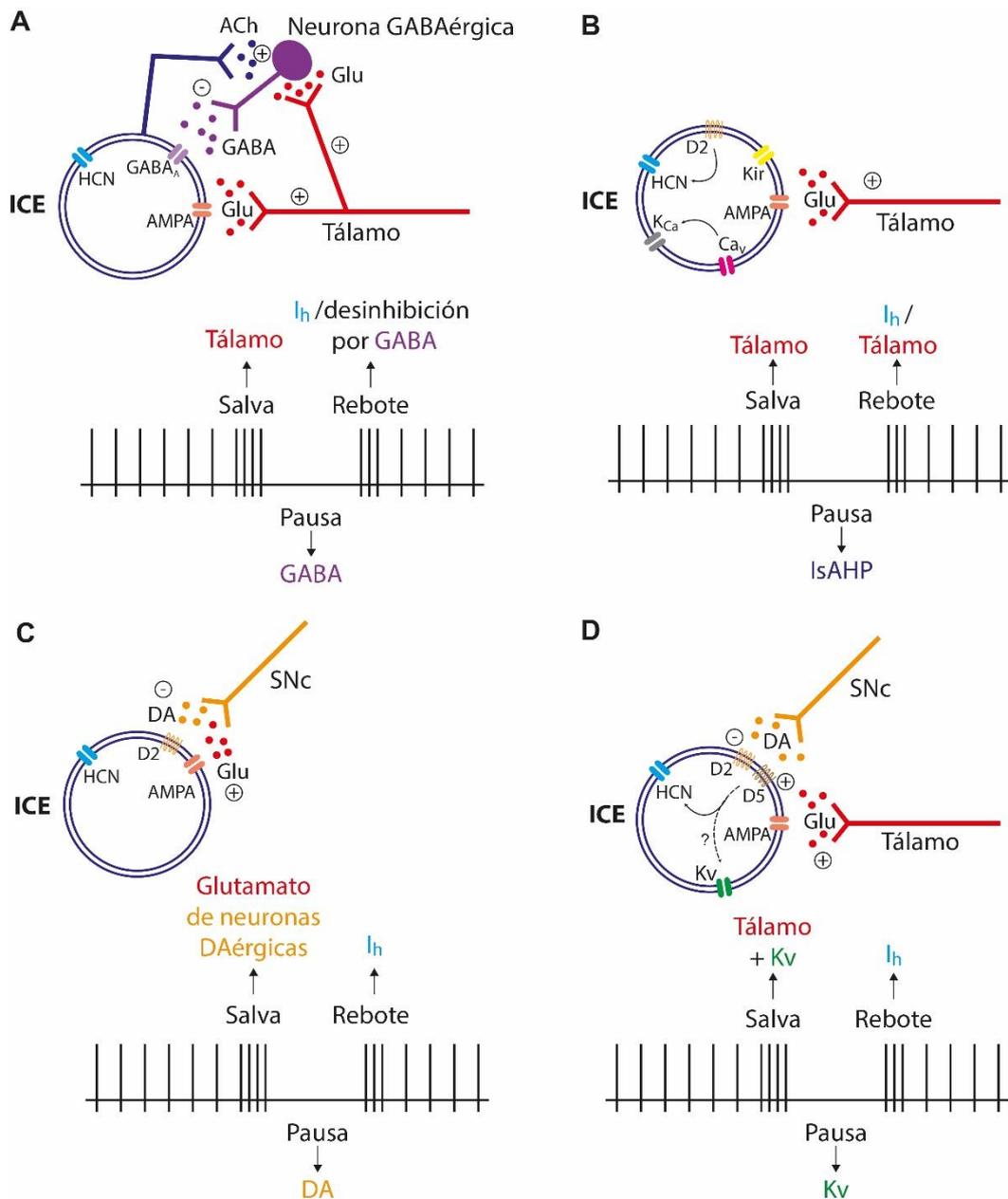


Figura i6. Resumen de los posibles mecanismos fisiológicos que subyacen a la respuesta en pausa de las ICE. Adaptado de Tubert y Murer, 2020. DA: dopamina; ACh: acetilcolina; Glu: glutamato; SNC: Sustancia Nigra pars compacta.

1.3 Enfermedad de Parkinson

1.3.1 Generalidades

La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno neurodegenerativo más común luego de la enfermedad de Alzheimer. Es una enfermedad cosmopolita, cuya prevalencia en Argentina es similar a la observada en el resto del mundo, alrededor de 500 casos por cada 100000

habitantes mayores de 40 años de edad (World Health Organization, 2006). El mayor factor de riesgo es la edad, de hecho, la incidencia de la EP crece exponencialmente con la edad (Pringsheim et al., 2014; Twelves et al., 2003). Esta tendencia implica que la carga que impone al sistema de salud aumenta a medida que aumenta la expectativa de vida de la población, y como se anticipa una mejora relativa de la esperanza de vida mundial, en particular en países en vías de desarrollo, se espera que el número de diagnósticos de EP crezca en más de un 50% para 2030 (Dorsey et al., 2007). La edad habitual de inicio de la enfermedad se ubica en los 60 años, aunque una reducida proporción de personas jóvenes también la desarrollan y se denomina de “aparición temprana” si presentan síntomas antes de los 40 años.

La EP se caracteriza por sintomatología predominantemente motora, aunque también se asocia a numerosos síntomas no-motores, algunos de los cuales aparecen años previos a las manifestaciones motoras. La sintomatología motora clásica fue descrita por primera vez por James Parkinson en el siglo XIX y revisada por Jean-Martin Charcot e incluye síntomas como la bradicinesia (lentificación de los movimientos, especialmente de los movimientos voluntarios complejos), rigidez muscular, temblor de reposo de 4 a 6 Hz e inestabilidad postural no causada por una patología visual, vestibular, cerebelosa o disfunción propioceptiva (Goetz, 2011). Las manifestaciones no motoras incluyen disfunción del olfato, alteraciones cognitivas, síntomas psiquiátricos, alteraciones del sueño, disfunción autonómica, dolor y fatiga (Kalia y Lang, 2015). Los síntomas no motores son comunes en etapas tempranas de la EP y se presentan antes del inicio de los síntomas motores clásicos.

Con la progresión de la EP, las manifestaciones motoras empeoran y pueden ser tratadas inicialmente con terapia farmacológica. Sin embargo, a medida que avanza la enfermedad comienzan a aparecer complicaciones adicionales asociadas a la terapéutica sintomática prolongada, como fluctuaciones motoras y no motoras (acortamiento temporal de los efectos terapéuticos de la terapia farmacológica), discinesias (movimientos anormales involuntarios) y psicosis. En etapas tardías de la EP, la sintomatología motora y no motora resistente al tratamiento comienza a ser prominente e incluye inestabilidad postural, caídas, disfagia, bloqueo de la marcha y disfunción del lenguaje. También se presentan síntomas autonómicos, como incontinencia urinaria, constipación que incluye la necesidad de administrar laxantes diariamente e hipotensión. La demencia es particularmente prevalente y se presenta en el 83% de los pacientes que cursaron la enfermedad durante más de 20 años (Kalia y Lang, 2015).

En la EP las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas degeneran por causas desconocidas. Estudios epidemiológicos indican que múltiples factores genéticos y ambientales interactúan ocasionando la degeneración de estas neuronas en los casos idiopáticos de la enfermedad, que constituyen un 90% del total de casos (Kalia y Lang, 2015). Entre los factores de riesgo se destacan los antecedentes familiares, lesiones cerebrales previas, la exposición a pesticidas y el uso de beta-bloqueantes.

El examen anatomopatológico macroscópico del cerebro de pacientes con EP revela una atrofia frontal leve con pérdida de neuromelanina, pigmento normalmente presente en el mesencéfalo. En el examen microscópico se observa la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas remanentes de la sustancia nigra pars compacta, en núcleos del tronco encefálico y en regiones corticales límbicas, temporales y frontales así como en algunas regiones periféricas (Kalia y Lang, 2015). Los cuerpos de Lewy son inclusiones citoplasmáticas eosinófilas formadas principalmente por agregados de α -sinucleína y otras proteínas como la ubiquitina y proteínas de neurofilamento y constituyen el rasgo anatomopatológico característico de la enfermedad.

Dado que no existen marcadores tempranos de la EP y que la sintomatología motora se evidencia con avanzada neurodegeneración, al momento del diagnóstico de la enfermedad se aprecia una degeneración de aproximadamente el 70% de las neuronas de la sustancia nigra pars compacta (George et al., 2009).

Como se describe más arriba, las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas son fundamentales para el funcionamiento de los circuitos de los ganglios de la base mediante sus proyecciones al estriado. La degeneración de estas proyecciones en la EP causa alteraciones funcionales en el estriado que se vinculan directamente con las manifestaciones motoras de la enfermedad, en especial con la bradicinesia y la rigidez. La degeneración de estas neuronas es irreversible y el conocimiento disponible sobre la etiopatogenia no ha resultado aún en aproximaciones terapéuticas neuroprotectoras efectivas (Athauda y Foltynie, 2015; Stocchi y Olanow, 2013). Como consecuencia, la única opción terapéutica consiste en controlar los síntomas mediante la restauración de la actividad neuronal normal de los núcleos afectados por la neurodegeneración.

Si bien la característica patológica crucial de la EP es la degeneración de las proyecciones dopaminérgicas nigroestriatales, ocurre degeneración neuronal en otras regiones nerviosas, incluyendo el locus ceruleus, el núcleo basalis de Meynert, el núcleo pedunculopontino, el núcleo del rafe, el núcleo dorsal motor del vago, la amígdala y el hipotálamo (Dickson, 2012), lo que limita aún más las opciones terapéuticas efectivas.

1.3.2 Tratamiento con L-DOPA

La terapia sintomatológica de la EP consiste principalmente en restaurar la estimulación fisiológica de receptores para dopamina en el estriado (Connolly y Lang, 2014; Meissner et al., 2011), aunque también se utilizan estrategias de neurocirugía funcional que buscan corregir la actividad neuronal corriente abajo del estriado (Benabid et al., 2009), como la estimulación de alta frecuencia del núcleo subtalámico.

La farmacología que apunta a restaurar la estimulación de receptores para dopamina es la principal terapéutica utilizada para tratar los síntomas motores. Estos fármacos incluyen a la levodopa (L-DOPA), los agonistas dopaminérgicos y los inhibidores de la monoamino oxidasa tipo B (MAO-B, que degrada la dopamina en la brecha sináptica) (Kalia y Lang, 2015). Dado

que la terapia intenta mejorar la calidad de vida del paciente, en general comienza a administrarse una vez que los síntomas se vuelven debilitantes. Aunque todos estos fármacos permiten adecuar la terapia de reemplazo de dopamina a las necesidades de cada paciente en etapas tempranas de la enfermedad, en etapas avanzadas sólo la L-DOPA provee suficiente beneficio sintomático para sostener un adecuado desempeño social (Connolly y Lang, 2014; Giugni y Okun, 2014; Meissner et al., 2011). La L-DOPA es un precursor de dopamina (y de todas las catecolaminas) que se co-administra por vía sistémica junto con inhibidores de la enzima DOPA-descarboxilasa que no atraviesa la barrera hematoencefálica, como la carbidopa o benserazida, para evitar que la L-DOPA se degrade antes de llegar al cerebro. Una vez en el cerebro, la L-DOPA es captada por las neuronas dopaminérgicas remanentes lo que les permite aumentar la liberación de dopamina en el estriado, restaurar la estimulación de los receptores para dopamina y por consiguiente atenuar la sintomatología motora. La administración de L-DOPA sigue siendo la terapéutica más efectiva y su introducción en el tratamiento de la enfermedad incrementó enormemente la esperanza de vida de los pacientes (Fahn et al., 2004).

Tras el inicio del tratamiento con L-DOPA se produce un importante beneficio clínico durante los primeros 5-7 años. Desafortunadamente, luego de algunos años de tratamiento la efectividad de la L-DOPA decrece y las opciones terapéuticas se agotan (Kalia y Lang, 2015). Se han estudiado diversos factores que contribuyen a limitar la eficacia terapéutica de la L-DOPA en etapas avanzadas de la EP. Una de ellas es la degeneración de neuronas en otras regiones del sistema nervioso que da origen a síntomas (especialmente no motores) que no responden a la L-DOPA (Kalia y Lang, 2015). Por otro lado, en etapas tempranas de la enfermedad, las terminaciones dopaminérgicas remanentes funcionan como un *buffer* de dopamina que luego de descarboxilar la L-DOPA, almacenan dopamina por más tiempo de lo que dura la L-DOPA en plasma, lo que permite prolongar el efecto de la L-DOPA más allá de su permanencia en plasma. Estos reservorios de dopamina disminuyen a medida que avanza la degeneración nigroestriatal, por lo que, en etapas de avanzada neurodegeneración, los niveles estriatales de dopamina fluctúan a la par con las concentraciones de L-DOPA en plasma. En consecuencia, la estimulación de los receptores para dopamina en el estriado se vuelve “pulsátil” y los pacientes transitan estados “on” y “off” (Connolly y Lang, 2014) (Figura i7).

Los desarreglos mencionados resultan en efectos adversos del tratamiento con L-DOPA, como las fluctuaciones motoras y las discinesias inducidas por L-DOPA (LID, *L-DOPA-induced dyskinesia*). Las LID son movimientos anormales involuntarios que pueden incluir corea, balismo, distonia y estereotipias. Hasta el 50% de los pacientes con EP desarrollan discinesias luego de un tratamiento con L-DOPA durante más de 5 años (Huot et al., 2013).

La aparición de estas complicaciones motoras se asocia principalmente al grado de degeneración dopaminérgica, al tiempo de tratamiento con L-DOPA y a la dosis de L-DOPA administrada. No hay evidencia clara de que exista además una predisposición genética al desarrollo de complicaciones relacionadas con la L-DOPA, aunque factores genéticos

podrían contribuir a explicar la heterogeneidad de la respuesta a la L-DOPA en los pacientes (Jankovic, 2005).

Las fluctuaciones motoras se caracterizan principalmente por el efecto de *wearing-off*, que consiste en el deterioro y la recurrencia de los síntomas parkinsonianos producto del acortamiento de la duración del efecto terapéutico de la L-DOPA. Además, muchos pacientes comienzan a experimentar síntomas no motores en el periodo “off”, como dolor, parestesia, depresión, ansiedad o miedo (Jankovic, 2005). En ocasiones, esta sintomatología lleva al paciente a incrementar el uso de la L-DOPA conduciéndolo a abusar de la misma y resultando en ocasiones en pacientes adictos a la L-DOPA, lo que se conoce como síndrome de desregulación de dopamina (Evans y Lees, 2004).

Además de las fluctuaciones motoras, las LID también son complicaciones motoras frecuentes (Figura i7). Las LID se manifiestan de diferentes formas, siendo las más frecuentes las llamadas discinesias de pico de dosis, que ocurren cuando los niveles de L-DOPA en plasma llegan a su máximo luego de una administración de L-DOPA (alrededor de una hora después de la administración). Otra forma de manifestación que ocurre en el 15-20% de los pacientes con tratamiento crónico con L-DOPA son las discinesias bifásicas. A diferencia de las discinesias de pico de dosis que se manifiestan en la secuencia: (1) parkinsonismo, (2) efecto terapéutico, (3) discinesia (pico de dosis), (4) efecto terapéutico y (5) parkinsonismo; las discinesias bifásicas se caracterizan por presentar una respuesta de tipo: (1) parkinsonismo, (2) discinesia, (3) efecto terapéutico, (4) discinesia y (5) parkinsonismo, dado que ocurren cuando los niveles estriatales de dopamina comienzan a aumentar y cuando empiezan a disminuir (Espay et al., 2018; Jankovic, 2005). Y finalmente, las LID pueden presentarse esporádicamente durante los periodos “off” L-DOPA cuando los niveles plasmáticos de L-DOPA son mínimos (Fabbrini et al., 2007). Si bien los mecanismos que causan discinesias durante el periodo “off” no se conocen, podrían relacionarse con los eventos de cinesia paradójica, cuando pacientes con EP son repentinamente y transitoriamente capaces de realizar tareas que les era imposible realizar, generalmente desencadenado por estímulos externos (Duysens y Nonnekes, 2021; Glickstein y Stein, 1991).

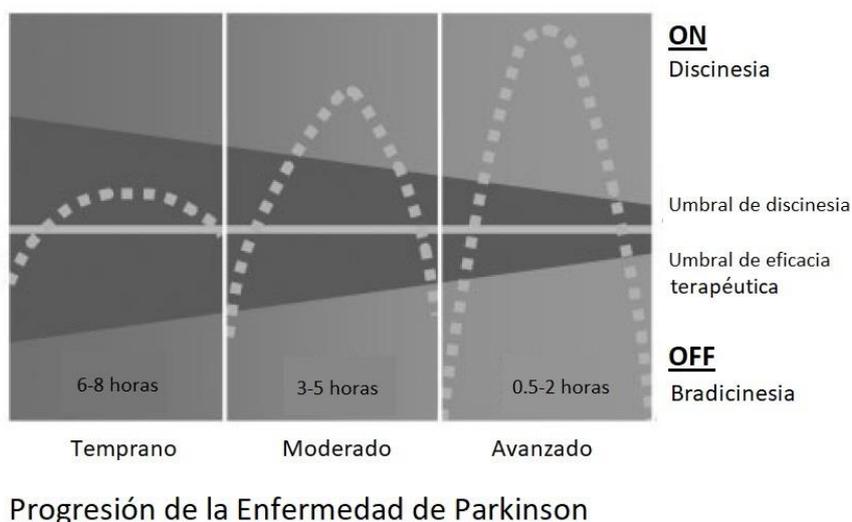


Figura i7. Fluctuaciones motoras y discinesias en función del avance de la enfermedad. Se esquematiza el curso del efecto de la L-DOPA (línea punteada) desde su administración según la progresión de la EP. En etapas tempranas, la L-DOPA presenta un gran beneficio sintomático sin complicaciones motoras. A medida que progresa la enfermedad se acorta la duración del efecto terapéutico de la L-DOPA, aparecen discinesias inducidas por L-DOPA y los pacientes transitan estados “on” y “off”. Adaptado de de Jankovic, 2005.

1.3.3 Alteraciones circuitales que siguen a la degeneración dopaminérgica

Como se describió en la sección 1.1, según el modelo clásico del circuito de los ganglios de la base (también conocido como *rate model*) (Albin et al., 1989; DeLong, 1990), la activación de la vía directa (originada en las dNEM estriatonigrales) promueve el movimiento y la activación de la vía indirecta (iNEM estriatopallidales) lo inhibe. Así, el balance adecuado de la actividad de estas dos vías es importante para el correcto desempeño motor. Aunque hoy sabemos que la interacción entre estas dos vías es mucho más compleja (Klaus et al., 2017; Tecuapetla et al., 2016), este modelo permite explicar muchos de los mecanismos que subyacen a los trastornos del movimiento hipo- e hiperkinéticos. En la EP, este modelo propone que la disminución de la liberación de dopamina en el estriado resulta en una menor activación de las dNEM (que expresan el receptor excitatorio para dopamina D1) y en una desinhibición de las iNEM (que expresan el receptor inhibitorio para dopamina D2), lo que resulta en un desequilibrio a favor de las iNEM que se asocia a los síntomas motores de la enfermedad (Figura i8A-B) (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). Múltiples estudios encontraron evidencia que lo sustenta. En este sentido, mientras que la liberación fisiológica de dopamina permite plasticidad bidireccional de las sinapsis córticoestriatales a través de la inducción de LTP y LTD (Calabresi et al., 2008; Kreitzer y Malenka, 2005; Shen et al., 2008; Wang et al., 2006), luego de la degeneración dopaminérgica las dNEM pierden la inducción de LTP dependiente de receptores D1 y las iNEM no muestran LTD (Kreitzer y Malenka, 2007), perdiendo la plasticidad bidireccional normal. Por otro lado, las iNEM muestran un aumento de su excitabilidad intrínseca luego de la degeneración nigroestriatal (Day et al., 2008) y, además, se podan de espinas, lo que podría facilitar la propagación hacia atrás de

potenciales de acción (Day et al., 2006, 2008). En registros *in vivo* de animales anestesiados se evidenció un desbalance en las respuestas de las dNEM y de las iNEM a entradas corticales excitatorias a favor de las iNEM (Escande et al., 2016). En animales despiertos y *freely moving*, se observó que la actividad de las dNEM se encuentra persistentemente disminuída luego de la degeneración dopaminérgica, mientras que la actividad de las iNEM aumenta selectivamente durante los períodos de inmovilidad del ratón (Parker et al., 2016; Ryan et al., 2018). Además, este desbalance se observó en otras estructuras del circuito de los ganglios de la base río abajo del estriado. Por ejemplo, en registros *in vivo* en monos parkinsonianos tratados con la protoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina), que produce degeneración dopaminérgica, se encontró que la actividad de las neuronas del GPi está aumentada, mientras que las del GPe está disminuída (Miller y DeLong, 1988; Tremblay et al., 1989). Finalmente, la estimulación optogenética de las dNEM en el estriado alivia la bradicinesia y restaura la actividad locomotora normal (Kravitz et al., 2010).

Otro rasgo importante de la fisiopatología de la EP son las alteraciones en la sincronización del circuito corteza-ganglios basales-tálamo (CBT). Las neuronas estriatales hiperactivas son reclutadas más fácilmente por los ritmos corticales en los animales parkinsonianos y transmiten estos ritmos al globo pálido (Kovaleski et al., 2020; Tseng et al., 2001; Zold et al., 2007, 2012). Estudios recientes muestran que la eliminación del receptor D2 en ratones adultos produce un fenotipo parkinsoniano y aumenta la sincronización de las neuronas palidales con los ritmos corticales (Bello et al., 2017), mientras que la inhibición optogenética de las iNEM reduce la influencia cortical sobre la actividad del globo pálido en ratones parkinsonianos (Kovaleski et al., 2020), lo que sugiere que la hiperactividad de iNEM tiene un rol importante en estos cambios. Los síntomas de la EP como la bradicinesia y la rigidez correlacionan con un aumento patológico de la actividad oscilatoria dentro del bucle CBT en la banda de frecuencias beta (15-30Hz), que se ha observado tanto en pacientes como en modelos animales (Brown, 2007; Kühn et al., 2006, 2008; Little et al., 2012; Sharott et al., 2005). De hecho, las terapias destinadas a controlar los síntomas de la EP, como la estimulación cerebral profunda o la administración de L-DOPA, pueden reducir la amplitud de las oscilaciones beta (Jenkinson y Brown, 2011; Kühn et al., 2006, 2008; Lemaire et al., 2012).

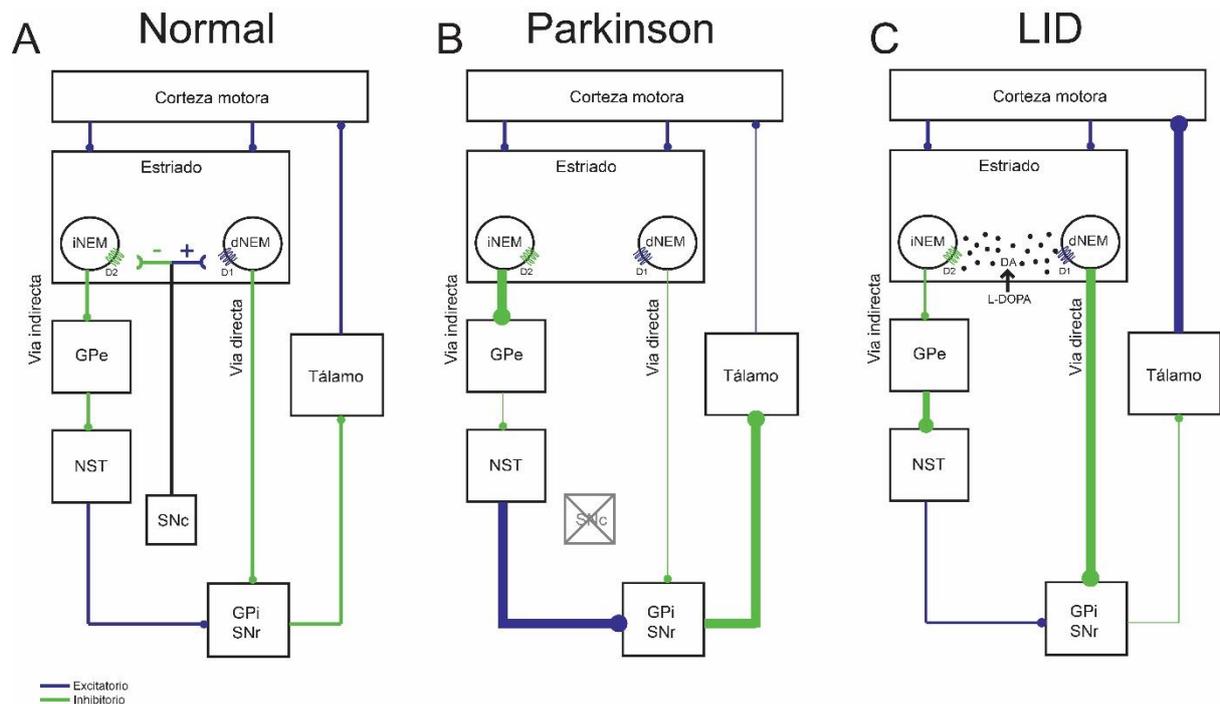


Figura i8. Circuito de los ganglios de la base en condiciones normales, en la enfermedad de Parkinson y en las LID. En B y C las conexiones más gruesas y más finas representan un aumento o disminución respectivamente de la actividad de esas conexiones. En la EP, un desbalance a favor de la vía indirecta resulta en una mayor inhibición de las neuronas tálamo-corticales excitatorias, mientras que, en las LID, el desbalance a favor de la vía directa resulta en una desinhibición de las neuronas tálamo-corticales.

1.3.4 Alteraciones circuitales que siguen al tratamiento con L-DOPA

El *rate model* también permite explicar las alteraciones subyacentes a los síndromes hiperkinéticos, como las LID, que se asociarían a un desbalance del circuito a favor de la vía directa. Las hipótesis dominantes en el campo asumen que las LID se deben a la sensibilización de una cascada de señalización activada por la estimulación "pulsátil" de receptores D1 en las dNEM (Bezard et al., 2001; Murer y Moratalla, 2011), producto de las fluctuaciones en la concentración de dopamina estriatal que acompañan a las concentraciones plasmáticas de L-DOPA en etapas avanzadas de la EP (Cenci y Konradi, 2010; Espay et al., 2018). En línea con esta hipótesis, se observó que los animales *knock-out* para el receptor D1 de dopamina no desarrollan LID, mientras que los *knock-out* para el receptor D2 sí lo hacen (Darmopil et al., 2009). Trabajos recientes del laboratorio demostraron que la estimulación optogenética de las proyecciones estriatonigrales de las dNEM es suficiente para desarrollar discinesias en ratones parkinsonianos que nunca fueron expuestos a la L-DOPA (Keifman et al., 2019). Además, existe abundante evidencia de que la administración de L-DOPA en ratones parkinsonianos produce activación aberrante de vías de señalización dependientes de cAMP y de marcadores de actividad celular en las dNEM (Aubert et al., 2005; Cenci y Konradi, 2010; Girasole et al., 2018; Santini et al., 2007, 2009). Por otro lado, la estimulación exacerbada del receptor D1 causa alteraciones sinápticas adicionales en animales con LID, como una deficiencia en la depotenciación de las sinapsis

glutamatérgicas (Picconi et al., 2003; Shen et al., 2015), conduciendo a una saturación sináptica de las aferencias córticoestriatales que impediría al estriado filtrar la información cortical relevante y contribuiría a la hiperactividad de las dNEM que causa las LID (Alcacer et al., 2017; Darmopil et al., 2009; Delfino et al., 2007; Girasole et al., 2018; Keifman et al., 2019; Ryan et al., 2018) (Figura i8C).

1.3.5 Anticolinérgicos

Previo a la aparición de la L-DOPA como tratamiento antiparkinsoniano, los "anticolinérgicos" (antagonistas de receptores muscarínicos) eran el mejor tratamiento existente para la enfermedad (Barbeau, 1962). La observación de que los fármacos anticolinérgicos y pro-dopaminérgicos alivian la sintomatología en pacientes con EP dio lugar a la hipótesis de que el balance dopamina-acetilcolina (DA-ACh) se encuentra alterado en la EP, dando lugar a un estado hipercolinérgico estriatal que contribuye a los síntomas de la EP como la rigidez y la acinesia (Barbeau, 1962; McGeer et al., 1961; Pisani et al., 2007; Tubert and Murer, 2020). La menor eficacia relativa de los anticolinérgicos comparada con la de la L-DOPA y sus efectos secundarios cognitivos y autonómicos limitó su uso clínico (Katzenschlager et al., 2003), aunque en ocasiones se siguen utilizando como terapia conjunta con L-DOPA (Duvoisin, 1967; Fox et al., 2018; Katzenschlager et al., 2003). Estudios recientes concluyeron que los anticolinérgicos son significativamente más efectivos que el placebo en el alivio de la sintomatología motora incluida la bradicinesia (Katzenschlager et al., 2003; Lang y Lees, 2002). Sin embargo, la administración sistémica de fármacos anticolinérgicos puede contribuir a exagerar síntomas que dependen de sitios colinérgicos extraestriatales. De hecho, existe evidencia de degeneración colinérgica en núcleos del prosencéfalo basal y del núcleo pedúnculo pontino que resultan en deterioro cognitivo (Bohnen et al., 2009, 2012; Müller y Bohnen, 2013; Yarnall et al., 2011). Por consiguiente, las futuras nuevas terapias colinérgicas antiparkinsonianas deberían estar dirigidas selectivamente al estriado.

1.3.6 Alteraciones de las ICE en la EP y las LID

Durante la última década, rigurosos estudios en modelos animales demostraron que la hiperactividad de las ICE, la principal fuente de acetilcolina estriatal, contribuye al estado hipercolinérgico que causa los síntomas motores de la EP (Fino et al., 2007; Maurice et al., 2015; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016; Ztaou et al., 2016). Una hipótesis influyente propuso que el aumento del tono colinérgico sería mediado por la disminución en la activación del receptor para dopamina D2 en las ICE (DeBoer et al., 1993, 1996; Maurice et al., 2004). De hecho, la inhibición optogenética o quemogenética de las ICE alivia los síntomas motores en animales parkinsonianos (Maurice et al., 2015; Tanimura et al., 2019).

Aunque podría presuponerse que un aumento de la frecuencia media de disparo de las ICE es responsable del aumento del tono colinérgico estriatal, los estudios realizados *in vivo* sugieren un panorama más complejo. Mediante registros *in vivo* en monos parkinsonianos

se encontró que las TAN estriatales pierden su característica respuesta en pausa a estímulos salientes (Aosaki et al., 1994b; Matsumoto et al., 2001). Además, las TAN aumentan su sincronización en animales parkinsonianos pero no muestran un incremento de su tasa de disparo tónico (Deffains et al., 2016; Raz et al., 1996, 2001), mientras que la sobreactivación de receptores muscarínicos estriatales ha sido relacionada con el aumento de las oscilaciones beta que correlaciona con los síntomas motores de la EP (Kondabolu et al., 2016; Pittman-Polletta et al., 2018). Por otra parte, estudios realizados *in vitro* no encontraron cambios en la actividad de disparo espontánea en las ICE de roedores parkinsonianos nunca expuestos a la L-DOPA (Maurice et al., 2015; Sanchez et al., 2011).

El cambio más robusto observado en las ICE luego de la degeneración dopaminérgica es el aumento de su excitabilidad intrínseca. En trabajos recientes del laboratorio (Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016) se demostró que las ICE de ratones parkinsonianos se encuentran hiperexcitables. Esta hiperexcitabilidad se evidencia como un aumento del número de potenciales de acción disparados en respuesta a pulsos de corriente despolarizante y se atribuye a la disminución de una corriente de potasio mediada por canales dependientes de voltaje de rectificación tardía (*delayed rectifier*) que contienen a la subunidad Kv1.3 (Tubert et al., 2016). La disminución de esta corriente no afecta la frecuencia de disparo tónica de las ICE, pero aumenta la respuesta excitatoria y reduce la hiperpolarización que sigue a la activación de aferencias talámicas (Tubert et al., 2016). Además, luego de la degeneración dopaminérgica las ICE pierden un mecanismo de regulación mediado por autorreceptores inhibitorios M4 (Ding et al., 2006; Yan y Surmeier, 1996). En conjunto, estos cambios podrían contribuir al estado hipercolinérgico estriatal en la EP.

Por otra parte, estudios recientes demostraron que las ICE tienen un rol clave en las LID, aunque con resultados aparentemente contradictorios. Por un lado, tanto en pacientes como en modelos animales, potenciar la señalización colinérgica reduce las LID (Birket-Smith, 1974; Shen et al., 2015) mientras que los anticolinérgicos las incrementan (Chambers et al., 2019; Jackson et al., 2014; Lang y Lees, 2002), lo que sugiere que las LID se relacionan con una deficiencia en la liberación de acetilcolina estriatal. Por otro lado, el tratamiento crónico con L-DOPA activa anormalmente marcadores como pERK y p-rpS6 en las ICE de animales con LID mediante la estimulación de receptores para dopamina D5 (Castello et al., 2020; Ding et al., 2011), mientras que animales con ablación selectiva de las ICE no desarrollan LID (Won et al., 2014). Además, aunque la activación opto- o quemogenética de las ICE puede empeorar las LID (Aldrin-Kirk et al., 2018; Bordia et al., 2016), la inhibición de las ICE con estas herramientas no modifica las LID (Aldrin-Kirk et al., 2018; Maurice et al., 2015). Sin embargo, cabe destacar que estas aproximaciones no están dirigidas a corregir los mecanismos que causan actividad aberrante de las ICE y probablemente no restauren su función normal. Un estudio reciente demostró que la activación optogenética de las ICE puede mejorar o empeorar las LID dependiendo del patrón de estimulación (Bordia et al., 2016). Así, la estimulación con pulsos cortos de luz empeora las LID mientras que la estimulación con pulsos largos las alivia (Bordia et al., 2016), sugiriendo que el patrón de

actividad de las ICE tiene una contribución importante en las LID. Así, tener en cuenta posibles cambios en el patrón de actividad de las ICE más que cambios netos en su actividad podría ayudar a entender las observaciones aparentemente contradictorias de la literatura en relación a la contribución de las ICE en las LID.

Aunque históricamente se consideró que las ICE mantenían niveles tónicos de ACh en el estriado por medio de su actividad marcapaso (Bennett et al., 2000; Bennett y Wilson, 1999; Kawaguchi et al., 1995), un trabajo reciente demostró que los receptores muscarínicos localizados en las NEM median respuestas sin fallas a los disparos de potenciales de acción de las ICE (Mamaligas y Ford, 2016), sugiriendo que cambios fásicos en la actividad de las ICE pueden ser detectados por las NEM. En este sentido, es probable que terapias dirigidas a reestablecer la actividad normal de las ICE, en lugar de sólo elevar o disminuir el tono colinérgico estriatal, produzcan una mayor ventaja terapéutica. Si bien las entradas sinápticas pueden dar lugar a cambios fásicos en la actividad de las ICE, los mecanismos intrínsecos de las ICE que causan patrones en salva-pausa también pueden dar lugar a alteraciones fásicas en la liberación de acetilcolina. En las secciones que siguen se presentan los mecanismos subyacentes a la generación de estos patrones de actividad, donde los canales Kir juegan un rol fundamental, por lo que se los describirá en detalle.

1.4 Canales de potasio *inward rectifier* (Kir)

1.4.1 Estructura

La familia de canales de K⁺ es sin duda la mayor y más diversa entre las diferentes familias de canales iónicos. Existen varios tipos de canales de K⁺, que fueron clasificados en tres grupos en función de sus propiedades estructurales (Coetzee et al., 1999) (Figura i9). El primer grupo, que consiste en proteínas de 6 dominios transmembrana (*TMD, transmembrane domains*), incluye a los canales dependientes de voltaje (K_v) y a los canales de K⁺ activables por calcio (K_{Ca}). El segundo grupo, también conocido como canales de dos poros (*two-pore channels*) está compuesto por los canales de fuga o de *leak* y presentan cuatro TMD. El tercer grupo consiste en proteínas con dos TMD e incluye a los canales *inward rectifier* o de rectificación entrante (Kir). Cada uno de estos grupos está subdividido en familias, que a su vez se dividen en subfamilias (Figura i9).

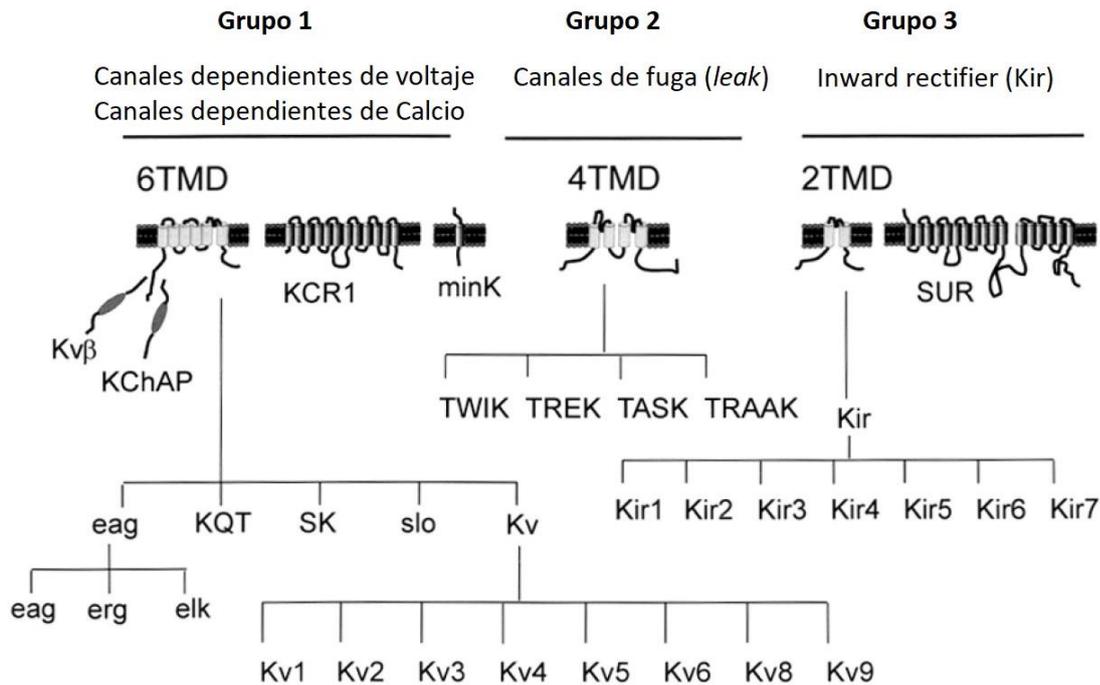


Figura i9. Esquema de los tres grupos de canales de K⁺. Los canales de K⁺ se clasifican en tres grupos de acuerdo a su topología de membrana: los que tienen 6, 4 y 2 dominios de transmembrana (6TMD, 4TMD y 2TMD). Adaptado de Coetzee y col., 1999.

Los canales de K⁺ cumplen funciones esenciales en la fisiología de las células. Están implicados en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, la repolarización de la membrana luego de un potencial de acción, el control de los intervalos inter-disparos, la limitación de entradas sinápticas y la liberación de neurotransmisores, entre otros (Hille, 2001).

En esta tesis se describen con más de detalle los canales pertenecientes al tercer grupo: canales de K⁺ *inward rectifier* (Kir). Estos canales fueron descritos originalmente como de “rectificación anómala”, dado que la relación entre la corriente que transportan y el potencial de membrana no sigue la dependencia clásica descrita por Hodgking y Huxley para los canales K_v (Hibino et al., 2010). A diferencia de los canales K_v, los canales Kir presentan una gran conductancia en potenciales negativos al potencial de reversión del potasio (E_K), pero permiten menos flujo a potenciales positivos, lo que se conoce como rectificación entrante (*inward rectification*). Además, estos canales responden de manera casi instantánea a los cambios de voltaje, es decir, de manera independiente del tiempo. Contrariamente, otros canales presentes en las ICE, como los HCN que median la corriente despolarizante I_h, se activan durante una hiperpolarización con una cinética lenta. La diferente respuesta en el tiempo de canales Kir y HCN durante una hiperpolarización provee un mecanismo para generar oscilaciones (Izhikevich, 2004).

Los canales Kir han sido encontrados en una amplia variedad de tipos celulares: cumplen una importante función en cardiomiocitos, neuronas y células gliales, pero también han sido encontrados en células de la sangre, osteoclastos, células endoteliales y epiteliales (Hibino et al., 2010). La estructura de estos canales incluye dos dominios transmembrana, y cuatro de estas subunidades forman un canal completo y funcional en un complejo tetramérico (Figura i10A).

En la actualidad se han identificado 15 genes que codifican para 15 subunidades diferentes de canales Kir, que a su vez han sido clasificados en 7 subfamilias (Kir1.x-Kir7.x). Estas familias pueden organizarse en 4 grupos de canales, con características funcionales claramente diferentes (Figura i10B):

- 1) Canales Kir transportadores de K⁺ (Kir1.x, Kir4.x, Kir5.x y Kir7.x)
- 2) Canales Kir clásicos (Kir2.x)
- 3) Canales Kir regulados por proteína G o GIRK (Kir3.x)
- 4) Canales Kir sensibles a ATP (Kir6.x)

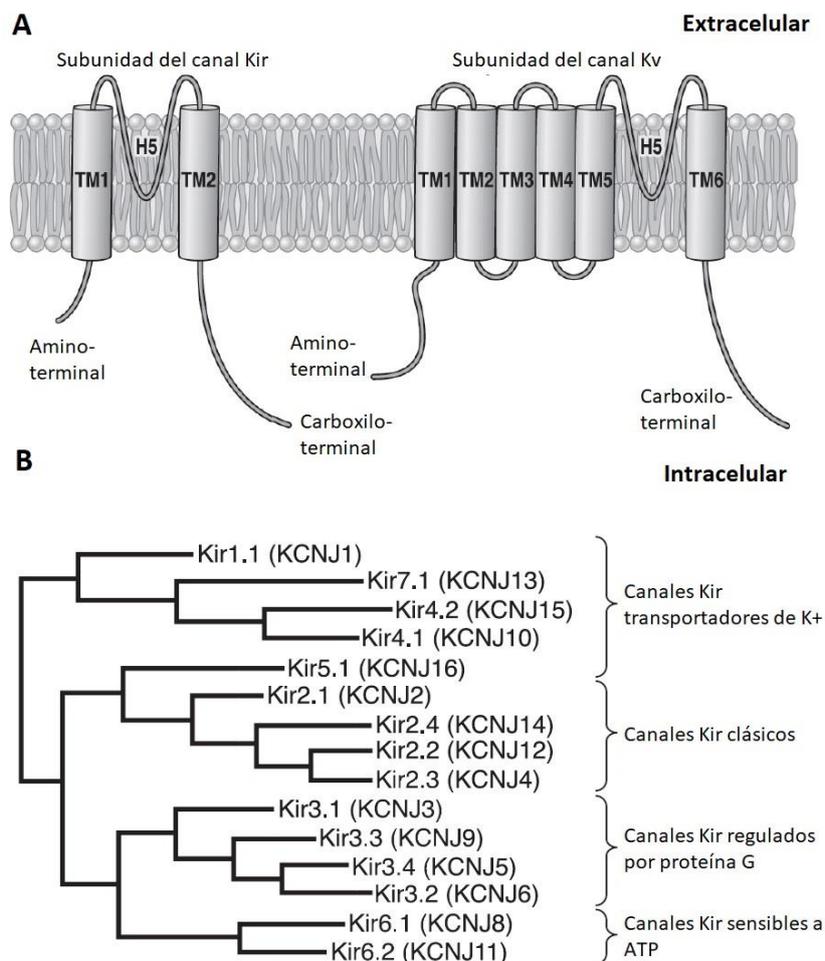


Figura i10. Estructura básica de los canales Kir y su árbol filogenético. A: Estructura de una subunidad de un canal Kir (izquierda) en comparación con una subunidad de un canal K_v (derecha). Cada subunidad de los canales Kir está formada por dos dominios transmembrana (TM1 y TM2), un *pore forming loop* (H5) y dos

terminales citosólicas (NH₂ y COOH). **B:** Arbol filogenético de las 15 subunidades identificadas de canales Kir humanos que fueron clasificadas en 4 grupos. Extraído de Hibino y col., 2010.

Un canal Kir puede estar formado por subunidades homoméricas o heteroméricas, aunque en general la heteromerización ocurre entre subunidades de la misma familia (Preisig-Müller et al., 2002; Schram et al., 2002).

La característica más distintiva de los canales Kir que dió lugar a su nombre es la rectificación entrante. Este fenómeno ocurre por el bloqueo directo del poro del canal por sustancias intracelulares como magnesio (Mg²⁺) y poliaminas, que se unen a residuos del canal localizados en regiones citoplasmáticas y de transmembrana, movilizados hacia la membrana a medida que el potencial se hace más positivo. La dependencia del voltaje se manifiesta en que, a potenciales cada vez más positivos, el bloqueo del canal por Mg²⁺ y poliaminas es cada vez más fuerte, lo que produce más rectificación (Figura i11). Cabe destacar que no todos los canales Kir presentan el mismo grado de rectificación y en base a ello se los conoce como rectificadores fuertes (Kir2.x y Kir3.x), rectificadores intermedios (Kir4.x) y débiles (Kir1.1 y Kir6.x).

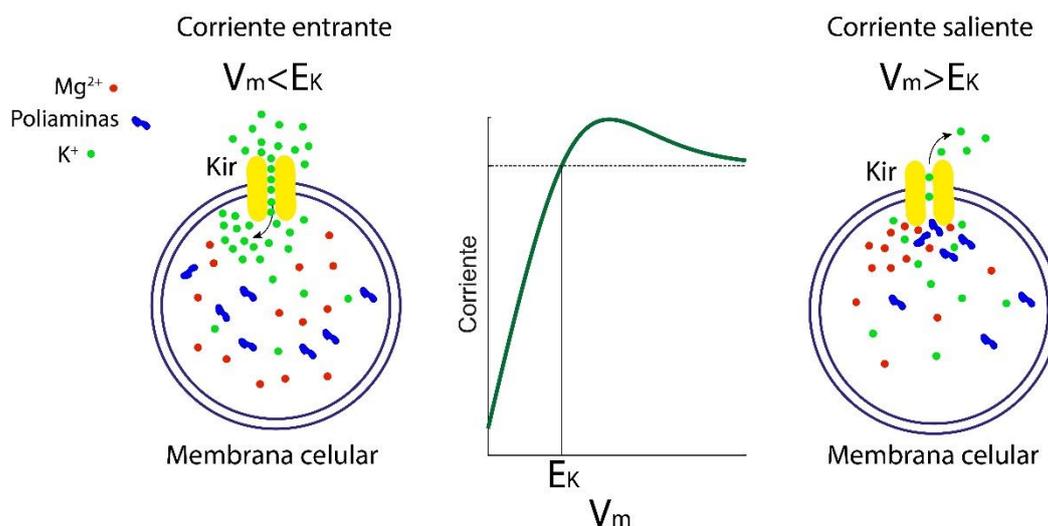


Figura i11. Esquema del mecanismo de rectificación de canales Kir. Se muestra en el panel del medio una representación típica de la curva I-V de canales Kir donde se observa cómo la magnitud de la corriente entrante aumenta linealmente para valores negativos al potencial de reversión del potasio (E_K) (izquierda), mientras que a valores positivos las poliaminas e iones de magnesio (con carga positiva) se movilizan hacia la membrana, bloquean el canal desde adentro impidiendo la salida de potasio y produciendo la rectificación.

