



---

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Acción de la L-DOPA en la actividad espontánea de  
distintas poblaciones neuronales en el estriado  
parkinsoniano**

Tesis presentada para obtener el grado de:  
**Licenciatura en Biotecnología**

Presenta:

**Alejandra Fuentes Serrano**

**Directora: Dra. Esther Lara González**

**Codirector: Dr. José Bargas Díaz**

Puebla, Pue.

Septiembre, 2021



## **Agradecimientos**

A mis mentoras, las Doctoras Esther Lara y Mariana Duhne, por brindarme su conocimiento, su dirección y apoyo, los cuales permitieron la consolidación de este proyecto. Por hacerme parte de él. Sus enseñanzas en cada ámbito constituyen un cimiento fundamental en mi formación.

Al Dr. José Bargas, por su acompañamiento y guía, por cada oportunidad dada.

A Montse y Janin, por su asesoría, tiempo y paciencia; por todo lo aprendido y pendiente por aprender.

A Oswaldo, por su amistad y su disposición a siempre ayudar.

A Judith, Ram, Jorge, Jael, José Luis, Jesús y Eric por su compañerismo y entusiasmo; por todos los buenos momentos.

A Susan por la complicidad y apoyo a través de los años. A Dan, por las palabras de aliento y el humor. A Jesús Gabrielle por el soporte y cada buena intención.

A mi familia por su amor, motivación y el impulso que han dado a cada objetivo. Gracias por hacer que sucedan.



## Índice general

<b>Resumen</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	8
<b>Antecedentes</b> .....	11
Ganglios basales.....	11
Microcircuito estriatal.....	13
Enfermedad de Parkinson .....	17
Modelo experimental .....	18
Imagenología de calcio .....	19
<b>Planteamiento del problema</b> .....	21
<b>Justificación</b> .....	22
<b>Hipótesis</b> .....	22
<b>Objetivos</b> .....	23
<b>Diseño metodológico</b> .....	23
Análisis de la actividad neuronal .....	26
Análisis estadístico.....	29
<b>Resultados</b> .....	30
Actividad espontánea de las poblaciones neuronales en el microcircuito parkinsoniano .....	30
Actividad espontánea de las poblaciones neuronales en el microcircuito parkinsoniano durante la administración de L-DOPA.....	35
<b>Discusión</b> .....	41
<b>Conclusiones</b> .....	50
<b>Bibliografía</b> .....	52

## Resumen

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neuropsiquiátrico complejo que cursa con signos motores y no motores. La afección en la conducta motora sigue a la deficiencia de dopamina en el neostriado (caudado y putamen) y otros ganglios basales, debiéndose a la muerte de las neuronas dopaminérgicas que inervan dichos núcleos. Los distintos linajes neuronales estriatales, que son regulados por la dopamina, modifican su actividad cuando esta se ve reducida. Sin embargo, sigue en discusión cuál es el cambio específico que sufre cada linaje; o cómo estos responden a tratamientos farmacológicos como la L-DOPA, que constituye la primera opción terapéutica. En este trabajo examinamos por primera vez, en tejido estriatal *in vitro* y sin estimulación de ningún tipo, cómo la privación de dopamina afecta la actividad de las neuronas estriatales de los siguientes linajes: neuronas de proyección de las vías directa (dSPNs) e indirecta (iSPNs) así como interneuronas colinérgicas (CINs); todas ellas en condición control, en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson y bajo el efecto de la adición de L-DOPA sobre dicho modelo. Para ello usamos registro múltiple con imagenología de calcio y resolución de célula única, así como herramientas moleculares con las que se expresaron indicadores de calcio, de forma específica, en docenas de neuronas de cada linaje neuronal para poder seguir y posteriormente comparar su actividad, a través del análisis de dos mediciones complementarias: actividad acumulada (AA) y funciones de distribución acumulada (FDA). Observamos que, ante la reducción de dopamina, todos los linajes neuronales estudiados exhibieron cambios en su actividad: las iSPNs y las CINs la aumentaron, mientras que las dSPNs la disminuyeron. El tratamiento con L-DOPA restauró la actividad de las iSPNs y CINs, pero no así de las dSPNs. Nuestros resultados muestran que la privación de dopamina incide tanto en la actividad neuronal individual como en la cantidad de neuronas que son activadas. El efecto terapéutico de la L-DOPA ocurre principalmente a través de la activación de receptores a dopamina de la clase D2. Lo cual abre la puerta a la realización de ensayos con fármacos específicos que eviten los efectos colaterales de la L-DOPA.

<b>Abreviaturas</b>	<b>Español</b>	<b>Inglés</b>
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson	Parkinson disease
<b>L-DOPA</b>	L-3,4 dihidroxifenilalanina	L-3,4 dihydroxyphenylalanine
<b>dSPNs</b>	Neuronas espinosas de proyección de la vía directa	Direct spiny projection neurons
<b>iSPNs</b>	Neuronas espinosas de proyección de la vía indirecta	Indirect spiny projection neurons
<b>CINs</b>	Interneuronas colinérgicas	Cholinergic interneurons
<b>GB</b>	Ganglios basales	Basal ganglia
<b>GPe</b>	Globo Pálido externo	External globus pallidus
<b>GPI</b>	Globo Pálido interno	Internal globus pallidus
<b>STN</b>	Núcleo subtalámico	Subthalamic nucleus
<b>SNr</b>	Sustancia Nigra pars reticulata	Substantia nigra pars reticulata
<b>VTA</b>	Núcleo ventral anterior	Ventral tegmental area
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico	Gamma aminobutyric acid
<b>SC</b>	Colículo superior	Superior colliculus
<b>MLR</b>	Región locomotora mesencefálica	Mesencephalic locomotor region
<b>PPN</b>	Núcleos pedúnculo-pontinos	Pedunculopontine nucleus
<b>TANs</b>	Neuronas tónicamente activas	Tonically active neurons
<b>FSIs</b>	Interneuronas de disparo rápido	Fast Spiking Interneurons
<b>PV</b>	Parvalbúmina	Parvalbumin
<b>LTIs</b>	Interneuronas de bajo umbral	Low-threshold interneurons
<b>SOM</b>	Somatostatina	Somatostatin
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa	Nitric oxide synthase
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y	Neuropeptide Y
<b>CR</b>	Calretinina	Calretinin
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa	Tyrosine hydroxylase
<b>AC</b>	Adenilil ciclasa	Adenylyl cyclase
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A	Protein kinase A
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C	Phospholipase C

<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
<b>6-OHDA</b>	6-hidroxidopamina	6-hydroxydopamine
<b>GECI</b>	Indicador de calcio genéticamente codificado	Genetically encoded calcium indicator
<b>AAV</b>	Virus adenoasociados	Adeno-associated viruses
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente mejorada	Enhanced green fluorescent protein
<b>FDA</b>	Función de distribución acumulada	Cumulative distribution function

## Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neuropsiquiátrico complejo que cursa con afectación del movimiento causado por la pérdida de la inervación dopaminérgica en los ganglios basales, el tálamo, la corteza y particularmente en el neostriado. Este núcleo está compuesto principalmente por neuronas estriatales de proyección (SPNs: por sus siglas en inglés *striatal projection neurons*) y una pequeña proporción de interneuronas GABAérgicas y colinérgicas (aprox. 5-10% de todas las neuronas estriatales; Bolam, 2013). Las SPNs poseen un papel crucial en operaciones de procesamiento y relevo de información hacia el resto de los ganglios basales (Plenz & Wickens, 2016), mientras que las interneuronas colinérgicas (CINs), a pesar de su escaso número, constituyen un elemento crítico de la modulación estriatal (Galarraga et al., 1999; Tanimura et al., 2018). El agotamiento de dopamina durante la EP produce alteraciones en la actividad y propiedades de las neuronas estriatales, las cuales han sido estudiadas en SPNs y CINs, aunque con resultados hasta hoy contradictorios.

Estudios en los que se han registrado dSPNs y iSPNs con imagenología de calcio y electrofisiología han descrito el aumento de la actividad de ambos linajes tras la privación dopaminérgica (Costa et al., 2006; Jáidar et al., 2019; Sharott et al., 2017). Usando metodologías un tanto distintas, se ha reportado una disminución en la tasa de disparo de las dSPNs y un aumento en las iSPNs (Ericsson et al., 2013; Kravitz et al., 2010; Mallet et al., 2006; Parker et al., 2018; Sagot et al., 2018; Warre et al., 2011). Estos últimos resultados favorecen el “modelo de las dos vías” de los ganglios basales planteado originalmente por Albin et al. (1989). También se ha reportado disminución de la actividad de las dSPNs sin cambios significativos en las iSPNs, sobre todo cuando los sujetos experimentales se encuentran realizando distintas acciones (Ketzer et al., 2017; Ryan et al., 2018). Por definición, en los estudios en sujetos vivos, el neostriado recibe muchas más aferencias activas (Kravitz et al., 2010) que en el tejido aislado *in vitro*. Por lo tanto, para aumentar la actividad control, los estudios previos *in vitro* han utilizado tejido estriatal estimulado química o eléctricamente para compararlo con el tejido enfermo (Aparicio-Juárez et al., 2019; Jáidar et al., 2010; Lara-González et al., 2019; Pérez-Ortega et al., 2016; Plata et al., 2013). Lo que se ha encontrado es un aumento en la actividad global del microcircuito durante el parkinsonismo, acompañado de la aparición de un ensamble neuronal altamente recurrente que interrumpe el flujo normal de actividad entre los ensamblajes activos en

situación control estimulada, y que acapara una gran cantidad de neuronas. Este circuito patológico se disuelve con el uso de agonistas dopaminérgicos o la estimulación cortical (Aparicio-Juárez et al., 2019; Lara-González et al., 2019). En este trabajo decidimos analizar, una vez más, los cambios en el circuito parkinsoniano *in vitro*, pero utilizando tejido control no activado o sin estimular, donde la actividad de las SPNs es muy escasa, la coactividad es virtualmente nula y, por lo tanto, difícil de registrar. Para esta tarea, utilizamos ratones genéticamente modificados con el objetivo de identificar distintos linajes neuronales, de modo que extrajimos y empleamos tejido estriatal mantenido *in vitro*, con pocas aferencias, y observamos qué ocurre a la actividad espontánea de estos linajes cuando se reduce la dopamina.

Respecto de las CINs la literatura actual también presenta severas discrepancias. Registros electrofisiológicos realizados en rebanadas cerebrales encuentran un incremento en su actividad durante la privación de dopamina (Ding et al., 2006; Raz et al., 1996; Sanchez et al., 2011; Tanimura et al., 2018; Tubert & Murer, 2021), aunque otros investigadores describen una disminución en dicha actividad (Choi et al., 2020; McKinley et al., 2019) y aun, virtualmente, nula actividad (Maltese et al., 2021). Por otro lado, manipulaciones optogenéticas muestran que el silenciamiento de las CINs en un modelo murino *in vivo* de EP alivia algunos déficits del parkinsonismo (Maurice et al., 2015). Por esta razón, las CINs es el otro linaje neuronal escogido para el presente estudio. La influencia de estas interneuronas sobre el circuito estriatal normal y patológico está fuera de toda duda (Galarraga et al., 1999).

Las discrepancias entre los trabajos referidos pueden deberse a múltiples diferencias metodológicas, a las distintas variables medidas y a las diferentes condiciones iniciales, las cuales inciden en la obtención de resultados aparentemente contradictorios (Magill et al., 2006; Sharott et al., 2012): *in vitro* vs. *in vivo*, animal anestesiado, en reposo, en libre movimiento o realizando una tarea determinada, etc. Mientras que *in vitro*, debido a que la mayoría de las neuronas estriatales son silentes en el tejido control (Carrillo-Reid et al., 2008) y por lo tanto difíciles de registrar, los estudios previos lo han activado o estimulado de diferentes formas: impulsos eléctricos, optogenética o la adición de fármacos (e.g.: NMDA) con la finalidad de provocar una actividad por arriba de la basal y más cercana a la encontrada *in vivo*. Otros factores que adicionan variabilidad incluyen la diversidad en los protocolos de optogenética, es decir, si se estimula con luz continua o discontinua, así como

el patrón y duración de la estimulación (Mallet et al., 2019), la idoneidad en el uso de fluoróforos y la identificación del linaje neuronal (Maltese et al., 2021).

En el presente trabajo buscamos observar los cambios que genera la reducción de dopamina en los siguientes linajes estriatales: dSPNs, iSPNs y CINs *in vitro* bajo ninguna clase de estimulación en tejido estriatal intacto y privado de dopamina, con el propósito de saber cuáles son los cambios en la actividad espontánea. Para ello partimos de dos consideraciones:

La primera, dado que la amplia variedad de linajes celulares en el estriado mantiene interacciones recíprocas que configuran la actividad de todo el conjunto; es decir, la actividad de una neurona sólo tiene sentido respecto a la de otras células en el tejido (Yuste, 2015), hemos decidido registrar de forma simultánea la actividad de varias neuronas pertenecientes a una misma población mediante imagenología de calcio. Esto lo realizamos en cepas murinas transgénicas que han sido ampliamente caracterizadas, en las que expresamos de forma específica el indicador de calcio proteico GCaMP6f para cada linaje celular con el objetivo de efectuar una identificación confiable. Así mismo, el registro de múltiples neuronas simultáneamente nos permite observar cambios poblacionales y no sólo cambios individuales de los que no se puede descartar la varianza entre las células, cuestión que también ha incidido en la generación de conclusiones tan dispares como las mencionadas previamente.

La segunda consideración, haciendo alusión a trabajos previos y ya referidos, se ha descrito que las neuronas estriatales *in vitro* exhiben un aumento drástico en su actividad espontánea respecto a la observada en tejido control (Aparicio-Juárez et al., 2019; Jáidar et al., 2010; Lara-González et al., 2019; Pérez-Ortega et al., 2016; Plata et al., 2013); formando un ensamble altamente recurrente, como si el tejido fuese incapaz de salir de ese estado, obstruyendo la transición normal entre ensambles neuronales, y semejando al paciente enfermo, cuya capacidad para cambiar de postura y moverse se inhabilita. Los ensambles neuronales se definen como neuronas coactivas que siguen secuencias alternando su actividad, pero que en general, no pueden observarse en tejido estriatal no estimulado, a diferencia de otros tejidos, como, por ejemplo, la corteza cerebral (Serrano-Reyes et al., 2020). Sin embargo, desconocemos qué clase de neuronas generan la hiperactividad patológica y el ensamble altamente recurrente. En este trabajo buscamos

revelar la identidad del linaje neuronal mayormente responsable de este fenómeno, lo que mejorará la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad (Pérez-Ortega et al., 2016).

Adicionalmente, hemos decidido investigar el efecto que tiene la aplicación de L-DOPA sobre la actividad espontánea de los distintos linajes neuronales afectados por la privación de dopamina. La L-DOPA constituye el tratamiento farmacológico más socorrido para tratar la EP, pues alivia drásticamente los signos motores aunque produce otras complicaciones como la aparición de discinesias tras su uso prolongado (Lara-González et al., 2019; Poewe et al., 2010). No obstante, a pesar de ser ampliamente usada y considerarse la principal línea de tratamiento para el padecimiento, aún se desconoce de manera completa su mecanismo terapéutico (McGregor & Nelson, 2019). Nuestros resultados sugieren un mecanismo importante. Con la información generada, además de contribuir a nuestro conocimiento sobre la acción de la L-DOPA en el núcleo estriado, también podemos guiar la búsqueda de alternativas farmacológicas que repliquen los efectos terapéuticos, evitando los adversos.

## **Antecedentes**

### Ganglios basales

Se denomina “ganglios basales” (GB) a un conjunto de núcleos situados en el interior de los hemisferios cerebrales. Están implicados funcionalmente en el aprendizaje procedimental por reforzamiento, la formación de hábitos, el mantenimiento de la postura, el control motor dirigido a metas y la selección de estrategias para realizar secuencias de acciones (Haber, 2016; Jin et al., 2014; Lanciego et al., 2012; Redgrave et al., 2010a). Las estructuras que los componen son categorizadas en tres grupos, de acuerdo con su participación en el procesamiento de la información: núcleos de entrada, intrínsecos y de salida.

El estriado es el principal núcleo de entrada (compuesto por los núcleos caudado, putamen y accumbens), recibe información de diversos orígenes, principalmente de tipo cortical, talámico y del tallo cerebral (Huerta-Ocampo et al., 2014), principalmente nigral. Los núcleos intrínsecos se localizan entre los de entrada y salida, incluyen el segmento externo del globo pálido (GPe) y el núcleo subtalámico (STN), recibiendo también aferentes corticales y talámicas. Finalmente, los núcleos de salida: segmento interno del globo pálido (GPi) y sustancia nigra pars reticulata (SNr) son encargados de enviar la información que

ha sido procesada de regreso al tálamo y corteza, así como al tallo cerebral (Lanciego et al., 2012). Todos estos núcleos reciben inervación dopaminérgica desde la sustancia nigra pars compacta (SNc) a excepción del accumbens y la corteza que la reciben del núcleo ventral anterior (VTA) (Grillner et al., 2013; Kozlov et al., 2009; Redgrave et al., 2010b).

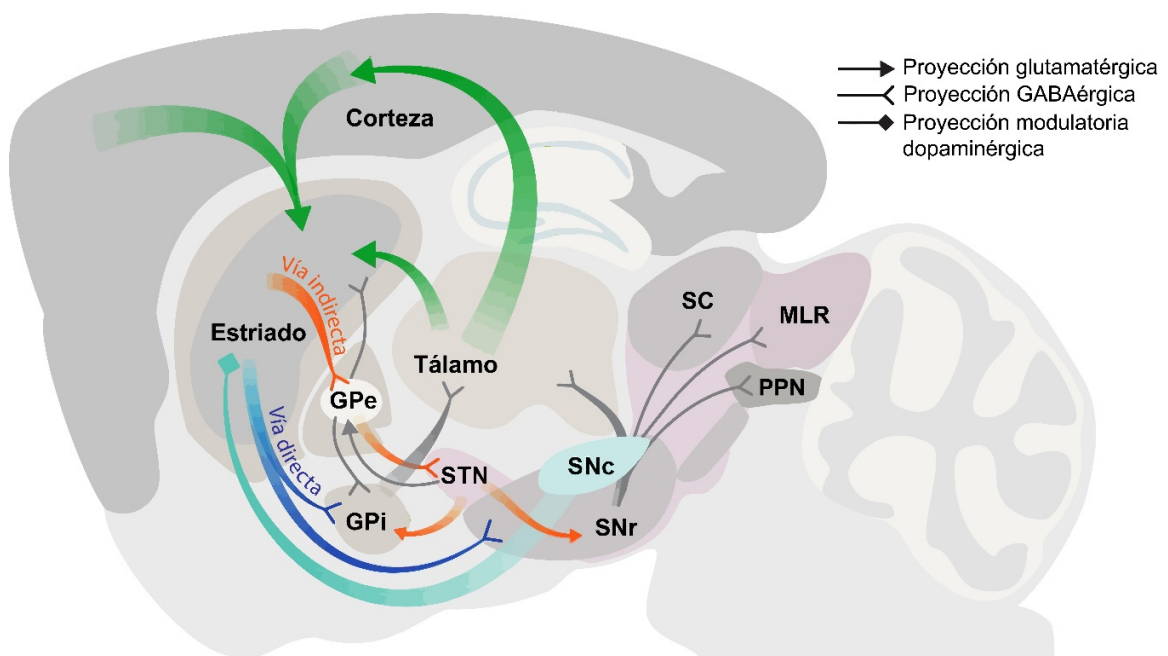
#### Modelo clásico de las dos vías

La información que recibe el estriado de las aferencias excitatorias talámicas y corticales, es procesada y posteriormente relevada a través de sus proyecciones, divididas tradicionalmente en dos vías principales: una llamada "directa" pues conecta al estriado directamente con los núcleos de salida (dSPNs → SNr/GPi); otra llamada "indirecta" que proyecta únicamente al GPe (iSPNs → GPe; Albin et al., 1989), pero que, a través de conexiones de relevo, también conecta con SNr/GPi. El GPe mantiene una conexión recíproca con STN y ambos a su vez proyectan hacia los núcleos de salida (DeLong & Wichmann, 2009; Nelson & Kreitzer, 2014). Estos núcleos, además de proyectar al tálamo y la corteza, también lo hacen hacia otras estructuras que están implicadas en la iniciación de movimientos así como en el mantenimiento de la postura, tales como los colículos, la región locomotora mesencefálica (MLR) y los núcleos pedúnculo-pontinos (PPN), a los que inhiben en condiciones de reposo (Grillner & Robertson, 2016), mientras que las colaterales de la vía piramidal los excitan. Se piensa que las dos vías de los GB son funcionalmente complementarias, debido a que la vía directa promueve la inhibición de los núcleos de salida (SNr/GPi), desinhibiendo, o activando, las estructuras tálamo-corticales que generan el movimiento. Al contrario, la activación de la vía indirecta suprime la inhibición que ejerce el GPe sobre los núcleos de salida y desinhibe al STN, que ejerce una influencia excitadora sobre estos núcleos, inhibiendo así, las estructuras tálamo-corticales que generan el movimiento. Toda acción motora compleja implica la activación e inhibición de diversas sinergias musculares, por lo que ambas vías actúan en conjunto en una secuencia de acciones (Jin & Costa, 2015; Tecuapetla et al., 2014). Así, por ejemplo, al dar un paso, la vía directa promueve el movimiento en la extremidad que da el paso, mientras la vía indirecta produce la rigidez en la extremidad contralateral o de apoyo, que no da el paso, para mantener el centro de gravedad. Otra manera de verlo es que la vía directa ejecuta los movimientos necesarios y la vía indirecta inhibe o filtra los movimientos no necesarios (Mink, 1996).