1.4.2 Regulación

Se han descrito múltiples mecanismos de regulación de canales Kir. Uno de los más conocidos es el mediado por el fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) (Fürst et al., 2014). Los canales Kir3.x son en general blancos de regulación por receptores acoplados a proteína G, aunque este tipo de regulación no es exclusiva en estos canales (Hibino et al., 2010). Otros tipos de regulación incluyen los cambios de pH, la concentración de ATP (que regula preferencialmente a la familia de canales Kir6.x) y la

fosforilación por quinasas como proteína quinasa A y C (PKA y PKC). La actividad de los canales Kir clásicos (Kir2.x) puede ser regulada por quinasas con diferente direccionalidad. Por ejemplo, los canales Kir2.3 son inhibidos por la activación de PKC (Zitron et al., 2008), mientras que PKA incrementa la corriente mediada por Kir2.2 (Zitron et al., 2004). Además, también se han descrito modulaciones de Kir2.x mediadas por cAMP e independiente de quinasas (Dong et al., 2004; Podda et al., 2010). En términos fisiológicos, estos mecanismos de regulación podrían estar involucrados en la modulación del canal por cascadas de señalización de receptores metabotrópicos.

Si se modela la membrana celular como un cable pasivo, donde todas sus conductancias tienen un comportamiento óhmico ($V=IR$), entonces el efecto de abrir un canal iónico incrementará la permeabilidad de la membrana, que se volverá más conductora, y por consiguiente disminuirá la resistencia de membrana o resistencia de entrada (R_{ent}). Por ejemplo, los canales de *leak* presentan este característico comportamiento óhmico y se consideran fuertes determinantes de la R_{ent} (Enyedi y Czirják, 2010). Dado su comportamiento óhmico, las corrientes de *leak* presentan una curva corriente-voltaje (curva I-V) lineal con pendiente siempre positiva (Figura i12A). Por otro lado, los canales dependientes del voltaje presentan comportamientos no lineales en su curva I-V que en ocasiones pueden producir regiones con pendiente negativa (Figura i12A-B). En términos funcionales, una región de la curva I-V con pendiente negativa implica que una corriente entrante aumenta con la despolarización (o lo que tendría el mismo efecto: que una corriente saliente disminuye con la despolarización); o bien que una corriente saliente aumenta con la hiperpolarización (o lo que tendría el mismo efecto: que una corriente entrante disminuye con la hiperpolarización) (Ceballos et al., 2017) (Figura i12A-B). Este fenómeno produce una retroalimentación positiva al sistema, de manera que se amplifican pequeños cambios del potencial de membrana (ya sea despolarización o hiperpolarización) mediante un mecanismo regenerativo. Así, las corrientes de membrana que presentan este tipo de comportamiento se las conoce como corrientes amplificadoras (Figura i12C). Ejemplos de corrientes que presentan esta propiedad son la corriente de sodio persistente, la corriente NMDA, la corriente de calcio tipo T y, como veremos a lo largo de esta tesis, la corriente Kir. Por el contrario, las corrientes de tipo amortiguadoras o resonantes exhiben siempre pendientes positivas en su curva I-V, ocasionando que siempre se opongan a los cambios de voltaje. La mayoría de los canales de potasio, la corriente I_h mediada por canales HCN y las corrientes de *leak* pertenecen a este último grupo (Figura i12C).

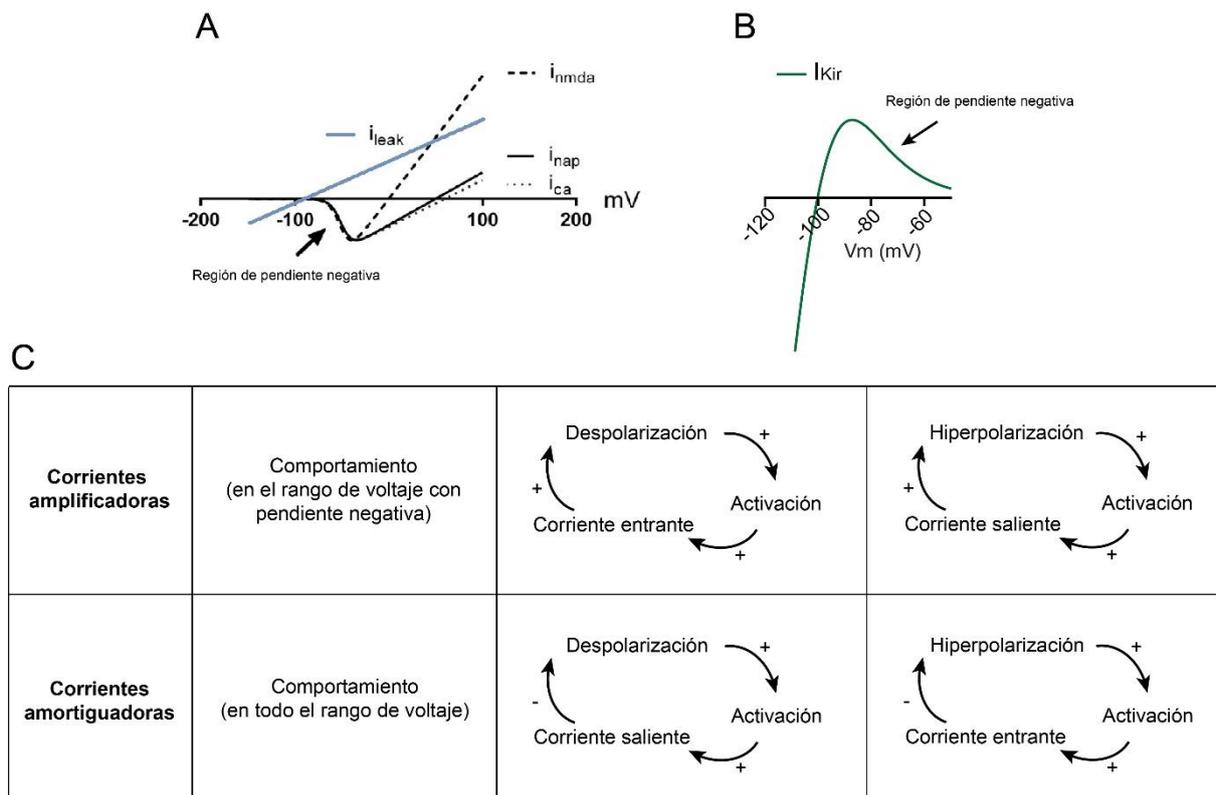


Figura i12. Efecto de las corrientes con curvas I-V con pendientes negativas en el comportamiento de membranas. **A:** Curvas I-V de la corriente de *leak* con comportamiento lineal y de corrientes entrantes con comportamiento no lineal. Se ilustran tres ejemplos típicos de corrientes entrantes con regiones con pendiente negativa: la corriente de sodio persistente (I_{nap}), la corriente NMDA (I_{nmda}) y la corriente de calcio tipo T (I_{ca}) (Adaptado de Ceballos y col., 2017). **B:** Curva I-V de la corriente Kir. La corriente Kir constituye un ejemplo de corriente amplificadora saliente en el rango con pendiente negativa. **C:** Tabla comparativa entre el comportamiento de corrientes amplificadoras y amortiguadoras frente a despolarización o hiperpolarización de la membrana.

El concepto de pendiente negativa genera una interesante paradoja. Como se describió previamente, si una membrana activa una conductancia con comportamiento óhmico (es decir aumenta su permeabilidad) entonces la resistencia de entrada, que es inversamente proporcional a la conductancia G ($R_{ent} = 1/G$), disminuye. En el caso del incremento de una conductancia que presenta una zona con pendiente negativa, la resistencia de entrada presentará un comportamiento no lineal a lo largo del potencial. En la zona con pendiente negativa, esta conductancia contribuirá negativamente a la conductancia total, resultando en un aumento de la resistencia de entrada. Este aumento “paradójico” de la resistencia de entrada fue evidenciado experimentalmente mediante la inyección de conductancias artificiales con pendientes negativas y positivas mediante la técnica de *dynamic clamp* (Fernandez et al., 2015). Los autores observaron que la inyección de conductancias con pendiente positiva disminuye la R_{ent} en células estrelladas entorhinales, mientras que la inyección de conductancias con pendiente negativa aumenta la R_{ent} (Ceballos et al., 2017; Fernandez et al., 2015).

Como se mencionó, la corriente Kir puede presentar en su curva I-V una zona con pendiente negativa. No todos los canales Kir tienen esta propiedad, sino que depende de la subunidad que conforma el canal (Amarillo et al., 2018; Anumonwo y Lopatin, 2010; Dhamoon et al., 2004). La pendiente negativa se origina como resultado de la fuerte rectificación causada por el bloqueo intracelular por Mg^{2+} o poliaminas. Cerca del potencial de reversión, el bloqueo con Mg^{2+} o poliaminas es débil por lo que la corriente Kir aumenta con la despolarización (entre el potencial de reversión y aproximadamente $-70mV$). Sin embargo, el bloqueo aumenta a potenciales cada vez más positivos ocasionando que, a partir de cierto punto, la corriente comienza a disminuir con la despolarización generando la zona de pendiente negativa. Sólo los canales Kir con fuerte rectificación (*strong rectifiers*: Kir2.x y Kir3.x) presentan esta zona con pendiente negativa, cuya magnitud es sensiblemente mayor en los Kir2.x (Anumonwo y Lopatin, 2010) y además varía entre cada subunidad (Figura i13). Entre ellos, los canales Kir2.2 son los que presentan mayor rectificación, que se evidencia por la reducida magnitud de la corriente saliente normalizada a la corriente entrante y por su empinada pendiente negativa (Figura i13).

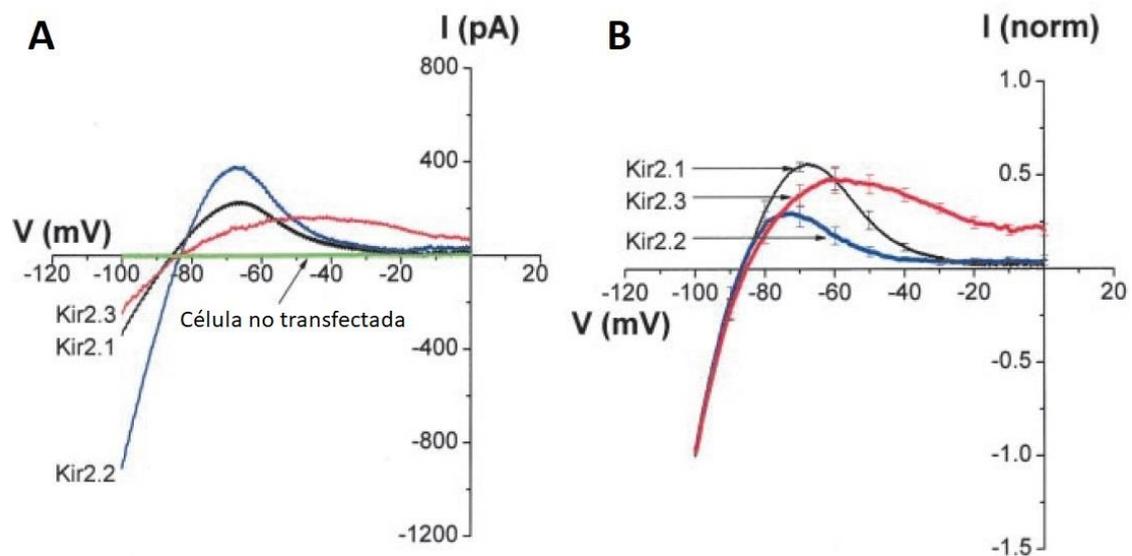


Figura i13. Curvas I-V de los canales Kir con fuerte rectificación. A: Curvas I-V de corrientes evocadas por rampas de voltaje en registros electrofisiológicos de células HEK293 transfectadas con las diferentes subunidades de canales Kir con fuerte rectificación. **B:** Curvas I-V normalizadas a la conductancia máxima de canal abierto. Adaptado de Dhamoon y col., 2004.

Los canales Kir2.2 han sido relacionados con la actividad oscilatoria en las neuronas excitatorias tálamicas (Amarillo et al., 2018) y tienen una importante contribución a la corriente Kir de células marcapaso cardíacas (Anumonwo y Lopatin, 2010; Dhamoon et al., 2004).

1.4.3 Rol de Kir en las oscilaciones de membrana de las ICE

Las interneuronas colinérgicas estriatales pueden exhibir actividad oscilatoria que da lugar a patrones en salva-pausa, aunque en condiciones fisiológicas sólo se ha observado en una

minoría de ICE (Sanchez et al., 2011; Wilson, 2005). En las ICE, este tipo de patrón de actividad intrínseco no depende de corrientes reclutadas durante los disparos que ocurren en la salva, dado que persisten de manera subumbral cuando se bloquean los potenciales de acción con tetrodotoxina (TTX) (Wilson, 2005) (Figura i14).

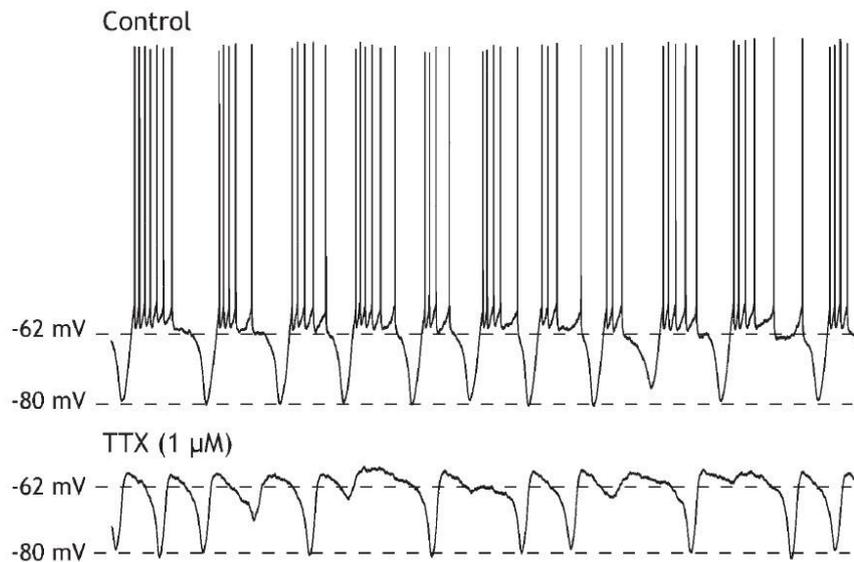


Figura i14. Efecto de la aplicación de TTX sobre la oscilación. Se muestra un registro en rodaja de una ICE con patrón de disparo en salva-pausa antes de la aplicación de TTX, cuyas oscilaciones subumbrales persisten luego del agregado de TTX. Extraído de Wilson (2005).

Múltiples mecanismos pueden contribuir a generar patrones de actividad de tipo salva-pausa en distintos tipos neuronales (Amarillo et al., 2014, 2018; Amini et al., 1999; Huguenard y McCormick, 1992; Wilson, 2005; Wu et al., 2005). Desde un punto de vista teórico, las oscilaciones de membrana requieren de una corriente amplificadora, que aporta la pendiente negativa y amplifica cambios en el potencial de membrana, y una corriente amortiguadora que se opone a la amplificadora. Estas dos corrientes interactúan en presencia de una corriente de fuga o *leak*, que está presente en todas las membranas celulares. En el caso de las ICE, que al igual que las neuronas tálamicas expresan canales Kir2.2 (Karschin et al., 1996; Prüss et al., 2003), el mecanismo que subyace al patrón oscilatorio depende de la interacción entre la corriente Kir (la corriente amplificadora) y la corriente I_h (la corriente amortiguadora) (Figura i15A). En la Figura i15B se muestra la curva I-V instantánea de una ICE en rangos de voltaje subumbrales asumiendo que la corriente I_h fuera nula. En este rango de voltaje, coexisten la corriente Kir y de *leak*. Mientras que la corriente Kir es de K^+ , la corriente *leak* resulta de una combinación de fuga de Na^+ y K^+ con potencial de reversión en aproximadamente $-60mV$. Al ser ambas independientes del tiempo, sus curvas I-V son invariables por lo que pueden sumarse dando lugar a una curva instantánea resultante (I_{Total}). Esta curva resultante será luego modificada a lo largo del tiempo por el efecto de la activación y desactivación lenta de la corriente I_h (Figura i15C): cuando I_h está desactivada ($I_h = 0$) la curva I-V presenta un único punto de equilibrio en potenciales negativos. A medida que I_h crece ($I_h > 0$), la curva I-V cae y corta al eje "x" en 3

puntos de equilibrio. El punto intermedio es inestable mientras que los puntos despolarizado e hiperpolarizado son estables. En este nivel de activación de I_h , si la célula se encuentra en el punto inestable, el potencial tiende rápidamente hacia uno de los otros dos puntos de equilibrio dependiendo de la dirección de cambio de potencial. Finalmente, con suficiente activación de I_h , los puntos de equilibrio intermedio y negativo desaparecen y queda sólo el punto de equilibrio localizado en potenciales más despolarizados ($I_h \gg 0$). Las oscilaciones se dan porque los cambios temporales de I_h mueven la curva I-V modificando los puntos de equilibrio y desestabilizando el potencial de membrana. Cabe destacar, que para que se produzca la condición donde aparezcan los 3 puntos de equilibrio, es condición necesaria que la curva I-V instantánea exhiba la zona de pendiente negativa, que es aportada por la relación I-V de la corriente Kir.

El ciclo de la oscilación que da lugar al patrón salva-pausa en las ICE se describe a continuación (Figura i15D-E): (1) la membrana se encuentra suficientemente despolarizada de manera que la corriente I_h empieza a desactivarse y por lo tanto la membrana se hiperpolariza lentamente a medida que I_h se desactiva. (2) Cuando el potencial de membrana alcanza el rango donde la curva I-V presenta la zona de pendiente negativa (punto de equilibrio inestable), I_{Kir} amplifica rápidamente la hiperpolarización a medida que los canales Kir se liberan del bloqueo dependiente de voltaje por metabolitos intracelulares, produciendo mayor activación de I_{Kir} por retroalimentación positiva (3) y por lo tanto mayor hiperpolarización. (4) En potenciales suficientemente negativos, I_h logra activarse lo suficiente como para contrabalancear el efecto de I_{Kir} y empieza a despolarizar la membrana. En este punto, el potencial atravesará nuevamente la zona de pendiente negativa (punto de equilibrio inestable), pero en este caso en el sentido de la despolarización (5), favoreciendo aún más la despolarización por la disminución de la corriente Kir a medida que los canales se bloquean por el efecto de Mg^{2+} y poliaminas. Esto lleva la membrana hasta valores despolarizados, alcanzando eventualmente el umbral de disparo, que podría resultar en la descarga de uno, dos o incluso una salva de potenciales de acción. (6) En estos potenciales despolarizados, I_h comienza a desactivarse nuevamente, permitiendo que el potencial de membrana vuelva lentamente hasta alcanzar la zona de pendiente negativa y estableciendo así las condiciones para el inicio de un nuevo ciclo.

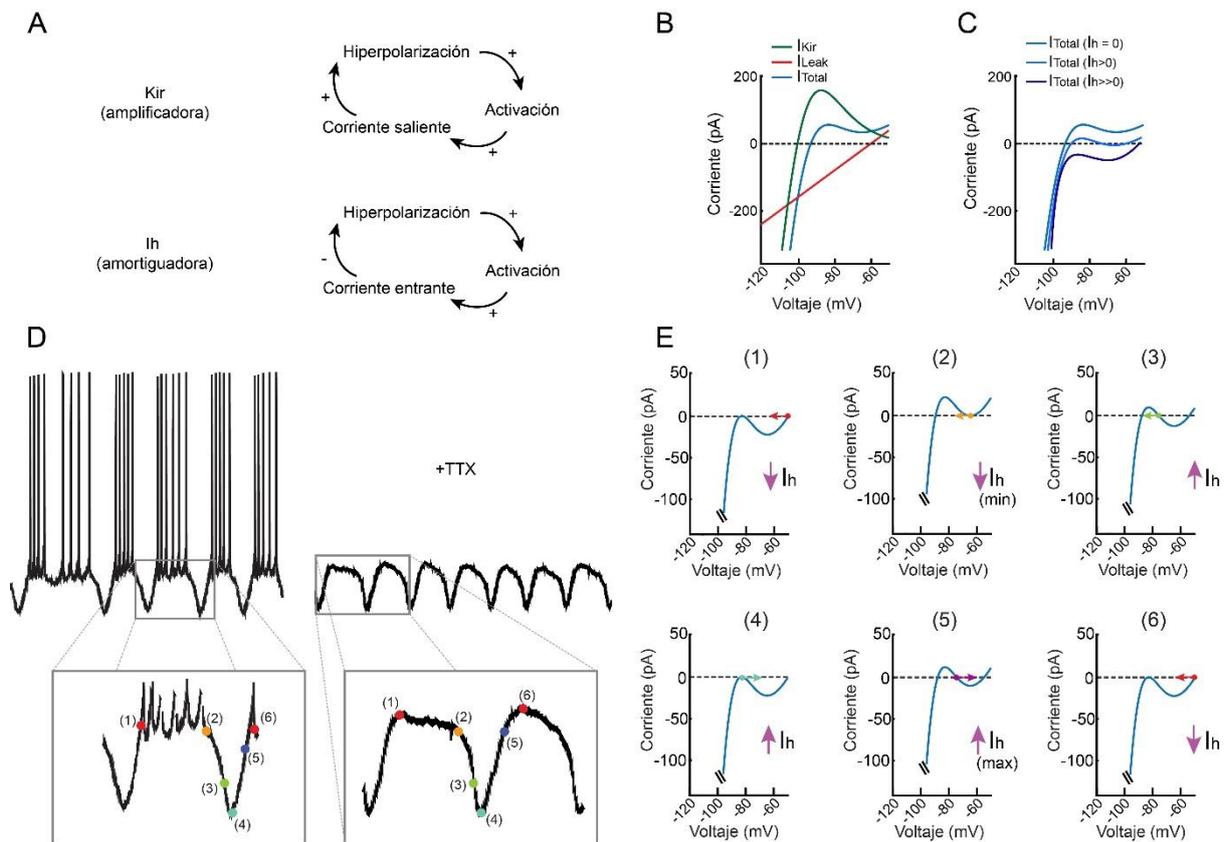


Figura i15. Mecanismo involucrado en las oscilaciones de las ICE. **A:** Descripción del comportamiento de las corrientes Kir e Ih. **B:** Composición de la curva I-V instantánea de la ICE. La curva I_{Total} resulta de sumar I_{Kir} e I_{Leak} . **C:** Desplazamiento de la curva I-V instantánea en función del nivel de activación de Ih. **D:** A la izquierda: se ejemplifica una ICE oscilatoria que dispara en salvas de potenciales de acción. A la derecha: la misma neurona luego del agregado de TTX (bloqueante de canales de Na^+). Se observa cómo la oscilación persiste luego del agregado de TTX. **E:** Descripción esquemática del ciclo de la oscilación. D-E: Ver explicación en el texto en relación con los puntos marcados 1 a 6.

1.5 Mecanismos de regulación de la actividad intrínseca de las ICE

Como se describió a lo largo de esta introducción, la actividad espontánea intrínseca de las ICE puede presentarse con un patrón de disparo regular, o con oscilaciones subumbrales acompañadas por salvas de potenciales de acción a intervalos regulares (patrón salva-pausa) o por disparos irregulares (ver Figura i3). Además, las ICE pueden transicionar de un patrón a otro (Goldberg y Wilson, 2005; Reynolds et al., 2004; Wilson, 2005; Wilson y Goldberg, 2006). Sin embargo, los mecanismos que regulan las corrientes que participan en la generación de estos patrones de actividad y que por consiguiente determinan el tipo de patrón en las ICE no se conocen. Se ha reportado que la descarga de aferentes excitatorios del tálamo o la corteza pueden inducir respuestas en salva-pausa en las ICE (Kosillo et al., 2016; Reynolds et al., 2004; Tubert y Murer, 2020), aunque estas respuestas son transitorias, dependen de la acción directa del glutamato sobre receptores ionotrópicos y no modifican de manera persistente la actividad de disparo de las ICE. Un estudio en el que se registraron ICE *in vivo* en ratas anestesiadas encontró que la estimulación de alta

frecuencia de la sustancia nigra pars compacta (que envía proyecciones dopaminérgicas al estriado) induce actividad en salva-pausa en las ICE que persiste durante algunos minutos luego de finalizada la estimulación (Reynolds et al., 2004). Aunque los autores discuten la posibilidad de que la potenciación de sinapsis córticoestriatales mediada por receptores D1/D5 contribuya al cambio de actividad en las ICE, los efectos de la terapia de reemplazo con L-DOPA en animales con degeneración crónica nigroestriatal, donde los receptores para DA se encuentran supersensibles, no se conocían en profundidad antes de la realización de esta tesis.

Aunque se han reportado cambios en la sincronización de las ICE luego de la degeneración dopaminérgica (Raz et al., 1996), no se conoce el impacto de la degeneración nigroestriatal en los patrones de disparo de las ICE, y menos aún si éstos son modificados por el tratamiento con L-DOPA. Los cambios de actividad espontánea de las ICE podrían tener importantes consecuencias en los patrones y niveles de liberación de acetilcolina estriatal. Así, entender los mecanismos de regulación de la actividad espontánea de las ICE y como ésta se modifica por la degeneración dopaminérgica y el tratamiento con L-DOPA permitiría identificar sustratos moleculares para el diseño de nuevas terapias que apunten a restaurar la señalización colinérgica normal en el estriado en la enfermedad de Parkinson y las LID, donde se sabe que la actividad patológica de las ICE juega un papel fundamental.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Como se describió en la introducción de esta tesis, la actividad aberrante de las interneuronas colinérgicas estriatales contribuye a los síntomas de la EP y a las LID. El diseño de terapias dirigidas a reestablecer su actividad normal podría tener ventajas terapéuticas en comparación con el uso de anticolinérgicos, en especial en etapas avanzadas de la EP, cuando las complicaciones motoras derivadas del tratamiento crónico con L-DOPA se vuelven seriamente debilitantes. En consecuencia, identificar los mecanismos que subyacen a la actividad aberrante de las ICE en estas condiciones es crucial para direccionar el desarrollo de nuevas terapéuticas.

Objetivo general:

Esclarecer los mecanismos subyacentes a las complicaciones motoras inducidas por la L-DOPA en la EP avanzada e identificar nuevos blancos terapéuticos para la EP.

Objetivos específicos:

- I. Caracterizar la electrofisiología de las ICE en un modelo experimental de la EP luego de un tratamiento con L-DOPA.
- II. Identificar los mecanismos que median la actividad aberrante de las ICE en este modelo.
- III. Identificar blancos moleculares adicionales para modular la actividad de las ICE.

MATERIALES Y METODOS

3 MATERIALES & MÉTODOS

3.1 Métodos generales

3.1.1 Animales

Se utilizaron ratones que expresan la proteína fluorescente roja tdTomato en todas las neuronas que expresan la proteína Colina Acetil-Transferasa (a los que llamaremos por simplicidad ChAT-Cre;tdT). Se obtuvieron estos ratones como la descendencia de la primera generación (F1) de la cruce de ratones de la línea ChAT-Cre [B6;129S6-Chat^{tm2^(cre)}Lowl/J, Stock 6410 (Rossi et al., 2011)] con ratones de la línea Rosa-CAG-LSL-tdTomato-WPRE [B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)}Hze/J, stock 7914 (Madisen et al., 2010)], ambos obtenidos de Laboratorios Jackson. Así, los ratones obtenidos ChAT-Cre;tdT son heterocigotas para Cre y para el gen reportero. Los animales experimentales fueron alimentados *ad libitum*, se mantuvieron en un máximo de 6 por jaula con ciclos de 12:12 horas de luz:oscuridad (la luz se enciende a las 7 am) y tenían >3 meses al momento del experimento (ratones adultos). Se respetaron los cuidados establecidos institucionalmente (CICUAL de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) y gubernamentales (SENASA, Argentina). Para los animales que recibieron la lesión con 6-OHDA o vehículo (sham) sólo se utilizaron animales hembras, mientras que para los ratones control (sin lesión sham) se utilizaron tanto machos como hembras.

3.1.2 Lesión por 6-hidroxidopamina

Para inducir la degeneración dopaminérgica nigroestriatal se inyectó la neurotoxina 6-hidroxidopamina HBr (6-OHDA) en el haz medial del cerebro anterior (*medial forebrain bundle*, MFB), el tracto por el que pasan los axones de las neuronas dopaminérgicas de la SNc en su trayecto hacia el cerebro anterior. Se utilizó anestesia inhalatoria (isoflurano, 4% en O₂ para inducción y 0.5-1% para mantenimiento de la anestesia). La 6-OHDA (Sigma Aldrich AB) fue disuelta en solución salina-ácido ascórbico 0.1%, en una concentración de 5.91 µg/µl de droga base. Se inyectó 0.5 µl de la solución en el MFB del hemisferio izquierdo siguiendo las siguientes coordenadas: 1 mm anteroposterior, 1.1 mm lateral y 4.8 mm dorsoventral medidos desde la dura madre (Paxinos y Franklin, 2001). La velocidad de inyección fue de 0.5 µl/min, y se utilizó una cánula de 300 µm de diámetro unida a una jeringa Hamilton controlada por una bomba motorizada (Bioanalytical Systems, USA). Se mantuvo la cánula en el sitio de inyección por 6 minutos luego de la inyección, y se la retiró lentamente cuidando que no hubiera reflujo de la toxina. Los animales sham recibieron una inyección de solución salina-ácido ascórbico 0.1% en el MFB y fueron manipulados de igual manera que los que recibieron la 6-OHDA. La asignación de cada ratón a cada tratamiento fue hecha al azar. Luego de la cirugía, durante todos los días, los ratones fueron pesados y

recibieron una inyección subcutánea de solución salina y fueron alimentados con una dieta rica en azúcares y grasas para que recuperen su peso (alrededor de 15-20 días luego de la cirugía).

3.1.3 Obtención de rodajas

Los animales fueron anestesiados con isoflurano y decapitados. El cerebro fue removido rápidamente y colocado en una solución fría y carbogenada (95% O₂ y 5% CO₂) de ACSF (líquido cefalorraquídeo artificial, *Artificial CerebroSpinal Fluid*) de alto magnesio y bajo calcio que contenía: 125mM NaCl, 2.5mM KCl, 1.3mM NaH₂PO₄·H₂O, 26mM NaHCO₃, 0.5mM CaCl₂, 2.5mM MgCl₂ y 10mM glucosa. Se preparó el cerebro para realizar cortes coronales a la altura del estriado en un vibrátomo (Pelco T series 1000, Ted Pella). Se cortaron rodajas de 300 µm de espesor y se las transfirió a una cámara conteniendo la misma solución, donde se mantuvieron a 34°C durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente hasta el momento de registro.

3.1.4 Registros electrofisiológicos

Para realizar los registros se transfirieron las rodajas a una cámara de registro alimentada mediante una bomba peristáltica (Ismatec, Alemania) con ACSF de niveles de magnesio y calcio normales a una tasa de 3 ml/min. Este ACSF contenía: 125mM NaCl, 2.5mM KCl, 1.3mM NaH₂PO₄·H₂O, 26mM NaHCO₃, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ y 10mM glucosa. La temperatura en la cámara fue de 34°C mantenida con un controlador de temperatura TC-344B (Warner Instruments). Antes de realizar los registros se dejó estabilizar las rodajas en la nueva solución durante 10 minutos en la cámara de registro. Se registraron ICE de la región dorsolateral del estriado, la cual corresponde a la región motora. Se identificaron las neuronas registradas con un microscopio Nikon Eclipse equipado con un objetivo de inmersión en agua 40x, con óptica DIC y para fluorescencia, y una cámara infrarroja conectada a un monitor y a la computadora. Se utilizaron pipetas de registro de capilares de borosilicato estirados con un *puller* (P-97, Sutter Instruments), de resistencia entre 4 y 7 MΩ. Para los registros en *whole cell* se llenaron las pipetas con solución intracelular: 20mM KCl, 120mM K-gluconato, 1mM HEPES, 2mM Na₂ATP, 0.3mM NaGTP, 0.1mM EGTA, 10mM fosfocreatina y 2mM MgCl₂, pH 7.3 ajustado con KOH. Para los registros en *cell attached* del Capítulo I se llenaron las pipetas con la misma solución intracelular, mientras que para los registros en *cell attached* del Capítulo III se llenaron con ACSF. Los registros se realizaron con un amplificador Axoparch-1D (Molecular Devices), a una frecuencia de muestreo de 20 kHz (Digidata 1322A, Molecular Devices) en una computadora equipada con pClamp 9.2 (Molecular Devices). Las células consideradas para el análisis superaban los siguientes criterios: resistencia en serie entre 10 y 30MΩ, potencial de acción con amplitud mayor o igual a 50mV desde el umbral al pico y con "overshoot", y potencial de membrana en reposo entre -75 y -45mV. Para los registros en *voltage clamp* se compensó la capacitancia y la resistencia en serie (mínimo 60%). No se sustrajo la conductancia de fuga (*leak*

conductance) ni del potencial de unión líquida (*liquid junction potential*). Para los registros en *current clamp* se compensó la resistencia en serie. Para evaluar la sumación de potenciales excitatorios post-sinápticos, se evocaron respuestas sinápticas en ICE mediante la estimulación eléctrica intraestriatal con un electrodo bipolar ubicado a $\sim 500 \mu\text{m}$ de la célula registrada (5 pulsos a 20Hz y 0.1ms de ancho de pulso). Por otro lado, se estimuló con liberación de glutamato enjaulado utilizando pulsos de luz azul (5 pulsos a 20Hz y 0.1ms de ancho de pulso) generados con un LED de 1W de potencia máxima y 447nm a través de una fibra óptica (Tolket, Argentina) ubicada a $< 300 \mu\text{m}$ de la célula registrada (la potencia en la punta de la fibra es de aproximadamente 5mW). En estos experimentos de estimulación sináptica (estimulación eléctrica y liberación de glutamato enjaulado), se añadió picrotoxina (100 μM) al ACSF para bloquear la transmisión GABAérgica. En el resto de los experimentos se agregó picrotoxina (100 μM) y CNQX (20 μM) o NBQX (10 μM) al ACSF para bloquear la transmisión GABAérgica y glutamatérgica. Para estudiar la actividad tónica, se registró la actividad espontánea de ICE en configuración *whole cell* durante aproximadamente 15 minutos desde la ruptura del sello. Luego se registró la respuesta a pulsos de corriente despolarizante de un segundo de duración y de intensidad creciente ($\Delta 30 \text{ pA}$) desde 20pA a 290pA. Para medir la corriente K_{ir} (I_{Kir}) se utilizaron protocolos de *voltage clamp* que consistieron en rampas rápidas de voltaje desde -55mV a -120mV en presencia de ZD7288 (30 μM) en la solución intracelular (Gertler et al., 2008; Li et al., 2013). Las corrientes I_h e I_{Leak} fueron medidas utilizando un protocolo de pulsos largos de voltaje: desde un potencial de *holding* de -40mV se aplicaron pulsos de voltaje de intensidad creciente ($\Delta 10 \text{ mV}$) desde -40mV hasta -130mV y de duración decreciente ($\Delta 1.5\text{s}$) alcanzado un último pulso de 3.5s y -130mV (Kanyshkova et al., 2009). Estos pulsos variables fueron seguidos por un pulso a un voltaje constante de -100mV que permitió medir corrientes de cola para calcular la curva de activación de I_h de manera independiente del gradiente electroquímico. Para este protocolo se incluyó bario (500 μM) y TTX (1 μM) en el ACSF para bloquear corrientes de sodio y de potasio. Para los experimentos de *dynamic clamp*, se registraron ICE con un Axoclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y, con frecuencia de muestreo de 20 kHz (Digidata 1322A, Molecular Devices), se adquirieron los registros con una computadora con pClamp 10.2 (Molecular Devices). El *dynamic clamp* fue implementado en el laboratorio gracias a la ayuda del Dr. Yimy Amarillo (Centro Atómico Bariloche) como se describe en Amarillo y col., 2018. Se utilizó una tarjeta DAQ (NI PCI-6259, National Instruments, Austin, TX) que fue comandada por el software libre StpC instalado en una computadora con Windows XP (Kemenes et al., 2011). La salida analógica del amplificador que lleva la señal de voltaje de la ICE (V_m) se conectó a la entrada analógica de la Digidata 1322A y de la tarjeta NI PCI-6259 del circuito de *dynamic clamp*. De esta manera, la señal de voltaje (V_m) de la ICE se usó para registrar el potencial de membrana y a la vez como entrada al circuito de *dynamic clamp*. Las salidas analógicas de ambas interfaces se conectaron a un dispositivo sumador de voltaje en tiempo real desarrollado a medida (Patente P20170101319, CONICET, Argentina), cuya salida fue conectada a la entrada analógica del amplificador MultiClamp 700B. Esta configuración permitió realizar simultáneamente protocolos de *current clamp*

con el software pClamp 10.2 y realizar simulaciones de *dynamic clamp* con el software StpC (Figura m1).

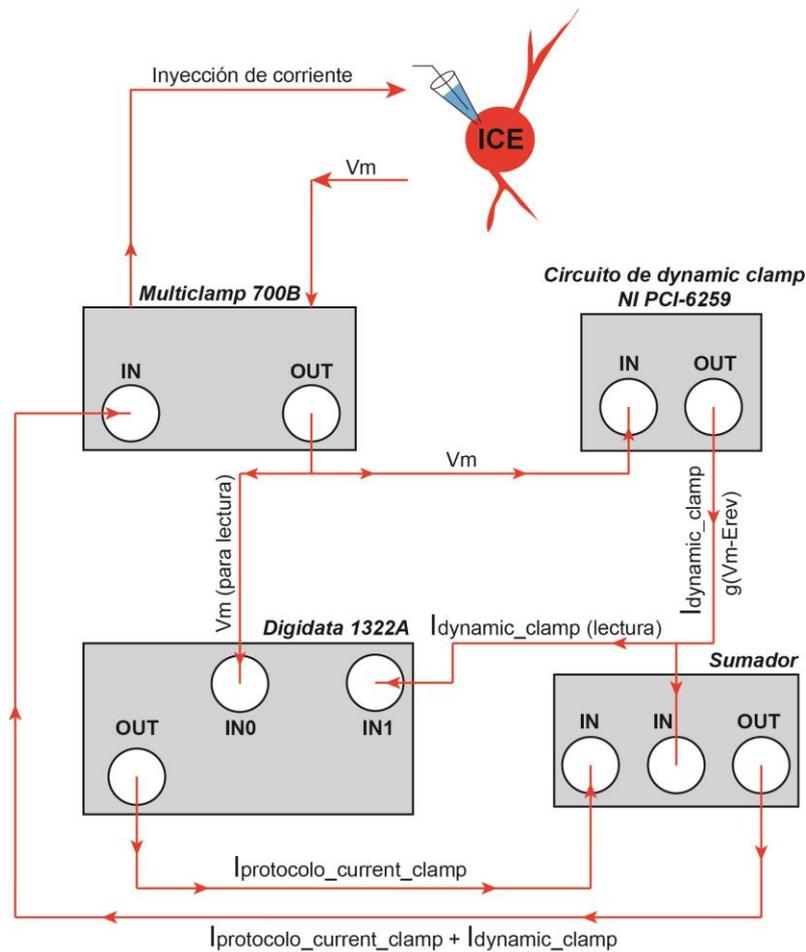


Figura m1. Descripción esquemática del conexionado para *dynamic clamp*. ICE: Interneurona colinérgica estriatal. V_m : Potencial de membrana de la ICE. $I_{dynamic-clamp}$: corriente generada por el modelo. $I_{protocolo-current-clamp}$: corriente generada por el protocolo de *current clamp* utilizado.

La ecuación de corriente del modelo de corriente inward-rectifier (I_{Kir}) utilizado en los experimentos de *dynamic clamp* tienen la forma (Amarillo et al., 2018):

$$I_{Kir} = G_{Kir} m_{\infty} (V_m - E_{Kir}^{rev})$$

Donde G_{Kir} es la conductancia máxima de la corriente, V_m es el potencial de membrana, $E_{Kir}^{rev} = -100$ mV es el potencial de reversión de I_{Kir} y m_{∞} es la variable de activación dependiente del voltaje:

$$m_{\infty} = 1 / \{1 + \exp[(V_m + 97.9) / 9.7]\}$$

Para eliminar la región de pendiente negativa de la curva I-V de I_{Kir} , se reemplazó la ecuación original por:

$$m_{\infty} = 1 / \{1 + \exp[(V_m + 97.9) / 9.7]\} + 0.1$$

La ecuación de la corriente para el modelo de corriente de leak (I_{Leak}) es:

$$I_{leak} = G_{leak}(V_m - E_{leak}^{rev})$$

Donde G_{leak} es la conductancia máxima de I_{leak} y $E_{leak}^{rev} = -60$ mV es el potencial de reversión de I_{leak} .

3.1.5 Manipulaciones farmacológicas

A menos que se indique lo contrario, los reactivos fueron adquiridos de Sigma (Argentina). Las sales se adquirieron de Baker (Research AG, Argentina). Las drogas se prepararon en soluciones de stock, fueron diluidas en ACSF inmediatamente antes de su uso y aplicadas a través del sistema de perfusión. Se utilizaron los siguientes solventes para el stock y concentración final: H₂O destilada para TTX (1μM, Alomone Labs), ZD7288 (30μM), BaCl (10μM, 25μM y 500μM), diclofenac (100μM) y MFA (ácido meclofenámico, 100μM); DMSO para CNQX (40μM, Sigma y Alomone Labs), picrotoxina (100μM), NBQX (10 μM, Tocris Bioscience), SKF81297 (500nM, 1μM, 2μM, 5μM), quinpirole (1μM), SCH23390 (10μM), glibenclamide (10μM, Tocris Bioscience), XE991 (30μM), linopirdine (10μM, Alomone Labs) y retigabina (10μM, Alomone Labs); ACSF para Rubi-Glutamato (300μM) y se utilizó el buffer recomendado por el fabricante (0.1% BSA, 100mM NaCl, 10mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA) para tertiapin-Q (100nM, Alomone Labs). En algunos experimentos, ZD7288 (30μM) fue agregado a la solución intracelular. Para marcar neuronas destinadas a análisis morfológico, se incorporó neurobiotina (1mg/ml, Neurobiotin Tracer, Vector) directamente disuelta en la solución intracelular. El glutamato enjaulado (Rubi-Glutamato) está disponible comercialmente en Tocris (Cat #3574), pero para estos estudios fue gentilmente proporcionado por el Dr. Roberto Etchenique (FCEyN, UBA).

3.1.6 Reconstrucciones neuronales

Para los análisis morfológicos, se registraron ICE con neurobiotina en la solución intracelular. Luego del registro, las rodajas se transfirieron inmediatamente a una solución fijadora (4% PFA en PBS), fueron fijadas *overnight* y luego preservadas en PBS con 0.1% azida de sodio durante <7 días. Para el revelado, se lavaron las rodajas con PBS y fueron incubadas *overnight* con estreptaavidina (Alexa Fluor488, Invitrogen), lavadas con PBS y montadas en portaobjetos de vidrio. Las reconstrucciones 3D del soma y del árbol dendrítico se realizaron con el sistema de reconstrucción de NeuroLucida (MFB Bioscience). Se calculó el volumen del soma, las medidas del árbol dendrítico y el análisis de Sholl utilizando el software NeuroLucida Explorer (MFB Bioscience). El análisis de Sholl se realizó sobre la proyección XY (2D) del árbol dendrítico reconstruido utilizando un radio incremental de Δ5μm desde 10μm hasta 360μm.

3.1.7 Inmunohistoquímica

Para confirmar la degeneración dopaminérgica inducida por la toxina 6-OHDA, se fijaron los cerebros durante 24 horas en 4% PFA en PBS luego de haber obtenido las rodajas de estriado para electrofisiología. Luego fueron crioprotegidos en 30% sacarosa en PBS y cortados con micrótopo (Leica) en cortes de 35 μm . Los cortes que contenían la sustancia nigra compacta fueron preservados en PBS con 0.1% de azida de sodio. Para la reacción de inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa (TH), los cortes fueron bloqueados durante 2 horas a temperatura ambiente (5% NGS y 0.3% Triton X-100 en PBS), incubados *overnight* con anticuerpos primarios (ratón anti-TH, Chemicon, 1:1000) a 4°C, lavados 3 veces con 0.15% Triton X-100 en PBS (PBS-T) e incubados con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor488 (cabra anti-ratón, Invitrogen, 1:500) por 2hs a temperatura ambiente. Luego se lavaron los cortes en PBS-T y se montaron en portaobjetos de vidrio con Vectashield (Vector).

3.1.8 Adquisición de imágenes

Las imágenes de células registradas con neurobiotina y las imágenes de inmunorreacciones contra TH fueron adquiridas con un microscopio Zeiss Axiomager M2 con software Neurolucida de MFB Bioscience (con objetivos de 20X y 40X respectivamente). Las imágenes para reconstrucciones fueron obtenidas en pilas (*stacks*) a un intervalo de 2 μm entre cada plano.

3.2 Cuantificaciones y análisis estadístico

3.2.1 Evaluación de síntomas motores de parkinsonismo experimental

Para evaluar los signos de parkinsonismo se sometió a los ratones a 3 ensayos conductuales a partir de la tercera semana luego de la inyección de 6-OHDA (Escande et al., 2016). Los ensayos se realizaron en días no consecutivos, durante la fase de luz, a ciegas del tratamiento. Para evaluar el índice de rotación se realizó un ensayo de arena abierta (*open field*). Para evaluar el índice de asimetría del uso de las patas delanteras se realizó el ensayo del cilindro. Y para evaluar la coordinación motora y el balance se realizó un ensayo de rotarod.

Arena abierta: se midió la cantidad de rotaciones espontáneas de los ratones en una arena abierta (40 x 40 cm) durante 15 minutos. Durante todo el ensayo la actividad de los ratones fue filmada por una cámara cenital, y la posición de los ratones en función del tiempo fue determinada por el sistema de rastreo automático ANY-maze. Se calculó el índice de rotaciones ipsilaterales como el número de rotaciones ipsilaterales sobre el número de rotaciones totales.

Cilindro: Se introdujo al ratón en un cilindro vertical de acrílico transparente de 10 cm de diámetro y 14 cm de alto. El test consistió en contar cuántas veces el ratón usa la pata

delantera contralateral, la ipsilateral o ambas juntas, para apoyarse en la pared al realizar una exploración vertical, durante 5 minutos. Todo el ensayo fue filmado con una videocámara lateral. Se calculó un índice de asimetría como el número de veces que el ratón apoya la pata contralateral respecto al total.