Esto sugiere que la función normal de los GB requiere de un balance entre las vías directa e indirecta, que al ser alterado, resulta en la activación anormal de los núcleos de salida y la sobreinhibición de las estructuras que inician y coordinan el movimiento (Calabresi et al., 2014).

### Microcircuito estriatal

Se han estudiado las propiedades de diversos linajes neuronales mediante técnicas de electrofisiología basadas en el estudio de células individuales. Sin embargo, el desarrollo de nuevos métodos que permiten el registro simultáneo de varias neuronas ha develado que la actividad de una neurona sólo tiene sentido respecto a la actividad de otras células en el tejido nervioso (Yuste, 2015). Así, la evidencia apunta a que las células nerviosas se



**Figura 1. Esquema en plano sagital de los ganglios basales.** El modelo clásico establece que el flujo de información inicia en corteza y es dirigido al estriado, donde se procesa y relea a través de dos vías principales: una directa (en azul) y una indirecta (en naranja). La vía directa tiene por blanco GPi y SNr, mientras que la indirecta proyecta hacia GPe y STN, que comunican a su vez con los núcleos de salida. El tálamo, colículo superior (SC), núcleo pedunculopontino (PPN) y región locomotora (MLR) reciben las aferencias de los núcleos de salida. Adicionalmente el tálamo remite información de vuelta a la corteza, que contribuye a la ejecución de los programas motores. La activación de las vías se encuentra sujeta a la modulación dopaminérgica que ejerce SNc sobre el estriado y los demás GB, aunque aquí se enfatiza la vía nigroestriatal. Modificado de Blumenstock & Dudanova, 2020.

organizan en grupos funcionales que, a través de patrones de actividad dada por sus interacciones sinápticas, directas e indirectas, operan tareas específicas como la ejecución

de programas motores, codificación de estímulos sensoriales, aprendizaje o memoria (Carrillo-Reid et al., 2015; Grillner & Graybiel, 2006; Sheperd & Grillner, 2010). Estos grupos funcionales se han denominado microcircuitos, donde lo que se conecta son grupos de neuronas coactivas denominados ensambles neuronales que se han convertido en objeto de amplio análisis e investigación en los últimos años.

El estriado, considerado centro integrador de información, contribuye a funciones tales como la selección de programas motores que facilitan o suprimen el movimiento (Balleine et al., 2007; Burke et al., 2017). Para ello resulta fundamental el estudio de la actividad de las poblaciones neuronales que lo integran.

De manera general, la diversidad neuronal estriatal ha sido dividida en dos grupos: neuronas espinosas o de proyección (SPNs) e interneuronas, como se ha referido anteriormente. Las primeras reciben su nombre debido a que sus axones proyectan hacia otros núcleos, mientras que la conexión y proyecciones de las segundas se limitan al estriado, sin salir de él. A su vez, estos grupos se subdividen en otros más específicos de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas, inmunocitoquímicas, neuroquímicas y morfológicas (Tepper & Plenz, 2006).

#### *Neuronas de proyección*

También llamadas neuronas estriatofugales, las neuronas estriatales de proyección (SPNs) conforman las vías que transmiten la información procesada en el neostriado al resto de los GB. Son la principal clase neuronal del núcleo (alrededor del 90%), emplean GABA como neurotransmisor y se caracterizan morfológicamente por poseer procesos dendríticos arborizados, cubiertos por abundantes espinas dendríticas por lo que también son llamadas neuronas “espinosas”. Se dividen de acuerdo con sus blancos de proyección y expresión de receptores: las dSPNs que inervan directamente a GPi y SNr expresan receptores a dopamina de tipo 1 (D1) y dan lugar a la vía directa. Aquellas cuyas proyecciones van hacia el GPe, poseen receptores a dopamina de tipo 2 (D2) e integran la vía indirecta (iSPNs) (Bolam, 2013).

#### *Interneuronas*

En este conjunto, de forma clásica se han incluido a cuatro poblaciones principales de interneuronas: neuronas colinérgicas (*cholinergic interneurons*, CINs), que poseen un gran tamaño, una arborización axonal masiva y expresan la enzima acetilcolintransferasa (ChAT)

con la que sintetizan acetilcolina, reciben aferencias de corteza y tálamo (Abudukeyoumu et al., 2019). Electrofisiológicamente se diferencian por mostrar un patrón de disparo constante, continuo y de baja frecuencia, por lo que se les denomina también neuronas tónicamente activas (TANs) (Bennett and Wilson, 1999; Bolam, 2013). Otra población estriatal corresponde a las llamadas interneuronas de disparo rápido (*fast-spiking interneurons*, FSIs), de dimensiones heterogéneas, producen GABA como neurotransmisor y expresan la proteína de unión a calcio parvalbúmina (PV), poseen un campo dendrítico amplio y exhiben potenciales de acción muy rápidos, pudiendo disparar trenes sostenidos de potenciales de acción de hasta 300 Hz tras ser estimuladas (Tepper & Plenz, 2006). Una segunda clase de interneuronas GABAérgicas, denominadas interneuronas de bajo umbral (*low-threshold spiking interneurons*, LTIs) exhiben, como su nombre lo indica, disparos de bajo umbral dependientes de los canales  $CaV_3$  de  $Ca^{2+}$  y pueden ser identificadas por la expresión de somatostatina (SOM), óxido nítrico sintasa (NOS) y neuropéptido Y (NPY) (Kawaguchi et al., 1995), además de que disponen de dendritas escasamente ramificadas. Un tercer linaje de interneuronas GABAérgicas contempla a las neuronas sin espinas dendríticas que expresan la proteína de unión a calcio calretinina (CR), de estructura heterogénea, constituyen la población más escasa en el estriado de roedores, razón por la cual sus características electrofisiológicas no han sido caracterizadas en detalle (Tepper et al., 2010), sin embargo, registros efectuados por Garas et al. (2018) sugieren que pueden presentar disparo rápido con patrones y tasas de disparo heterogéneas. Otro tipo más escaso expresa tirosina hidroxilasa (TH), pero no sintetiza ni libera dopamina, sino que también es GABAérgica (Tepper et al., 2010). No se descartan subtipos entre estas clases principales.

El microcircuito estriatal juega un rol fundamental en la regulación de las vías de salida estriatales: selecciona los grupos de SPNs que disparan potenciales de acción (Burke et al., 2017). En reposo, las SPNs se mantienen relativamente hiperpolarizadas y en estado quiescente; hasta que el impulso excitatorio de las entradas cortical y talámica las despolariza, permitiéndoles alcanzar el denominado up-state (Wilson & Kawaguchi, 1996; Tepper & Plenz, 2006). Es en este estado que las entradas excitatorias, inhibitorias y modulatorias adicionales, procedentes de fuentes locales y externas pueden llevar a las neuronas de proyección a presentar o no potenciales de acción (Clarke & Adermark, 2015).

#### *Transmisores moduladores en el neostriado*

El estriado además de recibir aferentes excitatorias, es innervado por otras proyecciones que incluyen entradas histaminérgicas, serotoninérgicas, colinérgicas y dopaminérgicas (Dautan et al., 2020; Lanciego et al., 2012). Estas últimas, además de poseer mayor densidad respecto al resto de las aferentes mencionadas, ejerce una importante modulación sobre la dinámica de las neuronas de proyección estriatales, interneuronas GABAérgicas y colinérgicas (Do et al., 2013).

Existen cinco tipos de receptores a dopamina a través de los que se efectúa esta regulación, todos ellos están acoplados a proteínas G y son divididos en dos familias farmacológicas: D1 y D2. Los receptores de la familia D1, contiene los subtipos D1 y D5, están acoplados a proteínas  $G_s$  y  $G_{olf}$ , estimulan a la enzima adenilil ciclasa (AC) y activan a la proteína quinasa A (PKA) (Neve et al., 2004). La PKA actúa sobre distintos objetivos que incluyen factores de transcripción, canales iónicos dependientes de voltaje, así como receptores de glutamato (Svenningsson et al., 2004). Mientras que los subtipos D2, D3 y D4, pertenecen a la familia D2, se encuentran unidos a proteínas  $G_i$  y  $G_o$ , que modulan negativamente a la AC además de modular canales iónicos dependientes de voltaje a través de la vía de la fosfolipasa C (PLC) (Hernández-López et al., 2000). Todos ellos son expresados en el estriado, sin embargo los subtipos D1 y D2 son los más abundantes (Surmeier et al., 2011).

Como se ha señalado previamente, las neuronas de proyección expresan receptores D1 (dSPNs) y D2 (iSPNs) que configuran su respuesta ante las entradas excitatorias e inhibitorias que reciben (Gerfen & Surmeier, 2011). Las interneuronas colinérgicas coexpresan receptores de ambas familias farmacológicas: D2 y D5 (Bergson et al., 1995; Yan et al., 1997), cuya activación incide en su disparo y la liberación de acetilcolina mientras que las interneuronas GABAérgicas FSIs, CR<sup>+</sup> y LTIs expresan el receptor D5 (Centonze et al., 2003; Rivera et al., 2002; Yan & Surmeier, 1997), que al ser estimulado en las interneuronas PV<sup>+</sup> y SOM<sup>+</sup>, induce la despolarización celular y promueve el disparo de potenciales de acción (Tepper et al., 2010). En las neuronas PV<sup>+</sup> se sabe que esto se debe en parte a la activación de canales CaV<sub>1</sub> (Rendón-Ochoa et al., 2018).

La acetilcolina es otro importante neuromodulador provisto por las interneuronas colinérgicas que se encuentran tónicamente activas en el estriado y por aferentes provenientes del tallo cerebral (Bennett & Wilson, 1999; Dautan et al., 2020). A pesar de que las CINs constituyen una mínima fracción de las neuronas estriatales totales, gracias a la densa innervación de sus arborizaciones, son capaces de mantener una concentración

basal de acetilcolina que regula la actividad del resto de poblaciones celulares mediante receptores muscarínicos y nicotínicos (Do et al., 2013).

Dada la notable concentración de estos neuromoduladores en el estriado y el importante rol que desempeña cada uno, se ha considerado que existe un balance entre los niveles de acetilcolina y dopamina, esencial para el control de la actividad motora y que al ser alterado causa desordenes neurológicos entre los que destaca la enfermedad de Parkinson (Aosaki et al., 2010; Do et al., 2013; Ztaou & Amalric, 2019).

### Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neuropsiquiátrico y neurodegenerativo progresivo, es el segundo en incidencia y prevalencia, sólo detrás de la enfermedad de Alzheimer y se estima que cerca de 10 millones de personas alrededor del mundo sufren la enfermedad (Hammond et al., 2007; Marras et al., 2018) mientras que en México, al menos 50 habitantes de cada 100 mil la padecen (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 2017).

Este trastorno neurológico exhibe síntomas no motores que aparecen hasta 20 años antes que los motores, cuando aparecen los signos motores es que ya hay una abundante degeneración de las fibras dopaminérgicas de la SNc que inervan al estriado y a otros núcleos de los GB, acompañada de la acumulación generalizada de la proteína intracelular  $\alpha$ -sinucleína. Entre sus características motoras están la lentitud y disminución de la eficacia con la que se ejecutan movimientos voluntarios (bradicinesia) y en casos más graves, por la incapacidad de iniciarlos (acinesia). Es común observar otros signos motores como rigidez muscular y temblor de extremidades en reposo, además de alteraciones cognitivas y emocionales (Poewe et al., 2017).

La muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SNc que ocurre durante la enfermedad implica la desaparición de la principal fuente de dopamina para el estriado y con ello el desequilibrio fisiológico del circuito. Esto se refleja en una importante elevación del tono colinérgico (Tanimura et al., 2018), pérdida de espinas dendríticas en las SPNs (Surmeier et al., 2010; Villalba & Smith, 2018; Zhai et al., 2019), modificaciones en la plasticidad y conectividad neuronal, entre otros cambios, que en conjunto repercuten en la aparición de actividad sincrónica anormal en el núcleo (Brown, 2003; Burkhardt et al., 2009). A pesar de ello, sigue existiendo un debate acerca de cuál es la participación de las neuronas estriatales en esta alteración y cómo incide en nuestras observaciones a nivel tisular.

Hasta el momento, la etiología de la enfermedad no se ha esclarecido por completo, sin embargo, numerosas investigaciones apuntan a que su naturaleza es multifactorial, debiéndose tanto a factores ambientales, autonómicos y genéticos (Kouli et al., 2018).

#### *Levodopa (L-DOPA)*

El fármaco L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) es un precursor de la biosíntesis de dopamina y uno de los agentes más eficaces en el manejo de la EP. Tras ser absorbida e incorporada a torrente sanguíneo, el medicamento atraviesa la barrera hematoencefálica alcanzando al cerebro, donde es descarboxilado a dopamina y ejerce sus funciones modulatorias. Para que esto suceda, su hidrólisis en la periferia se evita con drogas como la benserazida que inhiben la DOPA-descarboxilasa periférica. Esto se traduce en el alivio drástico en la lentitud del movimiento, del tono muscular incrementado, temblor en reposo e inclusive de síntomas no motores del trastorno (Marsot et al., 2017). Sin embargo, tras algunos años de tratamiento con el fármaco, se ha observado la pérdida de su eficacia, además del surgimiento de complicaciones motoras como fluctuaciones en el movimiento y discinesias (Poewe et al., 2010).

Por lo anterior, dilucidar cómo la L-DOPA revierte las alteraciones originadas por la depleción dopaminérgica permitiría buscar alternativas de tratamiento específicas que mimeticen su efecto terapéutico evadiendo la aparición de efectos colaterales.

#### Modelo experimental

En la búsqueda por profundizar nuestra comprensión sobre la EP, ha surgido la necesidad de desarrollar modelos experimentales que permitan replicar las características de la enfermedad en animales. Con este propósito se han empleado dos aproximaciones: la manipulación genética y el uso de neurotoxinas en roedores, primates no humanos y otras especies.

La aproximación genética se basa en la delección, mutación o sobreexpresión de genes implicados en mecanismos que favorezcan la aparición de la patología como lo son SNCA, LRRK2, UCH-L1, PINK1, DJ-1. Dichos genes están involucrados principalmente en la expresión y regulación transcripcional de  $\alpha$ -sinucleína y parkina, de forma que su manipulación promueve la agregación proteica (Palubinsky et al., 2015). Sin embargo, en esta clase de modelo no siempre se produce degeneración neuronal y por tanto no siempre se obtiene el fenotipo característico del Parkinsonismo (Bezard & Przedborski, 2011). Por

otro lado, los modelos neurotóxicos son creados mediante la inyección de moléculas como MPTP, rotenona y 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en fibras del haz medial del prosencéfalo o en la SNc induciendo la rápida pérdida de neuronas dopaminérgicas por estrés oxidativo (Duty & Jenner, 2011).

De estos, el modelo murino obtenido por la inyección unilateral de 6-OHDA en la SNc es uno de los más usados debido a su eficacia en la inducción de citotoxicidad neuronal, la seguridad en el proceso de administración de la toxina, la evaluación *in vivo* del grado de la lesión mediante pruebas conductuales (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970) y por su correlación con los síntomas y signos presentados por pacientes con EP. Algunos de estos signos, detectados en roedores lesionados con 6-OHDA incluyen déficits motores (Konnova & Swanberg, 2018), alteraciones de la conducta y el estado de ánimo (Campos et al., 2013), así como oscilaciones anormales en los GB, particularmente en STN y GPe (Bevan et al., 2002; Hammond et al., 2007; West et al., 2018).

En experimentos *in vitro* con rebanadas cerebrales derivadas de este modelo e imagenología de calcio, se ha reportado una mayor cantidad de actividad espontánea estriatal comparada con la registrada en condiciones control (Aparicio-Juárez et al., 2019; Jáidar et al., 2010) y de la que se han caracterizado marcadas diferencias (Pérez-Ortega et al., 2016). De forma que este modelo y metodología complementados con otras herramientas, pueden brindar información valiosa en la identificación y descripción de distintos linajes neuronales estriatales en condiciones patológicas y bajo tratamiento farmacológico.

#### Imagenología de calcio

La imagenología de calcio posibilita el registro de la actividad de varias células de forma simultánea con resolución de célula única, asegurando que las señales recabadas pertenecen a una célula que ha sido identificada. Esta técnica se basa en la medición óptica de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de indicadores de calcio que emiten fluorescencia.

En este sentido, la variación en la cantidad de iones de calcio al interior de las neuronas debido al disparo de potenciales de acción, ha sido ampliamente usado para monitorear la actividad neuronal *in vitro* (Mao et al., 2001), ya que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sufre importantes fluctuaciones a lo largo de estos eventos: en reposo, la mayoría de las neuronas de mamíferos poseen una concentración intracelular basal de 50–100 nM que

puede elevarse transitoriamente a valores entre 10-100 veces más grandes durante su actividad eléctrica (Berridge et al., 2000). Los indicadores de calcio permiten dar seguimiento a estos cambios mediante su unión a iones  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentren en difusión. Dicha unión induce cambios conformacionales en la estructura del indicador que permite la emisión de fluorescencia, de forma que los aumentos significativos en este parámetro evidencian la ocurrencia de potenciales de acción en una ventana de tiempo. A estas señales de actividad neuronal se les llama transitorios de calcio.

Existen diferentes tipos de sensores de calcio: los hay bioluminiscentes, químicos y genéticamente codificados (GECIs, *genetically encoded calcium indicator*); estos y sus subtipos se diferencian entre sí por el método de carga/expresión, grado de fotoblanqueo, vida media de fluorescencia, rendimiento cuántico, requerimientos de excitación y otras características que los hacen más o menos prácticos o idóneos para determinados fines; por lo cual, para el desarrollo de este proyecto se eligió un GECI denominado GCaMP6f, pues además de poseer propiedades ópticas y químicas aceptables, esta clase de indicador proporciona la ventaja de ser expresado en poblaciones neuronales específicas bajo la secuencia promotora de una proteína particular que identifique puntualmente a alguno de esos linajes.

La expresión de este indicador se lleva a cabo empleando el sistema Cre-Lox en ratones transgénicos que albergan en su información genética la secuencia codificante de la recombinasa Cre, seguida de la señal de poliadenilación SV40 que finaliza el transcrito. El transgén se encuentra ubicado entre la región promotora y el codón de inicio para la transcripción del gen de la proteína identitaria, de modo que la expresión de la recombinasa se encuentra dirigida por las secuencias reguladoras del mismo gen, implicando que la expresión de Cre se lleve a cabo únicamente en la población neuronal que se distingue por la ya mencionada proteína identitaria. De manera complementaria, se hace uso de un vector viral adenoasociado (AAV) que alberga la información genética codificante de GCaMP6f, flanqueada por los sitios *loxP*. Posteriormente, la recombinasa efectúa la integración de la secuencia nucleotídica del indicador en un sitio flanqueado por secuencias *loxP* que se encuentran también en el genoma del ratón transgénico.

### *GCaMP6f*

El indicador de calcio GCaMP6f es un complejo proteico recombinante que consiste en una proteína verde fluorescente mejorada (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*) y

permutada circularmente, flanqueada por calmodulina (una proteína de unión a calcio) y el péptido de unión a calmodulina M13. En presencia de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulina y el péptido M13 interactúan, induciendo cambios conformacionales en el complejo que propician la emisión de fluorescencia por la EGFP (Chen et al., 2013; Grienberger & Konnerth, 2012). Así, cada vez que tiene lugar el disparo de potenciales de acción, aumenta la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y hay un aumento en la intensidad de la fluorescencia con la que se monitorea la actividad neuronal a lo largo del tiempo. De hecho, se sabe que los potenciales de acción se generan durante la subida del transitorio de calcio, por lo que existen métodos para inferir la probabilidad de disparo neuronal a partir de dichos transitorios.

### **Planteamiento del problema**

Actualmente el conocimiento del que se dispone sobre las alteraciones que sufre la actividad de las dSPNs, iSPNs y CINs en la enfermedad de Parkinson es sumamente heterogéneo al ser derivado de trabajos con resultados aparentemente contradictorios. Estas discrepancias se deben a la presencia de fuentes de confusión, i.e., variables no medidas que afectan directa o indirectamente el resultado final, como el uso de fluoróforos inespecíficos en la identificación celular o la clase de estimulación dada en un determinado modelo, que dependen de la diversidad de métodos y configuraciones experimentales abordadas (Mallet et al., 2019). Además, la mayoría de estas metodologías se basan en el seguimiento de la actividad de células individuales, por lo que su enfoque no explica cómo interaccionan las neuronas con el resto de los elementos en el circuito ni como se interrelacionan los cambios puntuales, descritos a nivel celular, con los observados a nivel tisular (Yuste, 2015).

Uno de los cambios a nivel tisular más evidentes y que ha sido ampliamente estudiado de manera previa, es el aumento drástico en la actividad espontánea del tejido estriatal *in vitro* tras la privación de dopamina (Aparicio-Juárez et al., 2019; O Jáidar et al., 2010; Lara-González et al., 2019; Pérez-Ortega et al., 2016; Plata et al., 2013); sin embargo, se desconoce a qué se debe esta observación, es decir, si existe algún linaje neuronal estriatal que se encuentre implicado particularmente en dicha hiperactividad.

Por ello, resulta de vital importancia conocer con precisión la identidad de las neuronas que son registradas, seguir la actividad de varias de ellas de forma simultánea a lo largo del tiempo y caracterizar su participación a nivel poblacional (Maltese et al., 2021; McGregor &

Nelson, 2019), en la actividad tisular patológica. Respecto a la principal línea de tratamiento para este padecimiento, la levodopa (L-DOPA), a pesar de ser usada ampliamente aún no se conoce en su totalidad su mecanismo terapéutico, en especial a nivel estriatal (McGregor & Nelson, 2019). Por lo que todas estas consideraciones en conjunto nos llevan a preguntar: ¿cómo se modifica la actividad de dSPNs, iSPNs e interneuronas colinérgicas estriatales en ausencia de dopamina?, de estas poblaciones, ¿alguna de ellas está implicada especialmente en la hiperactividad observada a nivel tisular?, ¿cuál es el efecto del fármaco L-DOPA en la actividad de estos linajes neuronales cuando están deficientes en dopamina? Pero a diferencia de trabajos previos, en este caso intervendremos con el tejido lo menos posible, observando sólo actividad espontánea, sin estimular con el objetivo de eliminar posibles fuentes de confusión.