Rotarod: Los ratones fueron colocados en un rotarod acelerado (de 4 a 40 rpm en 5 minutos; Ugo Basile, Italia) y se evaluó la latencia a caerse del rodillo. Cada animal fue testeado 5 veces seguidas separadas por 5 minutos cada una

3.2.2 Administración de L-DOPA y puntuación de discinesias

Los animales recibieron una dosis diaria de 12mg/kg de L-3,4 dihydroxifenilalanina metil éster clorhidrato (L-DOPA, Sigma Aldrich) y 12mg/kg de Benserazide (Sigma Aldrich) por vía intraperitoneal durante 14 días consecutivos. Los días 1, 4, 8 y 12 desde iniciado el tratamiento los animales fueron grabados durante 120 minutos y sus discinesias fueron puntuadas. Las LID fueron cuantificadas siguiendo la escala de movimientos anormales involuntarios (AIM, *Abnormal Involuntary Movements*) establecida por Cenci y Lundblad, (2007). Cada 20 minutos se evaluó durante 60 segundos la conducta de los animales, es decir, se obtuvieron 6 puntajes durante los 120 minutos de duración de la sesión. Las LID tienen componentes orofaciales, de pata y axiales. A cada uno de estos tres segmentos corporales se le asignó un puntaje posible de 0 a 4 para cada tiempo registrado, pudiendo tener un animal un puntaje máximo de 12 puntos en cada minuto de evaluación (0 = no hay discinesias; 1 = discinesias ocasionales que se manifiestan durante <50% del tiempo de observación; 2 = discinesias sostenidas durante >50% del tiempo de observación; 3 = discinesias continuas; 4 = discinesias continuas que no logran ser interrumpidas por estímulos externos).

3.2.3 Análisis de datos electrofisiológicos

3.2.3.1 Registros en modo current clamp

El análisis de los datos fue realizado con ClampFit (Molecular Devices) y rutinas de MATLAB. Se calculó el potencial de membrana en reposo en la línea de base (como el promedio del potencial durante 460ms) antes de la inyección de pulsos de corriente en los protocolos de *current clamp*. La resistencia de entrada (R_{ent}) se calculó como $\Delta V/\Delta I$ en respuesta a la inyección de corriente hiperpolarizante de -10pA durante 300ms. Se midió la amplitud del *sag* como la diferencia entre el mínimo de voltaje generado por un pulso de corriente hiperpolarizante de -40pA y el estado estacionario al que llega el potencial al final del pulso de 1 segundo de duración (Figura m2A-B) (en algunos experimentos, la R_{ent} y el *sag* también se midieron en respuesta a un pulso de corriente de -200pA y 500ms). Se midió la amplitud de la sAHP como la diferencia entre el potencial de membrana antes de iniciar el pulso y el mínimo de voltaje observado luego de finalizar el pulso despolarizante de 140 pA (Figura m2C). Se definió la reobase como el menor pulso de corriente inyectado que generó al

menos un potencial de acción, de una serie de pulsos de corriente de 1 segundo de duración, desde +20 a +290 pA, cada 30pA (Figura m2D). Se midió el umbral del potencial de acción a partir de gráficos de fase del potencial de acción como el punto en el cual la derivada del potencial de membrana dV/dt se desvía de la media al menos por 5 desvíos estándar (Atherton y Bevan, 2005) (Figura m2E). Se midió el ancho del potencial de acción al 50% de la amplitud, que fue medida desde el umbral al pico (Figura m2F). Se midió el umbral, el ancho y la amplitud del potencial de acción únicamente para el primer potencial de acción observado en la reobase. El número de potenciales de acción y el tiempo del último disparo se calcularon durante la respuesta a pulsos de corriente despolarizante de intensidad creciente ($\Delta 30$ pA) desde 20 pA a 290 pA. Para clasificar a las ICE en oscilatorias y de disparo regular, se utilizó entre 10 y 15 minutos de actividad espontánea registrada en configuración *whole cell*. La señal fue filtrada para eliminar los potenciales de acción, para obtener sólo las fluctuaciones subumbrales. Se calculó la variación del potencial de membrana como la diferencia entre los valores máximos y mínimos del potencial en ventanas de 5 segundos (Figura m2G-I). Dado que al inicio del registro las células se encuentran más despolarizadas, se descartó la porción inicial del registro hasta que el potencial de membrana promedio se mantuvo debajo de los -50mV. Se calculó el promedio de la variación del potencial de membrana de los 5 minutos que registraron mayores valores y se utilizó este valor como parámetro para clasificar las neuronas en dos grupos mediante un algoritmo de *k-means*. Las ICE pertenecientes al grupo que registró mayor amplitud de variación del potencial de membrana fueron consideradas oscilatorias, mientras que aquellas con menor variación fueron consideradas regulares. Se compararon los resultados de esta clasificación no supervisada con los de un observador ciego a la clasificación a quien se le pidió que clasifique las mismas neuronas en base a la simple observación de los registros. Se obtuvo un 93% de concordancia entre ambos métodos. Para los experimentos de *dynamic clamp*, las neuronas fueron clasificadas por un observador ciego dado que se contaba con un tiempo de registro muy corto para definir el patrón de actividad antes de aplicar los tratamientos.

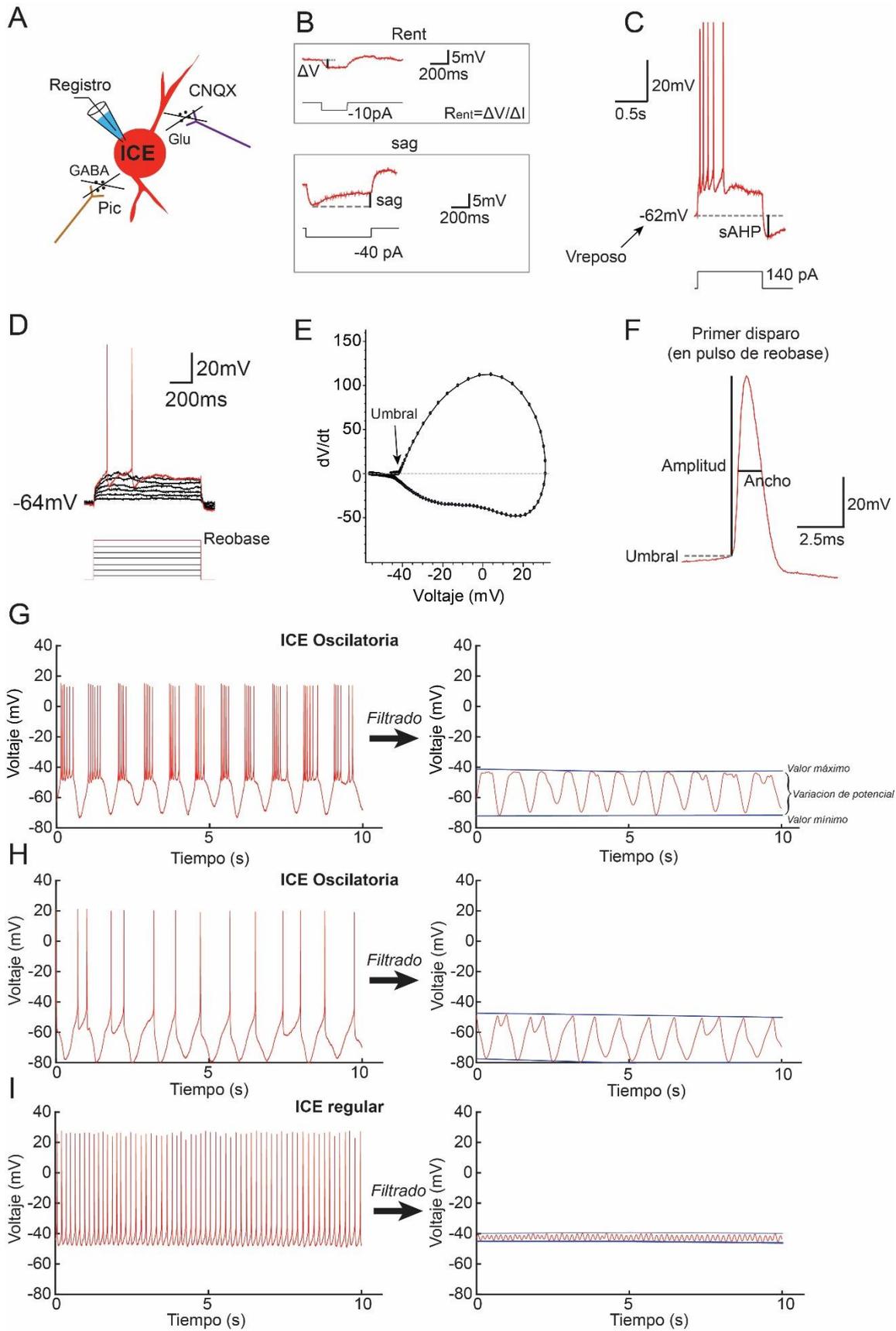


Figura m2. Ilustración de las mediciones de las características electrofisiológicas de las ICE. A: Esquema de registro en configuración *whole-cell*. **B:** Arriba: respuesta de una ICE a un pulso de corriente de -10pA y 300ms.

Se muestra cómo se mide la resistencia de entrada (R_{ent}). Abajo: Respuesta de una ICE a un pulso de -40pA y 1s. Se muestra cómo se mide la amplitud del *sag*. **C:** Respuesta de una ICE a un pulso de 140pA y 1 segundo. Se muestra cómo se mide la amplitud de la sAHP. **D:** Ejemplo de pulsos de corriente subumbrales (negro) y el correspondiente a la reobase (rojo). **E:** Ejemplo de gráfico de fase de un potencial de acción: derivada en el tiempo (dV/dt) en función del potencial de membrana a lo largo del potencial de acción. **F:** Registro de un potencial de acción de una ICE. Se esquematiza la medición de la amplitud y ancho del potencial de acción. **G-I:** Descripción del criterio de clasificación de las ICE en oscilatorias y regulares en función de la amplitud de variación del potencial de membrana luego de filtrar los potenciales de acción. G y H son ejemplos de ICE clasificadas como oscilatorias. I es un ejemplo de ICE clasificada como regular. A la izquierda se muestran los registros originales y a la derecha el mismo registro luego de la aplicación de un filtro para eliminar los disparos.

Para caracterizar la sumación temporal de entradas sinápticas excitatorias evocadas con estimulación eléctrica o con liberación de glutamato enjaulado, se midió la amplitud de los potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSP) y se normalizó a la amplitud del primer EPSP. La AHP post estimulación se calculó como la diferencia entre el potencial de membrana antes de iniciar el tren de pulsos y el mínimo voltaje observado luego de finalizada la estimulación.

3.2.3.2 Registros en configuración *cell attached*

De los registros de actividad espontánea en configuración *cell attached* se calculó la frecuencia de disparo promedio, el coeficiente de variación del intervalo inter disparo (ISI, *Inter Spike Interval*) y los histogramas normalizados de la distribución de los ISI utilizando dos minutos de registro. Los histogramas se normalizaron al ISI máximo de cada célula. Para identificar el espectro de frecuencias características de las ICE oscilatorias, se identificaron las coordenadas temporales de cada disparo (durante 2 minutos) y se agruparon en ventanas de 10ms (*bins*). Esta nueva señal discreta fue convolucionada con un kernel Gaussiano ($\sigma = 200\text{ms}$) para obtener la función de densidad de disparos (SDF, *Spike Density Function*). Se eliminó la variación lineal de la SDF y se obtuvo la transformada rápida de Fourier (FFT, *Fast Fourier Transform*) de la SDF y la correspondiente potencia de cada frecuencia. Esta potencia se calculó como el cuadrado del valor absoluto de la FFT dividido por la longitud de la señal (que en este caso es la misma para todos los registros).

3.2.3.3 Registros en modo *voltage clamp*

Para construir las curvas I-V de I_{Kir} , los registros de corrientes evocadas por el protocolo correspondiente de rampa de voltaje fueron filtrados con un filtro pasabajo, remuestreados para reducir su tamaño y promediados (3 registros). La conductancia Kir se calculó como la pendiente de la curva I-V entre -110 y -120mV (zona de voltaje donde se encuentran abiertos todos los canales y la pendiente se vuelve constante a valores más negativos). La amplitud de la corriente I_h se calculó sustrayendo la corriente instantánea de la corriente registrada en el estado estacionario en respuesta a diferentes intensidades de pulso de voltaje. La curva de activación de I_h , $p(V)$, se estimó normalizando la corriente de cola

registrada 50ms luego de cada pulso de voltaje variable y medida al inicio de un post-pulso a voltaje constante de -100mV utilizando la siguiente ecuación (Kanyshkova et al., 2009):

$$p(V) = (I - I_{-40}) / (I_{-130} - I_{-40})$$

Donde I_{-40} es la corriente de cola evocada por el pulso de -40mV medida a -100mV y I_{-130} es la corriente de cola evocada por el pulso de -130mV. I es la corriente de cola desde los pulsos variables (entre -40mV y -130mV). I_{leak} se estimó como la corriente instantánea evocada por los pulsos de voltaje del mismo protocolo usado para medir I_h . La conductancia de *leak* se calculó como la pendiente de la curva I-V de I_{leak} (esto es entre -40mV y -130mV). Las constantes de tiempo de activación de I_h se aproximaron ajustando una curva biexponencial al registro de corriente evocada por un pulso de voltaje de 3.5s y -130mV desde un potencial de -40mV utilizando la siguiente ecuación:

$$I_h(t) = A_0 + A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$$

Donde I_h es la corriente, t es tiempo, A_0 , A_1 y A_2 son los coeficientes de la exponencial y τ_1 y τ_2 son las constantes de activación rápida y lenta. Las constantes de deactivación de I_h se aproximaron ajustando la misma función biexponencial a los registros de corriente evocada por un pulso de voltaje de 5 segundos a -80mV que siguió a un pulso de 1 segundo a -130mV (desde un potencial de *holding* de -40mV). Se utilizó la misma ecuación, solo que en este caso τ_1 y τ_2 son las constantes de tiempo (rápida y lenta) de deactivación.

3.2.4 Análisis estadísticos

Se evaluó la normalidad y homocedasticidad de los datos, y se utilizaron pruebas no paramétricas cuando estos criterios no se cumplieron. Los análisis utilizados se detallan en los pies de figura correspondientes. Se utilizó un nivel de significancia de $p < 0.05$ y todos los datos se expresaron en media \pm EE (error estándar) a menos que se indique lo contrario. Para las pruebas estadísticas se utilizó GraphPad Prism versión 6 y rutinas de MATLAB. Se utilizaron correcciones Sidak para comparaciones múltiples (o Dunn's para el caso de pruebas no paramétricas).

RESULTADOS

CAPITULO I

4 CAPITULO I

Alteraciones electrofisiológicas de las ICE en un modelo animal de la EP tratado con L-DOPA

En este Capítulo I se caracterizó la electrofisiología de las ICE en un modelo animal de la EP luego de un tratamiento con L-DOPA.

4.1 Modelo animal de la EP

Para estudiar las alteraciones de las ICE inducidas por un tratamiento crónico con L-DOPA se empleó un modelo animal experimental de la EP utilizado con anterioridad en el laboratorio (Escande et al., 2016; Keifman et al., 2019; Tubert et al., 2016). Con el objetivo de facilitar la identificación de las células colinérgicas, se utilizaron ratones transgénicos en los que la proteína fluorescente tdTomato se expresa bajo el control de las secuencias regulatorias del gen ChAT (Cholin-Acetil Transferasa) mediante la cruce de ratones ChAT-Cre, en los que las secuencias regulatorias de ChAT dirigen la expresión de la recombinasa Cre, con ratones reporteros de la presencia de la recombinasa Cre mediante la proteína fluorescente tdTomato (Ver Materiales y Métodos). Los ratones obtenidos se denominan ChAT-Cre;tdT. Ratones ChAT-Cre;tdT fueron lesionados con la toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) para inducir la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, o vehículo (para los ratones con lesión simulada, sham), y tratados crónicamente con L-DOPA o vehículo. La 6-OHDA (o vehículo) se inyectó en el haz medial del cerebro anterior (MFB, por sus siglas en inglés) del hemisferio izquierdo de ratones hembras ChAT-Cre;tdT adultas. Cuatro semanas después de la cirugía, se realizaron tres ensayos conductuales que permitieron evaluar el déficit motor asociado al parkinsonismo (Escande et al., 2016) en los tres grupos experimentales que quedan definidos: sham (con lesión simulada), parkinsonianos o “Park” (con lesión dopaminérgica tratados con vehículo) y discinéticos o “Dysk” (con lesión dopaminérgica tratados con L-DOPA) (Figura r1A). Cabe notar que estos ensayos para evaluar el grado de lesión se realizaron antes de que los animales reciban L-DOPA o vehículo. El primer ensayo consistió en la exploración libre de una arena abierta (*open field*) durante 15 minutos que permitió evaluar la proporción de rotaciones ipsilaterales al hemisferio lesionado en relación al número total de rotaciones. Los ratones lesionados con 6-OHDA (que constituirán los grupos parkinsoniano y discinético, pero que en el momento de esta evaluación conductual fueron equivalentes) presentaron una preferencia de rotación hacia el lado ipsilateral con respecto a los animales sham (Figura r1B-C). El segundo ensayo consistió en una exploración de un cilindro de acrílico transparente, en el que se analizó el uso de las extremidades anteriores durante cinco minutos de exploración vertical de las paredes del cilindro. Los animales lesionados usaron menos la pata contralateral en relación

a los animales sham (Figura r1D-E). Finalmente, el ensayo del rotarod acelerado permitió evaluar la coordinación motora de animal. En este ensayo, el animal debe mantenerse sobre un rodillo que incrementa su velocidad de rotación con aceleración constante y se mide la latencia a la caída. El ensayo se repitió cinco veces con un descanso de cinco minutos entre cada uno. Los animales lesionados lograron mantenerse menos tiempo sobre el rodillo que los animales sham (Figura r1F-G). Para confirmar la lesión dopaminérgica, luego de realizar el experimento de electrofisiología, se evaluó la inmunoreactividad contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH), enzima clave en la síntesis de catecolaminas, en sustancia nigra pars compacta (SNc). Los animales con lesión 6-OHDA presentaron una marcada disminución de neuronas TH+ (Figura r1H).

Luego de las tres pruebas conductuales, los animales lesionados con 6-OHDA fueron aleatoriamente divididos en dos grupos. Un grupo recibió un tratamiento de 12mg/kg de L-DOPA combinada con 12mg/kg de benserazida, un inhibidor de la enzima DOPA-descarboxilasa periférica. El otro grupo recibió sólo vehículo. El tratamiento con L-DOPA o vehículo consistió en una dosis diaria durante 14 días consecutivos. Con estas dosis de L-DOPA, los animales severamente denervados generan discinesias desde el primer día de exposición a la L-DOPA. El efecto agudo pro-discinético dura 2-3 horas desde el momento de la inyección. Para cuantificar el grado de discinesias desarrolladas por lo animales, se evaluaron los movimientos anormales involuntarios (AIM, *Abnormal Involuntary Movements*) durante un minuto y cada 20 minutos hasta cumplidas dos horas desde la inyección de L-DOPA. Este puntaje se realizó de acuerdo a una escala publicada y ampliamente utilizada en la literatura (Cenci y Lundblad, 2007) los días 1, 4, 8 y 12 de tratamiento y se puntuaron movimientos anormales involuntarios axiales, de pata y orofaciales (Ver Materiales y Métodos). Los animales que recibieron L-DOPA obtuvieron puntajes altos de AIM, mientras que los animales que recibieron vehículo no desarrollaron discinesias (Figura r1I).

Si bien con esta dosis alta de L-DOPA los animales lesionados desarrollaron discinesias desde el día 1 de tratamiento, la curva de puntaje de AIM no se comportó igual a lo largo del tratamiento de 14 días. De hecho, los animales alcanzaron puntajes de AIM máximos más altos durante el día 12 de tratamiento en comparación con el día 1 (Figura r1J). Esto es consistente con la observación de que la exposición repetida a la L-DOPA en pacientes y en modelos animales induce sensibilización que se manifiesta como una respuesta exacerbada a la L-DOPA y a agonistas dopaminérgicos (Delfino et al., 2004; Keifman et al., 2019). Además, la respuesta a la L-DOPA fue más rápida (se adelantó en el tiempo) y el efecto de la L-DOPA duró menos en el día 12 de tratamiento en comparación con el día 1 (Figura r1K), lo que recuerda el acortamiento de la respuesta a la L-DOPA en pacientes durante el curso de un tratamiento crónico (más conocido como *wearing off*) (Jankovic, 2005; Quinn et al., 1982).

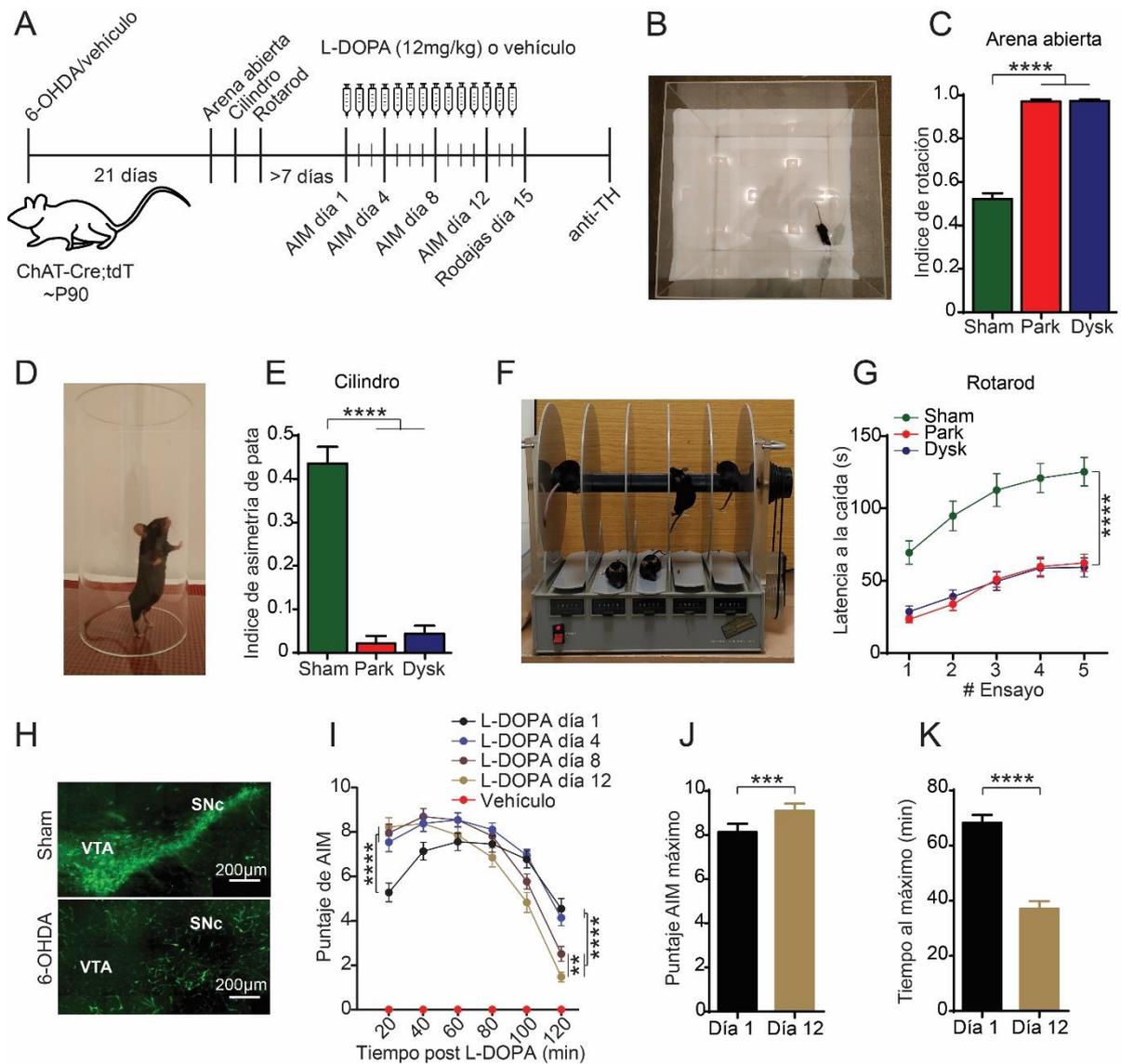


Figura r1. Caracterización conductual del modelo animal de la EP. **A:** Descripción esquemática del diseño experimental. **B:** Foto de un ratón durante el ensayo de exploración de una arena abierta (*open field*). **C:** Número de rotaciones ipsilaterales sobre el número de rotaciones totales durante la exploración de una arena abierta para animales sham, parkinsonianos (Park) y discinéticos (Dysk). ANOVA de una vía significativo, comparaciones post-hoc: **** $p < 0.0001$. **D:** Foto de un ratón en la prueba del cilindro. **E:** Índice de asimetría de pata: proporción del uso de la pata contralateral a la lesión. ANOVA de una vía significativo, comparaciones post-hoc: **** $p < 0.0001$. **F:** Foto de ratones realizando el test del rotarod. **G:** Latencia a la caída de un rotarod acelerante. ANOVA de dos vías, efecto de tratamiento: **** $p < 0.0001$. **H:** Inmunorreactividad contra tirosina hidroxilasa en cortes de área tegmental ventral (VTA) y sustancia nigra compacta (SNc) de ratones sham y lesionados con 6-OHDA. **I:** Puntaje de movimientos anormales involuntarios (AIM) en ratones lesionados con 6-OHDA tratados con vehículo o con L-DOPA. ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparaciones post-hoc (20min y 120min): ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. El grupo vehículo fue excluido del ANOVA. **J:** Comparación del puntaje de movimientos anormales involuntarios máximo alcanzado durante el día 1 y el día 12 de tratamiento. Prueba de T pareada. *** $p < 0.001$. **K:** Comparación del tiempo post inyección de L-DOPA en el que se registró el máximo puntaje de AIM entre el día 1 y 12 de tratamiento. Prueba de T pareada. **** $p < 0.0001$. $N > 29$ ratones por grupo. Se muestra la media \pm EE. NOTA: en B-G los ensayos fueron realizados antes del tratamiento con L-DOPA (Dysk) o vehículo (Park), por lo que los grupos Park y Dysk son animales lesionados con 6-OHDA que aún no fueron tratados.

4.2 Las ICE de ratones discinéticos están hiperexcitables y oscilatorias

Los animales recibieron L-DOPA o vehículo hasta el día 14 (inclusive). El día 15 no recibieron L-DOPA o vehículo y se realizó el experimento de electrofisiología. Es importante señalar que los experimentos se realizaron 24 horas después de la última dosis, es decir fuera del efecto agudo de la L-DOPA y cuando ésta ya no se detecta en plasma ni en líquido cefalorraquídeo (Zhang et al., 2003).

Se registraron ICE de la región dorsolateral del estriado, que corresponde a la región motora. A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos se realizaron en presencia de bloqueantes de la transmisión GABAérgica (picrotoxina) y glutamatérgica (CNQX ó NBQX) en el ACSF (solución de registro) para minimizar la influencia de efectos sinápticos y estudiar la actividad intrínseca de las ICE (Figura r2A).

Como se describió previamente (ver Introducción), las ICE presentan propiedades electrofisiológicas distintivas en registros en rodajas incluso en presencia de bloqueantes de la transmisión sináptica (Bennett y Wilson, 1999; Paz et al., 2018; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016): actividad tónica espontánea, un *sag* en respuesta a inyecciones de corriente hiperpolarizante, una despolarización “rebote” al final de un pulso de corriente hiperpolarizante, una sAHP (*slow after hyperpolarization*) al final de un pulso de corriente despolarizante y adaptación de frecuencia y en ocasiones un cese en el disparo de potenciales de acción, conocido como “acomodación”, en respuesta a inyecciones de corriente despolarizante supraumbrales (Figura r2B).

Trabajos previos reportaron que las ICE de ratas y ratones lesionados con 6-OHDA se encuentran hiperexcitables: disparan más potenciales de acción en respuesta a pulsos de corriente despolarizante en comparación con las ICE de ratones sham. Para evaluar el efecto de un tratamiento crónico con L-DOPA que generó discinesias sobre la excitabilidad de las ICE, se registró en *whole-cell current clamp* la respuesta de las ICE de los tres grupos experimentales a pulsos de corriente despolarizante de 1 segundo y de intensidad creciente. Consistente con trabajos previos (Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016), las ICE de ratones parkinsonianos se encontraron hiperexcitables, evidenciado como un aumento del número de potenciales de acción y del tiempo de ocurrencia del último potencial de acción en respuesta a las inyecciones de corriente en comparación con ICE de ratones sham. Además, se encontró que las ICE de ratones discinéticos tienen marcadamente exacerbada esta excitabilidad y presentan una disminución de la corriente de reobase (Figura r2C-F).

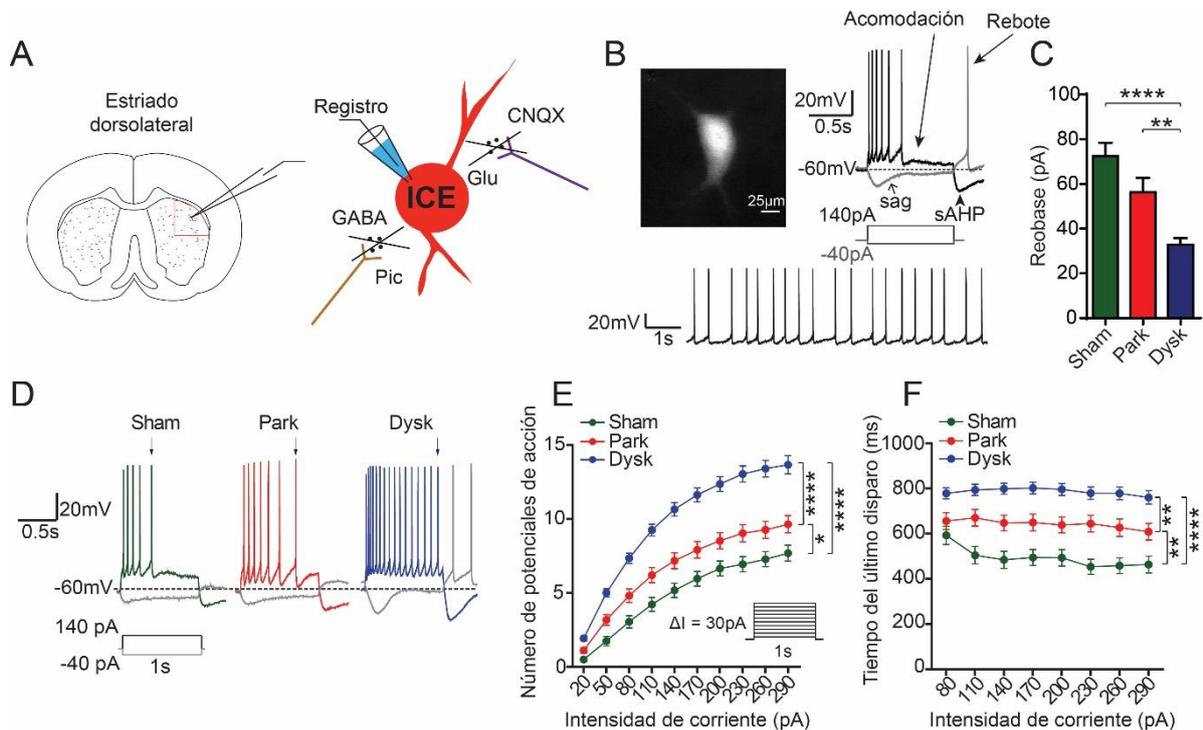


Figura r2. Las ICE de ratones discinéticos están hiperexcitables. **A:** Ilustración del experimento de electrofisiología. **B:** Imagen de una ICE con microscopía de fluorescencia y ejemplos de registros de actividad tónica y de respuesta a pulsos de corriente. **C:** Comparación de la corriente de reobase en ICE de ratones sham, parkinsonianos (Park) y discinéticos (Dysk). ANOVA de una vía significativo, comparaciones post-hoc: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. **D:** Registros representativos de respuesta a inyecciones de corriente de ICE de ratones sham, parkinsonianos (Park) y discinéticos (Dysk). Se indica con flechas el tiempo del último disparo. **E-F:** Comparación del número de potenciales de acción (**E**) y del tiempo del último disparo (**F**) en respuesta a pulsos de corriente despolarizante de diferente intensidad. **E:** ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparaciones post-hoc (pulso 290pA): * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. **F:** ANOVA de dos vías, efecto de grupo significativo, comparaciones post-hoc (pulso 290pA): ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. $N > 56$ células de > 17 animales por grupo. Se muestra la media \pm EE.

Tal como reportaron Tubert et al., 2016, la degeneración dopaminérgica no indujo cambios en otras propiedades electrofisiológicas de las ICE, como el umbral de disparo, la amplitud y ancho del potencial de acción, la resistencia de entrada (R_{ent}) o la amplitud del *sag* y de la *sAHP*, con pequeños cambios en el potencial de reposo (Figura r3A-D). Sin embargo, luego del tratamiento con L-DOPA las ICE exhibieron un marcado aumento de la R_{ent} (Figura r3E-F) acompañado por un aumento de las amplitudes del *sag* y de la *sAHP* (Figura r3G-J). Notablemente, las amplitudes del *sag* y de la *sAHP* correlacionaron fuertemente con la amplitud de la R_{ent} (Figura r3K) sugiriendo que el aumento de R_{ent} , *sag* y *sAHP* en animales discinéticos probablemente responda a un mecanismo común. Para estudiar si estos cambios son dependientes del voltaje en el que se miden, se repitieron las mediciones de R_{ent} y de amplitud del *sag* utilizando un pulso de corriente hiperpolarizante de mayor intensidad (-200pA) que lleva al potencial de membrana a valores mucho más hiperpolarizados que los pulsos de -10pA y -40pA estándar utilizados para medir R_{ent} y *sag* respectivamente. Se observó que tanto la R_{ent} como la amplitud del *sag* no difieren entre

grupos experimentales si se miden utilizando el pulso de -200pA (Figura r3L-O). Esto indica que los aumentos de R_{ent} , *sag* y probablemente también de la sAHP en animales discinéticos responden a fenómenos que muestran dependencia del voltaje.

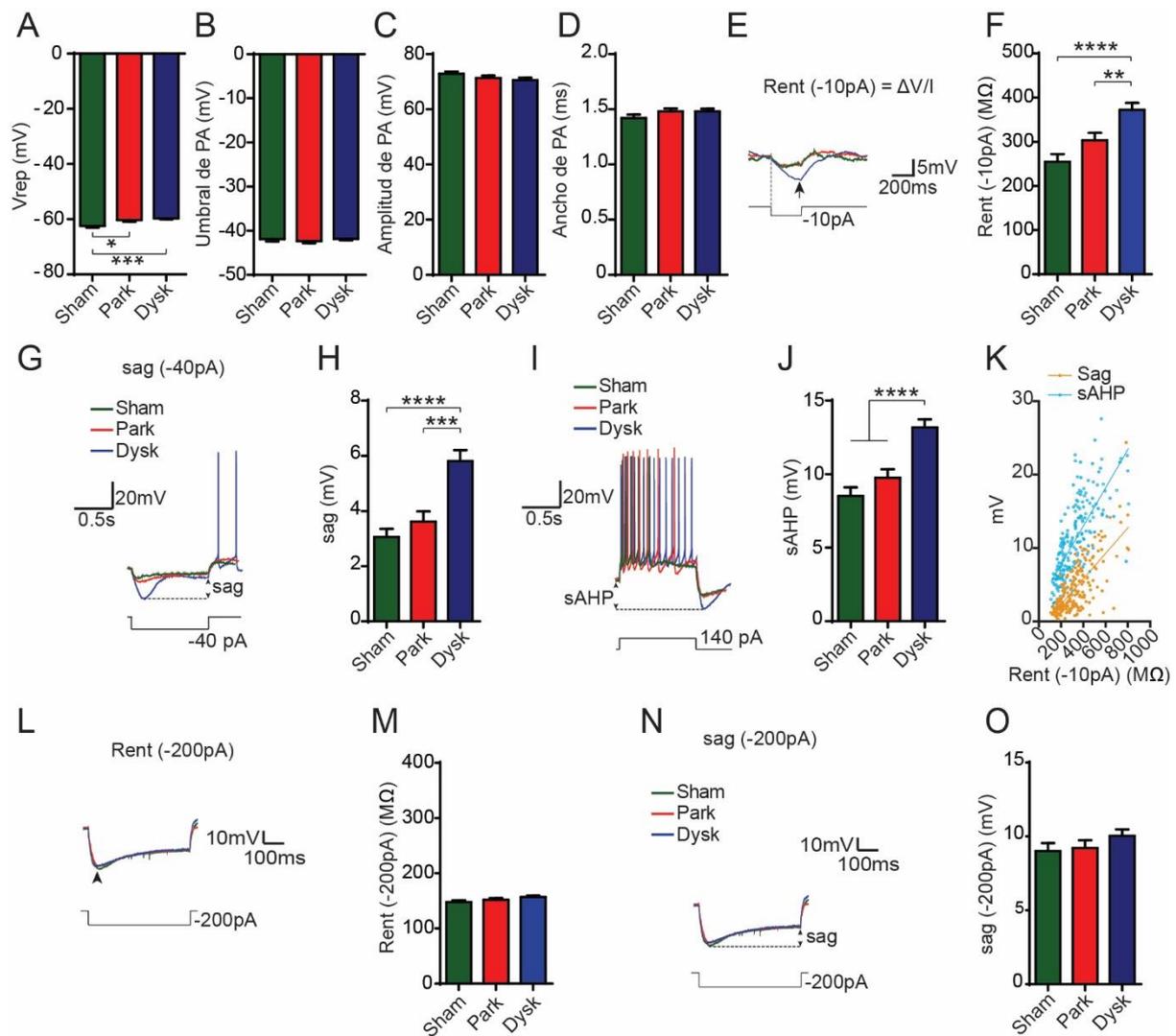


Figura r3. Comparación de propiedades electrofisiológicas de las ICE de animales sham, parkinsonianos (Park) y discinéticos (Dysk). A: Comparación del potencial de reposo. B: Comparación del umbral de disparo. C: Comparación de la amplitud del potencial de acción (PA). D: Comparación del ancho del potencial de acción. E: Ejemplo de la medición de la resistencia de entrada (R_{ent}) con un pulso de -10pA. F: Comparación de la resistencia de entrada. G: Ejemplo de la medición del *sag* en respuesta a un pulso de -40pA. H: Comparación de la amplitud del *sag*. I: Ejemplos de medición de la sAHP. J: Comparación de la amplitud de la sAHP. K: Relación entre *sag* o sAHP y resistencia de entrada. Correlación de Pearson: $R^2_{sag}=0.55$, $R^2_{sAHP}=0.53$, $p < 0.0001$. L: Ejemplo de la medición de la resistencia de entrada con un pulso de -200pA. M: Comparación de la resistencia de entrada medida con un pulso de -200pA. N: Ejemplo de medición del *sag* en respuesta a un pulso de -200pA. O: Comparación de la amplitud del *sag* en respuesta a un pulso de -200pA. A, F, H, J: ANOVA de una vía, comparaciones post-hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. B, C, D, M, O: ANOVA de una vía, NS. N>56 células de >17 animales por grupo. Se muestra la media \pm EE.

Además de la excitabilidad y las características electrofisiológicas, se estudiaron también los patrones de actividad espontánea de las ICE en los tres grupos experimentales. Como se

describió (ver Introducción), las ICE presentan diferentes patrones de disparo: pueden presentar un patrón de disparo rítmico regular (con disparos de potenciales de acción a intervalos regulares), un patrón en salvas de potenciales de acción acompañadas de pausas, o un patrón con disparos a intervalos irregulares acompañados de prominentes oscilaciones subumbrales. Tanto en el patrón en salva-pausa como en el irregular, las ICE presentan prominentes hiperpolarizaciones regenerativas que dan lugar a amplias oscilaciones del potencial de membrana capaces de alcanzar 20 mV de amplitud (Wilson, 2005; Wilson y Goldberg, 2006). Sólo una pequeña proporción de ICE muestran este tipo de actividad oscilatoria, que persiste en presencia de bloqueantes de la transmisión dopaminérgica, colinérgica, glutamatérgica y GABAérgica, sugiriendo que existen mecanismos intrínsecos que la generan (Bennett y Wilson, 1999). Estudios *ex vivo* demostraron que la degeneración dopaminérgica no afecta la regularidad, patrón o frecuencia de disparo de las ICE (Ding et al., 2006; Maurice et al., 2015; Sanchez et al., 2011), aunque resta aclarar si la actividad espontánea de las ICE se ve modificada luego de un tratamiento crónico con L-DOPA. Para responder a ello, se registró la actividad espontánea de las ICE en configuración *whole-cell*. Para identificar de manera no sesgada las ICE con actividad oscilatoria, se utilizó un algoritmo de clasificación no supervisada que utiliza como parámetro de entrada la amplitud de la fluctuación subumbral del potencial de membrana (ver Materiales y Métodos). Las neuronas fueron clasificadas en dos grupos: oscilatorias (con mayor amplitud de fluctuación del potencial de membrana) y de disparo regular (con menor amplitud de fluctuación). Se observó que los animales discinéticos presentan una mayor proporción de ICE oscilatorias en comparación con animales sham y parkinsonianos (Figura r4A-B).

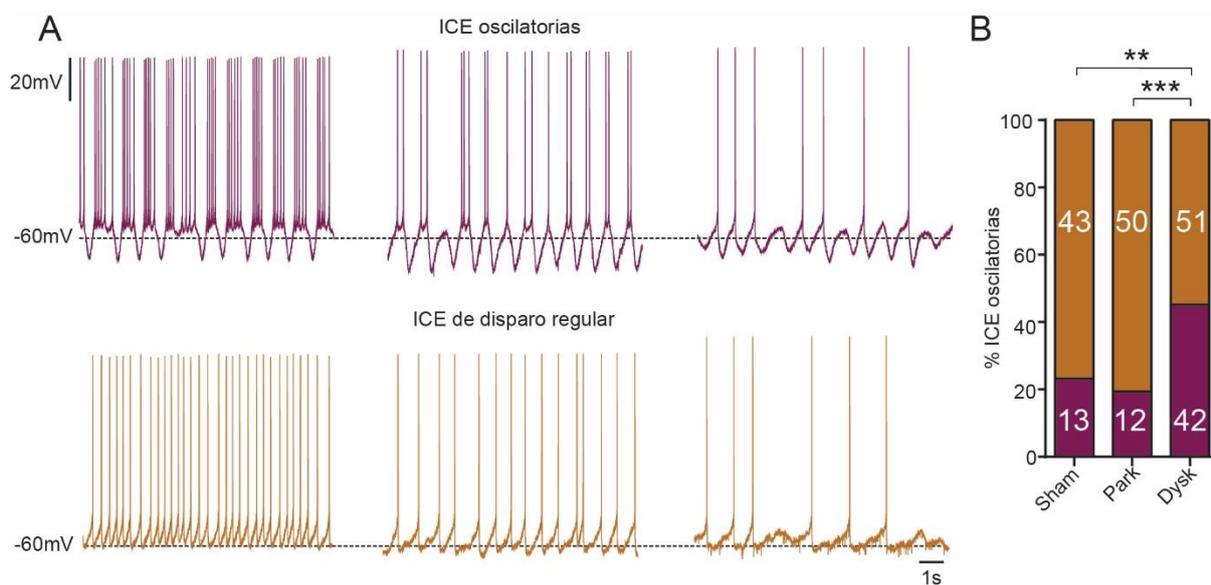


Figura r4. Los animales discinéticos presentan una mayor proporción de ICE oscilatorias. **A:** Tres ejemplos representativos de registros de actividad espontánea de ICE con actividad oscilatoria y tres de ICE con disparo regular, para diferentes frecuencias de disparo promedio. **B:** Proporción de ICE con actividad oscilatoria en cada grupo experimental. Prueba exacta de Fisher: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. El número de células por grupo se muestra en blanco sobre las barras. >17 animales por grupo.

4.3 Las ICE oscilatorias amplifican respuestas a estímulos hiperpolarizantes

Cabe destacar que la R_{ent} y la amplitud del *sag* y de la sAHP comparten la particularidad de ser parámetros que describen hiperpolarizaciones del potencial de membrana (ver Figura r3E, G, I). Dado que las ICE oscilatorias presentan como característica distintiva amplias hiperpolarizaciones regenerativas, evaluamos la posibilidad de que los incrementos en la R_{ent} y en la amplitud del *sag* y de la sAHP compartan el mismo mecanismo que subyace a la actividad oscilatoria. Para ello se compararon los parámetros electrofisiológicos de las ICE oscilatorias y regulares en los tres grupos experimentales (Figura r5). Se encontró que las ICE oscilatorias presentan mayor R_{ent} y amplitud del *sag* y de la sAHP que las ICE de disparo regular (Figura r5A-C), consistente con la hipótesis de que el aumento en estos tres parámetros responde a una amplificación de respuestas hiperpolarizantes. Curiosamente, las ICE oscilatorias exhibieron además una corriente de reobase más chica que las ICE regulares (Figura r5D), mientras que el resto de los parámetros estudiados no difirieron entre ambos grupos (Figura r5E-J).

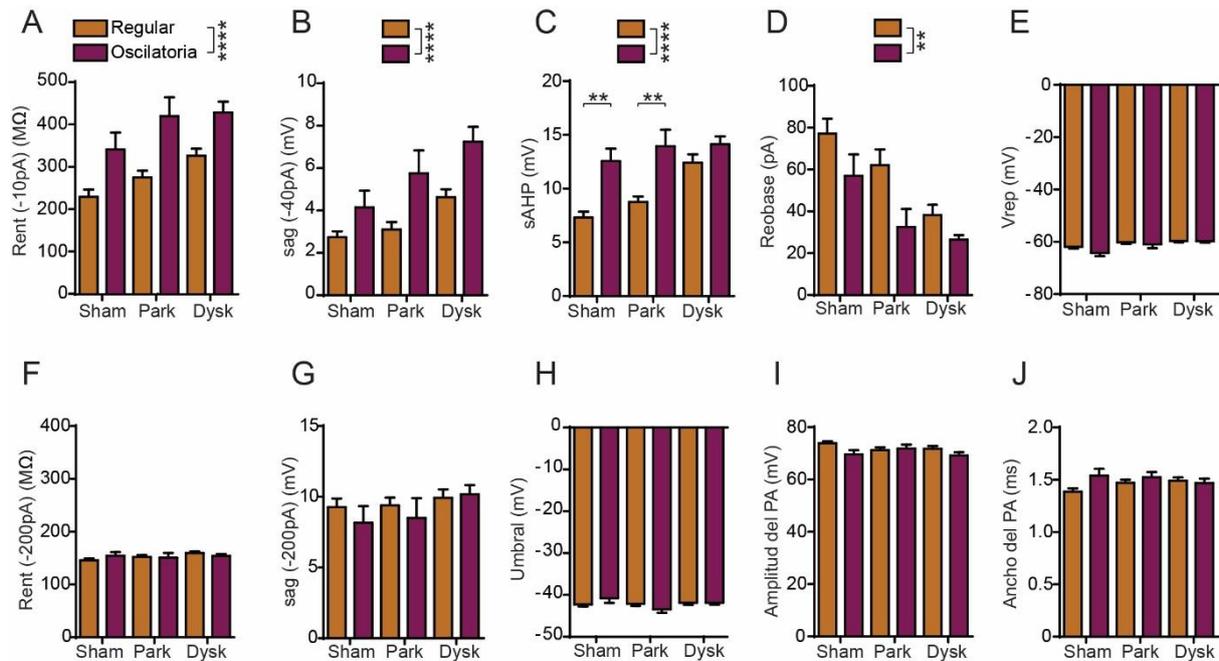


Figura r5. Las ICE oscilatorias amplifican hiperpolarizaciones. A-D: Comparación de resistencia de entrada medida con un pulso de -10pA (A), *sag* medido con un pulso de -40pA (B), sAHP (C) y corriente de reobase (D) entre ICE oscilatorias y de disparo regular de animales sham, parkinsonianos (Park) y discinéticos (Dysk). ANOVA de dos vías, efecto de tipo celular (oscilatoria vs regular): ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. C: Interacción significativa, comparaciones post-hoc: ** $p < 0.01$. E-J: Comparación de potencial de reposo (E), resistencia de entrada medida con un pulso de -200pA (F), *sag* medido con un pulso de -200pA (G), umbral de disparo (H), amplitud del potencial de acción (PA) (I) y ancho del potencial de acción (J). ANOVA de dos vías, NS. $N > 56$ células de > 17 animales por grupo. Se muestra la media \pm EE.

Por otro lado, las ICE con actividad oscilatoria mayormente no se distinguieron de las de disparo regular por su respuesta a pulsos de corriente supraumbrales, dado que sólo se

encontró una excitabilidad levemente mayor en ICE de disparo regular que en ICE oscilatorias en la respuesta a pulsos de corriente en animales discinéticos (Figura r6A-C).

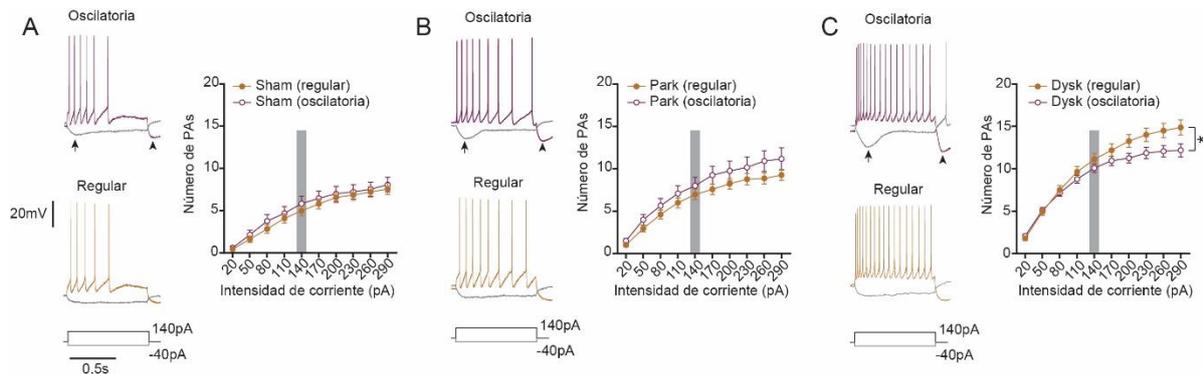


Figura r6. La exacerbada respuesta a pulsos de corriente supraumbrales no se relaciona con la actividad oscilatoria. A-C: Ejemplos de respuesta de ICE oscilatoria (arriba) y de disparo regular (abajo) a un pulso de corriente de -40pA (gris) y otro de +140pA (color) y comparación del número de potenciales de acción (PAs) en función de la intensidad del pulso de corriente entre ICE oscilatorias y regulares de animales sham (A), parkinsonianos (B) y discinéticos (C). La flecha y cabeza de flecha indican el aumento del *sag* y de la sAHP respectivamente en las ICE oscilatorias. A, B: ANOVA de dos vías, NS. C: ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparación post-hoc (pulso 290pA): * $p < 0.05$. $N > 56$ células de > 17 animales por grupo. Se muestra la media \pm EE.

Los resultados presentados hasta el momento demuestran que luego del tratamiento crónico con L-DOPA, las ICE exacerbaban su hiperexcitabilidad y muchas de ellas se vuelven oscilatorias. Estas oscilaciones parecen estar relacionadas con un mecanismo de amplificación de hiperpolarizaciones inducidas o espontáneas (R_{ent} , *sag* y sAHP) y son independientes de la exacerbada respuesta a pulsos de corriente despolarizante.

4.4 Las ICE de ratones discinéticos conservan su patrón salva-pausa en registros *cell attached*

Estudios previos reportaron que el proceso de diálisis del contenido intracelular durante los registros en configuración *whole-cell* podría permitir la aparición de fenómenos de escasa relevancia fisiológica (Lahiri y Bevan, 2020). Para descartar esta posibilidad, se realizaron registros en configuración *cell-attached* de la actividad tónica espontánea de ICE de ratones sham y discinéticos, en presencia de bloqueantes de la transmisión glutamatérgica y GABAérgica (Figura r7A). Estos registros permitieron estudiar la actividad tónica sin modificar el contenido intracelular. De manera consistente con lo observado en los registros en *whole-cell*, los ratones discinéticos presentaron una mayor proporción de ICE con disparo en salvas en comparación con el grupo sham (3 de 19 células en el grupo sham y 12 de 19 células en el grupo discinético; $p = 0.07$, test exacto de Fisher) (Figura r7B-D) así como un aumento en la irregularidad de los disparos, evidenciado por un mayor coeficiente de variación del intervalo entre espigas (Figura r7E). Trabajos previos encontraron que las ICE con mayor frecuencia de disparo muestran una mayor regularidad de disparo (Bennett et al., 2000; Bennett y Wilson, 1999). Consistentemente, se encontró una correlación

negativa entre el coeficiente de variación del intervalo entre disparos y la frecuencia media de disparo de las ICE de ratones sham (Figura r7F). Cabe preguntarse entonces si la menor regularidad de disparo de las ICE de animales discinéticos se relaciona con una disminución en la frecuencia de disparo. Sin embargo, y contrario a esta hipótesis, las ICE de ratones discinéticos presentaron una frecuencia media de disparo más alta en comparación con el grupo sham (Figura r7G). Asimismo, las ICE de animales discinéticos perdieron la correlación entre el coeficiente de variación del intervalo entre disparos y la frecuencia media de disparo (Figura r7H).

Finalmente, para identificar los componentes frecuenciales en los que se producen estas oscilaciones, se convirtieron los registros en *cell attached* en funciones de densidad de disparos (SDF, *Spike Density Function*) mediante la convolución de los disparos con un kernel gaussiano (Figura r7I). La función resultante (SDF) funciona como un indicador de la densidad de disparos en el tiempo, y permite realizar un análisis frecuencial a partir del estudio de la densidad espectral de la transformada rápida de Fourier (FFT) dado que se trata de una señal continua. Mediante este análisis se identificó una clara emergencia de oscilaciones lentas en las ICE de animales discinéticos (Figura r7I).

En conjunto, estos resultados demuestran que las ICE de animales discinéticos muestran mayor actividad oscilatoria en torno a los 0.6Hz y un aumento de la irregularidad en su actividad espontánea en comparación con ICE de animales sham, que está asociado a un aumento en la actividad en salvas y disociado de la frecuencia media de disparo. Además, estos datos refuerzan los resultados de los experimentos en configuración *whole cell*, descartando que la diálisis del contenido intracelular conduzca a fenómenos poco fisiológicos.

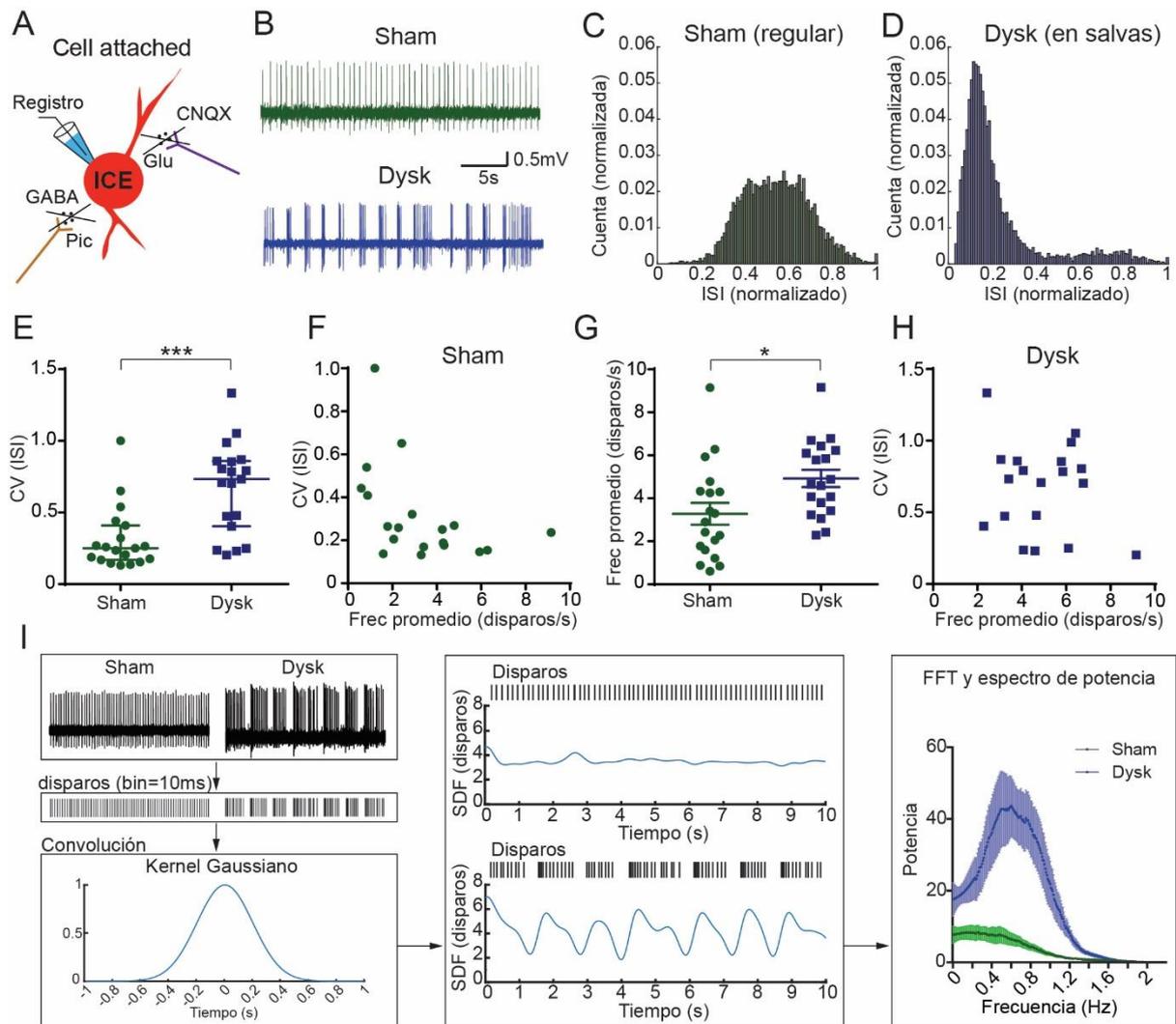


Figura r7. Las ICE de animales discinéticos disparan en salvas de manera periódica. **A:** Esquema del experimento en configuración *cell attached*. **B:** Registros representativos en configuración *cell attached* en ICE de animales sham (arriba) y discinéticos (Dysk, abajo). **C-D:** Histogramas normalizados del intervalo inter disparos (ISI, *Inter Spike Interval*) normalizado para ICE de ratones sham con disparo regular (C) y para ICE de ratones discinéticos con disparo en salvas (D). **E:** Comparación del coeficiente de variación (CV) del intervalo inter disparos entre ICE de animales sham y discinéticos. Prueba de Mann-Whitney: *** $p < 0.001$ (se muestra mediana \pm RIC). **F:** Coeficiente de variación del ISI en función de la frecuencia de disparo promedio para ICE de ratones sham. Correlación de Pearson: $R^2=0.22$, $p < 0.05$. **G:** Comparación de la frecuencia de disparo promedio entre ICE de ratones sham y discinéticos. Prueba de T: * $p < 0.05$ (se muestra media \pm EE). **H:** Coeficiente de variación del ISI en función de la frecuencia de disparo promedio para ICE de ratones discinéticos. Correlación de Pearson: $R^2=0.03$, $p=0.4678$. **I:** Descripción del análisis para obtener la potencia de cada componente frecuencial de la transformada rápida de Fourier (FFT) de las funciones de densidad de disparos (SDF, *Spike Density Function*). A la izquierda y al medio se muestran ejemplos representativos de ICE de animales sham y discinético, y a la derecha se muestran los espectros de potencia poblacionales. N=19 células por grupo.

4.5 La estimulación de receptores D1/D5 en ratones control reproduce los efectos del tratamiento con L-DOPA

Los resultados expuestos hasta aquí revelan que la exposición crónica a la L-DOPA induce alteraciones en las ICE que dan lugar a una exacerbada hiperexcitabilidad y a un aumento de

la actividad espontánea oscilatoria. En esta sección se intentarán identificar los mecanismos por los cuales L-DOPA podría inducir estos efectos en las ICE.

Existe evidencia sólida que demuestra que la estimulación de los receptores D1/D5 para dopamina en el estriado es necesaria y juega un papel clave en el desarrollo de discinesias inducidas por L-DOPA (Darmopil et al., 2009; Halje et al., 2012; Murer y Moratalla, 2011). Las ICE expresan receptores para dopamina de D2 y D5. Mientras que la estimulación de receptores D2 inhibe la actividad tónica de las ICE (Maurice et al., 2004), la estimulación de receptores D5 aumenta su excitabilidad (Aosaki et al., 1998). No obstante, resta determinar si la estimulación de receptores para dopamina tiene efecto sobre el patrón de disparo de las ICE. Para ello, se evaluaron los efectos de incluir en el baño de registro agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la actividad espontánea y respuesta de las ICE a pulsos de corriente (Figura r8A). En animales control (sin lesión simulada), el agonista selectivo para receptores de tipo D1/D5, SKF81297, incrementó marcadamente y de manera dependiente de la concentración la excitabilidad de las ICE (Figura r8B-C). La pre-inclusión del antagonista D1/D5, SCH23390, previno estos efectos, confirmando la especificidad del agonista D1/D5 (Figura r8D-E). Asimismo, SKF81297 (2 μ M) también incrementó la R_{ent} y la amplitud del *sag* y de la *sAHP* e indujo oscilaciones del potencial de membrana en 6 de las 11 células registradas (Figura r8F-G y Tabla 1). Nuevamente la pre-aplicación de SCH23390 previno estos efectos (Figura r8F-G y Tabla 2).

En resumen, estos datos muestran que la exposición aguda de las ICE a agonistas D1/D5 induce hiperexcitabilidad y actividad oscilatoria, es decir un fenotipo semejante al observado en ratones discinéticos 24 horas después de la finalización de un tratamiento con L-DOPA de 14 días de duración, sugiriendo que este fenotipo es resultado de la estimulación de receptores D1/D5 durante el tratamiento con L-DOPA.

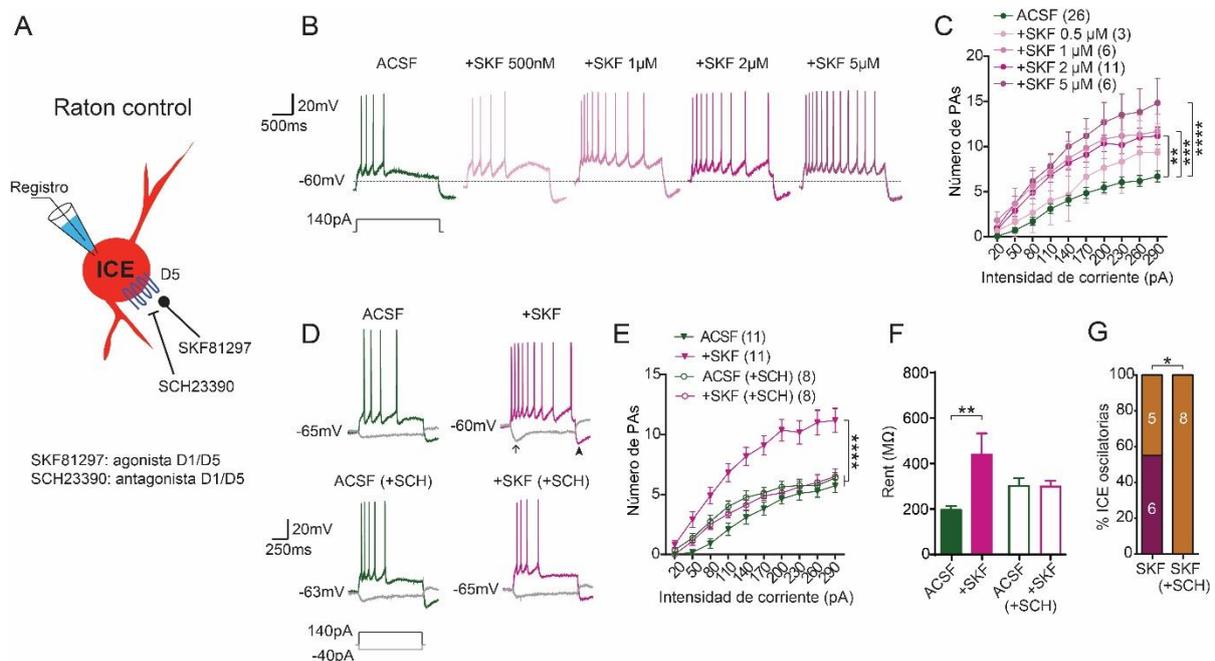


Figura r8. La estimulación D1/D5 induce hiperexcitabilidad y oscilaciones en ICE de ratones control. A: Esquema del experimento en el que se agregaron agonistas y antagonistas de receptores D1/D5 en el ACSF. **B:** Registros representativos de ICE en respuesta a pulsos de corriente despolarizante de 140pA en condiciones control (ACSF) y luego del agregado de diferentes concentraciones de SKF81297. **C:** Número de potenciales de acción (PAs) en función de la intensidad del pulso de corriente despolarizante antes y después del agregado de diferentes concentraciones de SKF81297 en ICE de animales control. ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparaciones post-hoc (pulso 290pA): **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. El número de células se indica entre paréntesis. **D:** Registros representativos de ICE de ratones control en respuesta a inyecciones de corriente antes y después del agregado de SKF81297 (2µM) sin SCH23390 (arriba) o en presencia de SCH23390 (abajo). La flecha y cabeza de flecha indican el aumento del *sag* y de la *sAHP* respectivamente luego del agregado de SKF81297. **E:** Número de potenciales de acción en función del tiempo del último disparo en respuesta a un pulso de corriente despolarizante de 140pA luego del agregado de SKF81297 (2µM) en presencia o en ausencia de SCH23390. ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparaciones post-hoc (pulso 290pA): ****p<0.0001. El número de células por grupo se indica entre paréntesis. **F:** Comparación de la resistencia de entrada antes y después del agregado de SKF81297 (2µM) en presencia o ausencia de SCH23390 (10µM). ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparaciones post-hoc: **p<0.01. **G:** Proporción de ICE que oscilan luego del agregado de SKF81297 (2µM) en presencia o ausencia de SCH23390 (10µM). El número de células en cada grupo se indica en blanco sobre las barras. Prueba exacta de Fisher: *p<0.05. >3 animales por grupo. Se muestra la media ± EE.

Tabla 1: Propiedades electrofisiológicas de las ICE antes y después de aplicar SKF81297 2µM

<i>Propiedad</i>	<i>ACSF</i>	<i>+SKF</i>	<i>p valor</i>
<i>Potencial de reposo (mV)</i>	-64.5±1.4	-60.3±1.4	0.0098
<i>Resistencia de entrada (MΩ)</i>	196.4±16.7	440.6±93.3	0.0010
<i>Sag (mV)</i>	2.4±0.5	5.5±1.0	0.0039
<i>sAHP (mV)</i>	6.1±1.0	10.5±1.4	0.0024
<i>Latencia sAHP (ms)</i>	126.7±22.4	128.5±23.7	0.4131
<i>Reobase (pA)</i>	104.5±10.6	44.6±7.9	0.0004
<i>Umbral (mV)</i>	-43.5±1.5	-41.9±1.6	0.0585
<i>Amplitud del 1^{er} disparo (mV)</i>	73.9±1.5	67.4±1.9	0.0049
<i>Ancho del 1^{er} disparo (ms)</i>	1.4±0.05	1.5±0.07	0.0251

Los p-valores corresponden a la prueba de T pareada. En **negrita** se indica que se alcanzó significancia estadística.

Tabla 2: Propiedades electrofisiológicas de las ICE antes y después de aplicar SKF81297 2µM en presencia de SCH23390 10µM

<i>Propiedad</i>	<i>ACSF (+SCH)</i>	<i>+SKF (+SCH)</i>	<i>p valor</i>
<i>Potencial de reposo (mV)</i>	-63.8±1.2	-65.8±1.0	0.0844
<i>Resistencia de entrada (MΩ)</i>	302.4±33.1	294.1±27.8	0.7738
<i>Sag (mV)</i>	6.4±0.9	4.6±0.6	0.0555
<i>sAHP (mV)</i>	13.3±1.2	11.2±1.2	0.1161
<i>Latencia sAHP (ms)</i>	84.3±7.5	106.1±18.9	0.5604
<i>Reobase (pA)</i>	46.3±8.9	57.5±4.9	0.1970

<i>Umbral (mV)</i>	-43.2±0.5	-42.8±0.7	0.3262
<i>Amplitud del 1^{er} disparo (mV)</i>	74.2±2.4	68.3±2.8	0.0078
<i>Ancho del 1^{er} disparo (ms)</i>	1.4±0.04	1.5±0.05	0.0038

Los p-valores corresponden a la prueba de T pareada. En **negrita** se indica que se alcanzó significancia estadística.

4.6 Antagonizar los receptores D1/D5 en animales discinéticos no revierte los efectos de la L-DOPA

El efecto agudo pro-discinético de la L-DOPA dura entre 2 y 3 horas (ver Figura r1). De hecho, los niveles de L-DOPA en plasma y en líquido cefalorraquídeo se vuelven indetectables luego de 6 horas post-inyección (Zhang et al., 2003). Dado que los registros mostrados hasta aquí fueron realizados 24 horas después de la última dosis de L-DOPA, es poco probable que los efectos observados del tratamiento con L-DOPA sobre las ICE se deban a la estimulación de receptores para dopamina durante el transcurso del experimento por la presencia de dopamina remanente en la rodaja. No obstante, para descartar esta posibilidad, se registraron ICE de ratones discinéticos bajo los efectos del antagonista D1/D5, SCH23390. Se incubaron rodajas de estriado de ratones discinéticos durante 20 minutos con ACSF o ACSF+SCH23390 (10µM) y en estas condiciones se registró la actividad espontánea de las ICE y su respuesta a pulsos de corriente. Se encontró que la aplicación aguda de SCH23390 no revierte la exacerbada hiperexcitabilidad y actividad oscilatoria ya establecida como consecuencia del tratamiento crónico con L-DOPA (Figura r9A-E y Tabla 3).

Estos datos sugieren que el fenotipo de hiperexcitabilidad y oscilaciones inducido por el tratamiento crónico con L-DOPA no es causado por la activación de receptores para dopamina durante el experimento, sino que probablemente sea el resultado de cambios plásticos inducidos por la estimulación crónica de receptores D1/D5 a lo largo del tratamiento con L-DOPA.

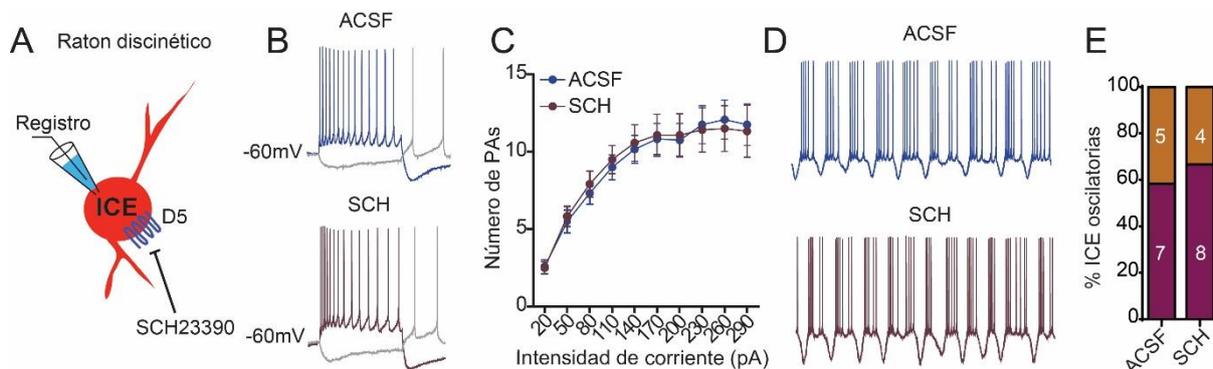


Figura r9. EL bloqueo D1/D5 no revierte la hiperexcitabilidad y oscilaciones en ICE de ratones discinéticos. A: Esquema del experimento. **B:** Ejemplos representativos de la respuesta de ICE de ratones discinéticos en presencia de ACSF (arriba) o luego de la aplicación de SCH23390 (SCH, abajo). **C:** Número de potenciales de acción (PAs) en función de la intensidad del pulso de corriente en ICE de ratones discinéticos en condiciones

control (ACSF) o con SCH23390 (SCH). ANOVA de dos vías, NS. **D:** Ejemplos representativos de registros de actividad espontánea de ICE de ratones discinéticos en condiciones control (ACSF) o en presencia de SCH23390 (SCH). **E:** Comparación del número de ICE osciladoras en cada condición. Prueba exacta de Fisher, NS. El número de células por grupo se muestra en blanco sobre las barras. N=12 células de >3 animales por grupo. Se muestra la media \pm EE.

Tabla 3: Propiedades electrofisiológicas de ICE de ratones discinéticos en presencia o ausencia de SCH23390 10 μ M

<i>Propiedad</i>	<i>ACSF</i>	<i>SCH</i>	<i>p valor</i>
<i>Potencial de reposo (mV)</i>	-58.9 \pm 0.8	-59.2 \pm 1.3	0.8405
<i>Resistencia de entrada (MΩ)</i>	438.7 \pm 58.8	520.0 \pm 53.7	0.2387
<i>Sag (mV)</i>	8.8 \pm 1.1	10.2 \pm 0.6	0.2894
<i>sAHP (mV)</i>	16.8 \pm 1.6	17.5 \pm 1.6	0.8757
<i>Latencia sAHP (ms)</i>	101.4 \pm 10.0	103.3 \pm 11.2	0.9616
<i>Reobase (pA)</i>	27.5 \pm 3.9	22.5 \pm 2.5	0.5904
<i>Umbral (mV)</i>	-42.0 \pm 0.9	-42.6 \pm 0.9	0.5938
<i>Amplitud del 1^{er} disparo (mV)</i>	72.9 \pm 2.1	71.5 \pm 1.6	0.5964
<i>Ancho del 1^{er} disparo (ms)</i>	1.4 \pm 0.05	1.4 \pm 0.05	0.4944

Los p-valores corresponden a la prueba de T no pareada.

4.7 Una única dosis de L-DOPA causa oscilaciones, pero no hiperexcitabilidad

Los animales lesionados con 6-OHDA que son tratados con L-DOPA generan discinesias desde el primer día de tratamiento (ver Figura r1I). Sin embargo, la exposición repetida a la L-DOPA induce alteraciones adicionales que sensibilizan la respuesta a la L-DOPA y a agonistas dopaminérgicos (Delfino et al., 2004; Keifman et al., 2019). De hecho, los datos presentados en esta tesis muestran que los animales tratados con L-DOPA alcanzan durante el día 12 de tratamiento picos de discinesias más altos en comparación con el día 1; y llegan a este pico más rápidamente (ver Figura r1I-K) como resultado de la sensibilización a la L-DOPA. En las ICE, esta sensibilización correlaciona con el aumento de la inmunomarcación de la proteína ERK fosforilada (p-ERK), que indica un incremento de la actividad celular (Ding et al., 2011). Por otro lado, los resultados presentados hasta aquí sugieren que en algún momento a lo largo del tratamiento con L-DOPA, los efectos de la estimulación D1/D5 se vuelven duraderos. Dado que la estimulación aguda de los receptores D1/D5 en ICE de ratones control reproduce todos los efectos de un tratamiento crónico con L-DOPA, se estudió la posibilidad de que una única dosis de L-DOPA sea suficiente para inducir oscilaciones e hiperexcitabilidad en las ICE al igual que el tratamiento crónico. Para ello, se registraron ICE de ratones lesionados con 6-OHDA 24 horas después de que fueron tratados con una única dosis de L-DOPA (Figura r11A). Los ratones tratados con una única dosis de L-DOPA desarrollaron puntajes de discinesias comparables con los observados durante el primer día de los ratones tratados crónicamente (Figura r11B).

Los animales tratados con una única dosis de L-DOPA mostraron una elevada proporción de ICE oscilatorias (48%), una proporción similar a la observada en los animales que recibieron un tratamiento crónico (45%) y significativamente mayor a la observada en los animales parkinsonianos tratados con vehículo (19%; Figura r11C). Asimismo, las ICE de los ratones tratados con una única dosis de L-DOPA exhibieron aumentos significativos de R_{ent} y amplitud del *sag* y de la sAHP (Figura r11D-F). De igual manera a lo que ocurre en el resto de los grupos experimentales, las ICE oscilatorias de ratones discinéticos tratados con una sola dosis de L-DOPA mostraron mayor R_{ent} , *sag* y sAHP que las ICE de disparo regular (Figura r11G-I), mientras que la diferencia en la reobase no alcanzó significancia estadística (Figura r11J). Llamativamente, la respuesta a pulsos de corriente despolarizante no se vió afectada tras el tratamiento con una única dosis de L-DOPA, dado que ésta no es diferente de la observada en ratones parkinsonianos que no fueron expuestos a la L-DOPA (que recibieron un tratamiento con vehículo) (Figura r11K-L). Y finalmente, al igual que en los otros grupos experimentales, no se hallaron diferencias en la respuesta a pulsos de corriente despolarizante entre ICE oscilatorias y de disparo regular en animales discinéticos tratados una sola vez con L-DOPA (Figura r11M).

En resumen, una única dosis de L-DOPA es suficiente para inducir oscilaciones y amplificación de hiperpolarizaciones en las ICE, pero no es suficiente para exacerbar la respuesta a pulsos de corriente supraumbrales.

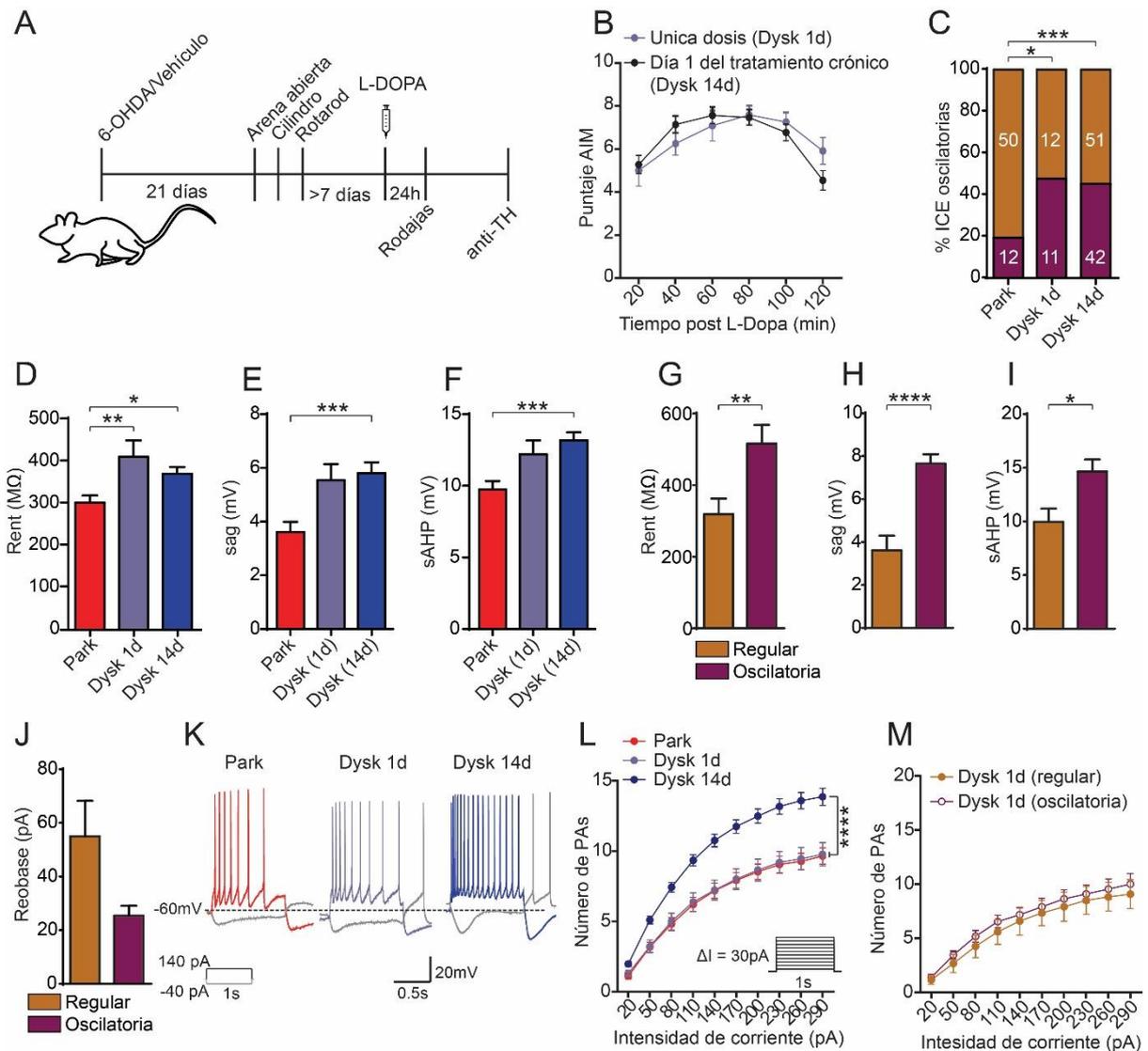


Figura r11. Una única dosis de L-DOPA causa oscilaciones, pero no hiperexcitabilidad. **A:** Diseño experimental para animales tratados con sólo una dosis de L-DOPA. **B:** Comparación del puntaje de movimientos anormales involuntarios (AIM) entre la primera dosis de L-DOPA de animales discinéticos que recibieron un tratamiento durante 14 días (Dysk 14d) y aquellos que recibieron sólo una dosis (Dysk 1d). ANOVA de dos vías, NS. **C:** Comparación del número de ICE oscilatorias entre animales parkinsonianos (Park, tratados con vehículo durante 14 días), discinéticos que recibieron una dosis (Dysk 1d) y discinéticos que recibieron 14 dosis (Dysk 14d) de L-DOPA. Prueba exacta de Fisher $*p < 0.05$, $***p < 0.001$. **D-F:** Comparación de resistencia de entrada (D), *sag* (E) y sAHP (F) entre ICE de animales parkinsonianos y discinéticos que recibieron 1 o 14 dosis de L-DOPA. ANOVA de una vía, comparaciones post-hoc: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. **G-J:** Comparación de resistencia de entrada (G), *sag* (H), sAHP (I) y corriente de rebase (J) entre ICE oscilatorias y de disparo regular de animales discinéticos que recibieron sólo una dosis de L-DOPA. Prueba de T: $*p < 0.5$, $**p < 0.01$, $***p < 0.0001$. **K:** Registros representativos de ICE en respuesta a pulsos de corriente despolarizante de animales parkinsonianos (Park), discinéticos tratados con una dosis de L-DOPA (Dysk 1d) y discinéticos tratados durante 14 días (Dysk 14d). **L:** Número de potenciales de acción (PAs) en función de la intensidad del pulso de corriente para ICE de los grupos descritos en K. ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparaciones post-hoc (pulso 290pA): $****p < 0.0001$. **M:** Número de potenciales de acción (PAs) en función de la intensidad del pulso de corriente despolarizante entre ICE oscilatorias y de disparo regular de animales discinéticos tratados con una única dosis de L-DOPA. ANOVA de dos vías, NS. $N > 23$ células de > 6 animales por grupo. Se muestra la media \pm EE.

4.8 La exposición a la L-DOPA en animales sanos no altera la fisiología de las ICE

Para que la exposición a la L-DOPA genere discinesias es necesario que los animales presenten denervación dopaminérgica severa. Animales sin lesión dopaminérgica (grupo sham) que son expuestos a un tratamiento con L-DOPA durante uno o 14 días no generan discinesias (Girasole et al., 2018). No obstante, los resultados presentados hasta el momento no excluyen la posibilidad de que los cambios observados en las ICE de animales discinéticos sean generados por la L-DOPA *per se* independientemente de la lesión dopaminérgica y de las LID. Para descartar esta posibilidad, se registraron ICE de ratones sham que fueron tratados de igual manera que los animales lesionados con 6-OHDA: un grupo recibió una dosis de L-DOPA y otro fue tratado durante 14 días. Estos animales no desarrollaron discinesias y sus ICE fueron indistinguibles de las de animales sham que nunca fueron expuestos a la L-DOPA en relación a la respuesta a pulsos de corriente despolarizante, a la proporción de células oscilatorias y a su resistencia de entrada (Figura r12). Este experimento confirma que las alteraciones inducidas por la L-DOPA en las ICE requieren de la denervación dopaminérgica y de un tratamiento con L-DOPA que genere discinesias.

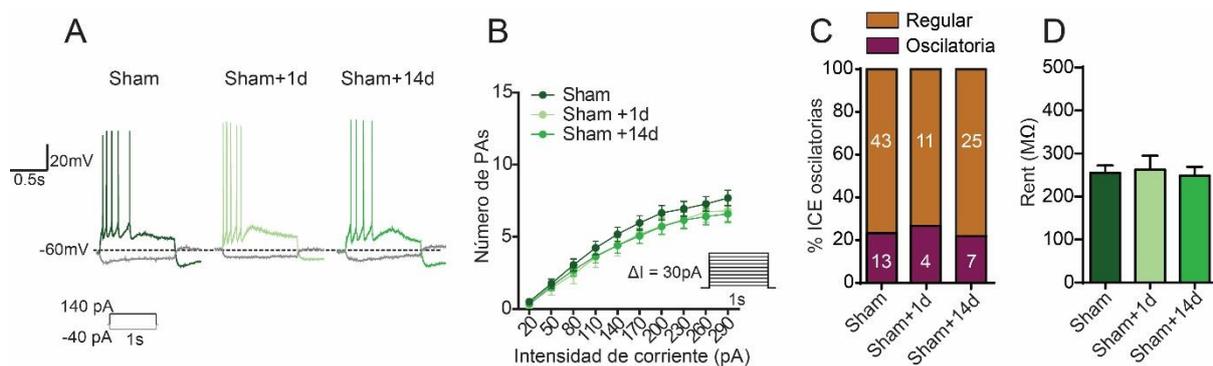


Figura r12. El tratamiento con L-DOPA en animales sanos no induce alteraciones en las ICE. **A:** Registros representativos de ICE en respuesta a pulsos de corriente despolarizante de animales sham, sham que recibieron 1 dosis de L-DOPA (Sham+1d) y sham tratados durante 14 días con L-DOPA (Sham+14d). **B:** Número de potenciales de acción en función de la intensidad del pulso de corriente para ICE de los grupos descritos en A. ANOVA de dos vías, NS. **C:** Comparación del número de ICE oscilatorias. Prueba exacta de Fisher, NS. El número de células de cada grupo se muestra en blanco sobre las barras. **D:** Comparación de la resistencia de entrada. ANOVA de una vía, NS. N>15 células de >3 animales por grupo. Se muestra la media ± EE.

4.9 Conclusión Capítulo I

En este Capítulo se caracterizaron los cambios en la actividad intrínseca, excitabilidad y propiedades electrofisiológicas de las ICE en animales con parkinsonismo experimental que recibieron un tratamiento crónico con L-DOPA. Se encontró que el tratamiento con L-DOPA exagera la excitabilidad de las ICE de ratones parkinsonianos y las vuelve oscilatorias. Además, se halló evidencia que sugiere que estos cambios resultan la estimulación de los receptores D1/D5 durante el tratamiento con L-DOPA y que estos cambios se vuelven duraderos dado que persisten una vez concluidos los efectos agudos de la L-DOPA (cuando

ya no hay dopamina estimulando los receptores). Así, esclarecer los mecanismos que resultan en un aumento persistente de la señalización del receptor D5 en las ICE e identificar las corrientes de membrana que contribuyen a generar los aumentos de excitabilidad y actividad oscilatoria podría proveer de nuevos blancos terapéuticos para restablecer la actividad normal de las ICE en la enfermedad de Parkinson y las LID.

CAPITULO II

5 CAPITULO II

Corrientes subyacentes a la actividad oscilatoria de las ICE

En este Capítulo se describirán las corrientes de membrana que participan en la actividad oscilatoria de las ICE de ratones discinéticos o inducidas por estimulación de receptores D1/D5.

5.1 Las oscilaciones observadas en ICE de animales discinéticos o por estimulación de receptores D1/D5 dependen de I_{Kir} e I_h

En la Introducción de esta tesis se describieron las corrientes de membrana involucradas en la generación de oscilaciones de potencial que dan lugar a patrones de actividad intrínsecos en salva-pausa en las ICE (ver Introducción). Dado que las oscilaciones descritas en ICE de ratones control requieren de las corrientes I_{Kir} (I_{Kir}) e I_h y no intervienen corrientes reclutadas durante el potencial de acción (Wilson, 2005), cabe analizar si las oscilaciones inducidas por la lesión con 6-OHDA y el tratamiento con L-DOPA en animales discinéticos, y por la exposición aguda a SKF81297 en animales control, involucran los mismos mecanismos iónicos. Para ello, se realizaron registros en configuración *whole-cell* de la actividad espontánea de ICE oscilatorias de ratones discinéticos y de ICE de ratones control en las que se indujeron oscilaciones con la incorporación del agonista D1/D5, SKF81297, al ACSF y se agregaron secuencialmente bloqueantes de potenciales de acción (TTX) y bloqueantes de las corrientes I_{Kir} o I_h . Se encontró que las oscilaciones persisten luego de remover potenciales de acción. De hecho, la amplitud de la oscilación no se vio alterada luego del agregado de TTX tanto en ICE oscilatorias de animales discinéticos como en ICE de animales control que fueron expuestas al SKF81297 para inducir las a oscilar (Figura r13A-B). La oscilación, en cambio, desapareció en presencia del bloqueante selectivo de la corriente I_h , ZD7288 (Figura r13A-B).

Las ICE expresan diferentes subunidades de canales Kir: los Kir6.1 sensibles a ATP (Lee et al., 1998; Thomzig et al., 2003), los Kir3.2 también conocidos como GIRK2, dado que pertenecen a la familia de canales regulados por proteína G (Calabresi et al., 1998; Murer et al., 1997) y los canales Kir clásicos Kir2.2 y Kir2.4 (Karschin et al., 1996; Prüss et al., 2003). El agregado de glibenclámda (bloquea Kir6) o de tertiapin-Q (bloquea Kir3) no logró interrumpir la oscilación (Figura r13C-D). Si bien no existe farmacología dirigida específicamente a canales Kir2, el bario en muy bajas concentraciones bloquea con alta selectividad a los canales Kir2.2 (Alagem et al., 2001; Hibino et al., 2010). El agregado de 10 μ M de bario bloqueó completamente las oscilaciones (Figura r13C-D). Así, tanto el agregado de bajas

concentraciones de bario como el bloqueante selectivo de la corriente I_h , ZD7288, detuvieron completamente la oscilación.

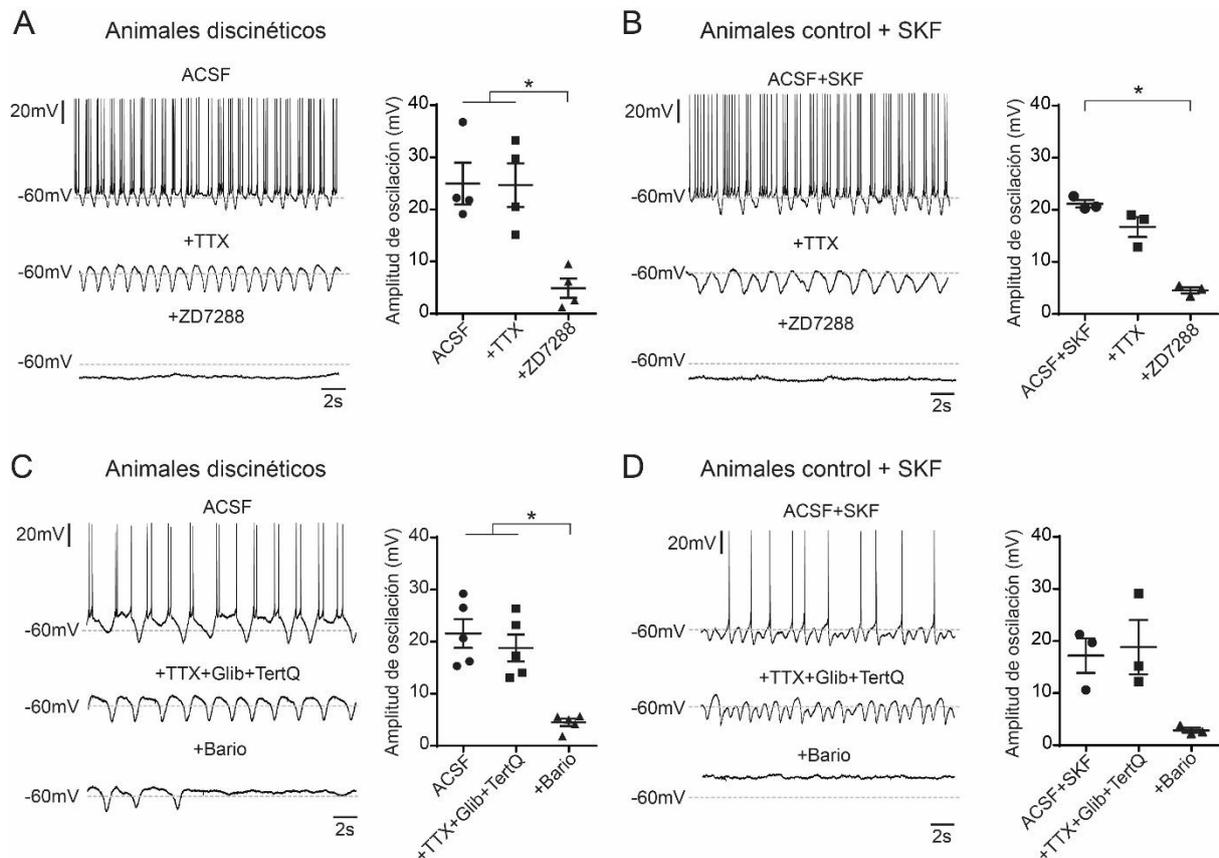


Figura r13. I_{Kir} e I_h median las oscilaciones de las ICE. **A:** Registros de actividad espontánea de ICE oscilatorias de ratones discinéticos en condición control (ACSF) y luego del agregado de TTX ($1\mu\text{M}$) y ZD7288 ($30\mu\text{M}$) y comparación de la amplitud de oscilación antes y después del agregado de TTX y ZD7288. **B:** Registros de actividad espontánea de ICE de animales control en las que se indujeron oscilaciones con el agregado del agonista D1/D5 (SKF81297) y comparación de la amplitud de oscilación antes y después del agregado de TTX y ZD7288. **C:** Registros de actividad espontánea de ICE oscilatorias de ratones discinéticos en condición control (ACSF) y luego del agregado de TTX, glibenclamida ($10\mu\text{M}$, Glib), tertiapin-Q (100nM , TertQ) y bario ($10\mu\text{M}$), y comparación de la amplitud de la oscilación antes y después del agregado de los diferentes bloqueantes. **D:** Registros de actividad espontánea de ICE de animales control en las que se indujeron oscilaciones con el agregado de agonista D1/D5 (SKF81297) antes y después del agregado de TTX, glibenclamida (Glib), tertiapin-Q (TertQ) y bario, y comparación de la amplitud de la oscilación antes y después del agregado de los diferentes bloqueantes. A-D: ANOVA de una vía, comparaciones post-hoc: * $p < 0.05$. $N = 3-5$ células de >3 animales por grupo. Cada símbolo corresponde a una célula. Se muestra la media \pm EE.