### **Justificación**

La implementación de técnicas como la imagenología de calcio auxiliada por la expresión específica de indicadores genéticamente codificados, permite el seguimiento de la actividad de poblaciones neuronales plenamente identificadas en el microcircuito estriatal. Esto hace posible caracterizar su dinámica de actividad a lo largo del tiempo en un modelo de estudio animal bajo condiciones control, deficiente de dopamina antes y después de la administración de L-DOPA, que corresponderían con los estados fisiológicos sano y patológico, antes y durante el tratamiento farmacológico en humanos. Con el objetivo de limitar las fuentes de confusión que han incidido en la abundancia de resultados contradictorios en trabajos que preceden al nuestro, nos limitaremos al estudio de la actividad espontánea en cada condición, bajo ninguna clase de estimulación.

Adicionalmente, los resultados obtenidos pueden guiar una búsqueda más eficiente de dianas terapéuticas y tratamientos que eviten la aparición de efectos secundarios como los observados tras el uso prolongado de L-DOPA.

### **Hipótesis**

La aplicación del precursor dopaminérgico L-DOPA revierte los cambios en la actividad espontánea de las neuronas dSPNs, iSPNs y CINs, en tejido *in vitro* sin estimular proveniente de modelos murinos (6-OHDA) de la enfermedad de Parkinson.

## **Objetivos**

### *General*

Caracterizar la actividad espontánea *in vitro* de neuronas de proyección e interneuronas colinérgicas en el microcircuito estriatal control y privado de dopamina, sin estimulación antes y durante la aplicación de L-DOPA.

### *Específicos*

- Lesionar la SNc en ratones con la neurotoxina 6-OHDA para generar el modelo animal de la enfermedad de Parkinson, validado por la conducta de giro.
- Expresar diferencialmente el indicador de calcio GCaMP6f en neuronas de proyección de la vía directa (D1-Cre), indirecta (A<sub>2A</sub>-Cre), y CINs (ChAT-Cre) de sujetos control y con lesión con 6-OHDA.
- Registrar mediante imagenología de calcio la actividad espontánea de neuronas de proyección de las vías directa e indirecta, así como de CINs en tejido cerebral control.
- Registrar la actividad espontánea de neuronas de proyección dSPNs, iSPNs y CINs en tejido proveniente de modelos 6-OHDA, antes y durante la aplicación de L-DOPA.
- Cuantificar y comparar la actividad de cada linaje neuronal registrado en condiciones control y en ausencia de dopamina antes y durante el tratamiento con L-DOPA.

## **Diseño metodológico**

De forma general, el proceso experimental consistió en la selección de ratones transgénicos que expresaran la recombinasa Cre de forma específica en neuronas de proyección dSPNs o D1(+) (D1-Cre), iSPNs o D2 (+) (A<sub>2A</sub>-Cre) y CINs (ChAT-Cre). Para cada linaje, los ratones se dividieron en dos grupos: uno control y otro que fue lesionado con 6-OHDA para dar lugar al modelo privado de dopamina. Los ratones que fueron tratados con la toxina se evaluaron y se procedió con la entrega por cirugía estereotáxica de los vectores virales que albergaban la información codificante para el indicador de calcio, intervención que se efectuó también en el grupo control.

Tras un periodo de tiempo que permitió la adecuada expresión del indicador, se realizó la extracción de tejido para llevar a cabo el registro de actividad neuronal. Finalmente, los datos obtenidos fueron analizados, representados gráficamente y comparados por medio de pruebas estadísticas libres de distribución.

Cada una de estas etapas se describe en detalle a continuación.

### *Animales*

Los ratones empleados fueron criados y mantenidos en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM; en condiciones de temperatura, aire, humedad relativa y ciclos de luz-oscuridad controlados, con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Las instalaciones operan bajo el cumplimiento de las especificaciones técnicas para la cría, cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas en la NOM 062-ZOO-1999.

Las líneas transgénicas usadas para la expresión específica del indicador de calcio se presentan en la siguiente tabla, así como su nombre identificador de base y la población neuronal que localizan:

Linaje neuronal	Proteína específica	Línea transgénica	Nombre stock
Neuronas de proyección de la vía directa (dSPNs)	Receptor D1	D1-Cre	B6.Cg-Tg( <i>DrD1a-cre</i> ) <sup>217</sup> Gsat/Mmucd
Neuronas de proyección de la vía indirecta (iSPNs)	Receptores D2/A <sub>2A</sub>	AdorA2-Cre	B6.FVB8(Cg)-Tg( <i>Adora2a-cre</i> ) <sup>KG139</sup> Gsat/Mmucd
Interneuronas colinérgicas (CINs)	Enzima ChAT	ChAT-Cre	B6;129S6- <i>Chat</i> <sup>tm2(cre)Lowl</sup> /J

Antes de la transfección viral, así como de la lesión con 6-OHDA; los ratones se anestesiaron por administración intraperitoneal de ketamina (85 mg/kg) - xilacina (15 mg/kg) para después ser colocados en un aparato estereotáxico (Stoelting Co™) y continuar el procedimiento.

### *Modelo hemiparkinsoniano por 6-OHDA*

Tras montar a los ratones en el aparato estereotáxico, uno por uno, se les realizó una lesión unilateral en el hemisferio derecho con 0.6 µL de 6-OHDA (0.1 mg/mL) en la SNc y a una velocidad de 0.2 µL/min en las coordenadas a partir de bregma: anteroposterior (AP) -2.6 mm, lateromedial (LM) -1.5 mm y dorsoventral (DV) -4.7 mm. Después de 10 minutos de difusión, cada ratón fue suturado y conservado en un vivarium bajo las condiciones de mantenimiento anteriormente mencionadas.

Para garantizar que la lesión había sido realizada eficazmente, se valoró la pérdida dopaminérgica en los ratones operados a través de un protocolo de conducta de giro, mediado por el software Rota-Count (OmniTech, Sioux Falls SD), el cual efectúa el conteo de giros considerando la dirección en la que tienen lugar para determinar si se obtuvo o no un modelo hemiparkinsoniano exitoso. Por lo que, transcurrido un lapso de 7 días posteriores a la cirugía, los ratones eran sujetos con arneses conectados a contadores controlados por el software e inyectados subcutáneamente con apomorfina (1 mL/kg de peso, concentración 0.5 mg/mL), un agonista dopaminérgico, que produce rotaciones contralaterales al sitio en el que se efectuó la lesión (Bové & Perier, 2012).

Tras 15 minutos de administrarse el fármaco, se realizó la cuantificación por 60 minutos. Como parámetro de selección, se consideraron sólo aquellos ratones que hicieron al menos 60 giros completos contralaterales al hemisferio lesionado.

#### *Transfección viral*

La entrega del constructo viral AAV1.SYN.FLEX.GCaMP6f.WPRE.SV40(CS1362) se efectuó en cada línea transgénica, tanto en ejemplares control como privados de dopamina, en las coordenadas (tomando como referencia bregma): AP +0.8 mm, LM -1.2 mm y DV -3.0 mm. La difusión duró 10 minutos tras los cuales, los ratones se suturaron y mantuvieron en condiciones adecuadas para su recuperación en las instalaciones del vivario. La expresión del indicador GCaMP6f tuvo lugar exclusivamente en las neuronas que expresaron la recombinasa Cre, permitiendo la localización y registro específico de cada población estudiada. El registro de la actividad neuronal se efectuó 14 días tras la entrega del constructo viral, tiempo suficiente para la adecuada expresión del GECl.

#### *Adquisición de datos*

El monitoreo de la actividad neuronal se efectuó *in vitro*, por lo que el tejido se extrajo, rebanó y mantuvo en un medio que permitiera la sobrevivencia celular. Para ello, ejemplares control y hemiparkinsonianos se anestesiaron vía intraperitoneal con ketamina (85 mg/kg)-xilacina (15 mg/kg) para ser perfundidos intracardialmente con solución de sacarosa fría (234 mM sacarosa, 7 mM dextrosa, 28 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.44 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>). Posteriormente, se realizó la craneotomía y extracción del cerebro; del cual se adquirieron rebanadas sagitales con una inclinación de 30° y 250 µm de grosor, empleando un vibrátomo Tissue slicer PELCO easiSlicer®. Las

rebanadas se colocaron en un baño de solución salina (126 mM NaCl, 11 mM dextrosa, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 mM ácido ascórbico, 3 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) saturada con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, pH: 7.4 y osmolaridad con valor de 300 ± 5 mOs/L, en la que se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

El tejido se transfirió a una cámara de perfusión que era suministrada con un flujo continuo de solución salina con las características ya mencionadas. La cámara de perfusión se encontraba adaptada a la platina del microscopio óptico usado, equipado con un objetivo de inmersión en agua 20X (Olympus, Objetivo XLUMPLFLN, 1.00 NA, 2.0 mm WD) y una videocámara (CoolSnap, Photometrics). Los registros se realizaron para las condiciones control, privada de dopamina (empleando rebanadas cerebrales procedentes del modelo 6-OHDA) antes y durante la aplicación de L-DOPA, para lo que se agregó 10 µM del fármaco en la solución salina que fluía en la cámara de perfusión.

La manipulación del equipo tanto para la visualización como para el registro de la actividad neuronal se hizo a través de Im-Patch© (software libre diseñado en LabView, disponible en [www.im-patch.com](http://www.im-patch.com)). Los registros de vídeo tuvieron una longitud de 720-2160 cuadros, en formato de vídeo, con una tasa de adquisición de 6 cuadros por segundo y un campo de observación de 800 x 800 µm. En los experimentos que requerían cubrir periodos largos, se realizaron de 5 a 10 vídeos, con lo que se abarcaba periodos de registro de hasta 60 minutos.

No todos los ratones control ni lesionados fueron empleados en los experimentos descritos aquí, ya que se descartaron las rebanadas con menos del 80% de supervivencia celular; lo cual fue cuantificado a través de videos en los que se registró la respuesta neuronal a la aplicación de KCl 20 mM al final de cada experimento. En total, se utilizaron rebanadas de 38 animales para los experimentos: 12 ratones D1-Cre, 12 ratones A<sub>2A</sub>-Cre, 14 ratones ChAT-Cre; donde cada experimento fue realizado en una rebanada de un animal distinto.

#### Análisis de la actividad neuronal

La manipulación y análisis de los registros de vídeo, así como el tratamiento y representación gráfica de los datos extraídos se realizó a través de los programas ImageJ (National Institutes of Health; open access: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>), Origin (Microcal, Northampton, MA, USA), MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) e Im-

Patch© (Instituto de Fisiología Celular; open access: [www.im-patch.com](http://www.im-patch.com)) este último escrito en el entorno de programación LabView (National Instruments, Austin, TX, USA).

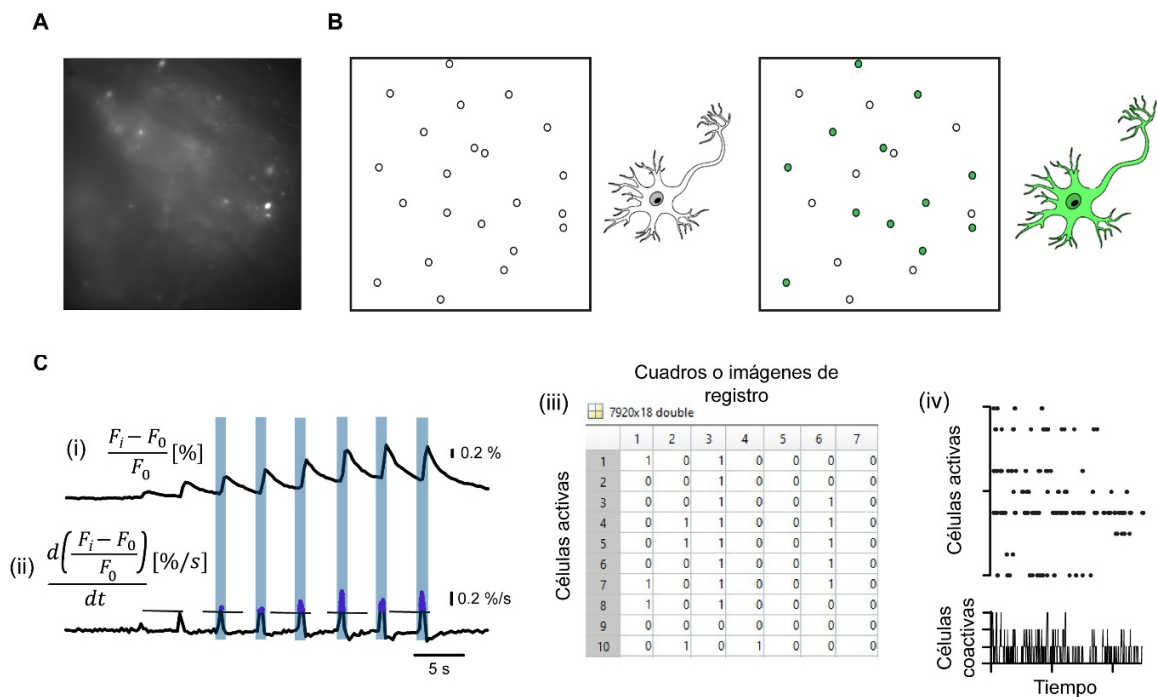
El análisis inició con el filtrado de los registros de vídeo con ImageJ para facilitar la selección manual de los somas neuronales activos (*regions of interest*: ROI) y medir la variación de su fluorescencia a través del tiempo, con el objetivo de inferir la probabilidad del disparo de potenciales de acción a partir de las señales de calcio correspondientes medidas como  $(F_i - F_o)/F_o$ , donde  $F_i$  es la intensidad de la fluorescencia en cada cuadro y  $F_o$  es la fluorescencia de fondo, medida 3 diámetros alrededor del ROI (Figs. 2A,B). Este procedimiento en particular se llevó a cabo mediante el software Im-Patch, y la probabilidad del disparo de espigas se infirió calculando la parte positiva de la derivada en el tiempo del transitorio de calcio:  $d((F_i - F_o)/F_o)/dt$  dentro del área delimitada por la selección de cada ROI estableciendo un umbral de 2.5 desviaciones estándar como señales de la ocurrencia de potenciales de acción (Fig. 2C, i-ii). Numerosos trabajos previos del laboratorio han demostrado con registros simultáneos de imagenología de calcio y electrofisiología que la derivada del cambio en la fluorescencia coincide efectivamente con eventos de disparo neuronal de potenciales de acción (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009, 2011; Duhne et al., 2020; Jáidar et al., 2010; Lara-González et al., 2019; Pérez-Ortega et al., 2016).

La selección de señales significativas fue examinada de forma manual con la finalidad de eliminar cualquier tipo de artefacto que alterara el resultado final.

Los datos adquiridos se representaron mediante matrices binarias de células activas en el eje-y y los cuadros de la secuencia de imágenes que hacen un video de registro en el eje-x, convirtiéndolos a unidades de tiempo. Se asignó un valor de 1 para un cuadro en el que una célula mostró actividad y de 0 cuando no la tuvo (Fig. 2C, iii). Los valores numéricos que denotan actividad neuronal se sustituyen por puntos y su ausencia indica inactividad. Sumando todos los puntos de actividad en cada cuadro de la secuencia (instante de tiempo) se construyeron histogramas de coactividad debajo de las matrices tipo ráster, con la suma de la actividad neuronal columna a columna, lo que permite observar cuántas células se encontraron activas en un momento determinado del experimento y si hay o no coactividad (Fig. 2C, iv).

*Actividad acumulada (AA)*

Con el propósito de evaluar la cantidad total de actividad neuronal entre los linajes estudiados y en las distintas condiciones, se realizaron gráficos de actividad acumulada (AA) para cada experimento. Esto se realizó haciendo una sumatoria de las columnas con actividad a lo largo del tiempo utilizando los histogramas de coactividad y abarcando todas las neuronas registradas en un experimento. A esta sumatoria de la actividad a lo largo del tiempo, o actividad acumulada (AA), se le ajustó una regresión lineal cuya pendiente es indicativa de cuantas neuronas estuvieron activas durante el registro de ese experimento. Se toma el valor absoluto de dicha pendiente para indicar AA en las gráficas correspondientes. Con las distribuciones de estos valores (pendientes) se compara la actividad total en las diversas muestras experimentales para cada condición. Una mayor pendiente indica mayor actividad en el circuito, la cual puede deberse a mayor número de neuronas activas, mayor actividad de estas o ambas.



**Figura 2. Proceso de análisis de la actividad neuronal.** **A)** Ejemplo de un cuadro del registro de vídeo obtenido por imagenología de calcio. **B)** Selección manual de neuronas a través del software Im-Patch. Cuando una neurona presenta potenciales de acción, es reportado por el indicador de calcio a través de la emisión de fluorescencia (en este caso, verde a la derecha). **C)** Procesamiento de datos: **(i)** Cálculo de las señales fluorescentes por Im-Patch. Se mide la diferencia en la fluorescencia del área delimitada para cada neurona respecto a la fluorescencia del área que la circunda. **(ii)** Cálculo de la derivada de los valores de fluorescencia respecto al tiempo. **(iii)** Obtención de matrices binarias de actividad con MATLAB. **(iv)** Construcción de rásters e histogramas de actividad.

### Función de distribución acumulada (FDA)

Como medida complementaria a la AA se construyó la función de distribución acumulada (FDA) de la actividad neuronal. Esta permite calcular la probabilidad de que la actividad de una neurona dada sea menor o igual a un valor P (valores entre 0 y 1). Para la FDA utilizamos el conjunto de todas las neuronas registradas en todos los experimentos bajo la misma condición. Las distribuciones (FDAs) se comparan de manera directa usando la prueba Kolmorov-Smirnov. Esta prueba permite precisar la probabilidad de que la actividad individual de las neuronas de una población en distintas condiciones sea igual o diferente. La actividad neuronal individual se mide como el tiempo en que una neurona estuvo activa entre el tiempo total de registro (cuadros con actividad entre todos los cuadros de la secuencia) y se expresa como porcentaje en las gráficas correspondientes.

Note que AA y FDA son medidas complementarias pero distintas: AA sirve para comparar muestras experimentales de una población de neuronas en un microcircuito en diferentes condiciones. FDA sirve para comparar si la actividad de una población de neuronas, tomándolas de manera individual y conjuntando las de todos los experimentos, tiene una distribución de probabilidad distinta. Las dos métricas se han usado en trabajos previos, y la razón de usar ambas es explorar las diferencias en la actividad de la población de un microcircuito y la población total tomando todos los microcircuitos y neuronas individuales registradas del mismo linaje. Puede darse el caso que existan diferencias en el comportamiento de la población total y el de células individuales (e.g.: una disminución en la probabilidad de actividad medida por la FDA), que los circuitos separados puedan compensar aumentando el número de neuronas activas.

#### Análisis estadístico

Se usaron pruebas estadísticas libres de distribución: la prueba U de Mann-Whitney que determina si existen diferencias entre dos muestras no pareadas, fue usada para comparar las pendientes de AA del control y del modelo 6-OHDA, en cada linaje neuronal.

La prueba de Kruskal-Wallis que permite evaluar las diferencias entre más de dos muestras independientes, se utilizó en la comparación de la AA en condiciones control, modelo 6-OHDA y 6-OHDA + L-DOPA de cada linaje estudiado. Adicionalmente es necesario hacer comparaciones *post hoc* entre los grupos, por lo que se aplicó la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Las FDAs de los distintos linajes neuronales y condiciones se compararon con la prueba de Kolmogorov-Smirnov que verifica el grado similitud entre dos distribuciones de datos, con el propósito de demostrar la presencia o ausencia de diferencias significativas entre ellas.

Todas las diferencias encontradas se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad,  $p$ , para cada comparación fue menor a 0.05. Las pruebas estadísticas fueron efectuadas con software hecho en MATLAB y GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA).

## **Resultados**

Al analizar los transitorios de calcio derivados de registros de actividad espontánea es posible representar de forma gráfica la actividad neuronal de docenas de células a lo largo del tiempo, así como medir parámetros que permiten su caracterización en distintas condiciones.

Por ello, se obtuvieron gráficos tipo ráster, histogramas de actividad, pendientes de AA y FDAs de cada una de las poblaciones estudiadas bajo las condiciones control, privada de dopamina antes y durante la administración de L-DOPA; con el fin de detectar los cambios en la actividad celular.