Estos resultados indican que tanto las oscilaciones observadas en las ICE de animales discinéticos como las inducidas por SKF81297 en ICE de animales control obedecen a mecanismos subumbriles que involucran a las corrientes I_{Kir} e I_h . Además, la corriente I_{Kir} implicada no es mediada por canales Kir3.2 o Kir6.1, sino que muy probablemente por canales Kir2.2, que son los únicos que se bloquean casi completamente con las bajas concentraciones de bario usadas (Hibino et al., 2010). Los valores IC_{50} de bario en sistemas de expresión heteróloga son $<1\mu\text{M}$ para Kir2.2 y $\sim 400\mu\text{M}$ para Kir2.4 (Hibino et al., 2010),

por lo que el bloqueo de las oscilaciones con una concentración de bario de $10\mu\text{M}$ sugiere que los Kir2.2 son jugadores clave y que los Kir2.4 no participan. Además, los canales Kir2, en particular los constituidos por la subunidad Kir2.2, son los de rectificación más marcada y por lo tanto los que poseen mayor capacidad amplificadora necesaria para la oscilación (Amarillo et al., 2018; Anumonwo y Lopatin, 2010; Dhamoon et al., 2004) (Ver Introducción).

5.2 Las ICE oscilatorias exhiben incrementos en I_{Kir} y decrementos en I_{leak} sin cambios en I_{h}

Los resultados presentados hasta aquí permiten especular que si las ICE de animales discinéticos se vuelven oscilatorias, entonces la L-DOPA debe afectar de alguna manera el balance entre las corrientes involucradas, resultando en una combinación de corrientes que favorezca la oscilación. En vista de ello, se examinaron los niveles de I_{Kir} e I_{h} en las ICE de ratones sham, parkinsonianos y discinéticos. Para este análisis, las ICE de ratones discinéticos fueron separadas en oscilatorias y de disparo regular.

5.2.1 Evaluación de I_{Kir}

Primeramente, se midió la corriente I_{Kir} . Para ello, se utilizó un protocolo de *voltaje clamp* adecuado que consistió en rampas rápidas de voltaje entre -55mV y -120mV (Gertler et al., 2008; Li et al., 2013). Para aislar I_{Kir} , se bloqueó I_{h} mediante el agregado de ZD7288 ($30\mu\text{M}$) a la solución intracelular. Las ICE oscilatorias de ratones discinéticos presentaron mayor amplitud de I_{Kir} en comparación con las ICE de disparo regular (Figura r14A-D). La diferencia entre el promedio de las corrientes medidas en ICE oscilatorias y de disparo regular de ratones discinéticos reveló la forma de una curva I-V característica de una conductancia Kir (Figura r14C). Estos resultados indican que I_{Kir} está aumentada en las ICE oscilatorias de ratones discinéticos.

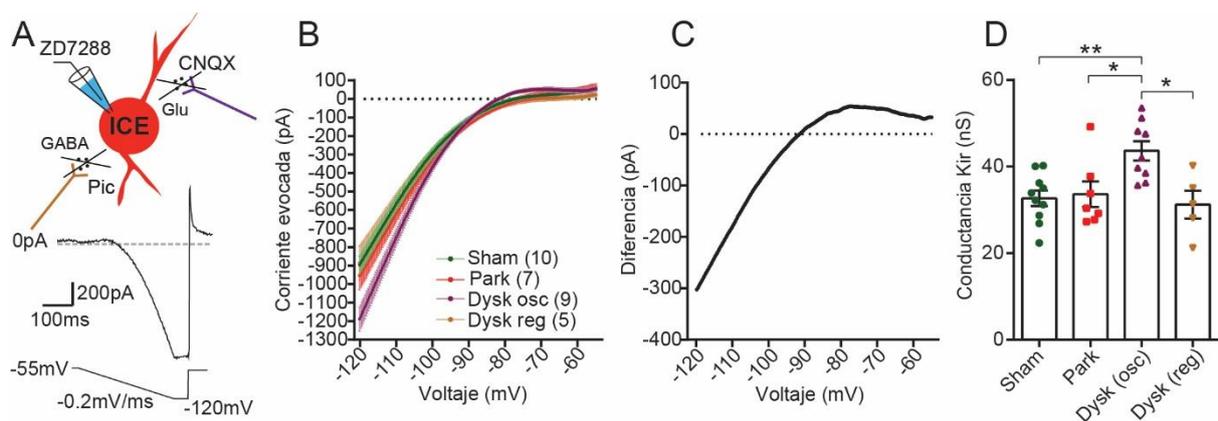


Figura r14. Las ICE oscilatorias de ratones discinéticos presentan mayor I_{Kir} . **A:** Esquema de registro de ICE en modo *voltage-clamp* y ejemplo de registro de corriente evocada por un protocolo de rampa de voltaje para medir I_{Kir} . **B:** Corriente evocada por una rampa de voltaje en ICE de disparo regular de ratones sham, parkinsonianos (Park) y discinéticos (Dysk reg) y en ICE oscilatorias de ratones discinéticos (Dysk osc). El número de células de cada grupo se indica entre paréntesis. **C:** Diferencia entre el promedio de corriente

evocada de ICE oscilatorias y de disparo regular de animales discinéticos. **D:** Comparación de la conductancia Kir medida como la pendiente de la curva de corriente mostrada en B entre -120mV y -110mV. ANOVA de una vía, comparaciones post-hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Se muestra la media \pm EE (B, D).

5.2.2 Evaluación de I_h

A continuación, se estudió si la corriente I_h también se encuentra modificada en las ICE oscilatorias de ratones discinéticos. Para medirla se utilizó un protocolo de *voltage-clamp* que consiste en pulsos cuadrados de voltaje de amplitud creciente ($-\Delta 10\text{mV}$) y duración decreciente desde un potencial de *holding* de -40mV (Figura r15A) (Kanyshkova et al., 2009) (Ver Materiales y Métodos). Para aislar I_h , se bloquearon canales de Na^+ y K^+ con el agregado de TTX ($1\mu\text{M}$) y bario ($500\mu\text{M}$) al ACSF. Cabe señalar que estas altas concentraciones de bario permiten bloquear no solo Kir sino también otros canales de potasio que podrían influir en la medición, como canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) y canales de potasio dependientes de calcio ($\text{K}_{\text{Ca}2+}$). Dado que I_h es una corriente de activación lenta, se asume que en estas condiciones de registro la corriente instantánea evocada al inicio del pulso de voltaje no corresponde a I_h sino a una componente de *leak* (I_{Leak}). I_h se activa lentamente a lo largo del pulso hasta alcanzar el estado estacionario, por lo que el cálculo de la amplitud de I_h se realiza restando la corriente instantánea de la corriente medida al final del pulso (Figura r15A). No se hallaron diferencias significativas en la amplitud de I_h de las ICE en ninguno de los grupos experimentales (Figura r15B). Por otra parte, dado que el pulso de mayor amplitud (-130mV) produce la activación máxima de los canales HCN (que median la corriente I_h) (Chan et al., 2004; Kanyshkova et al., 2009), se estimó la activación relativa de I_h a partir de la amplitud de las corrientes de cola evocadas por la serie de pulsos de voltaje variable, medidas a -100mV y normalizadas a la amplitud de corriente evocada por el pulso de -130mV (Ver Materiales y Métodos) (Figura r15C). Este parámetro permite describir la dependencia de voltaje de la activación de I_h independientemente de las diferencias de amplitud de corriente entre células y de la influencia del gradiente electroquímico sobre la medición (Kanyshkova et al., 2009). Estos experimentos tampoco arrojaron diferencias significativas en la activación relativa de I_h (Figura r15D), sugiriendo que las ICE de ratones discinéticos no registran cambios en la amplitud y dependencia de voltaje de la corriente I_h .

Luego se analizó la cinética de activación y deactivación de I_h . Para ello, se midieron las constantes de activación como las constantes de tiempo de un ajuste bi-exponencial al registro de corriente evocada por un pulso de voltaje de -130mV y de 3.5 segundos desde un potencial de -40mV (Figura r15E). Por su parte, las constantes de deactivación se obtuvieron ajustando la curva bi-exponencial al registro de corriente evocada por un pulso de -80mV de 5 segundos de duración desde un potencial de -130mV (Figura r15E) (ver Materiales y Métodos). Por el ajuste bi-exponencial se obtuvieron en cada caso constantes rápidas y lentas. Las constantes de activación y deactivación de I_h no resultaron diferentes

entre grupos (Figura r15F-G), indicando que las ICE de ratones discinéticos no registran cambios significativos en la amplitud y cinética de la corriente I_h .

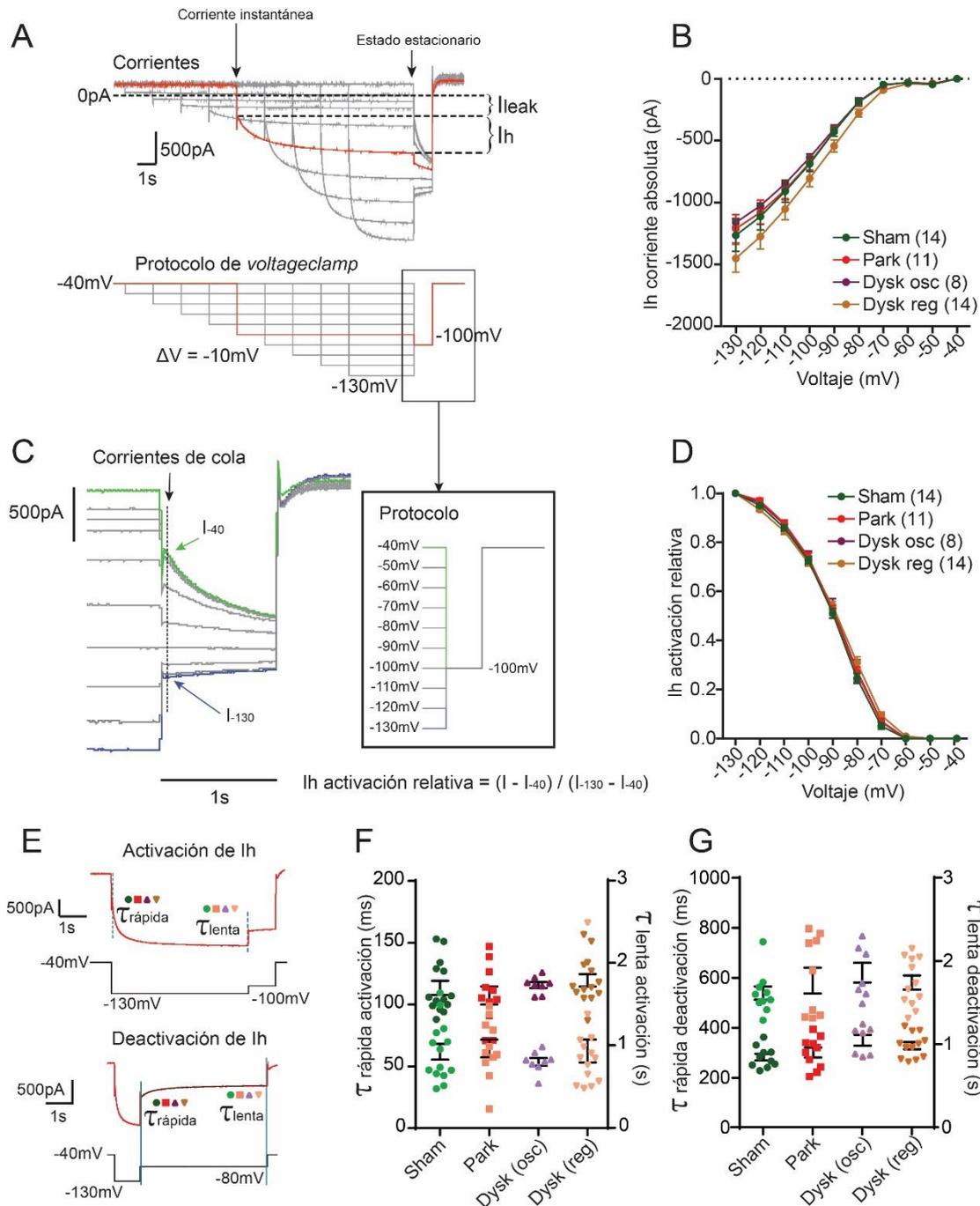


Figura r15. Las ICE oscilatorias de ratones discinéticos no registran cambios en amplitud y cinética de I_h . **A:** Ejemplo de corrientes evocadas (arriba) por un protocolo de *voltage clamp* (abajo) adecuado para medir I_h . Se muestra la fracción de corriente que corresponde a la medición de I_h y la porción correspondiente a I_{leak} . **B:** Comparación de la amplitud de I_h medida como se indica en A entre ICE de disparo regular de ratones sham, parkinsonianos (Park) y discinéticos (Dysk reg) y en ICE oscilatorias de ratones discinéticos (Dysk osc). ANOVA de dos vías, NS. **C:** Mismo protocolo de *voltage clamp* mostrado en A, pero enfocado y ampliado en las corrientes de cola. Se muestra cómo se calcula la curva de activación relativa de I_h (ver también Materiales y Métodos). **D:** Comparación de la curva de activación relativa de I_h . ANOVA de dos vías, NS. **E:** Protocolos de

voltage-clamp utilizados para medir las constantes (τ) de activación y deactivación de I_h y registros representativos. **F:** Comparación de las constantes (τ) de activación rápida y lenta de I_h . ANOVA de una vía (uno por cada variable), NS. **G:** Comparación de las constantes de deactivación rápida y lenta de I_h . ANOVA de una vía (uno por cada constante), NS. El número de células de cada grupo se indica entre paréntesis. >3 animales por grupo. Se muestra la media \pm EE.

5.2.3 Evaluación de I_{Leak}

Además de las corrientes I_{Kir} e I_h necesarias para que la oscilación ocurra, se mencionó que en el rango de voltaje en el que ocurre la oscilación existe además una corriente de fuga o *leak* I_{Leak} . La literatura relativa a los canales que median I_{Leak} en las ICE es escasa (Berg y Bayliss, 2007) al igual que las herramientas farmacológicas para manipularlos. Sin embargo, el protocolo de *voltage clamp* utilizado para medir I_h permite estimar I_{Leak} tomando la corriente instantánea evocada inmediatamente al inicio del pulso de voltaje, cuando I_h aún no está activada y la corriente I_{Kir} está bloqueada por bario (Figura r15A). La curva I-V resultante de medir esta corriente arrojó una relación lineal y con potencial de reversión en $-59.5mV$, consistente con la conductancia de *leak* presente en estas células (Wilson, 2005). Llamativamente, las ICE oscilatorias de ratones discinéticos mostraron una reducción de I_{Leak} (Figura r16A-B).

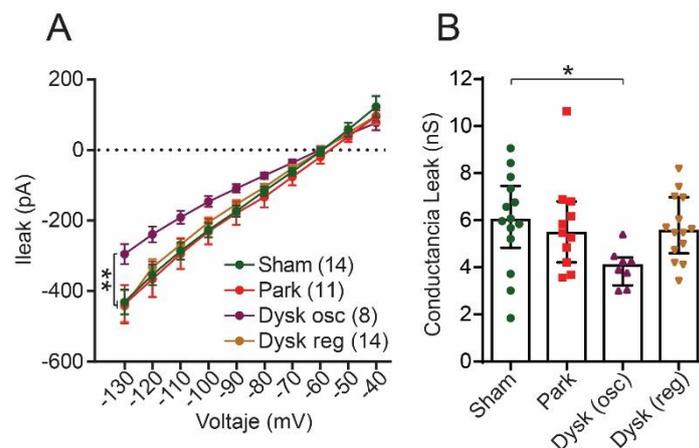


Figura r16. Las ICE oscilatorias de ratones discinéticos exhiben I_{Leak} de menor amplitud. **A:** Curva I-V de I_{Leak} medida como se muestra en Figura r15A en ICE de disparo regular de ratones sham, parkinsonianos (Park) y discinéticos (Dysk reg) y en ICE oscilatorias de ratones discinéticos (Dysk osc). ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparaciones post-hoc (pulso $-130pA$): ** $p < 0.01$. El número de células por grupo se muestra entre paréntesis. Se muestra la media \pm EE. **C:** Comparación de la conductancia de *leak* medida como la pendiente de la curva I-V mostrada en B. Kurskal-Wallis ANOVA, comparaciones post-hoc: * $p < 0.05$. Cada punto/cuadrado/triángulo corresponde a una célula. Los datos son de al menos 3 animales por grupo. Se muestra la mediana \pm RIC.

En líneas generales, los resultados de estos experimentos de *voltage clamp* señalan que las ICE oscilatorias de ratones discinéticos presentan un desbalance entre las corrientes I_{Kir} e I_{Leak} , con un aumento de I_{Kir} y una reducción de I_{Leak} , sin cambios en I_h . Es probable que este desbalance facilite la actividad oscilatoria. En este sentido, cabe destacar que corrientes I_{Kir} más grandes contribuirían a hiperpolarizaciones más pronunciadas mientras que corrientes

I_{Leak} más chicas dejarían al potencial de membrana más susceptible a la influencia de I_{Kir} , facilitando aún más las hiperpolarizaciones. Por lo tanto, resulta razonable pensar que condiciones de elevada I_{Kir} y reducida I_{Leak} (que caracteriza a las ICE de ratones discinéticos) promoverá la actividad oscilatoria al favorecer la amplificación de hiperpolarizaciones.

5.3 El tratamiento con L-DOPA no induce cambios morfológicos en las ICE

Los hallazgos descritos hasta el momento conducen a interrogarse sobre cuáles son los mecanismos que explican los cambios en I_{Kir} e I_{Leak} . Una posibilidad es que la L-DOPA modifique la morfología celular, resultando en cambios en el área total de membrana que afecte el número total de canales iónicos contribuyendo a las corrientes de membrana. Trabajos previos reportaron que la exposición a la L-DOPA induce marcadas alteraciones morfológicas en las neuronas espinosas medianas estriatales de animales parkinsonianos (Fieblinger et al., 2018; Suárez et al., 2014). Para evaluar si las ICE también sufren cambios en su morfología celular luego del tratamiento con L-DOPA, se registraron ICE de animales sham, parkinsonianos y discinéticos con el agregado de neurobiotina en la solución intracelular. Esta aproximación permitió marcar la célula registrada, revelarla y luego reconstruirla para su análisis morfológico. Se midió así el tamaño del soma, la longitud del árbol dendrítico, el número de bifurcaciones y terminaciones, y la complejidad del árbol dendrítico a partir de un análisis de Sholl. Los resultados de esta exploración no arrojaron diferencias en ninguna de las características examinadas, sugiriendo que el tratamiento con L-DOPA no induce cambios en el tamaño y morfología de las ICE (Figura r17). Así, los cambios en I_{Kir} e I_{Leak} no son causados por cambios en el área de membrana, sino que responderían a otros mecanismos, por ejemplo, a mecanismos de regulación de la densidad de los canales o su conductancia.

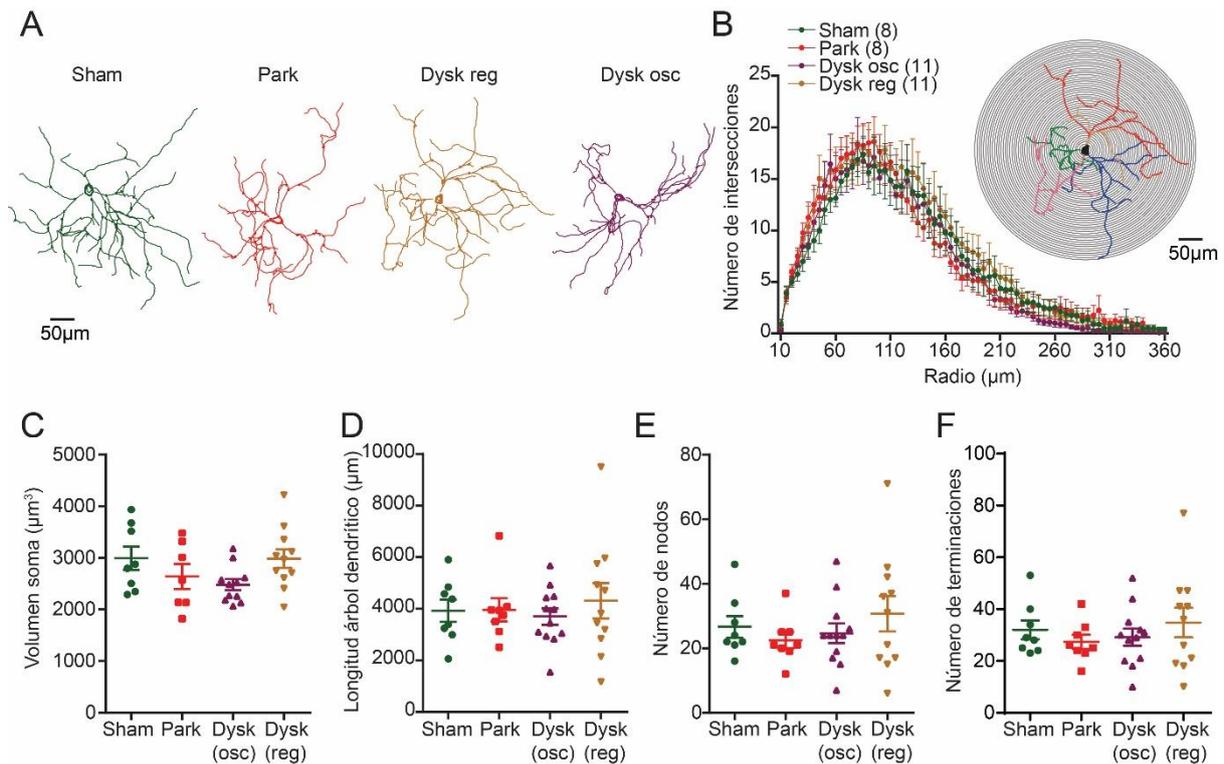


Figura r17. La degeneración dopaminérgica y el tratamiento con L-DOPA no inducen cambios morfológicos en las ICE. **A:** Ejemplos de trazos de reconstrucciones de ICE de disparo regular de ratones sham, parkinsonianos (Park) y discinéticos (Dysk reg) y de ICE oscilatorias de ratones discinéticos (Dysk osc). **B:** Análisis de Sholl de ICE registradas en rodajas y reconstruidas. ANOVA de dos vías, NS. El número de células de cada grupo se indica entre paréntesis. **C-F:** Comparación del volumen del soma (C), longitud del árbol dendrítico (D), número de nodos (bifurcaciones) (E) y número de terminaciones (F). ANOVA de una vía, NS. Cada punto/cuadrado/triángulo corresponde a una célula. Se muestra la media \pm EE (B-F).

5.4 La estimulación D1/D5 incrementa I_{Kir} en ICE de ratones control

Los datos mostrados hasta aquí sugieren que un aumento de I_{Kir} , que probablemente involucra canales Kir2.2, es un actor clave en la actividad oscilatoria de las ICE de ratones discinéticos. Dado que I_{Kir} también es necesaria para las oscilaciones inducidas por SKF81297 (agonista D1/D5) en ICE de ratones control, se evaluó la posibilidad de que I_{Kir} sea regulada por la estimulación de los receptores para dopamina D1/D5. Estudios previos reportaron que la dopamina y los agonistas D1/D5 incrementan una corriente de potasio sensible a cesio en las neuronas espinosas medianas estriatales, posiblemente atribuible a canales Kir2 (Pacheco-Cano et al., 1996). Sin embargo, no se ha reportado si los agonistas D1/D5 modulan Kir2 en las ICE. Para responder a esta pregunta, se midió I_{Kir} con el mismo protocolo de rampa descrito anteriormente en ICE de rodajas de estriado de ratones control incubadas con ACSF o ACSF + SKF81297 por 30 minutos. Nuevamente se agregó ZD7288 a la solución intracelular para bloquear I_h y aislar mejor I_{Kir} (Figura r18A). Se encontró que las ICE expuestas a SKF81297 exhibieron corrientes I_{Kir} mayores que las medidas en ACSF normal (Figura r18B-D).

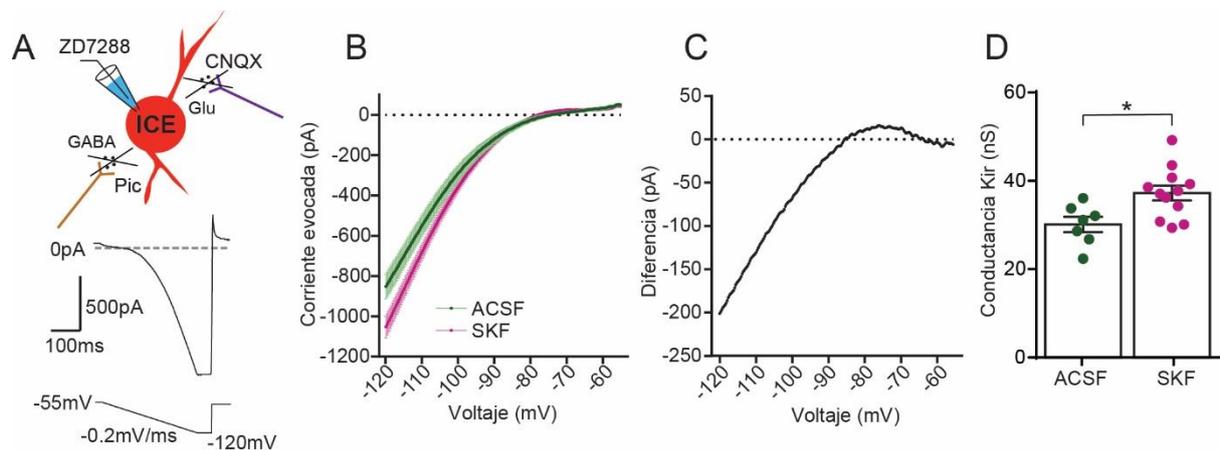


Figura r18. La estimulación D1/D5 aumenta I_{Kir} en ICE de ratones control. **A:** Esquema de registro de ICE en modo *voltage-clamp* y ejemplo de registro de corriente evocada por un protocolo de rampa de voltaje para medir I_{Kir} . **B:** Curvas I-V de las corrientes evocadas por una rampa de voltaje en ICE de ratones control en condiciones control (ACSF) o en rodajas que fueron incubadas con SKF81297 (SKF). **C:** Diferencia entre el promedio de corriente evocada en ICE de ratones control con o sin SKF81297. **D:** Comparación de la conductancia Kir medida como la pendiente de la curva de corriente mostrada en B entre -120mV y -110mV. Prueba de T no pareada: * $p < 0.05$. $N = 7-12$ células de >3 animales por grupo. Se muestra la media \pm EE (B, D).

Como se mencionó al comienzo de este Capítulo, los canales Kir2.2 son los más sensibles al bloqueo por concentraciones bajas de bario (10 - 25 μM) (Hibino et al., 2010), mientras que los canales K_v , como los K_v1 que median la acomodación en las ICE (Tubert et al., 2016), requieren de concentraciones de bario más elevadas para ser bloqueados (200 – 500 μM). Esta diferente sensibilidad de los canales de K^+ al bloqueo por bario permite bloquear canales Kir de manera relativamente selectiva sin afectar otros canales de K^+ . Para confirmar que la actividad oscilatoria y amplificación de hiperpolarizaciones (R_{ent} , *sag* y *sAHP*) inducidas por la estimulación D1/D5 con SKF81297 son causadas por el aumento de corrientes I_{Kir} mediadas por canales Kir2.2, se evaluó si concentraciones bajas de bario que bloqueen Kir2.2 son capaces de prevenir estos efectos del SKF81297. Para ello se registró la respuesta de ICE de animales control a pulsos de corriente despolarizante antes y después del agregado secuencial de bario (10 o 25 μM -no se encontraron diferencias usando 10 o 25 μM por lo que se muestran los datos agrupados-) y SKF81297 (2 μM). El agregado de bario despolarizó a las ICE y tuvo un pequeño efecto sobre la respuesta a pulsos despolarizantes (Tabla 4 y Figura r19A-B), probablemente secundario a un potencial de reposo más despolarizado, y no modificó otras propiedades de las ICE, incluyendo la R_{ent} , *sag* o *sAHP* (Tabla 4). El agregado de SKF81297 (en el ACSF que ya contenía bario) no indujo actividad oscilatoria en ninguna de las células ni cambios en la R_{ent} , *sag* o *sAHP* (Figura r19C y Tabla 4). No obstante, en presencia de bajas concentraciones de bario, SKF81297 incrementó marcadamente la respuesta a pulsos de corriente despolarizante de las ICE incluso con la inyección de corriente constante para corregir el potencial de reposo que había sido modificado por el bario (Figura r19A-B), indicando que este efecto es independiente de Kir. Por otro lado, el bloqueo de I_{Kir} con bario (10 μM) en ICE oscilatorias de ratones discinéticos redujo drásticamente su R_{ent} (Figura r19D).

Tabla 4: Propiedades electrofisiológicas de ICE de ratones control antes y después del agregado secuencial de Bario (10 o 25 μM) y SKF81297 (2 μM)

<i>Propiedad</i>	<i>ACSF</i>	<i>+Bario</i>	<i>+SKF</i>	<i>p valor</i>
<i>Potencial de reposo (mV)</i>	-60.7 \pm 1.0	-57.1\pm1.3*	-57.0\pm1.2*	0.0119
<i>Resistencia de entrada (MΩ)</i>	263.5 \pm 52.9	258.9 \pm 12.5	256.3 \pm 24.7	0.9450
<i>Sag (mV)</i>	4.6 \pm 0.8	3.6 \pm 0.4	3.5 \pm 0.5	0.1679
<i>sAHP (mV)</i>	12.7 \pm 1.1	13.4 \pm 1.0	10.8 \pm 3.5	0.2717
<i>Latencia sAHP (ms)</i>	96.6 \pm 7.8	111.6 \pm 13.4	139.5 \pm 24.1	0.1973
<i>Reobase (pA)</i>	50.0 \pm 11.3	27.5 \pm 4.9	20.0 \pm 0.0	0.0356
<i>Umbral (mV)</i>	-45.1 \pm 0.3	-45.5 \pm 0.4	-46.2 \pm 0.5	0.0236
<i>Amplitud del 1^{er} disparo (mV)</i>	78.5 \pm 1.8	76.9 \pm 1.7	74.7 \pm 2.8	0.4693
<i>Ancho del 1^{er} disparo (ms)</i>	1.2 \pm 0.04	1.2 \pm 0.05	1.2 \pm 0.05	0.2325

Los p-valores corresponden a la prueba ANOVA de una vía. Los asteriscos corresponden a las comparaciones post-hoc: *p<0.05. En **negrita** se indica que se alcanzó significancia estadística.

Finalmente, para confirmar que estas bajas concentraciones de bario bloquean I_{Kir} en las ICE, se midió I_{Kir} en ICE de ratones control antes y después del agregado secuencial de concentraciones crecientes de bario (10 μM , 25 μM y 50 μM). La concentración más baja (10 μM) bloqueó >80% de I_{Kir} mientras que 25 μM y 50 μM bloquearon casi el 100% de la corriente (Figura r19E), confirmando la alta sensibilidad de I_{Kir} a estas bajas concentraciones de bario en las ICE.

En conjunto, los datos presentados en esta sección demuestran que la estimulación de receptores D1/D5 para dopamina incrementa la corriente I_{Kir} , contribuyendo a la amplificación de hiperpolarizaciones (R_{ent} , *sag* y *sAHP*) observada en ICE de ratones control expuestas al SKF81297, mientras que confirma que la exacerbada respuesta a inyecciones de corriente despolarizante es mediada por un mecanismo independiente de I_{Kir} .

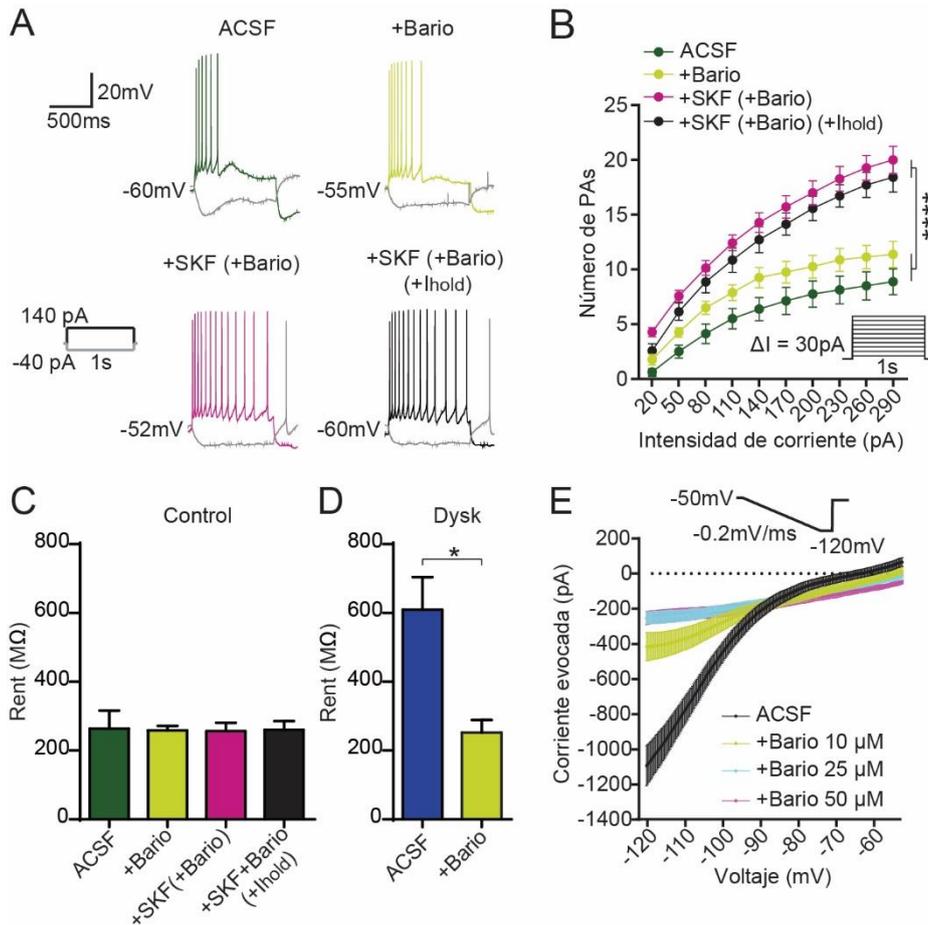


Figura r19. Bajas concentraciones de bario previenen el efecto del SKF81297 sobre las hiperpolarizaciones, pero no sobre la excitabilidad. A: Registros representativos de ICE de ratones control en respuesta a pulsos de corriente en condición control (ACSF) y luego del agregado secuencial de bario (10 o 25 μM) y SKF81297 (2 μM). Se muestra la condición SKF + Bario con la inyección de una corriente constante para corregir el potencial de reposo (+Ihold) de manera que sea comparable con la condición control. **B:** Número de potenciales de acción (PAs) en función de la intensidad del pulso de corriente en ICE de ratones control luego del agregado secuencial de bario y SKF81297. ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparación post-hoc (pulso 290pA): **** $p < 0.0001$. **C:** Comparación de resistencia de entrada en ICE de ratones control antes y después del agregado secuencial de bario y SKF. ANOVA de una vía, NS. **D:** Comparación de la resistencia de entrada en ICE oscilatorias de animales discinéticos (Dysk) antes y después del agregado de bario. Prueba de T pareada: * $p < 0.05$. **E:** Corrientes evocadas por rampas rápidas de voltaje para medir I_{Kir} antes y después del agregado de concentraciones crecientes de bario. N=4-12 células de >3 animales por grupo. Se muestra la media \pm EE.

5.5 Manipular I_{Kir} y/o I_{Leak} en tiempo real permite modificar el patrón de disparo de las ICE

Los resultados presentados hasta aquí en este Capítulo demuestran que existe una clara relación entre el aumento de I_{Kir} y la reducción de I_{Leak} con la actividad oscilatoria y amplificación de hiperpolarizaciones en las ICE de animales discinéticos. No obstante, no queda demostrado si alteraciones sólo de I_{Kir} son suficientes para explicar la emergencia de la actividad oscilatoria o si se requiere un determinado balance entre I_{Kir} e I_{Leak} . Desafortunadamente, las herramientas farmacológicas disponibles para modular estas dos

corrientes son escasas. Además, una aproximación farmacológica haría difícil evaluar la contribución relativa de cada corriente dado que para esto es necesario lograr controlar la magnitud de la corriente que se pretende modular. En vista de ello, se decidió utilizar la herramienta de *dynamic clamp* para evaluar si cambios en I_{Kir} e I_{Leak} en ICE de ratones sham son suficientes para inducir actividad oscilatoria y, por otra parte, si revertir los cambios observados de I_{Kir} e I_{Leak} en ICE oscilatorias de ratones discinéticos (y en ICE de ratones sham inducidas a oscilar con SKF81297) logra detener las oscilaciones y conducir a la célula hacia un patrón de disparo regular. La técnica de *dynamic clamp* utiliza una interfaz en tiempo real entre la célula registrada y un sistema analógico que permite simular un proceso dinámico en la célula como por ejemplo el aumento o disminución de corrientes de membrana o corrientes sinápticas (Figura r20A). En otras palabras, esta configuración permite adicionar o sustraer diferentes magnitudes de corrientes de membrana en tiempo real (si se conocen los parámetros que describen el modelo de corriente que se quiere manipular) y de esta manera observar cómo se comporta la célula con estas corrientes sumadas o restadas. La adición y sustracción de corrientes de membrana se realiza de manera instantánea (*on/off*) y es posible manipular varias corrientes al mismo tiempo. Además, una ventaja importante de esta técnica es que permite controlar la magnitud de las corrientes que se pretenden manipular, y así estudiar no sólo si éstas participan en el fenómeno biofísico (en este caso la oscilación) sino también cuáles los cambios relativos necesarios en estas corrientes para desencadenar dicho fenómeno, y si existe algún tipo de interacción (adición, oclusión, sinergia, etc) entre varias corrientes manipuladas sobre el fenómeno estudiado.

En estos experimentos, se sumaron y restaron diferentes niveles de conductancia (G) de I_{Kir} (G_{Kir}) e I_{Leak} (G_{Leak}). Se utilizó un modelo ya caracterizado de Kir2.2, empleado en otros trabajos para manipular I_{Kir} en neuronas tálamo-corticales (Amarillo et al., 2014, 2018), mientras que el modelo de I_{Leak} es simplemente una corriente óhmica con reversión en -60mV (el potencial de reversión de I_{Leak} en las ICE) (Figura r20B). Se manipuló I_{Kir} e I_{Leak} en ICE no oscilatorias de ratones sham, en ICE de ratones sham que fueron inducidas a oscilar por el agregado de SKF81297 en el ACSF y en ICE oscilatorias de ratones discinéticos.

Se encontró que la adición de niveles crecientes de G_{Kir} aumenta la probabilidad (p) de oscilación de las ICE de ratones sham, alcanzando $p=1$ con la adición de $G_{Kir}=40nS$. Si al mismo tiempo se resta G_{Leak} , se requieren menores niveles de G_{Kir} para lograr la misma probabilidad de oscilación. Llamativamente, la sustracción de suficientes niveles de G_{Leak} sin cambios en G_{Kir} fue suficiente para inducir oscilaciones, lo que sugiere que las ICE poseen normalmente suficientes niveles endógenos de I_{Kir} capaces de promover actividad oscilatoria en determinadas condiciones (Figura r20C-D). Asimismo, la sustracción de $G_{Kir}=30nS$ o la adición de $G_{Leak}=3nS$ fue suficiente para interrumpir tanto las oscilaciones inducidas por SKF81297 en ICE de animales sham como las oscilaciones de ICE de ratones discinéticos. Análogamente, la adición de niveles crecientes de I_{Leak} requirió la sustracción de niveles menores de I_{Kir} para interrumpir las oscilaciones (Figura r20E-H).

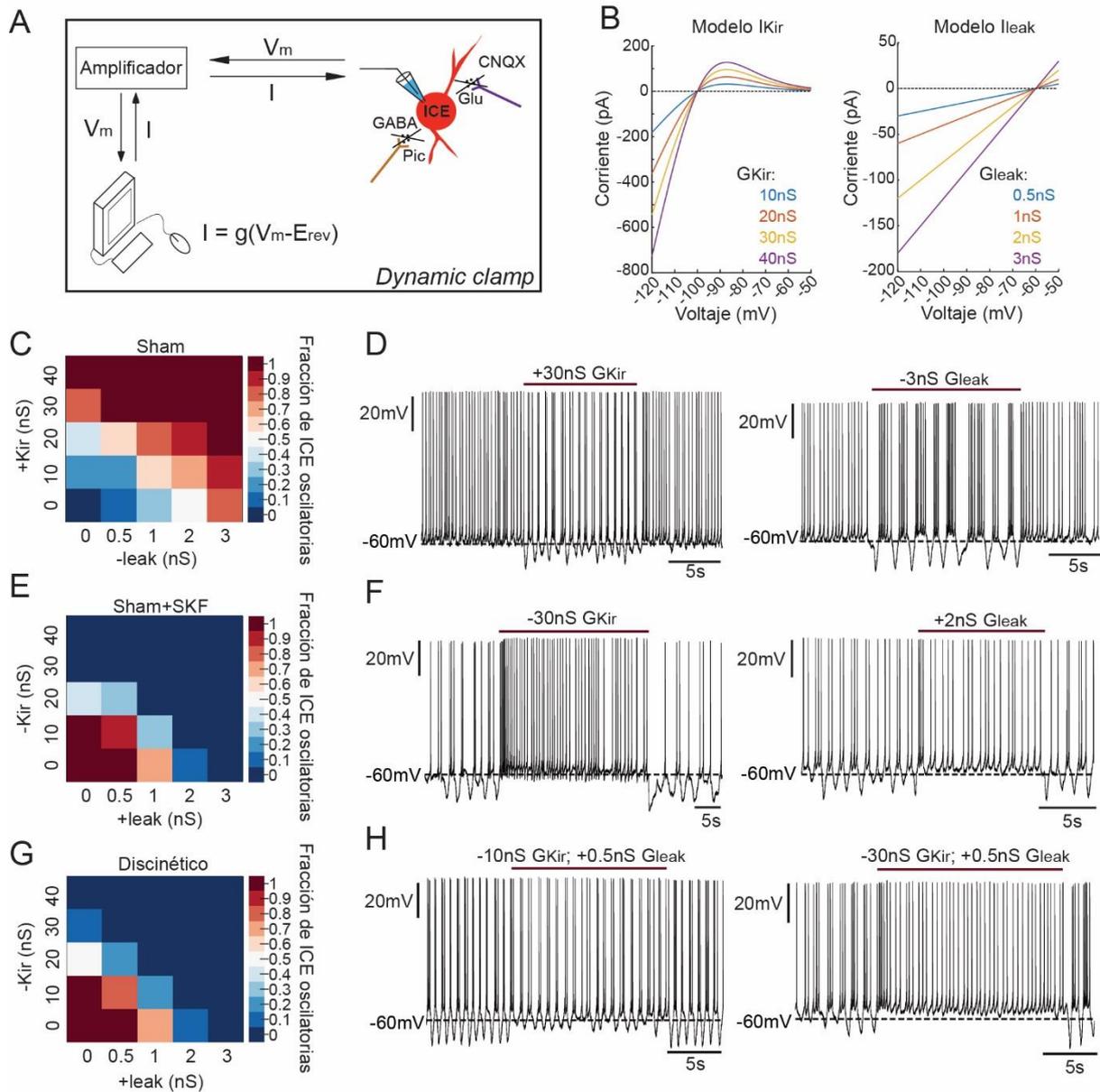


Figura r20. El balance entre I_{Kir} e I_{Leak} determina el patrón de disparo de las ICE. **A:** Esquema ilustrativo del experimento de *dynamic clamp*. **B:** Valores de conductancia (G) de los modelos de I_{Kir} e I_{Leak} utilizados en los experimentos de *dynamic clamp*. **C-D:** Mapa de calor (C) que muestra la fracción de ICE de ratones sham que se vuelven oscilatorias luego de sumar y restar diferentes niveles de I_{Kir} e I_{Leak} respectivamente, y registros representativos (D). **E-F:** Mapa de calor (E) que muestra la fracción de ICE de ratones sham que fueron inducidas a oscilar con SKF81297, y que dejan de oscilar luego de restar y sumar diferentes niveles de I_{Kir} e I_{Leak} respectivamente, y registros representativos (F). **G-H:** Mapa de calor (G) que muestra la fracción de ICE oscilatorias de ratones discinéticos que dejan de oscilar luego de restar y sumar diferentes niveles de I_{Kir} e I_{Leak} respectivamente, y registros representativos (H). $N=9-12$ células de >3 animales por grupo.

Por otra parte, se evaluó el efecto de manipular I_{Kir} e I_{Leak} sobre la resistencia de entrada (como medida de amplificación de hiperpolarizaciones) y sobre la respuesta a pulsos de corriente despolarizante. Se encontró que la suma de I_{Kir} y/o resta de I_{Leak} tiende a aumentar la resistencia de entrada en ICE de ratones sham, alcanzando significancia estadística con la resta de $G_{Leak}=3nS$ (Figura r21A). Por otro lado, la resta de I_{Kir} y/o suma de I_{Leak} revirtió el

aumento de resistencia de entrada en las ICE de ratones sham inducidas a oscilar con SKF81297 y en las ICE oscilatorias de ratones discinéticos (Figura r21B-C), llevándolas a niveles de las ICE de ratones sham. Por el contrario, la respuesta a pulsos de corriente despolarizante se vió muy poco afectada por la manipulación de I_{Kir} y/o I_{Leak} (Figura r21D-F).