Actividad espontánea de las poblaciones neuronales en el microcircuito parkinsoniano

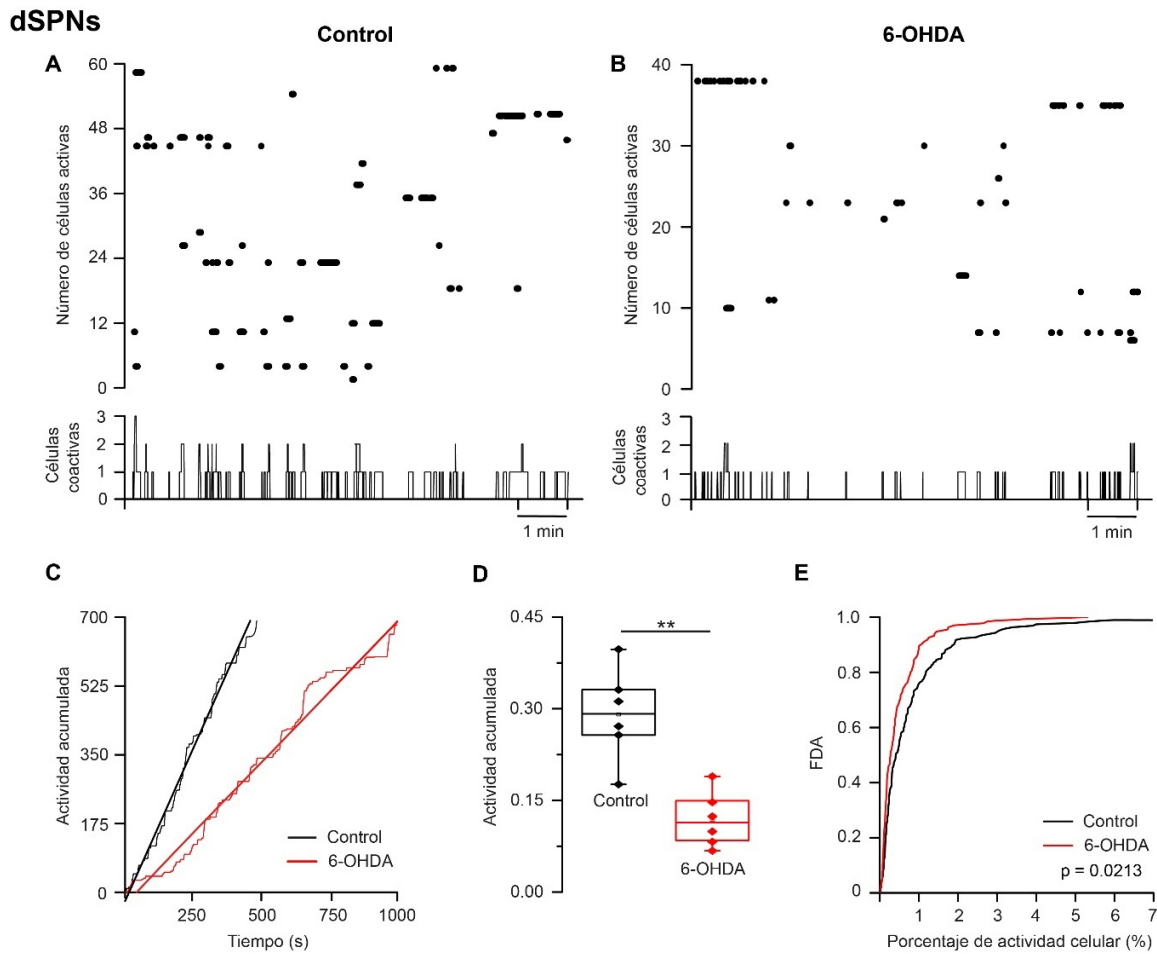
### *Neuronas estriatales de proyección de la vía directa (dSPNs)*

En el microcircuito reducido en dopamina, la actividad espontánea de las dSPNs disminuye respecto a la observada en el control, lo cual puede apreciarse en los gráficos tipo ráster para cada condición (Figs. 3A, B). Al contrastar la AA en control y en el modelo 6-OHDA, se pueden apreciar diferencias significativas, denotando cantidades de AA distintas en ambas condiciones (Fig. 3C): se puede observar una reducción de la actividad tras la depleción dopaminérgica (experimentos/condición: control = 6, modelo 6-OHDA = 6; donde cada experimento provino de un animal diferente; Mann-Whitney,  $p = 0.0043$ ) (Fig. 3D). De forma similar, la comparación de las FDAs de las dSPNs indica que la actividad individual en control es mayor que la registrada en ausencia de dopamina, ya que la curva de distribución del control está desplazada hacia la derecha respecto a la del modelo 6-OHDA (control = 194 neuronas de 6 experimentos, 6-OHDA = 135 neuronas de 6 experimentos;

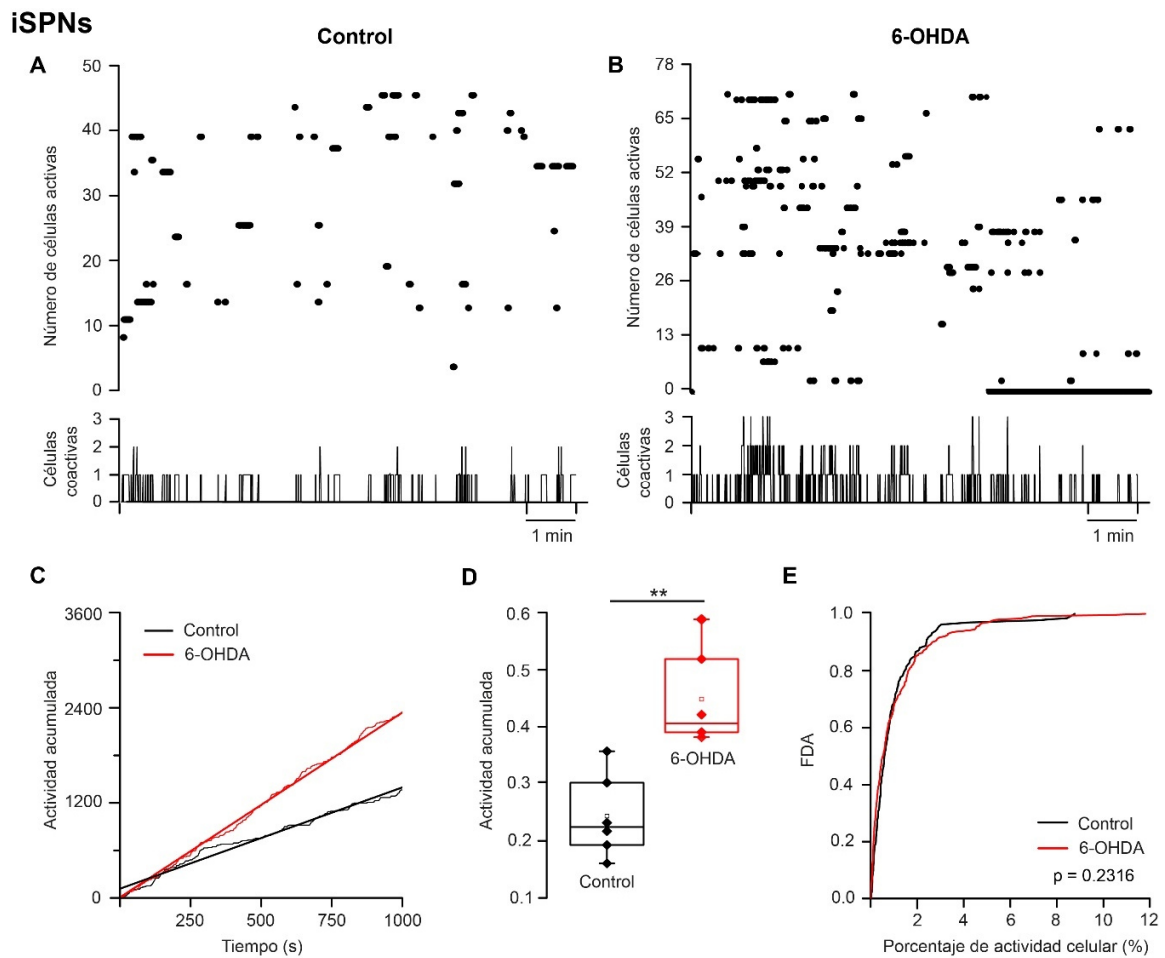
Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0213$ ) (Fig. 3E). Concluimos que ambas métricas coinciden en el caso de la actividad espontánea de las dSPNs.

#### *Neuronas estriatales de proyección de la vía indirecta (iSPNs)*

El registro de neuronas iSPN muestra que esta población neuronal exhibe un incremento en su actividad espontánea tras la privación de dopamina en el microcircuito, así como un aumento en el número de neuronas que se activan respecto a las observadas en el control (Figs. 4A,B). La comparación de la AA corrobora una diferencia entre los experimentos en diferentes condiciones: la AA del modelo 6-OHDA es significativamente mayor que la del control (experimentos/condición: control = 6, modelo 6-OHDA = 6; donde cada experimento provino de un animal distinto; Mann-Whitney,  $p = 0.0022$ ) (Figs. 4C,D). Sin embargo, cuando se contrastan las FDAs de la condición control y en ausencia de dopamina no se encuentran diferencias significativas en la probabilidad de activación (control = 134 neuronas de 6 experimentos, 6-OHDA = 242 neuronas de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.2136$ ), sugiriendo que la varianza de la actividad neuronal individual impide ver la significancia cuando la población de neuronas es mayor (Fig. 4E). Esto puede explicar discrepancias reportadas en trabajos previos (ver Discusión).



**Figura 3. La actividad espontánea de las dSPNs disminuye en el microcircuito privado de dopamina. A)** Gráfico tipo ráster de la actividad espontánea de dSPNs en condición control. Cada renglón representa una célula activa y cada columna denota un intervalo de tiempo. Los puntos indican cuando una neurona generó potenciales de acción. En la parte inferior se muestra el histograma de coactividad correspondiente en función del tiempo. **B)** Ráster e histograma de coactividad de la actividad espontánea de dSPNs en el modelo privado de dopamina. **C)** Ejemplos representativos de gráficos de actividad acumulada en control y en el modelo 6-OHDA para el mismo linaje neuronal, donde una mayor inclinación de la pendiente representa mayor cantidad de actividad total respecto al tiempo. **D)** Gráfica de cajas que compara la actividad acumulada (AA) en función del tiempo en las dSPNs en las condiciones control y privadas de dopamina. Se observa que la actividad de las dSPNs en el control disminuye tras la falta de dopamina (control = 6 experimentos de 6 animales diferentes, modelo 6-OHDA = 6 experimentos de 6 animales diferentes; \*\*Mann-Whitney,  $p = 0.0043$ ). **E)** Funciones de distribución de actividad acumulada (FDAs) correspondientes a las dSPNs en control y en el modelo de la EP, entre las que se puede notar una diferencia significativa (control = 194 células de 6 experimentos, 6-OHDA = 135 células de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0213$ ).