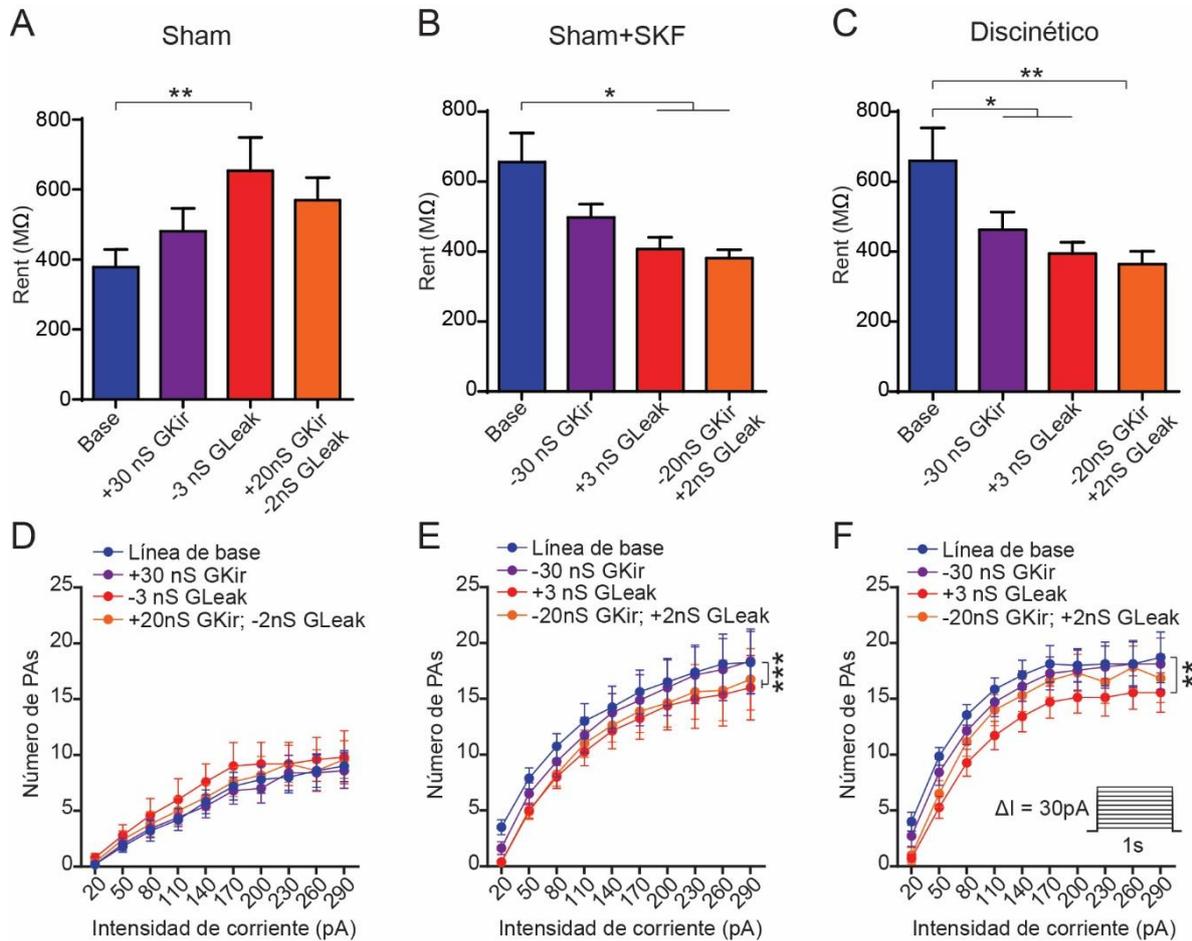


Figura r21. I_{Kir} e I_{Leak} influyen sobre la resistencia de entrada, pero tienen poca participación en la respuesta a pulsos supraumbrales de corriente. **A:** Comparación de resistencia de entrada (R_{ent}) en ICE de ratones sham antes y después de modificar I_{Kir} y/o I_{Leak} . ANOVA de una vía, comparaciones post-hoc: ** $p < 0.01$. **B:** Comparación de resistencia de entrada en ICE de ratones sham que fueron inducidas a oscilar con SKF81297 antes y después de modificar I_{Kir} y/o I_{Leak} . ANOVA de una vía, comparaciones post-hoc: * $p < 0.05$. **C:** Comparación de resistencia de entrada en ICE oscilatorias de ratones discinéticos antes y después de modificar I_{Kir} y/o I_{Leak} . ANOVA de una vía, comparaciones post-hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **D-F:** Número de potenciales de acción en función de la intensidad de un pulso de corriente despolarizante antes y después de manipular I_{Kir} o I_{Leak} en ICE de ratones sham (D), ICE de ratones sham que fueron inducidas a oscilar con SKF81297 (E) e ICE oscilatorias de ratones discinéticos (F). D: ANOVA de dos vías, NS. E: ANOVA de dos vías, efecto de +3nS G_{Leak} y de -20nS G_{Kir} ; +2nS G_{Leak} : *** $p < 0.001$. F: ANOVA de dos vías, efecto de +3nS G_{Leak} : ** $p < 0.01$. N=9-12 células de >3 animales por grupo. Se muestra media \pm EE.

Estos resultados demuestran causalidad entre los cambios en I_{Kir} e I_{Leak} y la actividad oscilatoria y amplificación de hiperpolarizaciones observada en las ICE oscilatorias de ratones discinéticos. Además, la observación de los mapas de calor (Figura r20) permite especular que los cambios en I_{Kir} e I_{Leak} tienen efectos aditivos entre sí. Y finalmente se

demostró que la exacerbada respuesta a pulsos de corriente despolarizante depende muy poco de los cambios en I_{Kir} e I_{Leak} . De hecho, sólo manipulaciones de I_{Leak} causaron pequeñas diferencias en la respuesta de las ICE oscilatorias a pulsos de corriente despolarizante (Figura r21F), aunque estos cambios están lejos de restaurar los niveles de respuesta en animales sham (Figura r21D), indicando una vez más que las corrientes que median la exacerbada respuesta a pulsos de corriente despolarizante en ICE de ratones discinéticos depende de mecanismos independientes de I_{Kir} e I_{Leak} , y posiblemente involucre a los canales K_v1 (Tubert et al., 2016).

Wilson, (2005) encontró que las ICE que muestran amplias oscilaciones del potencial de membrana, presentan una región de pendiente negativa en su curva I-V. Asimismo, Amarillo et al., (2018) reportaron que la zona de pendiente negativa de la curva I-V de I_{Kir} es responsable de la actividad oscilatoria de las neuronas tálamo-corticales. Para evaluar si la zona de pendiente negativa de la curva I-V de I_{Kir} es necesaria para el comportamiento oscilatorio de las ICE, se utilizó *dynamic clamp* para adicionar niveles crecientes de una conductancia Kir cuyo modelo fue modificado de manera que no posea esta región de pendiente negativa en su curva I-V (Amarillo et al., 2018) (Figura r22A). La adición de niveles crecientes de conductancia de este modelo modificado de I_{Kir} no logró inducir oscilaciones en las ICE (Figura r22B-C), demostrando que la región de pendiente negativa de la curva I-V de I_{Kir} es responsable del comportamiento oscilatorio.

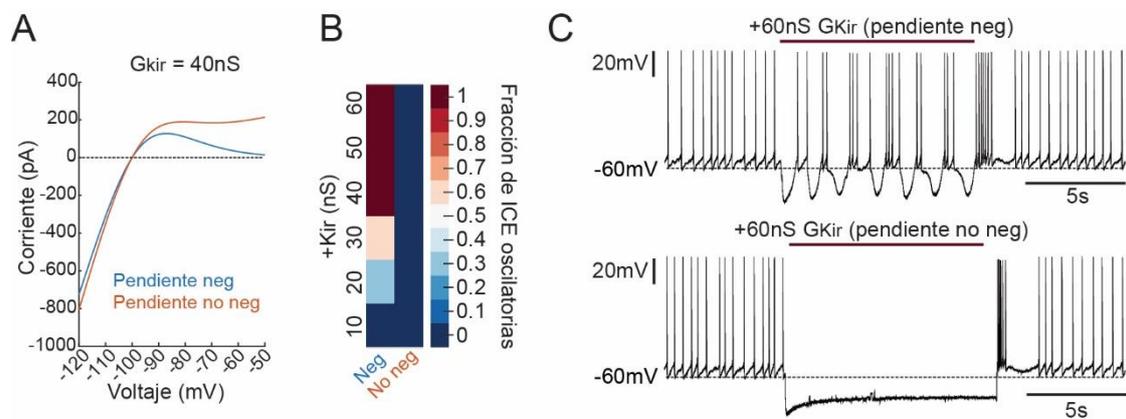


Figura r22. La región de pendiente negativa de la curva I-V de I_{Kir} es responsable del fenotipo oscilatorio en las ICE. **A:** Modificación del modelo de I_{Kir} que no tiene la región de pendiente negativa en su curva I-V. **B:** Mapa de calor que muestra la fracción de ICE de ratones control que se vuelven oscilatorias luego de sumar diferentes niveles de conductancia de I_{Kir} con el modelo original que presenta la zona de pendiente negativa (Neg) y con el modelo modificado sin la zona de pendiente negativa (No neg). **C:** Registros representativos de los datos de B. N=9 células de 3 animales.

5.6 Conclusión Capítulo II

En este Capítulo se describieron las alteraciones en las corrientes de membrana involucradas en la actividad oscilatoria de las ICE de ratones discinéticos. Se encontró que las ICE oscilatorias presentan amplitudes mayores de I_{Kir} y menores de I_{Leak} , y se demostró

mediante *dynamic clamp* que una mayor influencia de I_{Kir} sobre I_{Leak} causa el comportamiento oscilatorio.

Dado que I_{Kir} e I_{Leak} son corrientes independientes del tiempo, sus curvas I-V pueden sumarse para dar lugar a una curva instantánea I-V resultante. Para que las oscilaciones ocurran, la curva I-V resultante debe poseer la zona con pendiente negativa, que aparecerá con niveles altos de I_{Kir} y niveles bajos de I_{Leak} . Mientras que I_{Kir} aporta la zona con pendiente negativa, niveles altos de I_{Leak} pueden enmascararla. Así, menor I_{Leak} incrementa la capacidad de I_{Kir} de inducir oscilaciones porque permite la aparición de la zona con pendiente negativa de I_{Kir} en la curva I-V resultante. De esta manera, niveles bajos de I_{Kir} y altos de I_{Leak} (característicos de las ICE de ratones sham o parkinsonianos que no fueron tratados con L-DOPA) resultan en una curva I-V sin región de pendiente negativa (Figura r23A), y en ausencia de oscilaciones; mientras que niveles altos de I_{Kir} y bajos de I_{Leak} (característicos de las ICE oscilatorias de ratones discinéticos) favorecen la aparición de la zona con pendiente negativa en la curva I-V resultante (Figura r23B-C) y causan la actividad oscilatoria.

La pendiente negativa de I_{Kir} amplifica cambios del potencial de membrana (ver Introducción) no sólo en el sentido de la hiperpolarización sino también en el de la despolarización (fase descendente y ascendente de la oscilación respectivamente). Por su propiedad amplificadora de hiperpolarizaciones, se pueden explicar los aumentos de R_{ent} , *sag* y *sAHP* en las ICE oscilatorias. Por su parte, la amplificación en el sentido de la despolarización podría contribuir a la disminución de la reobase observada en las ICE oscilatorias en comparación con las de disparo regular (ver Capítulo I, Figura r5D), aunque mecanismos adicionales no explorados en esta tesis (como cambios en corrientes mediadas por canales K_v – ver Tubert et al., 2016) también podrían contribuir a los cambios en la reobase.

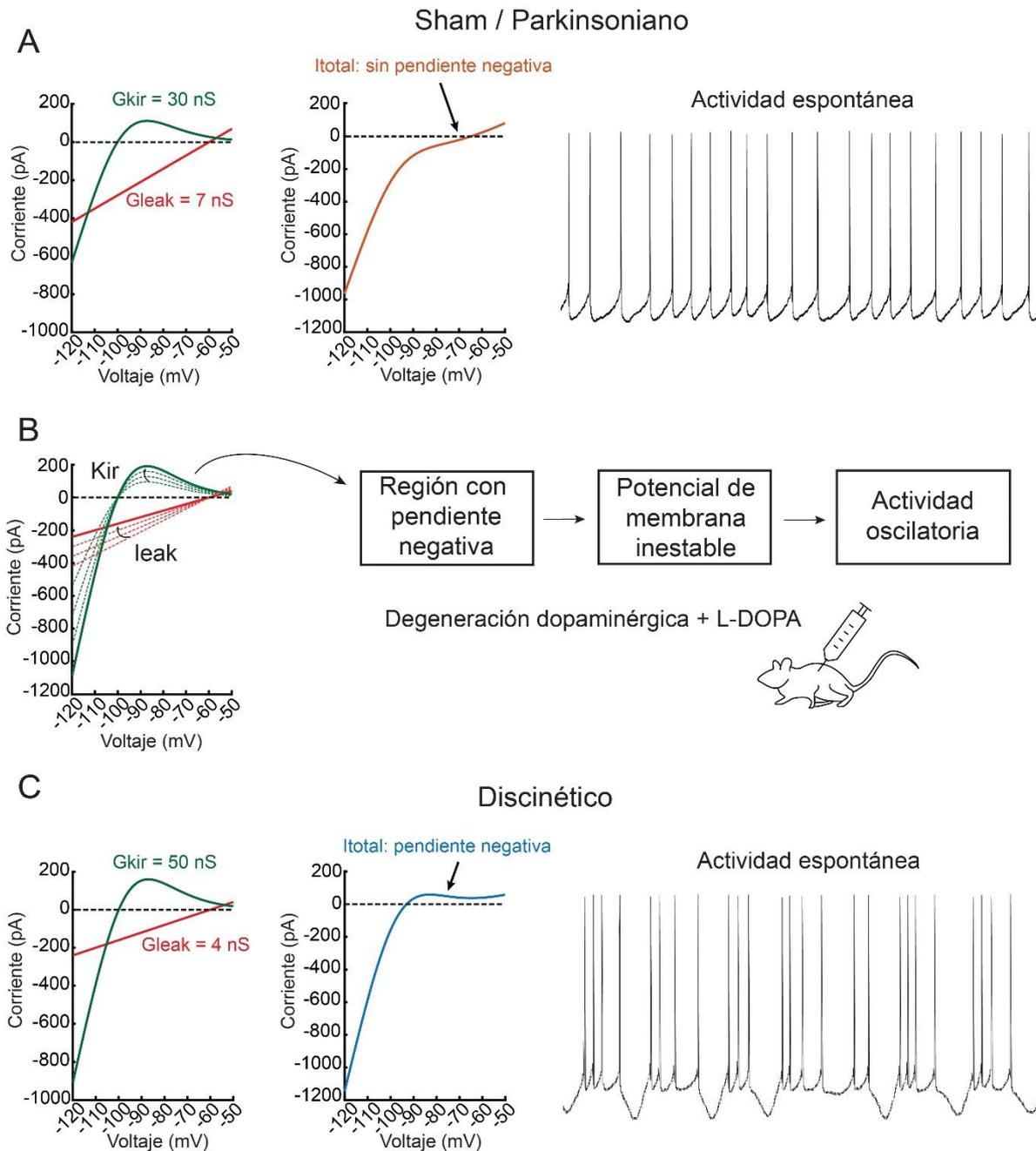


Figura r23. Cambios en I_{Kir} e I_{Leak} resultan en la aparición de la zona con pendiente negativa de la curva I-V y causan las oscilaciones en ICE de animales discinéticos. A: Representación esquemática de los niveles de I_{Kir} e I_{Leak} en ICE de ratones sham y parkinsonianos no expuestos a la L-DOPA, curva I-V resultante que no presenta la zona con pendiente negativa (I_{total}) y ejemplo de actividad espontánea en ICE con estos niveles de I_{Kir} e I_{Leak} . **B:** Efectos sobre I_{Kir} e I_{Leak} de la lesión dopaminérgica y el tratamiento con L-DOPA. **C:** Representación esquemática de los niveles de I_{Kir} e I_{Leak} en ICE oscilatorias de ratones discinéticos, curva I-V resultante en la que emerge la zona con pendiente negativa (I_{total}) y ejemplo de actividad espontánea en ICE con estos niveles de I_{Kir} e I_{Leak} .

Además del mecanismo que involucra la interacción entre I_{Kir} e I_h , otras corrientes pueden intervenir en la generación de oscilaciones de membrana (Amarillo et al., 2018; Wu et al., 2005). De hecho, el modelado computacional de membranas celulares permitió identificar

varias combinaciones de corrientes iónicas capaces de causar actividad oscilatoria (Izhikevich, 2004) que, como se detalló en la introducción de esta tesis, requiere necesariamente la presencia de corrientes amplificadoras (ver Figura i12). En neuronas tálamocorticales, por ejemplo, la corriente mediada por canales de calcio tipo T (I_T) tiene un papel fundamental en la actividad oscilatoria de estas células (Amarillo et al., 2014, 2018). Esta corriente se de-inactiva a potenciales muy negativos ($<-80\text{mV}$) y presenta una zona de pendiente negativa que ocasiona que, cuando la neurona alcanza potenciales para de-inactivar I_T , si ocurre una excitación posterior (mediada por I_h o aferencias excitatorias), la pendiente negativa retroalimenta positivamente la despolarización y causa una salva de potenciales de acción (Amarillo et al., 2014). Sin embargo, las ICE no presentan niveles significativos de I_T (Bennett et al., 2000) y resultados preliminares del laboratorio indican que el bloqueante de los canales de calcio que transportan I_T (TTA-P2 $1\mu\text{M}$) no suprime la oscilación. En conclusión, la interacción entre I_h y la pendiente negativa de la curva I-V resultante de sumar I_{Kir} e I_{Leak} determina el comportamiento oscilatorio de las ICE.

CAPITULO III

6 CAPITULO III

Canales K_v7 como potenciales blancos para disminuir la actividad de las ICE

En el Capítulo I de esta tesis se describió que el tratamiento crónico con L-DOPA induce oscilaciones y exacerba la hiperexcitabilidad en las ICE vía estimulación de los receptores D1/D5. Luego, a lo largo del Capítulo II se describió el mecanismo que subyace a la generación de oscilaciones, que involucra a los canales K_{ir} (muy probablemente $K_{ir2.2}$) y canales de *leak*. Por otro lado, Tubert et al., (2016) describieron que los canales K_v1 juegan un papel clave en la excitabilidad de las ICE y que una reducción de la corriente mediada por estos canales causa hiperexcitabilidad en ICE de ratones parkinsonianos. Si bien los mecanismos que exacerban la hiperexcitabilidad de las ICE en ratones discinéticos aún no han sido esclarecidos y no fueron abordados en esta tesis, resultados preliminares del laboratorio indican que los canales K_v1 estarían involucrados. Esta evidencia permite proponer a los canales K_{ir2} , de *leak* y K_v1 de las ICE como potenciales blancos para controlar la actividad de las ICE en condiciones patológicas como la enfermedad de Parkinson. Desafortunadamente, las opciones farmacológicas disponibles actualmente para modular estos canales son escasas. Otro grupo de canales con propiedades y funciones similares a los canales K_v1 es la familia de canales de K^+ dependientes de voltaje de rectificación tardía K_v7 , que controlan la excitabilidad de varios tipos neuronales (Brown y Passmore, 2009). Los canales K_v7 han sido involucrados en el mantenimiento del potencial de reposo, en la regulación de la generación y propagación de potenciales de acción y en el control de disparo en salvas (Battfeld et al., 2014; Wu et al., 2008; Yue y Yaari, 2006). Además, los canales K_v7 limitan la probabilidad de liberación de neurotransmisor en el cáliz de Held (Huang y Trussell, 2011) y la sumación temporal de potenciales post-sinápticos excitatorios en neuronas hipocámpales, piramidales de la corteza y neuronas espinosas medianas estriatales (Hu et al., 2002; Lee y Kwag, 2012; Shen et al., 2005).

Las ICE expresan canales K_v7 (Cooper et al., 2001; Paz et al., 2018). Sin embargo, trabajos previos del laboratorio demostraron que el bloqueo de estos canales no altera la excitabilidad de las ICE (Paz et al., 2018; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016) en ratones control. Por otro lado, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como el diclofenac y el ácido meclofenámico (MFA), se comportan como abridores o bloqueantes de canales K_v7 , dependiendo de las subunidades que conformen el canal (Brueggemann et al., 2011). En este Capítulo, se describe el rol de los canales K_v7 en la actividad espontánea y excitabilidad de las ICE. Se utilizaron no sólo bloqueantes sino también abridores selectivos de estos canales y se estudió la capacidad de los AINEs para controlar la actividad de las ICE a través de su acción sobre canales K_v7 . El objetivo último fue determinar si los canales K_v7 y la

farmacología actualmente disponible para regularlos podrían representar nuevas opciones terapéuticas para modular la actividad de las ICE en condiciones patológicas donde se encuentran hiperactivas como en la EP.

6.1 Las ICE expresan canales K_v7 , pero bloquearlos no tiene efecto sobre la actividad tónica y excitabilidad

Existen cinco subunidades de canales K_v7 ($K_v7.1$ - $K_v7.5$) que pueden formar homo- o heterotetrámeros con diferentes propiedades funcionales y farmacológicas. Cuatro de ellos ($K_v7.2$ - $K_v7.5$) se expresan en el cerebro (Jentsch, 2000). En un trabajo del laboratorio del que forman parte datos de esta tesis, se demostró la presencia de las subunidades $K_v7.2$, $K_v7.3$ y $K_v7.5$ en ICE mediante técnicas de inmunohistoquímica y análisis de expresión de ARN mensajero (Paz et al., 2018). Estos experimentos fueron realizados por la Lic. Agustina Stahl. Las subunidades 7.2 y 7.5 fueron detectadas en el $97.8 \pm 2.2\%$ y $98.0 \pm 2.0\%$ de las ICE analizadas por inmunomarcación respectivamente. La subunidad 7.3 fue detectada en el $39.8 \pm 11.1\%$ de las ICE mientras que no se detectó la subunidad 7.4 (Paz et al., 2018).

A pesar de la abundante expresión de canales K_v7 en las ICE, trabajos previos mostraron que su bloqueo no altera la excitabilidad de las ICE (Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016). Para confirmar y extender estos resultados, se evaluó el efecto de dosis más altas del bloqueante de K_v7 , XE991, que las usadas previamente (Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016) y el efecto de un bloqueante adicional, linopirdine, sobre la respuesta a pulsos de corriente despolarizante en ICE de ratones control. La aplicación de estos bloqueantes no modificó el número de potenciales de acción ni la coordenada temporal del último disparo en respuesta a pulsos de corriente despolarizante (Figura r24). Estos datos confirman y extienden resultados previos que indican que el bloqueo de canales K_v7 no afecta la excitabilidad de las ICE.

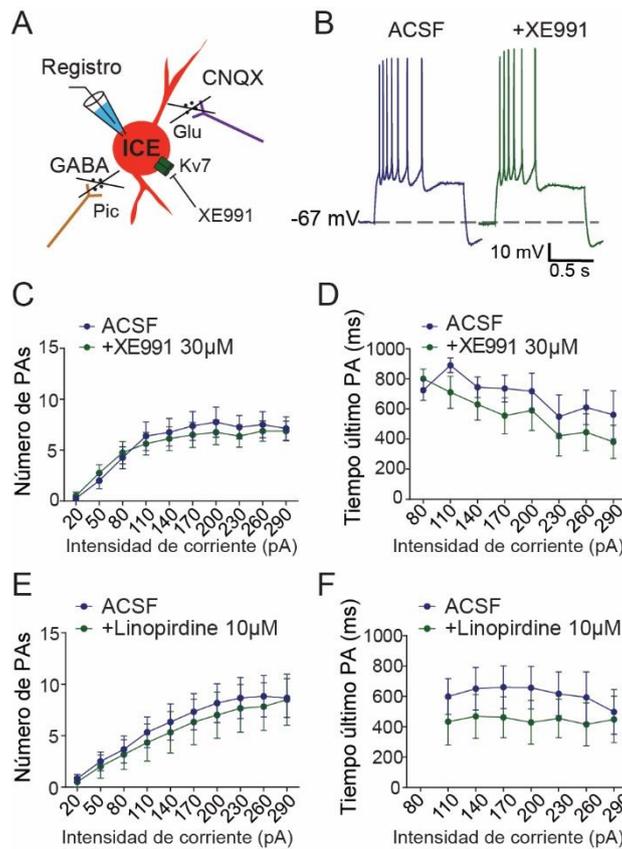


Figura r24. El bloqueo de canales Kv7 no modifica la respuesta a pulsos de corriente. **A:** Esquema de una ICE en las condiciones experimentales de registro. **B:** Registros representativos de una ICE antes y después del agregado de XE991 (30 μ M). **C-D:** Número de potenciales de acción (PAs) (C) y coordenada temporal del último potencial de acción (D) en ICE antes y después del agregado de XE991 (30 μ M) al baño de registro. ANOVA de dos vías, NS. N=6 células de 4 ratones. **E-F:** Número de potenciales de acción (E) y coordenada temporal del último potencial de acción (F) en ICE antes y después del agregado de linopirdine (10 μ M) al baño de registro. ANOVA de dos vías, NS. N=5 células 2 ratones.

Por otro lado, se estudió si los canales Kv7 son reclutados durante la actividad tónica espontánea de las ICE. Para ello, se realizaron registros en configuración *cell-attached* para estudiar la actividad espontánea en presencia de XE991 (30 μ M). El agregado de XE991 no modificó la frecuencia de disparo espontáneo de las ICE en estos registros (Figura r25), sugiriendo que, al menos en condiciones *ex vivo*, los canales Kv7 no contribuyen a regular la frecuencia de disparo espontánea de las ICE.

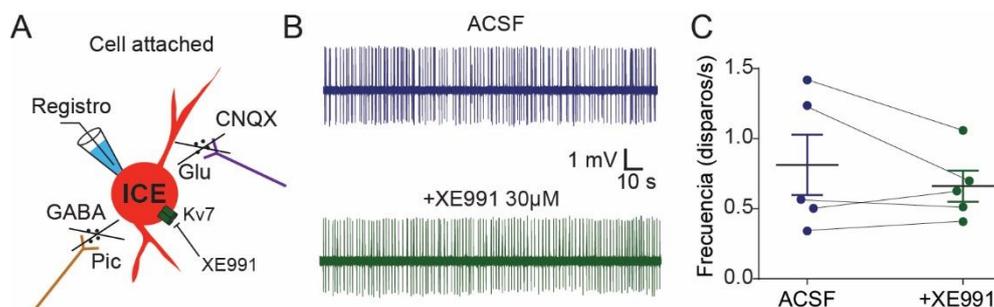


Figura r25. El bloqueo de canales K_v7 no modifica la actividad de disparo espontánea de las ICE. A: Esquema de una ICE en configuración *cell-attached*. B: Registros representativos de una ICE antes y después del agregado de XE991 ($30\mu\text{M}$). C: Comparación de la frecuencia promedio de disparo de ICE antes y después del agregado de XE991. Prueba de T pareada, NS. Cada círculo corresponde a una célula.

6.2 Canales K_v7 limitan la sumación de EPSP en ICE mediante mecanismos postsinápticos

Se ha descrito que los canales K_v7 regulan la integración de entradas sinápticas excitatorias subumbrales (Hu et al., 2002; Lee y Kwag, 2012; Shen et al., 2005). En general, se observa una correlación entre la magnitud de la respuesta a pulsos de corriente despolarizante aplicados en el soma y el grado de sumación temporal de EPSP. Sin embargo, existen estudios en los que encuentran disociados estos dos fenómenos (Hönigsperger et al., 2015). Para estudiar si estos canales limitan la integración temporal de EPSP en ICE, se evaluó la respuesta de ICE a entradas glutamatérgicas. Por un lado, se estimularon eléctricamente las aferencias sinápticas con un electrodo bipolar localizado en el estriado con un protocolo de estimulación de 5 pulsos a 20Hz en presencia de picrotoxina para independizarse de efectos mediados por transmisión GABAérgica (Figura r26A). El agregado de XE991 incrementó la amplitud del primer EPSP ($1.8 \pm 0.3\text{mV}$ antes y $2.5 \pm 0.2\text{ mV}$ después del agregado de XE991 $30\mu\text{M}$, prueba de T pareada, $p=0.0084$) y la sumación temporal de entradas excitatorias, evidenciada como un aumento en la despolarización inducida por el último pulso con respecto al primero (Figura r26B-C), sin modificar el potencial de reposo de la célula ($-65.3 \pm 1.7\text{mV}$ antes y $-64.9 \pm 1.7\text{mV}$ después del agregado de XE991 $30\mu\text{M}$, prueba de T pareada, $p=0.6950$). Se repitieron estos experimentos utilizando otro bloqueante de canales K_v7 , linopirdine ($10\mu\text{M}$). La adición de linopirdine tuvo los mismos efectos que el XE991 sobre la sumación de EPSP (Figura r26D-E) sin modificar el potencial de reposo ($-66.5 \pm 1.0\text{ mV}$ antes y $-66.6 \pm 0.9\text{ mV}$ después de agregar linopirdine, prueba de T pareada, $p=0.9528$). La adición de CNQX ($40\mu\text{M}$) bloqueó la inducción de EPSP, confirmando que la estimulación eléctrica no está despolarizando directamente la neurona registrada (Figura r26B, D).

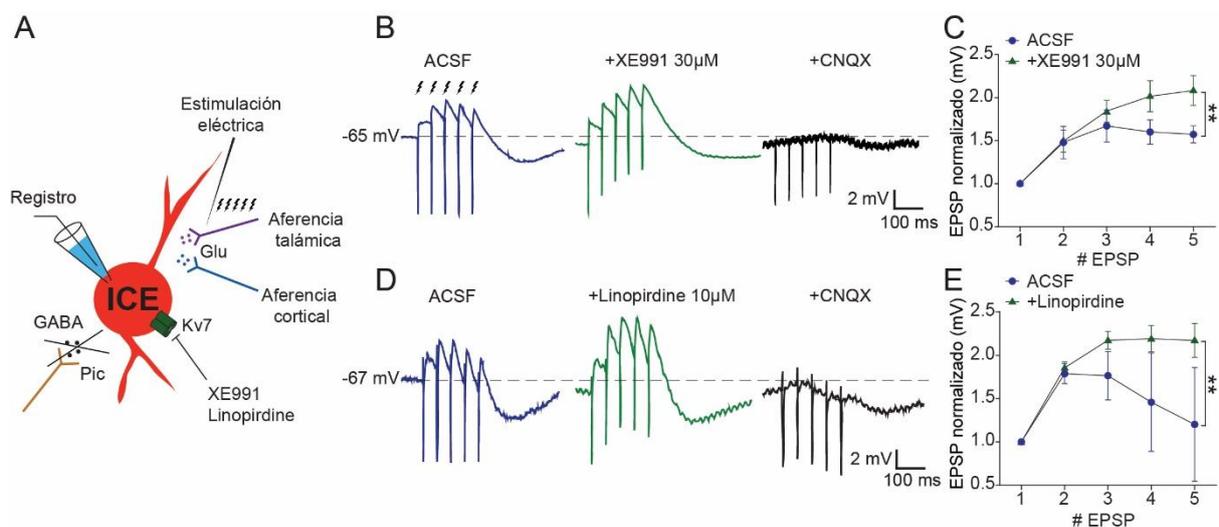


Figura r26. El bloqueo de canales K_v7 aumenta la sumación temporal de EPSP en ICE. **A:** Esquema de una ICE en las condiciones de registro usadas. **B:** Ejemplos representativos de la respuesta subumbral de una ICE a una estimulación eléctrica intraestriatal de 5 pulsos a 20Hz antes y después del agregado de XE991. El agregado de CNQX ($40\mu\text{M}$) suprime la respuesta confirmando la dependencia de aferentes glutamatérgicos. **C:** EPSP normalizado al primer potencial postsináptico. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción significativa, comparación post-hoc (pulso 5): $**p<0.01$. $N=4$ células de 3 ratones. **D:** Ejemplos representativos de la respuesta subumbral de una ICE a la estimulación eléctrica intraestriatal de 5 pulsos a 20Hz antes y después del agregado de linopirdine y CNQX. **E:** EPSP normalizado al primer potencial. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción significativa, comparación post-hoc (pulso 5): $**p<0.01$. $N=6$ células de 3 animales.

Estos efectos pueden deberse a la acción de los bloqueantes sobre los canales K_v7 localizados en las ICE pero también podrían explicarse como un aumento en la liberación de glutamato a nivel del terminal pre-sináptico. Dado que existe evidencia de que los canales K_v7 pueden regular la liberación de neurotransmisores (Huang y Trussell, 2011) y que los experimentos presentados hasta el momento no permiten distinguir efectos pre-sinápticos de efectos post-sinápticos, se estudió el efecto de bloquear canales K_v7 en la sumación de respuestas evocadas por la fotoliberación de glutamato enjaulado (RuBi-glutamato) en presencia de picrotoxina (Figura r27A) (Fino et al., 2009). El glutamato enjaulado fue agregado al ACSF y liberado con un tren de pulsos de luz que reproduce el patrón de estimulación eléctrica (5 pulsos a 20Hz y 0.1ms de ancho de pulso) mediante una fibra óptica ubicada cerca de la ICE registrada. En estas condiciones, la aplicación de XE991 incrementó la sumación de EPSP en las ICE (Figura r27B-C).

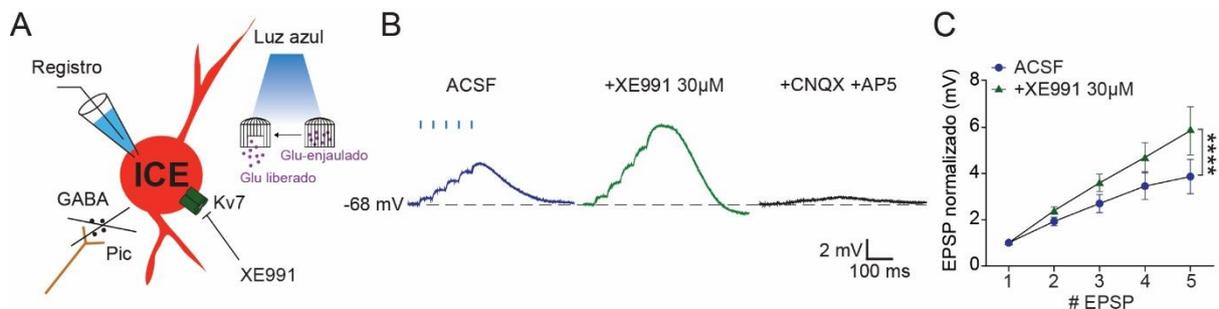


Figura r27. El bloqueo de canales K_v7 aumenta la sumación de EPSP en respuesta a liberación de glutamato. **A:** Esquema del experimento. **B:** Registro representativo de una ICE a pulsos de luz (5 pulsos a 20Hz de ancho 0.1ms) que liberan glutamato antes y después del agregado de XE991 y luego de añadir bloqueantes de la transmisión glutamatérgica (CNQX $40\mu\text{M}$ y AP5 $50\mu\text{M}$). El agregado de CNQX y AP5 confirma la dependencia de receptores glutamatérgicos. **C:** EPSP normalizado al primer potencial post-sináptico. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción significativa, comparación post-hoc (pulso 5): $****p<0.0001$. $N=6$ células de 3 ratones.

De manera similar a la *after hyperpolarization* (AHP) que sigue a inyecciones de corriente despolarizante (ver Figura r3I), un tren de EPSP también es seguido por una AHP (Figura r28A). Esta AHP ha sido relacionada con la respuesta en pausa que muestran las ICE en respuesta a estímulos ambientales salientes (Reynolds et al., 2004; Tubert et al., 2016; Tubert y Murer, 2020) y podría depender de corrientes de K^+ activables por despolarización,

por ejemplo, corrientes K_v7 . Sin embargo, el bloqueo de canales K_v7 no disminuyó la amplitud de la AHP que sigue a un tren de EPSP evocados mediante estimulación eléctrica (Figura r28B-C), mientras que la AHP que sigue a EPSP evocados por liberación de glutamato fue mayor luego del agregado de XE991 (Figura r28D).

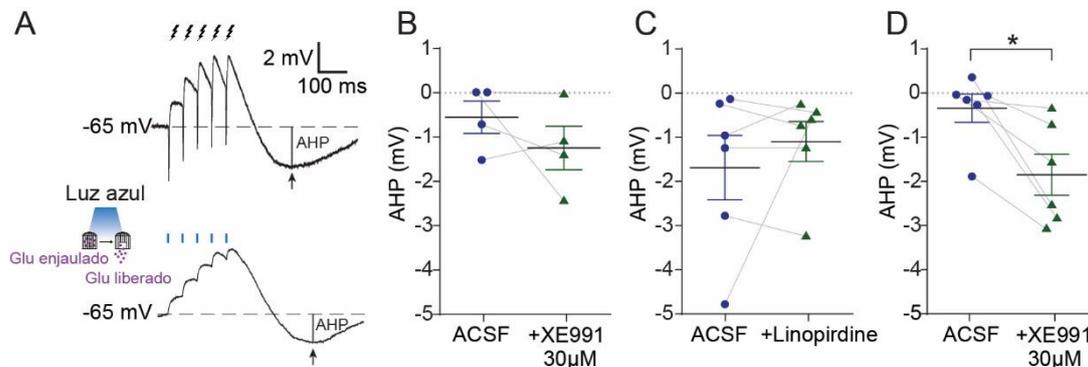


Figura r28. La AHP no se ve reducida por el bloqueo de canales K_v7 . **A:** Registros donde se muestra la medición de la AHP luego de un tren de EPSP generados por estimulación eléctrica (arriba) o por liberación de glutamato (abajo). **B-D:** Comparación de la AHP antes y después del agregado de XE991 (B) o linopirdine (C) para el protocolo de estimulación eléctrica, y antes y después del agregado de XE991 para el protocolo de liberación de glutamato (D). B-D: prueba de T pareada: * $p=0.0175$. Los círculos/triángulos corresponden a células individuales.

Estos resultados confirman que los canales K_v7 localizados en las ICE, contribuyen a limitar la sumación temporal de EPSP, e indican que la AHP que sigue a un tren de EPSP depende principalmente de otras corrientes, lo que resulta consistente con resultados de trabajos previos (Goldberg y Wilson, 2005; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016; Wilson y Goldberg, 2006). El aumento de la AHP luego del bloqueo de canales K_v7 en los experimentos de liberación de glutamato podría deberse a que una mayor despolarización alcanzada luego del agregado de XE991 recluta corrientes adicionales que amplifican la AHP que sigue al tren de pulsos.

6.3 Las ICE poseen una gran reserva funcional de canales K_v7

Los datos presentados hasta el momento indican que los canales K_v7 presentes en las ICE contribuyen a la integración temporal de EPSP subumbrales. Sin embargo, es llamativa la falta de efecto del bloqueo de estos canales en la respuesta a pulsos despolarizantes supraumbrales aplicados en el soma dada la alta expresión de tres de las subunidades detectadas mediante inmunohistoquímica (Paz et al., 2018). Para evaluar si una mayor disponibilidad de corrientes mediadas por canales K_v7 en las ICE puede contribuir a limitar la respuesta a estímulos supraumbrales y la actividad espontánea, se estudiaron los efectos de un fármaco abridor de canales K_v7 , retigabina (Figura r29A).

El agregado de retigabina ($10\mu\text{M}$) al ACSF disminuyó marcadamente la respuesta de las ICE a inyecciones despolarizantes de corriente, evidenciado como una disminución en el número de potenciales de acción en respuesta a pulsos de corriente despolarizante de 1 segundo,

mientras que XE991 bloqueó completamente el efecto de la retigabina (Figura r29B-C). Por otro lado, el agregado de retigabina disminuyó la frecuencia de disparo espontánea en registros en configuración *cell-attached* mientras que el XE991 la restauró (Figura r29D-E). Los resultados de estos experimentos indican que las ICE poseen canales K_v7 disponibles en la membrana con la capacidad de ser reclutados para contribuir a modular la excitabilidad somática y la frecuencia de disparo espontáneo de las ICE.

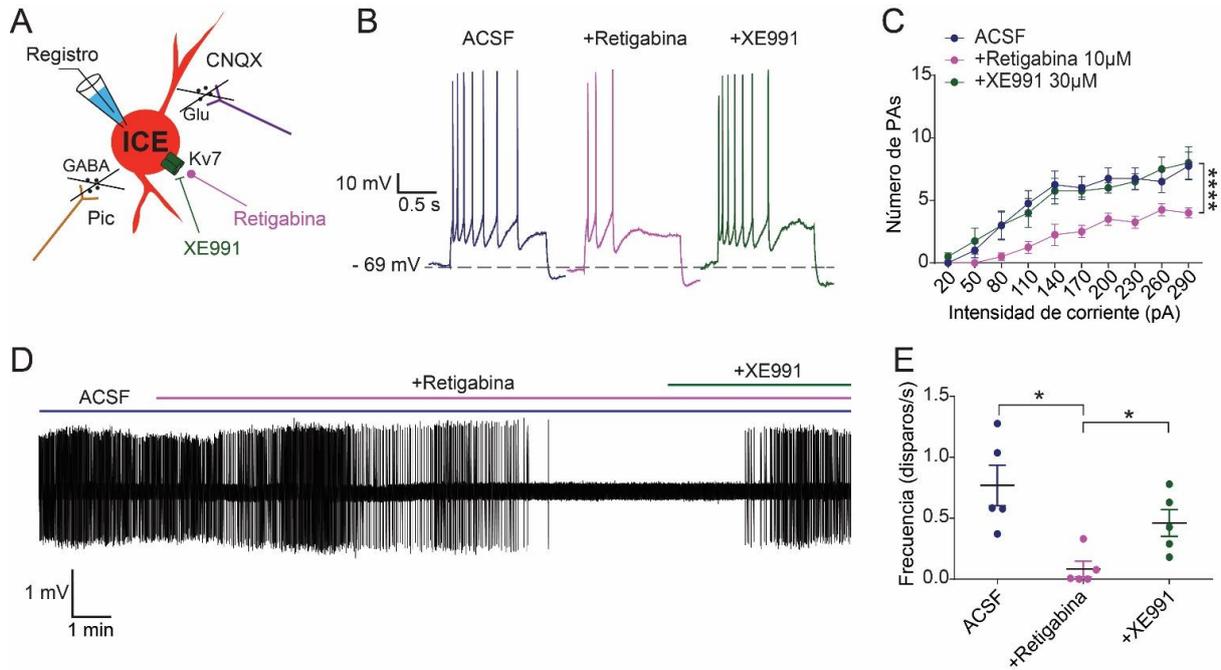


Figura r29. Retigabina disminuye la excitabilidad de las ICE y su actividad tónica espontánea. **A:** Esquema de una ICE indicando la acción del abridor (retigabina) y bloqueante (XE991) de canales K_v7 . **B:** Respuesta de una ICE a un pulso despolarizante de 140pA antes y después del agregado de retigabina (10μM) y XE991 (30μM). **C:** Número de potenciales de acción en respuesta a diferentes intensidades de pulso de corriente antes y después del agregado de retigabina y XE991. ANOVA de dos vías, interacción significativa, comparaciones post-hoc (pulso 290pA): **** $p < 0.0001$, N=4 células de 3 animales. **D:** Registro representativo en configuración *cell-attached* de la actividad espontánea de una ICE luego del agregado secuencial de retigabina y XE991. **E:** Comparación de la frecuencia promedio de disparo de ICE antes y después del agregado secuencial de retigabina y XE991. ANOVA de una vía con medidas repetidas, comparaciones post-hoc: * $p < 0.05$. N=5 células de 3 animales.

6.4 Los AINEs disminuyen la excitabilidad de las ICE por un mecanismo independiente de K_v7

Los AINEs se han descrito como abridores o bloqueantes de canales K_v7 dependiendo de las subunidades que componen al canal. Los canales compuestos por subunidades $K_v7.2$, $K_v7.3$ y $K_v7.4$ son susceptibles a ser abiertos por los AINEs, mientras que los $K_v7.5$ son bloqueados (Brueggemann et al., 2011; Peretz et al., 2005). Para evaluar si los AINEs son capaces de modificar la excitabilidad y actividad espontánea de las ICE por su acción sobre canales K_v7 , se evaluó la respuesta a pulsos de corriente despolarizante y la actividad tónica espontánea antes y después del agregado de diclofenac o ácido meclofenámico (MFA)

(Figura r30A). Ambos AINEs disminuyeron significativamente la excitabilidad somática y el diclofenac disminuyó la actividad espontánea de las ICE. Sin embargo, la aplicación de XE991 luego del agregado de diclofenac o de MFA no logró revertir estos efectos (Figura r30B-G). Estos resultados sugieren que los AINEs regulan la excitabilidad y actividad espontánea de las ICE por un mecanismo independiente (al menos en parte) de su acción sobre canales K_v7 .

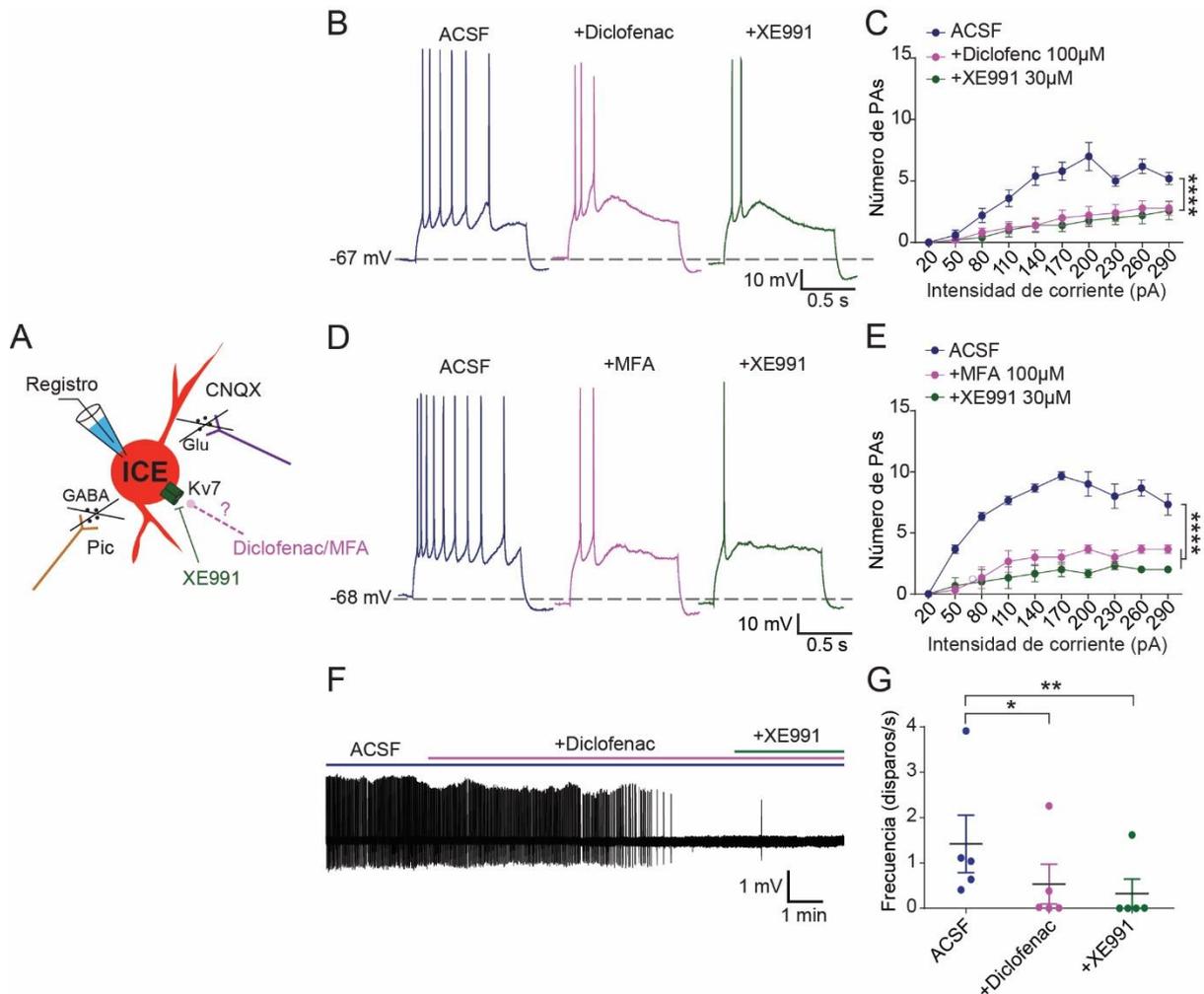


Figura r30. XE991 no revierte los efectos de los AINEs. **A:** Esquema de una ICE bajo la acción de diclofenac/MFA y XE991. **B:** Registros representativos de ICE en respuesta a un pulso de corriente de 140pA antes y después del agregado secuencial de diclofenac (100µM) y XE991 (30µM). **C:** Número de potenciales de acción en función de la intensidad de pulso de corriente despolarizante antes y después del agregado de diclofenac y XE991. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción significativa, comparaciones post-hoc (pulso 290pA): **** $p < 0.0001$, $n = 5$ células. **D:** Registros representativos de ICE en respuesta a un pulso de corriente de 140pA antes y después del agregado secuencial de ácido meclofenámico (MFA, 100µM) y XE991 (30µM). **E:** Número de potenciales de acción en función de la intensidad de pulso de corriente despolarizante antes y después del agregado de MFA y XE991. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción significativa, comparaciones post-hoc (pulso 290pA): **** $p < 0.0001$, $n = 3$ células. **F:** Registro en *cell-attached* de la actividad espontánea de una ICE antes y después del agregado secuencial de diclofenac y XE991. **G:** Comparación de la frecuencia promedio de disparo de ICE antes y después del agregado secuencial de diclofenac y XE991. ANOVA de una vía con medidas repetidas, comparaciones post-hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Cada círculo corresponde a una célula.

6.5 Conclusión Capítulo III

En este Capítulo se estudió el rol de los canales de potasio dependientes de voltaje K_v7 en la excitabilidad y actividad espontánea intrínseca de las ICE. Si bien las ICE expresan varias subunidades de canales K_v7 , bloquearlos no tuvo efectos sobre la respuesta a inyecciones somáticas de corriente despolarizante ni sobre la actividad espontánea, aunque sí limitan las respuestas subumbrales a entradas sinápticas glutamatérgicas. Sin embargo, la apertura farmacológica de canales K_v7 disminuyó marcadamente la respuesta a inyecciones de corriente y la frecuencia de disparo espontánea, indicando que la gran reserva de canales K_v7 presentes en las ICE son funcionales y susceptibles a ser regulados. *In vivo*, esta regulación probablemente dependa de la acción de neuromoduladores sobre receptores metabotrópicos que regulan la vía de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) necesaria para la apertura de estos canales (Zaydman y Cui, 2014). Además, se encontró que los AINEs reducen la excitabilidad y actividad espontánea de las ICE, aunque por un mecanismo independiente de canales K_v7 . Así, tanto los AINEs como la retigabina aparecen como farmacología prometedora para reducir la actividad de las ICE en condiciones patológicas como en la EP, donde se encuentran hiperexcitables. Estos fármacos ya están aprobados por organismos reguladores como la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*) para uso como antiinflamatorios, en el caso de los AINEs, y como terapia anticonvulsionante en el caso de la retigabina (Large et al., 2012), lo que podría acelerar su transferencia para uso clínico en la EP.

DISCUSSION

7 DISCUSION

7.1 Alteraciones intrínsecas de las ICE en la EP

Las ICE tienen un rol crítico en el funcionamiento de los circuitos estriatales y estudios recientes demostraron que cambios en la actividad de estas interneuronas contribuyen a generar los síntomas de la enfermedad de Parkinson y las discinesias inducidas por L-DOPA (Ding et al., 2011; Maurice et al., 2015; Tubert y Murer, 2020; Won et al., 2014). Sin embargo, las alteraciones fisiológicas de las ICE inducidas por un tratamiento crónico con L-DOPA no habían sido estudiadas, en particular en modelos de la EP avanzada, cuando las fluctuaciones motoras y las LID se vuelven seriamente debilitantes y es necesario el desarrollo de nuevas terapias.

En esta tesis se utilizaron registros en rodajas de cerebro para caracterizar la excitabilidad y actividad espontánea intrínseca de las ICE en un modelo animal de la EP que recibió un tratamiento crónico discinetogénico con L-DOPA. Se encontró que el tratamiento con L-DOPA induce hiperexcitabilidad y actividad espontánea con patrón oscilatorio “salva-pausa” en las ICE de ratones parkinsonianos. Luego se identificaron las corrientes involucradas en este patrón oscilatorio con protocolos de *voltaje clamp* selectivos combinados con farmacología y se modificaron estas corrientes en tiempo real con la técnica de *dynamic clamp*, logrando corregir la actividad patológica en células de animales discinéticos y generando patrones de actividad anormales en células de animales sanos. Los resultados de estos experimentos concluyeron que las ICE oscilatorias presentan mayores corrientes *inward-rectifier* (I_{Kir}) y menores corrientes de *leak* (I_{Leak}), y que una mayor influencia de I_{Kir} mediada muy probablemente por canales Kir2.2 es responsable del comportamiento oscilatorio (Figura d1).

Se reconoce que los canales Kir2 generalmente contribuyen a mantener el potencial de membrana, la resistencia de entrada y limitar la suma temporal de entradas sinápticas excitatorias (Day et al., 2005; Shen et al., 2007). Sin embargo, en determinadas condiciones, como en presencia de niveles apropiados de I_h y de I_{Leak} , los canales Kir2 pueden contribuir a generar oscilaciones del potencial de membrana (Amarillo et al., 2014, 2018; Wilson, 2005). Los datos de esta tesis indican que canales formados por la subunidad Kir2.2 son los candidatos más probables a mediar las oscilaciones dada su sensibilidad a bajas concentraciones de bario y su prominente rectificación que da lugar a una zona con pendiente negativa en la curva I-V (Dhamoon et al., 2004; Hibino et al., 2010). Por otro lado, la identidad de I_{Leak} en las ICE es aún desconocida. Aunque las ICE expresan canales de *leak* de potasio TASK-3 (Berg y Bayliss, 2007), la I_{Leak} reportada aquí parecería depender de Na^+ y K^+ , dado su potencial de reversión. Un candidato probable a mediar esta corriente son los canales HCN. Los canales HCN2 conducen una corriente instantánea con comportamiento

óhmico de *leak* (además de la conocida corriente I_h de activación lenta) (Biel et al., 2009; Proenza et al., 2002) que también es sensible a cAMP (Proenza et al., 2002). Es probable entonces que los canales HCN2 contribuyan a I_{Leak} en las ICE dado que se expresan en estas neuronas (Santoro et al., 2000; Zhao et al., 2016).

Por otro lado, los mecanismos de regulación de I_{Kir} en las ICE no se conocían. Se demostró que la estimulación de receptores para dopamina D1/D5 incrementa I_{Kir} e induce actividad oscilatoria en ICE de ratones control. La exposición a agonistas D1/D5 también incrementa la respuesta a pulsos de corriente despolarizante en ICE de animales control, volviendo a estas células muy parecidas en cuanto a su perfil de actividad a las ICE de animales discinéticos. Si bien la estimulación D1/D5 reproduce todos los efectos del tratamiento crónico con L-DOPA, el bloqueo de receptores D1/D5 no revierte la hiperexcitabilidad y actividad oscilatoria ya establecida en ICE de ratones discinéticos, sugiriendo que estos cambios no son causados por la presencia de dopamina remanente durante los experimentos, sino que responderían a alteraciones plásticas inducidas por el tratamiento crónico con L-DOPA. Se conoce que los receptores para dopamina de tipo D5, presentes en las ICE, exhiben una significativa actividad constitutiva (actividad en ausencia de dopamina) que se relaciona con los niveles de expresión del receptor D5 y producen acumulación intracelular de cAMP dependiente del tiempo (Tiberi y Caron, 1994; Zhang et al., 2014), y un trabajo reciente encontró un aumento de la expresión del receptor D5 en tejido estriatal de animales discinéticos (Castello et al., 2020). Sobre esta base, cabe hipotetizar que una mayor expresión del receptor D5 en ICE de ratones discinéticos podría resultar en una mayor actividad constitutiva, contribuyendo a generar el estado de hiperexcitabilidad y patrón de disparo oscilatorio. Si bien no fue abordado en los resultados de esta tesis, en experimentos realizados por la Dra. Cecilia Tubert en el laboratorio, se demostró que la vía de cAMP está involucrada en el aumento de excitabilidad y actividad oscilatoria en las ICE de ratones discinéticos (Paz et al., 2021) (Figura d1). Actualmente no existen técnicas que permitan medir la actividad constitutiva del receptor de manera directa. Una posibilidad para estudiarla de manera indirecta consiste en intervenir las cascadas de señalización río abajo del receptor, como por ejemplo la vía de cAMP, aunque otros receptores metabotrópicos también señalizan por esta vía. Alternativamente, existe fármacos que funcionan como agonistas inversos sobre receptores D1/D5 que disminuyen su actividad constitutiva (Martin et al., 2001). En particular, se ha descrito que algunos fármacos antipsicóticos tienen esta propiedad, aunque con poca especificidad, dado que tienen efectos adicionales sobre otros receptores (Tiberi y Caron, 1994; Zhang et al., 2014). Alternativamente, y considerando que la actividad constitutiva se relaciona con el nivel de expresión del receptor (Zhang et al., 2014) se puede estudiar si eliminar o silenciar el receptor D5 de las ICE reduce las discinesias y la actividad anormal de las ICE luego del tratamiento con L-DOPA. Un estudio reciente encontró que la inyección intraestriatal de ARN de interferencia dirigida contra el gen *Ddr5* (que codifica para el receptor D5) reduce las discinesias en ratas parkinsonianas (Wang et al., 2021), aunque esta manipulación no es

especifica de interneuronas colinérgicas. El uso de vectores virales que dirijan la expresión de la recombinasa cre selectivamente en las ICE de ratones donde el único exón del receptor D5 está flanqueado por sitios loxP (Sariñana et al., 2014) es una alternativa que tiene la ventaja de poder eliminar el receptor con selectividad de tipo neuronal, temporal y espacial.

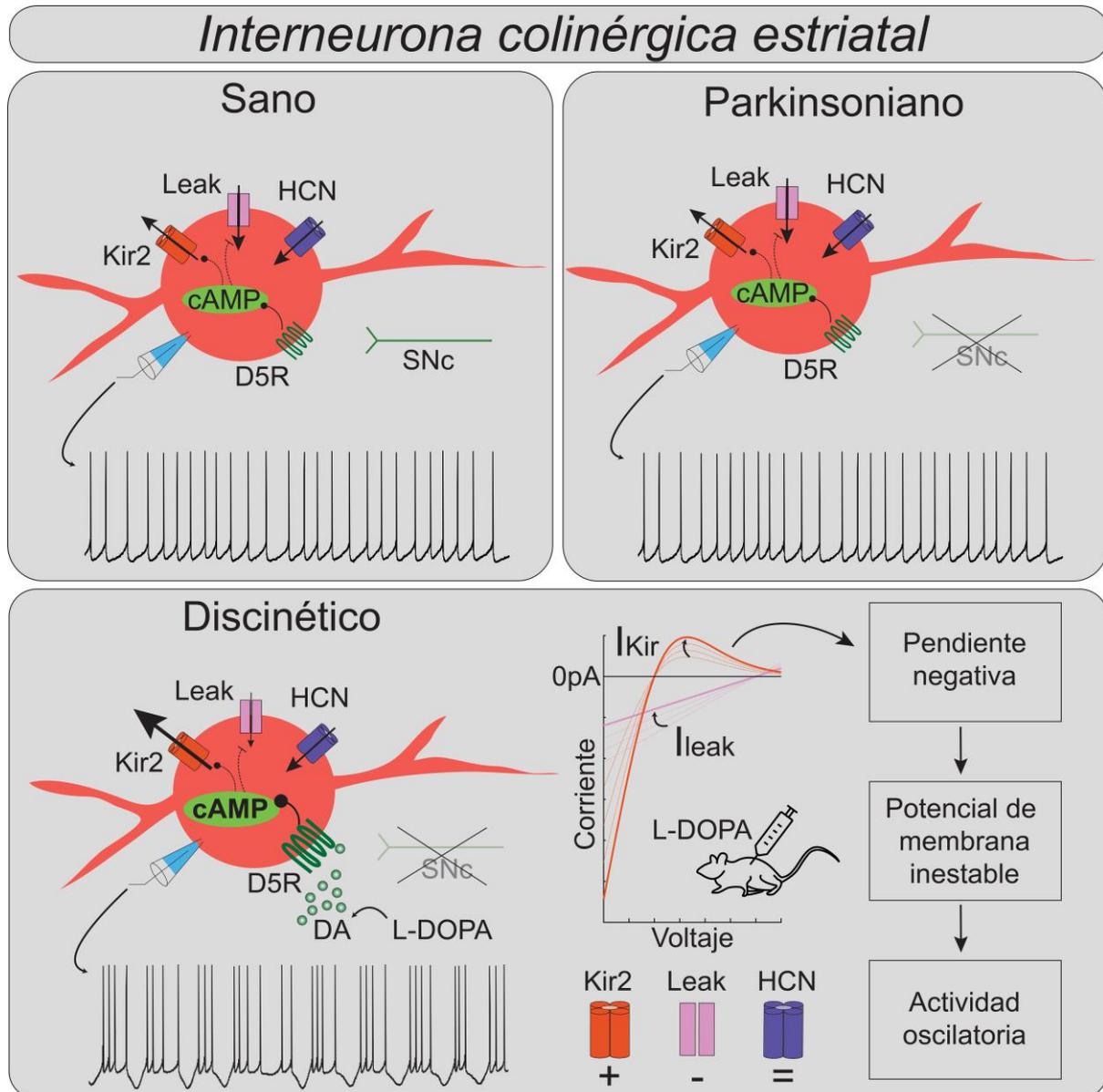


Figura d1. Resumen de los mecanismos involucrados en el aumento del patrón oscilatorio salva-pausa en las ICE de ratones discinéticos. Arriba: en el raton sano, la actividad normal del receptor D5 (que señala vía cAMP) resulta en niveles fisiológicos de corrientes Kir y leak conduciendo a un patrón de actividad espontanea regular que no es modificado por la degeneración de células dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNc). Abajo: luego de un tratamiento crónico con L-DOPA que indujo discinesias, la mayor actividad independiente de ligando de la vía D5-cAMP conduce a un desbalance de las corrientes Kir y leak, permitiendo la aparición de una zona con pendiente negativa en la curva I-V que causa un patrón oscilatorio salva-pausa anormal en las ICE.

Finalmente, resta esclarecer los mecanismos iónicos involucrados en el aumento de la excitabilidad medida como respuesta a inyecciones de corriente despolarizante. Tubert et al. (2016) demostraron que una disminución en la corriente mediada por canales $K_v1.3$ es responsable de la hiperexcitabilidad de las ICE en ratones parkinsonianos nunca expuestos a la L-DOPA. En esta tesis se encontró que el tratamiento con L-DOPA exacerba esta hiperexcitabilidad, pero no se identificaron las corrientes que subyacen a este cambio. Resultados no publicados de Cecilia Tubert sugieren que una reducción aún mayor de la corriente mediada por canales $K_v1.3$ sería causante de esta hiperexcitabilidad y que esta corriente es modulada por la vía de D5-cAMP. Así, los canales $K_v1.3$ se convierten en otro potencial blanco molecular para controlar la actividad patológica de las ICE en la EP y en las LID.

7.2 Posibles consecuencias circuitales de los cambios intrínsecos de las ICE en la EP

7.2.1 Plasticidad córticoestriatal y excitabilidad de las NEM

Se reconoce que alteraciones en la plasticidad córticoestriatal contribuyen al desbalance de las vías de salida del estriado que causa los síntomas motores de la EP. En este sentido, las ICE tienen un rol clave. Durante el período “off” L-DOPA, la actividad en salvas de las ICE podría aumentar la inhibición de la producción de endocannabinoides (eCB) por sobreestimulación del receptor M1 en las iNEM (Kreitzer y Malenka, 2005, 2007; Wang et al., 2006), bloqueando la LTD en las sinapsis glutamatérgicas sobre las iNEM, que exhiben LTD dependiente de eCB. De hecho, es posible reestablecer la LTD inhibiendo a las ICE (Augustin y Lovinger, 2018; Calabresi et al., 2014; Wang et al., 2006). Además, la estimulación de receptores M1 permite la inducción de LTP sobre las sinapsis córticoestriatales (Calabresi et al., 1999). Si bien tanto las dNEM como las iNEM expresan receptores M1, las iNEM son más moduladas por estos receptores, en especial en modelos de la EP (Shen et al., 2007). Así, las ICE podrían contribuir mediante este mecanismo a la falta de LTD en las iNEM característico de la EP. Asimismo, los receptores M1 reducen corrientes $Kir2$, K_v7 y K_v4 , aumentando la excitabilidad de las NEM (Day et al., 2008; Howe y Surmeier, 1995; Lv et al., 2017; Pérez-Ramírez et al., 2015; Perez-Rosello et al., 2005; Shen et al., 2007; Xiang et al., 2012) lo que proporciona otro mecanismo por el cual las ICE contribuirían al desbalance de las vías de salida del estriado en la EP. Por otro lado, la activación de receptores nicotínicos presinápticos también puede contribuir al desbalance a favor de las iNEM (McGehee et al., 1995). De hecho, en modelos animales de la EP, las ICE amplifican la excitación tálamoestriatal sobre las iNEM mediante la activación de receptores nicotínicos localizados en las aferencias tálamoestriatales (Tanimura et al., 2019).

Por otra parte, la activación de receptores M4, localizados preferentemente en las dNEM (Bernard et al., 1992; Kreitzer y Malenka, 2007), tiene efectos antagónicos al receptor D1 sobre la señalización por cAMP en las dNEM (Bonsi et al., 2008; Shen et al., 2015; Xue et al.,

2015). Niveles relativamente bajos de acetilcolina son capaces de atenuar el aumento de cAMP inducido por la activación del receptor para dopamina D1 en las dNEM (Nair et al., 2019), sugiriendo que la activación tónica del receptor M4 bloquea la señalización dopaminérgica sobre las dNEM. De esta manera, las pausas de las ICE representarían una ventana temporal para la señalización mediada por receptores D1. Durante el periodo “on” L-DOPA, el aumento de pausas de las ICE podría facilitar la activación de cascadas dependientes de cAMP mediadas por activación del receptor D1, resultando en LTP anormal e hiperactividad de las dNEM que causan las LID (Cenci, 2014; Darmopil et al., 2009; Espay et al., 2018). En línea con esta hipótesis, la potenciación de la señalización M4 restaura la plasticidad normal de las sinapsis glutamatérgicas sobre las dNEM y reduce las LID (Shen et al., 2015). Por otro lado, a medida que los niveles de L-DOPA caen, la menor activación del receptor D1 podría ser insuficiente para contrarrestar el efecto inhibitorio del M4 durante las salvas de las ICE, lo que limitaría el efecto terapéutico de la L-DOPA y aceleraría la transición al estado “off”. De hecho, los antagonistas M4 administrados junto con la L-DOPA extienden la duración de los efectos de la L-DOPA (Chambers et al., 2019).

7.2.2 Liberación de dopamina

La activación sincrónica de las ICE mediada por excitación glutamatérgica aferente de la corteza o del tálamo es capaz de inducir la liberación de dopamina por activación de receptores nicotínicos localizados en las terminales dopaminérgicas presinápticas (Kosillo et al., 2016; Threlfell et al., 2012). En etapas tempranas de la EP, las terminales dopaminérgicas remanentes almacenan la L-DOPA y liberan dopamina de manera controlada. Sin embargo, en etapas tardías con avanzada neurodegeneración, la conversión de L-DOPA a dopamina ocurre principalmente en las aferencias estriatales serotoninérgicas que no cuentan con los mecanismos de regulación para la liberación de dopamina y la liberan de forma descontrolada (Lindgren et al., 2010; Mosharov et al., 2015). Estas terminales también poseen receptores nicotínicos que inducen la liberación de serotonina (Takahashi et al., 1998) y antagonizar o desensibilizar los receptores nicotínicos durante el periodo “on” L-DOPA es capaz de atenuar la liberación de dopamina y reducir las discinesias en modelos animales (Bordia et al., 2013; Bordia y Perez, 2019; Zhang et al., 2015). Así, es posible especular que la hiperexcitabilidad de las ICE reportada en esta tesis podría volverlas más susceptibles a ser sincronizadas por aferencias excitatorias (Tubert et al., 2016) y de esta manera podrían contribuir a la liberación anormal de dopamina durante el periodo “on” L-DOPA.

7.2.3 Plasticidad estructural

Luego de la degeneración dopaminérgica, se han encontrados marcados cambios estructurales en las NEM que son además afectados por el tratamiento con L-DOPA (Day et al., 2006; Fieblinger et al., 2018; Shen et al., 2007; Suárez et al., 2014). En particular, las iNEM se podan de espinas luego de la denervación dopaminérgica (Day et al., 2006) y se ha propuesto que este podado responde a adaptaciones homeostáticas para compensar la

hiperexcitabilidad inducida por sobreestimulación del receptor de acetilcolina M1 (Shen et al., 2007). Esto sugiere que las alteraciones en la actividad de las ICE podrían inducir cambios plásticos estructurales adicionales al efecto directo de las ICE en el circuito.

7.2.4 Actividad anormal de la red

Como se describió en la introducción de esta tesis, en la EP ocurren cambios en la sincronización del circuito corteza-ganglios basales-tálamo (CBT) que resultan en un aumento de los ritmos beta (Brown, 2007; Kühn et al., 2006, 2008; Little et al., 2012; Sharott et al., 2005). Sobre esta base, estudios recientes reportaron que la infusión intraestriatal de acetilcolina en ratones sanos aumenta la potencia de ritmos beta en el estriado y en corteza motora (Pittman-Polletta et al., 2018) y que la activación selectiva de las ICE induce parkinsonismo y aumento de ritmos beta mediante su acción sobre receptores muscarínicos (Kondabolu et al., 2016). Estos estudios sugieren que las alteraciones en las ICE podrían contribuir a los cambios patológicos en la sincronización del circuito CBT observados en la EP.

7.3 Reinterpretación del estado hipercolinérgico

El uso de antagonistas de receptores muscarínicos (anticolinérgicos) estaba muy extendido antes de la aparición de la L-DOPA como tratamiento antiparkinsoniano (Barbeau, 1962). Aunque su uso clínico actual se ve limitado por su menor eficacia relativa a la L-DOPA y por sus efectos adversos por acción sobre sitios colinérgicos extraestriatales (Bohnen et al., 2009, 2012), los anticolinérgicos presentan eficacia terapéutica comprobada (Katzenschlager et al., 2003; Lang y Lees, 2002). Sin embargo, dada su baja especificidad, no está claro sobre qué tipo de receptor muscarínico ejercen sus efectos.

Si bien históricamente se consideró que la degeneración dopaminérgica conduce a aumentos en el tono colinérgico estriatal (estado hipercolinérgico), los resultados de esta tesis indican que la señalización colinérgica en el estriado parece volverse mucho más compleja luego del tratamiento crónico con L-DOPA dado que en estas condiciones las ICE presentan un patrón de actividad en salva-pausa que podría dar lugar a variaciones alternantes de acetilcolina estriatal. Un estudio reciente reportó que la activación optogenética de las ICE puede aumentar o disminuir las discinesias dependiendo del patrón de estimulación: pulsos cortos de luz empeoran las LID mientras que pulsos largos las alivian (Bordia et al., 2016), indicando que más que cambios netos en los niveles de acetilcolina estriatal, es la temporalidad en la liberación de acetilcolina lo que resultaría crucial en la manifestación de síntomas motores. En este contexto, teniendo en cuenta los resultados de esta tesis y la revisión bibliográfica expuesta en aquí, es posible realizar una reinterpretación de la hipótesis del estado hipercolinérgico que permita explicar los mecanismos de acción de los antagonistas muscarínicos y concilie resultados de la literatura que hasta ahora parecían contradictorios (Ding et al., 2011; Shen et al., 2015; Won et al., 2014).

7.3.1 Posibles sitios de acción de los anticolinérgicos

Durante el período “off” L-DOPA, cuando los niveles de DA son bajos, el desbalance DA-ACh (a favor de la ACh) ocurriría durante las salvas de las ICE contribuyendo a la acinesia, mientras que durante el periodo “on” L-DOPA, cuando los niveles de DA son altos, el desbalance DA-ACh (a favor de la DA) ocurriría durante las pausas de las ICE, causando las LID (Figura d2). Así, los efectos de los anticolinérgicos durante estos dos periodos podrían deberse a receptores distintos con diferentes localizaciones (Figura d2).

En el periodo “off” L-DOPA, caracterizado por un desbalance a favor de la vía indirecta, el receptor M1 localizado en las iNEM parece un blanco probable que podría explicar los efectos terapéuticos de los anticolinérgicos, dado que antagonizar estos receptores reduciría la hiperexcitabilidad de las iNEM (Shen et al., 2007) y restauraría la LTD de las sinapsis córticoestriatales sobre las iNEM (Kreitzer y Malenka, 2007; Shen et al., 2008; Wang et al., 2006). En efecto, el bloqueo de receptores M1 en las iNEM alivia los síndromes parkinsonianos inducidos por antipsicóticos en modelos animales (Kharkwal et al., 2016).

Por otro lado, el bloqueo de receptores M4 (localizado en las dNEM) podría facilitar la acción de la dopamina sobre las dNEM (Nair et al., 2019), en particular durante el periodo “off” L-DOPA, cuando los niveles de dopamina son bajos, mecanismo que sustentaría la potenciación del efecto de la L-DOPA en presencia de anticolinérgicos (Birket-Smith, 1975). En resumen, durante el estado “off” L-DOPA, el efecto antiaquinético de los anticolinérgicos sería mediado por receptores M1 localizados en las iNEM, mientras que la potenciación del efecto terapéutico de la L-DOPA dependería del bloqueo de receptores M4 en las dNEM (Figura d2).

Por otro lado, mientras que la administración de anticolinérgicos también puede empeorar las discinesias cuando son administrados junto con la L-DOPA (Birket-Smith, 1975; Lang y Lees, 2002), potenciar la señalización colinérgica endógena es capaz de aliviarlas (Birket-Smith, 1974; Shen et al., 2015), indicando que durante el periodo “on” L-DOPA la acetilcolina tendría efectos antidiscinéticos (Chambers et al., 2019; Jackson et al., 2014; Shen et al., 2015) y los receptores M4 localizados en las dNEM tendrían un papel crucial (Shen et al., 2015). En estas condiciones, los anticolinérgicos administrados durante el periodo “on” L-DOPA exacerbarían el efecto de las pausas de las ICE, facilitando aún más la respuesta de las dNEM a la dopamina (anormalmente liberada) al bloquear los receptores M4, promoviendo la hiperactividad patológica de las dNEM que causa las discinesias (Figura d2).

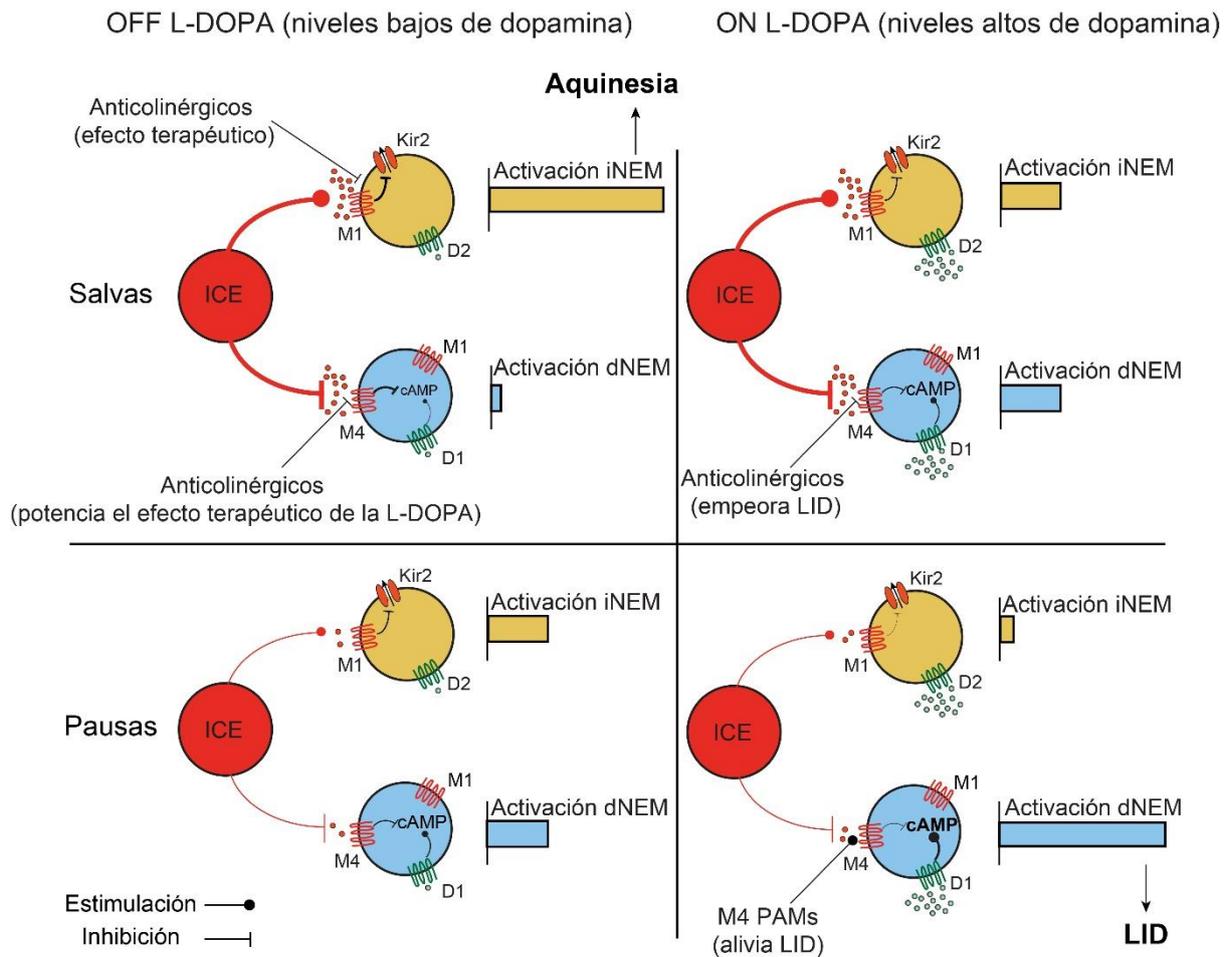


Figura d2. Posible contribución de la actividad en salva-pausa de las ICE a los síntomas de la EP y las LID, y blancos probables de los anticolinérgicos. Durante el periodo “off” L-DOPA, la actividad en salvas de las ICE contribuiría a la hiperactividad de las iNEM por estimulación de receptores M1 (arriba, izquierda) y los anticolinérgicos tendrían efectos terapéuticos mediante su acción sobre los receptores M1 y M4 localizados en las iNEM y las dNEM respectivamente. Durante el periodo “on” L-DOPA, las pausas de las ICE disminuirían la activación del receptor M4, permitiendo el aumento anormal de cAMP de las dNEM en respuesta a la dopamina y promoviendo las LID (abajo, derecha). La liberación endógena de acetilcolina durante las salvas tendría efectos antidiscinéticos al activar el receptor M4 y contrabalancear la excitación de las dNEM mediada por la dopamina (arriba, derecha). Los anticolinérgicos administrados en estas condiciones empeorarían las LID por el bloqueo de receptores M4 en las dNEM. Por el contrario, potenciar la señalización M4 mediante la administración de moduladores alostéricos positivos (PAMs, *positive allosteric modulators*) (Shen y col., 2015) podría reducir los efectos prodiscinéticos de las pausas de las ICE.

7.3.2 Restaurar la actividad de las ICE como alternativa terapéutica a la administración de anticolinérgicos

En conjunto, lo anteriormente expuesto sugiere que aproximaciones dirigidas a restaurar la actividad normal de las ICE tanto durante los periodos “on” como “off” L-DOPA podrían tener importantes ventajas terapéuticas sobre el uso de anticolinérgicos. En este sentido, resultados de este y otros trabajos recientes indican que los receptores D5 localizados en las ICE representan un blanco terapéutico prometedor. Además de mediar el aumento de hiperexcitabilidad y actividad oscilatoria de las ICE reportados aquí, los receptores D5 son

responsables del aumento de marcadores de actividad celular en las ICE, como pERK y p-*rpS6*, inducidos por el tratamiento con L-DOPA (Castello et al., 2020). Asimismo, disminuir la expresión del receptor D5 en el estriado reduce las discinesias (Wang et al., 2021). Si bien resta determinar si las ICE presentan mayor expresión del D5 luego del tratamiento con L-DOPA y si esto conduce a mayor actividad constitutiva de este receptor, estos estudios revelan una importante contribución del receptor D5 en las discinesias inducidas por L-DOPA y remarcan la necesidad de desarrollar farmacología dirigida específicamente a este receptor.

Por otro lado, herramientas dirigidas a los canales Kir2.2 y/o de *leak* que restauren el balance entre estas dos corrientes podría representar una alternativa terapéutica que reestablezca la actividad normal de las ICE. En este contexto, los resultados de este trabajo adquieren particular relevancia en vista de un estudio reciente que demostró que la amantadina, el único tratamiento farmacológico aprobado para atenuar las LID (Fox et al., 2018; Verhagen Metman et al., 1998), produce su efecto antidiscinético mediante el bloqueo de canales Kir2 y no mediante el bloqueo de receptores NMDA como se pensaba anteriormente (Shen et al., 2020). Shen et al., demostraron que la amantadina bloquea canales Kir2 en las iNEM, lo que resulta en una potenciación de las sinapsis glutamatérgicas sobre estas células y contribuye a disminuir las LID. Aunque no es abordado por los autores, el efecto antidiscinético de la amantadina podría depender (al menos en parte) del bloqueo de los canales Kir2 de las ICE. Llamativamente, la amantadina no sólo reduce las discinesias, sino que también tiene efectos terapéuticos sobre la aquinesia y la rigidez (Schwab et al., 1969), y sobre la severidad y duración de los periodos “off” L-DOPA en pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada y fluctuaciones motoras.

En conclusión, el desarrollo de herramientas que permitan controlar la actividad de las ICE y en particular intervenciones dirigidas a canales Kir2, canales de *leak* y la vía de señalización mediada por receptores D5 podrían representar nuevas alternativas terapéuticas para tratar los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson durante el periodo “off” y “on” L-DOPA.

7.4 Canales K_v7 como blancos alternativos para regular la actividad de las ICE

En el Capítulo III de esta tesis se caracterizó la contribución de canales K_v7 a la excitabilidad y actividad espontánea de las ICE con el objetivo último de identificar blancos moleculares alternativos para modular la actividad de las ICE en condiciones patológicas. Se utilizó una batería de bloqueantes de canales K_v7 para demostrar que estos canales no contribuyen a la respuesta a pulsos de corriente en cuanto a tasa de disparos y magnitud de la sAHP en las ICE. Sin embargo, el abridor de canales K_v7, retigabina, redujo drásticamente la excitabilidad y la frecuencia de disparo espontánea de las ICE, demostrando que estas células tienen una gran reserva funcional de canales K_v7 susceptibles de ser reclutados farmacológicamente.

Por otro lado, los datos expuestos muestran que los canales K_v7 limitan la suma temporal de EPSP evocados por estimulación eléctrica de aferencias estriatales. Si bien en otros tipos neuronales se ha descrito que los canales K_v7 pueden modular la respuestas subumbrales a EPSP mediante efectos pre- y post-sinápticos (Hönigsperger et al., 2015; Hu et al., 2007; Pérez-Ramírez et al., 2015; Shen et al., 2005), la suma de EPSP inducidos por la liberación de glutamato enjaulado se ve aumentada al bloquear canales K_v7 , lo que confirma que los canales K_v7 localizados en las ICE limitan la suma temporal de EPSP. Curiosamente, la amplitud de la AHP que sigue al tren de EPSP no cambia o incluso se intensifica en lugar de reducirse luego del bloqueo de canales K_v7 , probablemente debido a que una mayor despolarización durante un tren de EPSP logra reclutar con más intensidad las corrientes que median la AHP. Estos resultados son consistentes con estudios previos del laboratorio que muestran que la AHP que sigue a un tren de EPSP depende en gran parte de canales $K_v1.3$ en las ICE y sugieren que la regulación de diferentes canales K_v controlan la integración de EPSP y la AHP que le sigue de manera parcialmente independiente (Tubert et al., 2016).

La integración de EPSP puede influir sobre la respuesta de las ICE ante estímulos ambientales salientes. Como se describió en la introducción de esta tesis, durante el aprendizaje de tipo instrumental las ICE desarrollan respuestas a estímulos salientes que consisten en una rápida y corta excitación seguida por una pausa en su actividad que dura alrededor de 200ms y es usualmente seguida de un rebote de actividad (Aosaki et al., 1994a; Kimura et al., 1984). Asimismo, mientras que la rápida respuesta excitatoria inicial depende de la descarga glutamatérgica de aferentes tálamoestriatales (Matsumoto et al., 2001), los mecanismos que median la pausa que le sigue aún son sujeto de debate (Tubert y Murer, 2020) (ver Introducción, Figura i6). Una de las hipótesis propone que esta excitación inicial reclutaría corrientes de K^+ de activación lenta cuya activación prolongada en el tiempo produciría una hiperpolarización comparable con la sAHP que podría mediar la pausa (Reynolds et al., 2004). En vista de ello, los resultados de esta tesis muestran que los canales K_v7 son reclutados durante la suma de EPSP y contribuyen a limitar la despolarización, pero no contribuyen significativamente a la sAHP, indicando que estos canales podrían contribuir a limitar la excitación inicial de las ICE en respuesta a estímulos salientes y que otros canales, como los $K_v1.3$ y K_{ca} serían más determinantes en moldear la pausa que sigue a la excitación (Goldberg y Wilson, 2005; Tubert et al., 2016).

Finalmente, con la perspectiva de identificar farmacología utilizada en la clínica para modular la actividad de las ICE, se evaluó el efecto de los AINEs, como el diclofenac y el MFA, sobre la excitabilidad y frecuencia de disparo espontánea de las ICE considerando que los AINEs se comportan como abridores o bloqueantes de canales K_v7 dependiendo de las subunidades que conforman el canal (Brueggemann et al., 2011; Peretz et al., 2005). Si bien la aplicación de diclofenac o MFA reduce drásticamente la excitabilidad y la actividad tónica de las ICE, estos efectos no son revertidos por el bloqueante de canales K_v7 , XE991, sugiriendo que los AINEs modulan la actividad de las ICE por mecanismos independientes de canales K_v7 . Aunque no fue abordado en esta tesis, se han reportado efectos del diclofenac

sobre otros canales de membrana tanto a través de mecanismos directos como indirectos (Huang et al., 2013; Liu et al., 2005; Sun et al., 2017; Villalonga et al., 2010; Voilley et al., 2001). Por ejemplo, una vía dependiente de la ciclooxygenasa-1 (COX-1) activa corrientes I_h en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Sun et al., 2017), mecanismo que podría explicar parte del efecto del diclofenac y el MFA (que inhiben la COX-1) observado en esta tesis. En resumen, los datos presentados aquí señalan a los moduladores de canales K_v7 y a los AINEs como herramientas que permitirían reducir la actividad de las ICE en condiciones patológicas, como en la EP, donde las ICE presentan exacerbada hiperexcitabilidad y desregulación de su actividad espontánea.

En resumen, los resultados de esta tesis permiten entender mejor los efectos de la señalización colinérgica estriatal en la EP luego del tratamiento crónico con L-DOPA y sugieren que terapias dirigidas a reestablecer su actividad normal podrían tener importantes beneficios terapéuticos. Así, los receptores D5, los canales Kir y canales de *leak* aparecen como potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de la EP, mientras que los canales K_v7 surgen como blancos moleculares alternativos para controlar la actividad de las ICE.

8 REFERENCIAS

- Abudukeyoumu, N., Hernandez-Flores, T., Garcia-Munoz, M., y Arbuthnott, G.W. (2019). Cholinergic modulation of striatal microcircuits. *Eur. J. Neurosci.* *49*, 604-622.
- Alagem, N., Dvir, M., y Reuveny, E. (2001). Mechanism of Ba(2+) block of a mouse inwardly rectifying K+ channel: differential contribution by two discrete residues. *J. Physiol.* *534*, 381-393.
- Albin, R.L., Young, A.B., y Penney, J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* *12*, 366-375.
- Alcacer, C., Andreoli, L., Sebastianutto, I., Jakobsson, J., Fieblinger, T., y Cenci, M.A. (2017). Chemogenetic stimulation of striatal projection neurons modulates responses to Parkinson's disease therapy. *J. Clin. Invest.* *127*, 720-734.
- Alcantara, A.A., Mrzljak, L., Jakab, R.L., Levey, A.I., Hersch, S.M., y Goldman-Rakic, P.S. (2001). Muscarinic m1 and m2 receptor proteins in local circuit and projection neurons of the primate striatum: anatomical evidence for cholinergic modulation of glutamatergic prefronto-striatal pathways. *J. Comp. Neurol.* *434*, 445-460.
- Alcantara, A.A., Chen, V., Herring, B.E., Mendenhall, J.M., y Berlanga, M.L. (2003). Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat. *Brain Res.* *986*, 22-29.
- Aldrin-Kirk, P., Heuer, A., Rylander Ottosson, D., Davidsson, M., Mattsson, B., y Björklund, T. (2018). Chemogenetic modulation of cholinergic interneurons reveals their regulating role on the direct and indirect output pathways from the striatum. *Neurobiol. Dis.* *109*, 148-162.
- Alexander, G.E., DeLong, M.R., y Strick, P.L. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* *9*, 357-381.
- Amarillo, Y., Zagha, E., Mato, G., Rudy, B., y Nadal, M.S. (2014). The interplay of seven subthreshold conductances controls the resting membrane potential and the oscillatory behavior of thalamocortical neurons. *J. Neurophysiol.* *112*, 393-410.
- Amarillo, Y., Tiszone, A.I., Mato, G., y Nadal, M.S. (2018). Inward rectifier potassium current I(Kir) promotes intrinsic pacemaker activity of thalamocortical neurons. *J. Neurophysiol.* *119*, 2358-2372.
- Amini, B., Clark, J.W.J., y Canavier, C.C. (1999). Calcium dynamics underlying pacemaker-like and burst firing oscillations in midbrain dopaminergic neurons: a computational study. *J. Neurophysiol.* *82*, 2249-2261.
- Anumonwo, J.M.B., y Lopatin, A.N. (2010). Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 45-54.
- Aosaki, T., Tsubokawa, H., Ishida, A., Watanabe, K., Graybiel, A.M., y Kimura, M. (1994a). Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J. Neurosci.* *14*, 3969-3984.
- Aosaki, T., Graybiel, A.M., y Kimura, M. (1994b). Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science* *265*, 412-415.
- Aosaki, T., Kiuchi, K., y Kawaguchi, Y. (1998). Dopamine D1-like receptor activation excites rat striatal large aspiny neurons in vitro. *J. Neurosci.* *18*, 5180-5190.

- Apicella, P. (2002). Tonicly active neurons in the primate striatum and their role in the processing of information about motivationally relevant events. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 2017-2026.
- Assous, M. (2021). Striatal cholinergic transmission. focus on nicotinic receptors' influence in striatal circuits. *Eur. J. Neurosci.*
- Athalye, V.R., Carmena, J.M., y Costa, R.M. (2020). Neural reinforcement: re-entering and refining neural dynamics leading to desirable outcomes. *Curr. Opin. Neurobiol.* *60*, 145-154.
- Athauda, D., y Foltynie, T. (2015). The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* *11*, 25-40.
- Atherton, J.F., y Bevan, M.D. (2005). Ionic Mechanisms Underlying Autonomous Action Potential Generation in the Somata and Dendrites of GABAergic Substantia Nigra Pars Reticulata Neurons In Vitro. *J. Neurosci.* *25*, 8272-8281.
- Aubert, I., Guigoni, C., Håkansson, K., Li, Q., Dovero, S., Barthe, N., Bioulac, B.H., Gross, C.E., Fisone, G., Bloch, B., et al. (2005). Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann. Neurol.* *57*, 17-26.
- Augustin, S.M., y Lovinger, D.M. (2018). Functional Relevance of Endocannabinoid-Dependent Synaptic Plasticity in the Central Nervous System. *ACS Chem. Neurosci.* *9*, 2146-2161.
- Barbeau, A. (1962). The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can. Med. Assoc. J.* *87*, 802-807.
- Battfeld, A., Tran, B.T., Gavrilis, J., Cooper, E.C., y Kole, M.H.P. (2014). Heteromeric Kv7.2/7.3 Channels Differentially Regulate Action Potential Initiation and Conduction in Neocortical Myelinated Axons. *J. Neurosci.* *34*, 3719-3732.
- Bello, E.P., Casas-Cordero, R., Galiñanes, G.L., Casey, E., Belluscio, M.A., Rodríguez, V., Noaín, D., Murer, M.G., y Rubinstein, M. (2017). Inducible ablation of dopamine D2 receptors in adult mice impairs locomotion, motor skill learning and leads to severe parkinsonism. *Mol. Psychiatry* *22*, 595-604.
- Benabid, A.L., Chabardes, S., Mitrofanis, J., y Pollak, P. (2009). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet. Neurol.* *8*, 67-81.
- Bennett, B.D., y Wilson, C.J. (1999). Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *J. Neurosci.* *19*, 5586-5596.
- Bennett, B.D., Callaway, J.C., y Wilson, C.J. (2000). Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* *20*, 8493-8503.
- Berg, A.P., y Bayliss, D.A. (2007). Striatal cholinergic interneurons express a receptor-insensitive homomeric TASK-3-like background K⁺ current. *J. Neurophysiol.* *97*, 1546-1552.
- Bernard, V., Normand, E., y Bloch, B. (1992). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *J. Neurosci.* *12*, 3591-3600.
- Bevan, M.D., Booth, P.A., Eaton, S.A., y Bolam, J.P. (1998). Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *J. Neurosci.* *18*, 9438-9452.
- Bezard, E., Brotchie, J.M., y Gross, C.E. (2001). Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 577-588.
- Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S., y Zong, X. (2009). Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol. Rev.* *89*, 847-885.

- Birket-Smith, E. (1974). Abnormal involuntary movements induced by anticholinergic therapy. *Acta Neurol. Scand.* *50*, 801-811.
- Birket-Smith, E. (1975). Abnormal involuntary movements in relation to anticholinergics and levodopa therapy. *Acta Neurol. Scand.* *52*, 158-160.
- Bohnen, N.I., Müller, M.L.T.M., Koeppe, R.A., Studenski, S.A., Kilbourn, M.A., Frey, K.A., y Albin, R.L. (2009). History of falls in Parkinson disease is associated with reduced cholinergic activity. *Neurology* *73*, 1670-1676.
- Bohnen, N.I., Müller, M.L.T.M., Kotagal, V., Koeppe, R.A., Kilbourn, M.R., Gilman, S., Albin, R.L., y Frey, K.A. (2012). Heterogeneity of cholinergic denervation in Parkinson's disease without dementia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *32*, 1609-1617.
- Bolam, J.P., Wainer, B.H., y Smith, A.D. (1984). Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* *12*, 711-718.
- Bolam, J.P., Smith, Y., Ingham, C.A., von Krosigk, M., y Smith, A.D. (1993). Convergence of synaptic terminals from the striatum and the globus pallidus onto single neurones in the substantia nigra and the entopeduncular nucleus. *Prog. Brain Res.* *99*, 73-88.
- Bonsi, P., Martella, G., Cuomo, D., Platania, P., Sciamanna, G., Bernardi, G., Wess, J., y Pisani, A. (2008). Loss of muscarinic autoreceptor function impairs long-term depression but not long-term potentiation in the striatum. *J. Neurosci.* *28*, 6258-6263.
- Bordia, T., y Perez, X.A. (2019). Cholinergic control of striatal neurons to modulate L-dopa-induced dyskinesias. *Eur. J. Neurosci.* *49*, 859-868.
- Bordia, T., McIntosh, J.M., y Quik, M. (2013). The nicotine-mediated decline in l-dopa-induced dyskinesias is associated with a decrease in striatal dopamine release. *J. Neurochem.* *125*, 291-302.
- Bordia, T., Perez, X.A., Heiss, J., Zhang, D., y Quik, M. (2016). Optogenetic activation of striatal cholinergic interneurons regulates L-dopa-induced dyskinesias. *Neurobiol. Dis.* *91*, 47-58.
- Brown, P. (2007). Abnormal oscillatory synchronisation in the motor system leads to impaired movement. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 656-664.
- Brown, D.A., y Passmore, G.M. (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br. J. Pharmacol.* *156*, 1185-1195.
- Brueggemann, L.I., Mackie, A.R., Martin, J.L., Cribbs, L.L., y Byron, K.L. (2011). Diclofenac distinguishes among homomeric and heteromeric potassium channels composed of KCNQ4 and KCNQ5 subunits. *Mol. Pharmacol.* *79*, 10-23.
- Calabresi, P., Centonze, D., Pisani, A., Sancesario, G., North, R.A., y Bernardi, G. (1998). Muscarinic IPSPs in rat striatal cholinergic interneurons. *J. Physiol.* *510* (Pt 2), 421-427.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., y Bernardi, G. (1999). Activation of M1-like muscarinic receptors is required for the induction of corticostriatal LTP. *Neuropharmacology* *38*, 323-326.
- Calabresi, P., Di Filippo, M., Ghiglieri, V., y Picconi, B. (2008). Molecular mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia. *Mov. Disord.* *23 Suppl 3*, S570-9.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., y Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat. Neurosci.* *17*, 1022-1030.
- Castello, J., Cortés, M., Malave, L., Kottmann, A., Sibley, D.R., Friedman, E., y Reibholz, H. (2020). The Dopamine D5 receptor contributes to activation of cholinergic interneurons during L-DOPA induced dyskinesia. *Sci. Rep.*

10, 2542.

Ceballos, C.C., Roque, A.C., y Leão, R.M. (2017). The role of negative conductances in neuronal subthreshold properties and synaptic integration. *Biophys. Rev.* 9, 827-834.

Cenci, M.A. (2014). Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. *Front. Neurol.* 5, 242.

Cenci, M.A., y Konradi, C. (2010). Maladaptive striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Prog. Brain Res.* 183, 209-233.

Cenci, M.A., y Lundblad, M. (2007). Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 9*, Unit 9.25.

Chambers, N.E., Meadows, S.M., Taylor, A., Sheena, E., Lanza, K., Conti, M.M., y Bishop, C. (2019). Effects of Muscarinic Acetylcholine m1 and m4 Receptor Blockade on Dyskinesia in the Hemi-Parkinsonian Rat. *Neuroscience* 409, 180-194.

Chan, C.S., Shigemoto, R., Mercer, J.N., y Surmeier, D.J. (2004). HCN2 and HCN1 channels govern the regularity of autonomous pacemaking and synaptic resetting in globus pallidus neurons. *J. Neurosci.* 24, 9921-9932.

Chuhma, N., Mingote, S., Moore, H., y Rayport, S. (2014). Dopamine neurons control striatal cholinergic neurons via regionally heterogeneous dopamine and glutamate signaling. *Neuron* 81, 901-912.

Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., et al. (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 233-285.

Connolly, B.S., y Lang, A.E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* 311, 1670-1683.

Cooper, E.C., Harrington, E., Jan, Y.N., y Jan, L.Y. (2001). M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J. Neurosci.* 21, 9529-9540.

Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., y Costa, R.M. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238-242.

Darmopil, S., Martín, A.B., De Diego, I.R., Ares, S., y Moratalla, R. (2009). Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. *Biol. Psychiatry* 66, 603-613.

Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I.B., Deisseroth, K., Bolam, J.P., Gerdjikov, T., y Mena-Segovia, J. (2014). A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *J. Neurosci.* 34, 4509-4518.

Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Gut, N.K., Valencia, M., Kondabolu, K., Kim, Y., Gerdjikov, T. V, y Mena-Segovia, J. (2020). Cholinergic midbrain afferents modulate striatal circuits and shape encoding of action strategies. *Nat. Commun.* 11, 1739.

Day, M., Carr, D.B., Ulrich, S., Ilijic, E., Tkatch, T., y Surmeier, D.J. (2005). Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K_{leak} channels. *J. Neurosci.* 25, 8776-8787.

Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering, A.F., Wokosin, D., Ilijic, E., Sun, Z., Sampson, A.R., et al. (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci.* 9, 251-259.

Day, M., Wokosin, D., Plotkin, J.L., Tian, X., y Surmeier, D.J. (2008). Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J. Neurosci.* 28, 11603-11614.

- DeBoer, P., y Abercrombie, E.D. (1996). Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *277*, 775-783.
- DeBoer, P., Abercrombie, E.D., Heeringa, M., y Westerink, B.H. (1993). Differential effect of systemic administration of bromocriptine and L-dopa on the release of acetylcholine from striatum of intact and 6-OHDA-treated rats. *Brain Res.* *608*, 198-203.
- DeBoer, P., Heeringa, M.J., y Abercrombie, E.D. (1996). Spontaneous release of acetylcholine in striatum is preferentially regulated by inhibitory dopamine D2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* *317*, 257-262.
- Deffains, M., Iskhakova, L., Katabi, S., Haber, S.N., Israel, Z., y Bergman, H. (2016). Subthalamic, not striatal, activity correlates with basal ganglia downstream activity in normal and parkinsonian monkeys. *Elife* *5*.
- Delfino, M., Kalisch, R., Czisch, M., Larramendy, C., Ricatti, J., Taravini, I.R.E., Trenkwalder, C., Murer, M.G., Auer, D.P., y Gershanik, O.S. (2007). Mapping the effects of three dopamine agonists with different dyskinetogenic potential and receptor selectivity using pharmacological functional magnetic resonance imaging. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *32*, 1911-1921.
- Delfino, M.A., Stefano, A. V, Ferrario, J.E., Taravini, I.R.E., Murer, M.G., y Gershanik, O.S. (2004). Behavioral sensitization to different dopamine agonists in a parkinsonian rodent model of drug-induced dyskinesias. *Behav. Brain Res.* *152*, 297-306.
- DeLong, M.R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* *13*, 281-285.
- Deng, P., Zhang, Y., y Xu, Z.C. (2007). Involvement of I(h) in dopamine modulation of tonic firing in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* *27*, 3148-3156.
- Dhamoon, A.S., Pandit, S. V, Sarmast, F., Parisian, K.R., Guha, P., Li, Y., Bagwe, S., Taffet, S.M., y Anumonwo, J.M.B. (2004). Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current. *Circ. Res.* *94*, 1332-1339.
- Dickson, D.W. (2012). Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*.
- Ding, J., Guzman, J.N., Tkatch, T., Chen, S., Goldberg, J.A., Ebert, P.J., Levitt, P., Wilson, C.J., Hamm, H.E., y Surmeier, D.J. (2006). RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat. Neurosci.* *9*, 832-842.
- Ding, J.B., Guzman, J.N., Peterson, J.D., Goldberg, J.A., y Surmeier, D.J. (2010). Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron* *67*, 294-307.
- Ding, Y., Won, L., Britt, J.P., Lim, S.A.O., McGehee, D.S., y Kang, U.J. (2011). Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 840-845.
- Doig, N.M., Magill, P.J., Apicella, P., Bolam, J.P., y Sharott, A. (2014). Cortical and thalamic excitation mediate the multiphasic responses of striatal cholinergic interneurons to motivationally salient stimuli. *J. Neurosci.* *34*, 3101-3117.
- Dong, Y., Cooper, D., Nasif, F., Hu, X.-T., y White, F.J. (2004). Dopamine modulates inwardly rectifying potassium currents in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *J. Neurosci.* *24*, 3077-3085.
- Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., et al. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* *68*, 384-386.

- Duvoisin, R.C. (1967). Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism. *Arch. Neurol.* *17*, 124-136.
- Duysens, J., y Nonnekes, J. (2021). Parkinson's Kinesia Paradoxa Is Not a Paradox. *Mov. Disord.*
- Enyedi, P., y Czirják, G. (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* *90*, 559-605.
- Escande, M. V, Taravini, I.R.E., Zold, C.L., Belforte, J.E., y Murer, M.G. (2016). Loss of Homeostasis in the Direct Pathway in a Mouse Model of Asymptomatic Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* *36*, 5686-5698.
- Espay, A.J., Morgante, F., Merola, A., Fasano, A., Marsili, L., Fox, S.H., Bezard, E., Picconi, B., Calabresi, P., y Lang, A.E. (2018). Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: Current and evolving concepts. *Ann. Neurol.* *84*, 797-811.
- Evans, A.H., y Lees, A.J. (2004). Dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* *17*, 393-398.
- Exley, R., y Cragg, S.J. (2008). Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.* *153 Suppl*, S283-97.
- Fabbrini, G., Brotchie, J.M., Grandas, F., Nomoto, M., y Goetz, C.G. (2007). Levodopa-induced dyskinesias. *Mov. Disord.* *22*, 1379-1389; quiz 1523.
- Fahn, S., Oakes, D., Shoulson, I., Kiebertz, K., Rudolph, A., Lang, A., Olanow, C.W., Tanner, C., y Marek, K. (2004). Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2498-2508.
- Fernandez, F.R., Malerba, P., y White, J.A. (2015). Non-linear Membrane Properties in Entorhinal Cortical Stellate Cells Reduce Modulation of Input-Output Responses by Voltage Fluctuations. *PLoS Comput. Biol.* *11*, e1004188.
- Fieblinger, T., Zanetti, L., Sebastianutto, I., Breger, L.S., Quintino, L., Lockowandt, M., Lundberg, C., y Cenci, M.A. (2018). Striatonigral neurons divide into two distinct morphological-physiological phenotypes after chronic L-DOPA treatment in parkinsonian rats. *Sci. Rep.* *8*, 10068.
- Fino, E., Glowinski, J., y Venance, L. (2007). Effects of acute dopamine depletion on the electrophysiological properties of striatal neurons. *Neurosci. Res.* *58*, 305-316.
- Fino, E., Araya, R., Peterka, D.S., Salierno, M., Etchenique, R., y Yuste, R. (2009). RuBi-Glutamate: Two-Photon and Visible-Light Photoactivation of Neurons and Dendritic spines. *Front. Neural Circuits* *3*, 2.
- Fox, S.H., Katzenschlager, R., Lim, S.-Y., Barton, B., de Bie, R.M.A., Seppi, K., Coelho, M., y Sampaio, C. (2018). International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *33*, 1248-1266.
- Fürst, O., Mondou, B., y D'Avanzo, N. (2014). Phosphoinositide regulation of inward rectifier potassium (Kir) channels. *Front. Physiol.* *4*, 404.
- George, J.L., Mok, S., Moses, D., Wilkins, S., Bush, A.I., Cherny, R.A., y Finkelstein, D.I. (2009). Targeting the progression of Parkinson's disease. *Curr. Neuropharmacol.* *7*, 9-36.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J.J., y Sibley, D.R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* *250*, 1429-1432.
- Gertler, T.S., Chan, C.S., y Surmeier, D.J. (2008). Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* *28*, 10814-10824.

- Girasole, A.E., Lum, M.Y., Nathaniel, D., Bair-Marshall, C.J., Guenther, C.J., Luo, L., Kreitzer, A.C., y Nelson, A.B. (2018). A Subpopulation of Striatal Neurons Mediates Levodopa-Induced Dyskinesia. *Neuron* 97, 787-795.e6.
- Giugni, J.C., y Okun, M.S. (2014). Treatment of advanced Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 27, 450-460.
- Glickstein, M., y Stein, J. (1991). Paradoxical movement in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 14, 480-482.
- Goetz, C.G. (2011). The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a008862.
- Goldberg, J.A., y 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.
- Gonzales, K.K., y Smith, Y. (2015). Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1349, 1-45.
- Graybiel, A.M. (2008). Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 359-387.
- Halje, P., Tamtè, M., Richter, U., Mohammed, M., Cenci, M.A., y Petersson, P. (2012). Levodopa-induced dyskinesia is strongly associated with resonant cortical oscillations. *J. Neurosci.* 32, 16541-16551.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., y Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* 90, 291-366.
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., y Nakanishi, S. (2010). Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66, 896-907.
- Hille, B. (2001) 'Ion channels of excitable membranes', (Vol. 507). Sunderland, MA: Sinauer.
- Holly, E.N., Davatolhagh, M.F., Choi, K., Alabi, O.O., Vargas Cifuentes, L., y Fuccillo, M. V (2019). Striatal Low-Threshold Spiking Interneurons Regulate Goal-Directed Learning. *Neuron* 103, 92-101.e6.
- Hönigsperger, C., Marosi, M., Murphy, R., y Storm, J.F. (2015). Dorsoventral differences in Kv7/M-current and its impact on resonance, temporal summation and excitability in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 593, 1551-1580.
- Howe, A.R., y Surmeier, D.J. (1995). Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type Ca²⁺ currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J. Neurosci.* 15, 458-469.
- Hu, H., Vervaeke, K., y Storm, J.F. (2002). Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 545, 783-805.
- Hu, H., Vervaeke, K., y Storm, J.F. (2007). M-Channels (Kv7/KCNQ Channels) That Regulate Synaptic Integration, Excitability, and Spike Pattern of CA1 Pyramidal Cells Are Located in the Perisomatic Region. *J. Neurosci.* 27, 1853-1867.
- Huang, H., y Trussell, L.O. (2011). KCNQ5 channels control resting properties and release probability of a synapse. *Nat. Neurosci.* 14, 840-847.
- Huang, C.W., Hung, T.Y., Liao, Y.K., Hsu, M.C., y Wu, S.N. (2013). Underlying mechanism of regulatory actions of diclofenac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent, on neuronal potassium channels and firing: an experimental and theoretical study. *J. Physiol. Pharmacol.* 64, 269-280.
- Huguenard, J.R., y McCormick, D.A. (1992). Simulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *J. Neurophysiol.* 68, 1373-1383.

- Huot, P., Johnston, T.H., Koprach, J.B., Fox, S.H., y Brotchie, J.M. (2013). The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol. Rev.* *65*, 171-222.
- Izhikevich, E.M. (2004). *Dynamical Systems in Neuroscience: The Geometry of Excitability and Bursting*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Jackson, M.J., Swart, T., Pearce, R.K.B., y Jenner, P. (2014). Cholinergic manipulation of motor disability and L-DOPA-induced dyskinesia in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated common marmosets. *J. Neural Transm.* *121*, 163-169.
- Jankovic, J. (2005). Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestations. *Mov. Disord.* *20 Suppl 1*, S11-6.
- Jenkinson, N., y Brown, P. (2011). New insights into the relationship between dopamine, beta oscillations and motor function. *Trends Neurosci.* *34*, 611-618.
- Jentsch, T.J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 21-30.
- Kalia, L. V, y Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)* *386*, 896-912.
- Kanyshkova, T., Pawlowski, M., Meuth, P., Dubé, C., Bender, R.A., Brewster, A.L., Baumann, A., Baram, T.Z., Pape, H.-C., y Budde, T. (2009). Postnatal expression pattern of HCN channel isoforms in thalamic neurons: relationship to maturation of thalamocortical oscillations. *J. Neurosci.* *29*, 8847-8857.
- Karschin, C., Dissmann, E., Stühmer, W., y Karschin, A. (1996). IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J. Neurosci.* *16*, 3559-3570.
- Katzenschlager, R., Sampaio, C., Costa, J., y Lees, A. (2003). Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003735.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., y Emson, P.C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* *18*, 527-535.
- Keifman, E., Ruiz-DeDiego, I., Pafundo, D.E., Paz, R.M., Solís, O., Murer, M.G., y Moratalla, R. (2019). Optostimulation of striatonigral terminals in substantia nigra induces dyskinesia that increases after L-DOPA in a mouse model of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* *176*, 2146-2161.
- Kemenes, I., Marra, V., Crossley, M., Samu, D., Staras, K., Kemenes, G., y Nowotny, T. (2011). Dynamic clamp with StdpC software. *Nat. Protoc.* *6*, 405-417.
- Kharkwal, G., Brami-Cherrier, K., Lizardi-Ortiz, J.E., Nelson, A.B., Ramos, M., Del Barrio, D., Sulzer, D., Kreitzer, A.C., y Borrelli, E. (2016). Parkinsonism Driven by Antipsychotics Originates from Dopaminergic Control of Striatal Cholinergic Interneurons. *Neuron* *91*, 67-78.
- Kimura, M., Rajkowski, J., y Everts, E. (1984). Tonicly discharging putamen neurons exhibit set-dependent responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 4998-5001.
- Klaus, A., Martins, G.J., Paixao, V.B., Zhou, P., Paninski, L., y Costa, R.M. (2017). The Spatiotemporal Organization of the Striatum Encodes Action Space. *Neuron* *96*, 949.
- Kondabolu, K., Roberts, E.A., Bucklin, M., McCarthy, M.M., Kopell, N., y 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*, E3159-68.
- Koralek, A.C., Jin, X., Long, J.D. 2nd, Costa, R.M., y Carmena, J.M. (2012). Corticostriatal plasticity is necessary for learning intentional neuroprosthetic skills. *Nature* *483*, 331-335.

- Kosillo, P., Zhang, Y.-F., Threlfell, S., y Cragg, S.J. (2016). Cortical Control of Striatal Dopamine Transmission via Striatal Cholinergic Interneurons. *Cereb. Cortex* 26, 4160-4169.
- Kovaleski, R.F., Callahan, J.W., Chazalon, M., Wokosin, D.L., Baufreton, J., y Bevan, M.D. (2020). Dysregulation of external globus pallidus-subthalamic nucleus network dynamics in parkinsonian mice during cortical slow-wave activity and activation. *J. Physiol.* 598, 1897-1927.
- Kravitz, A. V, Freeze, B.S., Parker, P.R.L., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., y Kreitzer, A.C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622-626.
- Kreitzer, A.C., y Malenka, R.C. (2005). Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J. Neurosci.* 25, 10537-10545.
- Kreitzer, A.C., y Malenka, R.C. (2007). Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445, 643-647.
- Kühn, A.A., Kupsch, A., Schneider, G.-H., y Brown, P. (2006). Reduction in subthalamic 8-35 Hz oscillatory activity correlates with clinical improvement in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1956-1960.
- Kühn, A.A., Kempf, F., Brücke, C., Gaynor Doyle, L., Martinez-Torres, I., Pogosyan, A., Trottenberg, T., Kupsch, A., Schneider, G.-H., Hariz, M.I., et al. (2008). High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus suppresses oscillatory beta activity in patients with Parkinson's disease in parallel with improvement in motor performance. *J. Neurosci.* 28, 6165-6173.
- Lahiri, A.K., y Bevan, M.D. (2020). Dopaminergic Transmission Rapidly and Persistently Enhances Excitability of D1 Receptor-Expressing Striatal Projection Neurons. *Neuron* 106, 277-290.e6.
- Lang, A.E., y Lees, A.J. (2002). Anticholinergic therapies in the treatment of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 17 Suppl 4, S7-12.
- Lapper, S.R., y 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.
- Large, C.H., Sokal, D.M., Nehlig, A., Gunthorpe, M.J., Sankar, R., Crean, C.S., Vanlandingham, K.E., y White, H.S. (2012). The spectrum of anticonvulsant efficacy of retigabine (ezogabine) in animal models: implications for clinical use. *Epilepsia* 53, 425-436.
- Lee, S., y Kwag, J. (2012). M-channels modulate the intrinsic excitability and synaptic responses of layer 2/3 pyramidal neurons in auditory cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 448-453.
- Lee, K., Dixon, A.K., Freeman, T.C., y Richardson, P.J. (1998). Identification of an ATP-sensitive potassium channel current in rat striatal cholinergic interneurons. *J. Physiol.* 510 (Pt 2), 441-453.
- Lemaire, N., Hernandez, L.F., Hu, D., Kubota, Y., Howe, M.W., y 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.
- Li, J., Blankenship, M.L., y Baccei, M.L. (2013). Inward-rectifying potassium (Kir) channels regulate pacemaker activity in spinal nociceptive circuits during early life. *J. Neurosci.* 33, 3352-3362.
- Lindgren, H.S., Andersson, D.R., Lagerkvist, S., Nissbrandt, H., y Cenci, M.A. (2010). L-DOPA-induced dopamine efflux in the striatum and the substantia nigra in a rat model of Parkinson's disease: temporal and quantitative relationship to the expression of dyskinesia. *J. Neurochem.* 112, 1465-1476.
- Little, S., Pogosyan, A., Kuhn, A.A., y Brown, P. (2012). β band stability over time correlates with Parkinsonian rigidity and bradykinesia. *Exp. Neurol.* 236, 383-388.

- Liu, L.-Y., Fei, X.-W., Li, Z.-M., Zhang, Z.-H., y Mei, Y.-A. (2005). Diclofenac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, activates the transient outward K⁺ current in rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* *48*, 918-926.
- Lv, X., Dickerson, J.W., Rook, J.M., Lindsley, C.W., Conn, P.J., y Xiang, Z. (2017). M(1) muscarinic activation induces long-lasting increase in intrinsic excitability of striatal projection neurons. *Neuropharmacology* *118*, 209-222.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* *13*, 133-140.
- Mallet, N., Schmidt, R., Leventhal, D., Chen, F., Amer, N., Boraud, T., y Berke, J.D. (2016). Arky pallidal Cells Send a Stop Signal to Striatum. *Neuron* *89*, 308-316.
- Mamaligas, A.A., y Ford, C.P. (2016). Spontaneous Synaptic Activation of Muscarinic Receptors by Striatal Cholinergic Neuron Firing. *Neuron* *91*, 574-586.
- Martin, M.W., Scott, A.W., Johnston, D.E.J., Griffin, S., y Luedtke, R.R. (2001). Typical antipsychotics exhibit inverse agonist activity at rat dopamine D1-like receptors expressed in Sf9 cells. *Eur. J. Pharmacol.* *420*, 73-82.
- Matsumoto, N., Minamimoto, T., Graybiel, A.M., y Kimura, M. (2001). Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events. *J. Neurophysiol.* *85*, 960-976.
- Maurice, N., Mercer, J., Chan, C.S., Hernandez-Lopez, S., Held, J., Tkatch, T., y Surmeier, D.J. (2004). D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na⁺ channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* *24*, 10289-10301.
- Maurice, N., Liberge, M., Jaouen, F., Ztaou, S., Hanini, M., Camon, J., Deisseroth, K., Amalric, M., Kerkerian-Le Goff, L., y Beurrier, C. (2015). Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal Ganglia Function in Experimental Parkinsonism. *Cell Rep.* *13*, 657-666.
- McGeer, P.L., BOULDING, J.E., GIBSON, W.C., y FOULKES, R.G. (1961). Drug-induced extrapyramidal reactions. Treatment with diphenhydramine hydrochloride and dihydroxyphenylalanine. *JAMA* *177*, 665-670.
- McGehee, D.S., Heath, M.J., Gelber, S., Devay, P., y Role, L.W. (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* *269*, 1692-1696.
- Meissner, W.G., Frasier, M., Gasser, T., Goetz, C.G., Lozano, A., Piccini, P., Obeso, J.A., Rascol, O., Schapira, A., Voon, V., et al. (2011). Priorities in Parkinson's disease research. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 377-393.
- Miller, W.C., y DeLong, M.R. (1988). Parkinsonian symptomatology. An anatomical and physiological analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *515*, 287-302.
- Moehle, M.S., y Conn, P.J. (2019). Roles of the M(4) acetylcholine receptor in the basal ganglia and the treatment of movement disorders. *Mov. Disord.* *34*, 1089-1099.
- Mohebi, A., y Berke, J.D. (2020). Dopamine release drives motivation, independently from dopamine cell firing. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *45*, 220.
- Mohebi, A., Pettibone, J.R., Hamid, A.A., Wong, J.-M.T., Vinson, L.T., Patriarchi, T., Tian, L., Kennedy, R.T., y Berke, J.D. (2019). Dissociable dopamine dynamics for learning and motivation. *Nature* *570*, 65-70.
- Morris, G., Arkadir, D., Nevet, A., Vaadia, E., y Bergman, H. (2004). Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron* *43*, 133-143.

- Mosharov, E. V, Borgkvist, A., y Sulzer, D. (2015). Presynaptic effects of levodopa and their possible role in dyskinesia. *Mov. Disord.* *30*, 45-53.
- Müller, M.L.T.M., y Bohnen, N.I. (2013). Cholinergic dysfunction in Parkinson's disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *13*, 377.
- Murer, M.G., y Moratalla, R. (2011). Striatal Signaling in L-DOPA-Induced Dyskinesia: Common Mechanisms with Drug Abuse and Long Term Memory Involving D1 Dopamine Receptor Stimulation. *Front. Neuroanat.* *5*, 51.
- Murer, G., Adelbrecht, C., Lauritzen, I., Lesage, F., Lazdunski, M., Agid, Y., y Raisman-Vozari, R. (1997). An immunocytochemical study on the distribution of two G-protein-gated inward rectifier potassium channels (GIRK2 and GIRK4) in the adult rat brain. *Neuroscience* *80*, 345-357.
- Nair, A.G., Castro, L.R. V, El Khoury, M., Gorgievski, V., Giros, B., Tzavara, E.T., Hellgren-Kotaleski, J., y Vincent, P. (2019). The high efficacy of muscarinic M4 receptor in D1 medium spiny neurons reverses striatal hyperdopaminergia. *Neuropharmacology* *146*, 74-83.
- Nambu, A., Tokuno, H., y Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal «hyperdirect» pathway. *Neurosci. Res.* *43*, 111-117.
- Oswald, M.J., Oorschot, D.E., Schulz, J.M., Lipski, J., y Reynolds, J.N.J. (2009). IH current generates the afterhyperpolarisation following activation of subthreshold cortical synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J. Physiol.* *587*, 5879-5897.
- Pacheco-Cano, M.T., Bargas, J., Hernández-López, S., Tapia, D., y Galarraga, E. (1996). Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs(+)-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp. Brain Res.* *110*, 205-211.
- Pan, W.-X., Schmidt, R., Wickens, J.R., y Hyland, B.I. (2005). Dopamine cells respond to predicted events during classical conditioning: evidence for eligibility traces in the reward-learning network. *J. Neurosci.* *25*, 6235-6242.
- Parker, P.R.L., Lalive, A.L., y Kreitzer, A.C. (2016). Pathway-Specific Remodeling of Thalamostriatal Synapses in Parkinsonian Mice. *Neuron* *89*, 734-740.
- Paxinos, G. y Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Paz, R.M., Tubert, C., Stahl, A., Díaz, A.L., Etchenique, R., Murer, M.G., y Rela, L. (2018). Inhibition of striatal cholinergic interneuron activity by the Kv7 opener retigabine and the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Neuropharmacology* *137*, 309-321.
- Paz, R.M., Tubert, C., Stahl, A.M., Amarillo, Y., Rela, L., y Murer, M.G. (2021). Levodopa Causes Striatal Cholinergic Interneuron Burst-Pause Activity in Parkinsonian Mice. *Mov. Disord.*
- Peretz, A., Degani, N., Nachman, R., Uziyel, Y., Gibor, G., Shabat, D., y Attali, B. (2005). Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Mol. Pharmacol.* *67*, 1053-1066.
- Pérez-Ramírez, M.B., Laville, A., Tapia, D., Duhne, M., Lara-González, E., Bargas, J., y Galarraga, E. (2015). KV7 Channels Regulate Firing during Synaptic Integration in GABAergic Striatal Neurons. *Neural Plast.* *2015*, 472676.
- Perez-Rosello, T., Figueroa, A., Salgado, H., Vilchis, C., Tecuapetla, F., Guzman, J.N., Galarraga, E., y Bargas, J. (2005). Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca²⁺ channels. *J. Neurophysiol.* *93*, 2507-2519.

- Picconi, B., Centonze, D., Håkansson, K., Bernardi, G., Greengard, P., Fisone, G., Cenci, M.A., y Calabresi, P. (2003). Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Neurosci.* *6*, 501-506.
- Pisani, A., Bernardi, G., Ding, J., y Surmeier, D.J. (2007). Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci.* *30*, 545-553.
- Pittman-Polletta, B.R., Quach, A., Mohammed, A.I., Romano, M., Kondabolu, K., Kopell, N.J., Han, X., y McCarthy, M.M. (2018). Striatal cholinergic receptor activation causes a rapid, selective and state-dependent rise in cortico-striatal β activity. *Eur. J. Neurosci.* *48*, 2857-2868.
- Podda, M. V, Riccardi, E., D'Ascenzo, M., Azzena, G.B., y Grassi, C. (2010). Dopamine D1-like receptor activation depolarizes medium spiny neurons of the mouse nucleus accumbens by inhibiting inwardly rectifying K⁺ currents through a cAMP-dependent protein kinase A-independent mechanism. *Neuroscience* *167*, 678-690.
- Preisig-Müller, R., Schlichthörl, G., Goerge, T., Heinen, S., Brüggemann, A., Rajan, S., Derst, C., Veh, R.W., y Daut, J. (2002). Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7774-7779.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., y Steeves, T.D.L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* *29*, 1583-1590.
- Proenza, C., Angoli, D., Agranovich, E., Macri, V., y Accili, E.A. (2002). Pacemaker channels produce an instantaneous current. *J. Biol. Chem.* *277*, 5101-5109.
- Prüss, H., Wenzel, M., Eulitz, D., Thomzig, A., Karschin, A., y Veh, R.W. (2003). Kir2 potassium channels in rat striatum are strategically localized to control basal ganglia function. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *110*, 203-219.
- Quinn, N., Marsden, C.D., y Parkes, J.D. (1982). Complicated response fluctuations in Parkinson's disease: response to intravenous infusion of levodopa. *Lancet (London, England)* *2*, 412-415.
- Raz, A., Feingold, A., Zelanskaya, V., Vaadia, E., y Bergman, H. (1996). Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates. *J. Neurophysiol.* *76*, 2083-2088.
- Raz, A., Frechter-Mazar, V., Feingold, A., Abeles, M., Vaadia, E., y 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.
- Reynolds, J.N., Hyland, B.I., y Wickens, J.R. (2001). A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature* *413*, 67-70.
- Reynolds, J.N.J., Hyland, B.I., y Wickens, J.R. (2004). Modulation of an afterhyperpolarization by the substantia nigra induces pauses in the tonic firing of striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* *24*, 9870-9877.
- Rivera, A., Alberti, I., Martín, A.B., Narváez, J.A., de la Calle, A., y Moratalla, R. (2002). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 2049-2058.
- Rossi, J., Balthasar, N., Olson, D., Scott, M., Berglund, E., Lee, C.E., Choi, M.J., Lauzon, D., Lowell, B.B., y Elmquist, J.K. (2011). Melanocortin-4 Receptors Expressed by Cholinergic Neurons Regulate Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Cell Metab.* *13*, 195-204.
- Ryan, M.B., Bair-Marshall, C., y Nelson, A.B. (2018). Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia. *Cell Rep.* *23*, 3438-3446.e5.
- Sanchez, G., Rodriguez, M.J., Pomata, P., Rela, L., y Murer, M.G. (2011). Reduction of an afterhyperpolarization current increases excitability in striatal cholinergic interneurons in rat parkinsonism. *J. Neurosci.* *31*, 6553-6564.

- Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J.-A., Hervé, D., Greengard, P., y Fisone, G. (2007). Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J. Neurosci.* *27*, 6995-7005.
- Santini, E., Alcacer, C., Cacciatore, S., Heiman, M., Hervé, D., Greengard, P., Girault, J.-A., Valjent, E., y Fisone, G. (2009). L-DOPA activates ERK signaling and phosphorylates histone H3 in the striatonigral medium spiny neurons of hemiparkinsonian mice. *J. Neurochem.* *108*, 621-633.
- Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G.P., Tibbs, G.R., y Siegelbaum, S.A. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci.* *20*, 5264-5275.
- Sariñana, J., Kitamura, T., Künzler, P., Sultzman, L., y Tonegawa, S. (2014). Differential roles of the dopamine 1-class receptors, D1R and D5R, in hippocampal dependent memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 8245-8250.
- Schram, G., Melnyk, P., Pourrier, M., Wang, Z., y Nattel, S. (2002). Kir2.4 and Kir2.1 K(+) channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J. Physiol.* *544*, 337-349.
- Schultz, W. (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* *36*, 241-263.
- Schultz, W., Dayan, P., y Montague, P.R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science* *275*, 1593-1599.
- Schulz, J.M., y Reynolds, J.N.J. (2013). Pause and rebound: sensory control of cholinergic signaling in the striatum. *Trends Neurosci.* *36*, 41-50.
- Schwab, R.S., England, A.C.J., Poskanzer, D.C., y Young, R.R. (1969). Amantadine in the treatment of Parkinson's disease. *JAMA* *208*, 1168-1170.
- Sharott, A., Magill, P.J., Harnack, D., Kupsch, A., Meissner, W., y Brown, P. (2005). Dopamine depletion increases the power and coherence of beta-oscillations in the cerebral cortex and subthalamic nucleus of the awake rat. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 1413-1422.
- Sharott, A., Doig, N.M., Mallet, N., y Magill, P.J. (2012). Relationships between the firing of identified striatal interneurons and spontaneous and driven cortical activities in vivo. *J. Neurosci.* *32*, 13221-13236.
- Shen, W., Hamilton, S.E., Nathanson, N.M., y Surmeier, D.J. (2005). Cholinergic Suppression of KCNQ Channel Currents Enhances Excitability of Striatal Medium Spiny Neurons. *J. Neurosci.* *25*, 7449-7458.
- Shen, W., Tian, X., Day, M., Ulrich, S., Tkatch, T., Nathanson, N.M., y Surmeier, D.J. (2007). Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat. Neurosci.* *10*, 1458-1466.
- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., y Surmeier, D.J. (2008). Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* *321*, 848-851.
- Shen, W., Plotkin, J.L., Francardo, V., Ko, W.K.D., Xie, Z., Li, Q., Fieblinger, T., Wess, J., Neubig, R.R., Lindsley, C.W., et al. (2015). M4 Muscarinic Receptor Signaling Ameliorates Striatal Plasticity Deficits in Models of L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Neuron* *88*, 762-773.
- Shen, W., Ren, W., Zhai, S., Yang, B., Vanoye, C.G., Mitra, A., George, A.L.J., y Surmeier, D.J. (2020). Striatal Kir2 K+ channel inhibition mediates the antidyskinetic effects of amantadine. *J. Clin. Invest.* *130*, 2593-2601.
- Spyraki, C., Fibiger, H.C., y Phillips, A.G. (1982). Attenuation by haloperidol of place preference conditioning using food reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*. *77*, 379-382.

- Steinberg, E.E., Keiflin, R., Boivin, J.R., Witten, I.B., Deisseroth, K., y Janak, P.H. (2013). A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning. *Nat. Neurosci.* *16*, 966-973.
- Stocchi, F., y Olanow, C.W. (2013). Obstacles to the development of a neuroprotective therapy for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *28*, 3-7.
- Straub, C., Tritsch, N.X., Hagan, N.A., Gu, C., y Sabatini, B.L. (2014). Multiphasic modulation of cholinergic interneurons by nigrostriatal afferents. *J. Neurosci.* *34*, 8557-8569.
- Suárez, L.M., Solís, O., Caramés, J.M., Taravini, I.R., Solís, J.M., Murer, M.G., y Moratalla, R. (2014). L-DOPA treatment selectively restores spine density in dopamine receptor D2-expressing projection neurons in dyskinetic mice. *Biol. Psychiatry* *75*, 711-722.
- Sun, W., Yang, F., Wang, Y., Fu, H., Yang, Y., Li, C.-L., Wang, X.-L., Lin, Q., y Chen, J. (2017). Contribution of large-sized primary sensory neuronal sensitization to mechanical allodynia by upregulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels via cyclooxygenase 1 cascade. *Neuropharmacology* *113*, 217-230.
- Suzuki, T., Miura, M., Nishimura, K., y Aosaki, T. (2001). Dopamine-dependent synaptic plasticity in the striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* *21*, 6492-6501.
- Takahashi, H., Takada, Y., Nagai, N., Urano, T., y Takada, A. (1998). Nicotine increases stress-induced serotonin release by stimulating nicotinic acetylcholine receptor in rat striatum. *Synapse* *28*, 212-219.
- Tanimura, A., Du, Y., Kondapalli, J., Wokosin, D.L., y Surmeier, D.J. (2019). Cholinergic Interneurons Amplify Thalamostriatal Excitation of Striatal Indirect Pathway Neurons in Parkinson's Disease Models. *Neuron* *101*, 444-458.e6.
- Tecuapetla, F., Matias, S., Dugue, G.P., Mainen, Z.F., y Costa, R.M. (2014). Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nat. Commun.* *5*, 4315.
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S.Q., y Costa, R.M. (2016). Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell* *166*, 703-715.
- Tepper, J.M., y Bolam, J.P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* *14*, 685-692.
- Tepper, J.M., Koós, T., Ibanez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Faust, T.W., y Assous, M. (2018). Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons: Update 2018. *Front. Neuroanat.* *12*, 91.
- Thomzig, A., Prüss, H., y Veh, R.W. (2003). The Kir6.1-protein, a pore-forming subunit of ATP-sensitive potassium channels, is prominently expressed by giant cholinergic interneurons in the striatum of the rat brain. *Brain Res.* *986*, 132-138.
- Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N.J., Jennings, K.A., Deisseroth, K., y Cragg, S.J. (2012). Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron* *75*, 58-64.
- Tiberi, M., y Caron, M.G. (1994). High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *J. Biol. Chem.* *269*, 27925-27931.
- Tremblay, L., Filion, M., y Bédard, P.J. (1989). Responses of pallidal neurons to striatal stimulation in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain Res.* *498*, 17-33.
- Tseng, K.Y., Kasanetz, F., Kargieman, L., Riquelme, L.A., y Murer, M.G. (2001). Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions. *J. Neurosci.* *21*, 6430-6439.

- Tubert, C., y Murer, M.G. (2020). What's wrong with the striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease? Focus on intrinsic excitability. *Eur. J. Neurosci.*
- Tubert, C., Taravini, I.R.E., Flores-Barrera, E., Sánchez, G.M., Prost, M.A., Avale, M.E., Tseng, K.Y., Rela, L., y Murer, M.G. (2016). Decrease of a Current Mediated by Kv1.3 Channels Causes Striatal Cholinergic Interneuron Hyperexcitability in Experimental Parkinsonism. *Cell Rep.* *16*, 2749-2762.
- Twelves, D., Perkins, K.S.M., y Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *18*, 19-31.
- Verhagen Metman, L., Del Dotto, P., van den Munckhof, P., Fang, J., Mouradian, M.M., y Chase, T.N. (1998). Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology* *50*, 1323-1326.
- Villalonga, N., David, M., Bielańska, J., González, T., Parra, D., Soler, C., Comes, N., Valenzuela, C., y Felipe, A. (2010). Immunomodulatory effects of diclofenac in leukocytes through the targeting of Kv1.3 voltage-dependent potassium channels. *Biochem. Pharmacol.* *80*, 858-866.
- Voilley, N., de Weille, J., Mamet, J., y Lazdunski, M. (2001). Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J. Neurosci.* *21*, 8026-8033.
- Wang, L., Shang, S., Kang, X., Teng, S., Zhu, F., Liu, B., Wu, Q., Li, M., Liu, W., Xu, H., et al. (2014). Modulation of dopamine release in the striatum by physiologically relevant levels of nicotine. *Nat. Commun.* *5*, 3925.
- Wang, Y., Yao, L., Gao, S., Zhang, G., Zhang, Q., Liu, W., Zhou, Y., Sun, Y., Feng, J., y Liu, J. (2021). Inhibition of striatal dopamine D(5) receptor attenuates levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* *1754*, 147266.
- Wang, Z., Kai, L., Day, M., Ronesi, J., Yin, H.H., Ding, J., Tkatch, T., Lovinger, D.M., y Surmeier, D.J. (2006). Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* *50*, 443-452.
- Wei, W., Li, L., Yu, G., Ding, S., Li, C., y Zhou, F.-M. (2013). Supersensitive presynaptic dopamine D2 receptor inhibition of the striatopallidal projection in nigrostriatal dopamine-deficient mice. *J. Neurophysiol.* *110*, 2203-2216.
- Wieland, S., Du, D., Oswald, M.J., Parlato, R., Köhr, G., y Kelsch, W. (2014). Phasic dopaminergic activity exerts fast control of cholinergic interneuron firing via sequential NMDA, D2, and D1 receptor activation. *J. Neurosci.* *34*, 11549-11559.
- Wilson, C.J. (2005). The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron* *45*, 575-585.
- Wilson, C.J., y Goldberg, J.A. (2006). Origin of the slow afterhyperpolarization and slow rhythmic bursting in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurophysiol.* *95*, 196-204.
- Wilson, C.J., Chang, H.T., y Kitai, S.T. (1990). Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* *10*, 508-519.
- Wise, R.A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 483-494.
- Wise, R.A., y Schwartz, H. V (1981). Pimozide attenuates acquisition of lever-pressing for food in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *15*, 655-656.
- Won, L., Ding, Y., Singh, P., y Kang, U.J. (2014). Striatal cholinergic cell ablation attenuates L-DOPA induced dyskinesia in Parkinsonian mice. *J. Neurosci.* *34*, 3090-3094.

- World Health Organization (2006). *Neurological disorders. Public health challenges*. Washington, DC: The World Bank and Oxford University Press.
- Wu, N., Enomoto, A., Tanaka, S., Hsiao, C.-F., Nykamp, D.Q., Izhikevich, E., y Chandler, S.H. (2005). Persistent sodium currents in mesencephalic v neurons participate in burst generation and control of membrane excitability. *J. Neurophysiol.* *93*, 2710-2722.
- Wu, W.W., Chan, C.S., Surmeier, D.J., y Disterhoft, J.F. (2008). Coupling of L-Type Ca²⁺ Channels to K_v7/KCNQ Channels Creates a Novel, Activity-Dependent, Homeostatic Intrinsic Plasticity. *J. Neurophysiol.* *100*, 1897-1908.
- Xiang, Z., Thompson, A.D., Jones, C.K., Lindsley, C.W., y Conn, P.J. (2012). Roles of the M1 muscarinic acetylcholine receptor subtype in the regulation of basal ganglia function and implications for the treatment of Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *340*, 595-603.
- Xue, B., Mao, L.-M., Jin, D.-Z., y Wang, J.Q. (2015). Regulation of synaptic MAPK/ERK phosphorylation in the rat striatum and medial prefrontal cortex by dopamine and muscarinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci. Res.* *93*, 1592-1599.
- Yan, Z., y Surmeier, D.J. (1996). Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J. Neurosci.* *16*, 2592-2604.
- Yan, Z., Flores-Hernandez, J., y Surmeier, D.J. (2001). Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* *103*, 1017-1024.
- Yarnall, A., Rochester, L., y Burn, D.J. (2011). The interplay of cholinergic function, attention, and falls in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *26*, 2496-2503.
- Yin, H.H., Ostlund, S.B., Knowlton, B.J., y Balleine, B.W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur. J. Neurosci.* *22*, 513-523.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J., y Balleine, B.W. (2006). Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. *Behav. Brain Res.* *166*, 189-196.
- Yin, H.H., Mulcare, S.P., Hilário, M.R.F., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M.I., Hansson, A.C., Lovinger, D.M., y Costa, R.M. (2009). Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat. Neurosci.* *12*, 333-341.
- Yue, C., y Yaari, Y. (2006). Axo-Somatic and Apical Dendritic Kv7/M Channels Differentially Regulate the Intrinsic Excitability of Adult Rat CA1 Pyramidal Cells. *J. Neurophysiol.* *95*, 3480-3495.
- Zaydman, M.A., y Cui, J. (2014). PIP2 regulation of KCNQ channels: biophysical and molecular mechanisms for lipid modulation of voltage-dependent gating. *Front. Physiol.* *5*, 195.
- Zhang, B., Albaker, A., Plouffe, B., Lefebvre, C., y Tiberi, M. (2014). Constitutive activities and inverse agonism in dopamine receptors. *Adv. Pharmacol.* *70*, 175-214.
- Zhang, D., McGregor, M., Bordia, T., Perez, X.A., McIntosh, J.M., Decker, M.W., y Quik, M. (2015). α 7 nicotinic receptor agonists reduce levodopa-induced dyskinesias with severe nigrostriatal damage. *Mov. Disord.* *30*, 1901-1911.
- Zhang, J., Qu, F., Nakatsuka, A., Nomura, T., Nagai, M., y Nomoto, M. (2003). Pharmacokinetics of L-dopa in plasma and extracellular fluid of striatum in common marmosets. *Brain Res.* *993*, 54-58.
- Zhang, Y.-F., Reynolds, J.N.J., y Cragg, S.J. (2018). Pauses in Cholinergic Interneuron Activity Are Driven by Excitatory Input and Delayed Rectification, with Dopamine Modulation. *Neuron* *98*, 918-925.e3.

- Zhao, Z., Zhang, K., Liu, X., Yan, H., Ma, X., Zhang, S., Zheng, J., Wang, L., y Wei, X. (2016). Involvement of HCN Channel in Muscarinic Inhibitory Action on Tonic Firing of Dorsolateral Striatal Cholinergic Interneurons. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 71.
- Zhou, F.-M., Wilson, C.J., y Dani, J.A. (2002). Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J. Neurobiol.* 53, 590-605.
- Zitron, E., Kiesecker, C., Lück, S., Kathöfer, S., Thomas, D., Kreye, V.A.W., Kiehn, J., Katus, H.A., Schoels, W., y Karle, C.A. (2004). Human cardiac inwardly rectifying current IKir2.2 is upregulated by activation of protein kinase A. *Cardiovasc. Res.* 63, 520-527.
- Zitron, E., Günth, M., Scherer, D., Kiesecker, C., Kulzer, M., Bloehs, R., Scholz, E.P., Thomas, D., Weidenhammer, C., Kathöfer, S., et al. (2008). Kir2.x inward rectifier potassium channels are differentially regulated by adrenergic alpha1A receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 84-94.
- Zold, C.L., Ballion, B., Riquelme, L.A., Gonon, F., y Murer, M.G. (2007). Nigrostriatal lesion induces D2-modulated phase-locked activity in the basal ganglia of rats. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2131-2144.
- Zold, C.L., Escande, M. V, Pomata, P.E., Riquelme, L.A., y Murer, M.G. (2012). Striatal NMDA receptors gate cortico-pallidal synchronization in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 47, 38-48.
- Ztaou, S., Maurice, N., Camon, J., Guiraudie-Capraz, G., Kerkerian-Le Goff, L., Beurrier, C., Liberge, M., y Amalric, M. (2016). Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 36, 9161-9172.