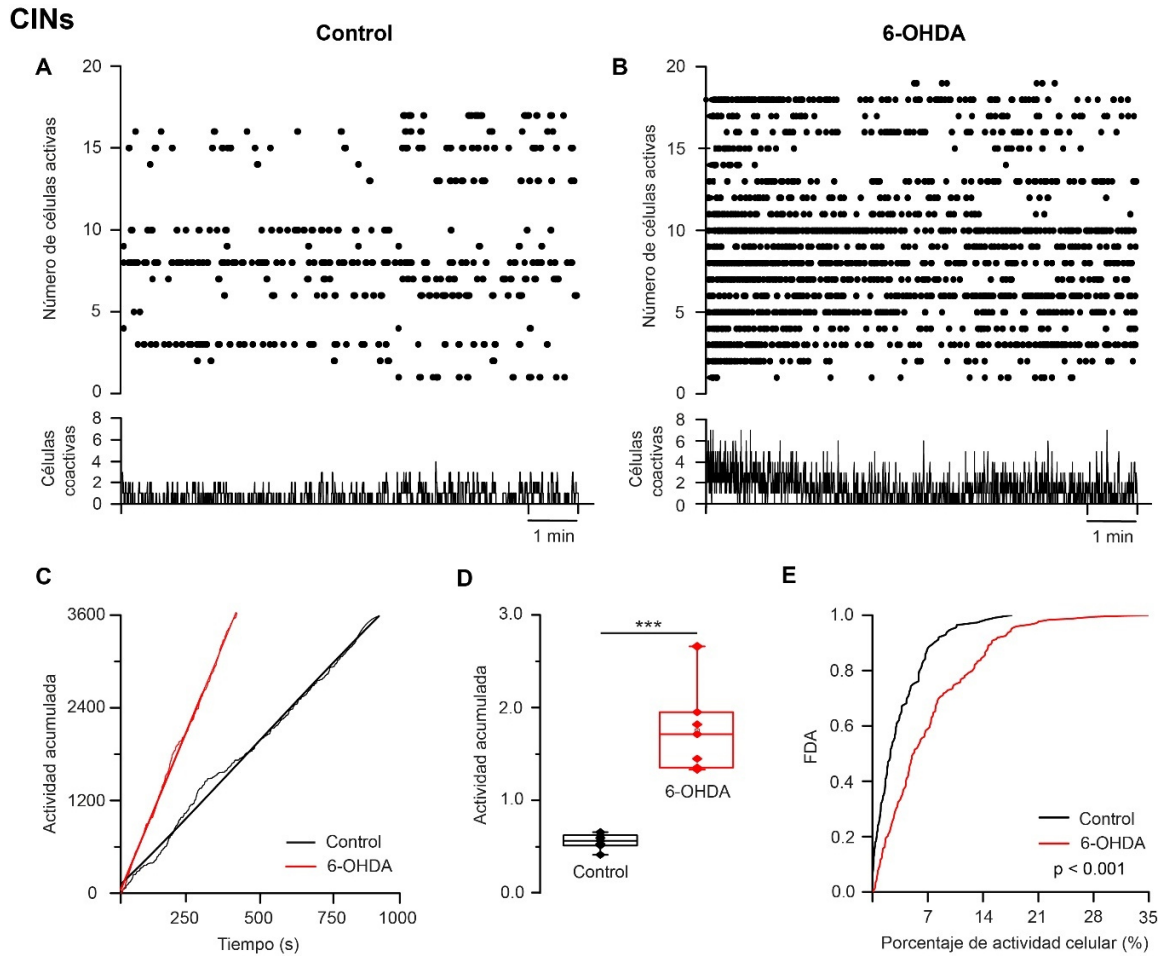
**Figura 4. La actividad espontánea de las neuronas espinosas de proyección de la vía indirecta aumenta en el microcircuito parkinsoniano al ser privado de dopamina. A)** Gráfico tipo ráster e histograma de coactividad correspondientes a la actividad espontánea de iSPNs en condición control. **B)** Ráster e histograma representativo de coactividad de la actividad espontánea de neuronas iSPNs en el modelo privado de dopamina. **C)** Gráficos de AA representativos de la condición control y del modelo 6-OHDA para el mismo linaje celular. **D)** Gráfica de cajas que compara la AA de iSPNs en el microcircuito control y privado de dopamina. Es notable el incremento en la actividad de las neuronas iSPNs tras la privación de dopamina cuando se comparan distintos experimentos (control = 6 experimentos de 6 animales diferentes, modelo 6-OHDA = 6 experimentos de 6 animales distintos; **\*\*Mann-Whitney,  $p = 0.0022$** ). **E)** FDA de iSPNs en control y en el modelo de Parkinson. No se encuentra diferencia significativa cuando se conjuntan las neuronas de todos los experimentos (control = 134 células de 6 experimentos, 6-OHDA = 242 células de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.2136$ ).

### Interneuronas colinérgicas (CINs)

Las CINs también manifiestan actividad espontánea incrementada en el modelo 6-OHDA

Al comparar la AA en ambas condiciones (Figs. 5A,B), la actividad observada tras la depleción dopaminérgica resultó significativamente mayor que la del control (experimentos/condición: control = 7, modelo 6-OHDA = 7; donde cada experimento provino

de un animal distinto; Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ) (Fig. 5C,D). De igual forma, el contraste de las FDAs de las CINs en el microcircuito control y en el parkinsoniano exhibió diferencias significativas (control = 113 neuronas de 7 experimentos, 6-OHDA = 173 neuronas de 7 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.001$ ), mostrando un valor superior en privación de dopamina (Fig. 5E).



**Figura 5. La actividad espontánea de las interneuronas colinérgicas incrementa en el microcircuito carente de dopamina. A)** Gráfico tipo ráster e histograma de coactividad de la actividad espontánea de las interneuronas colinérgicas en la condición control. **B)** Ráster e histograma de coactividad que corresponden a la actividad espontánea de CINs en el modelo carente de dopamina. **C)** Gráfico de los valores de AA representativos de la condición control y del modelo 6-OHDA para la misma población celular. **D)** Gráfica de cajas que compara las distribuciones de AA de CINs en el microcircuito control y parkinsoniano. Se aprecia que la actividad incrementa tras ser privadas de dopamina (control = 7 experimentos de 7 animales diferentes, modelo 6-OHDA = 7 experimentos de 7 animales distintos; \*\*\*Mann-Whitney  $p < 0.001$ ). **E)** FDAs de interneuronas colinérgicas en el microcircuito control y parkinsoniano, se hallaron diferencias significativas (control = 113 células de 7 experimentos, 6-OHDA = 173 células de 7 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.001$ ).

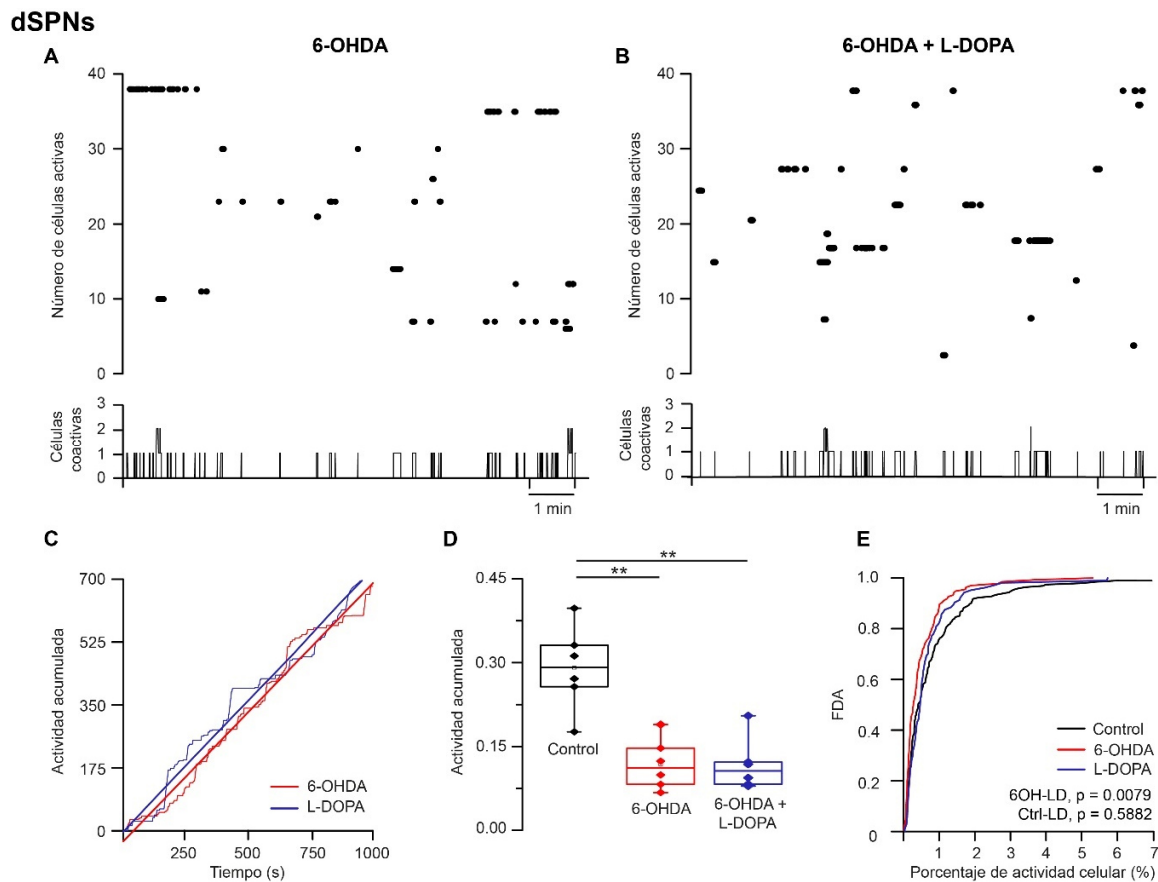
Al igual que las poblaciones anteriormente referidas, las interneuronas colinérgicas también muestran un cambio en el número de neuronas activas tras la privación de dopamina, exhibiendo un aumento de este parámetro (Figs. 5A,B,E).

Actividad espontánea de las poblaciones neuronales en el microcircuito parkinsoniano durante la administración de L-DOPA

A continuación, se muestran los gráficos tipo ráster y pendientes representativas de actividad acumulada de los linajes celulares estudiados en el microcircuito parkinsoniano, antes y durante el tratamiento con L-DOPA. A las comparaciones anteriormente presentadas, se adiciona esta tercera condición tanto en el diagrama estadístico de cajas como en las probabilidades de actividad celular, con el objetivo de contrastar el efecto que tiene la adición del fármaco en la actividad neuronal tras la privación de dopamina y ver si este efecto es suficiente para regresar la actividad a valores similares a los observados en el control.

#### *Neuronas estriatales de proyección de la vía directa (dSPNs)*

Durante la adición del precursor dopaminérgico, la actividad espontánea de las neuronas de proyección dSPNs en el microcircuito parkinsoniano no presentó cambios (Figs. 6A,B). Lo cual es congruente con la comparación de la AA, que muestran la ausencia de diferencias significativas entre la actividad de las dSPNs antes y después de la aplicación de L-DOPA (experimentos/condición: 6-OHDA = 6 experimentos de 6 animales diferentes, 6-OHDA + L-DOPA = 6 experimentos de 6 animales diferentes; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p = 0.9139$ ). Sin embargo, al compararse la AA en presencia del fármaco con la correspondiente al control puede verse que son significativamente distintas (control = 6 experimentos de 6 animales distintos; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p = 0.0049$ ) (Figs. 6C, D). El contraste de las FDAs también reporta diferencias significativas entre la condición privada de dopamina antes y durante la administración de L-DOPA (6-OHDA = 135 neuronas de 6 experimentos, 6-OHDA + L-DOPA = 104 neuronas de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0079$ ), pero no entre el control y el tratamiento farmacológico (control = 194 células de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.5882$ ) (Fig. 6E). La discrepancia entre las métricas usadas muestra que tan diferente puede ser comparar muestras tomadas de distintos experimentos a tomar toda el conjunto de neuronas provenientes de distintos experimentos (ver Discusión).

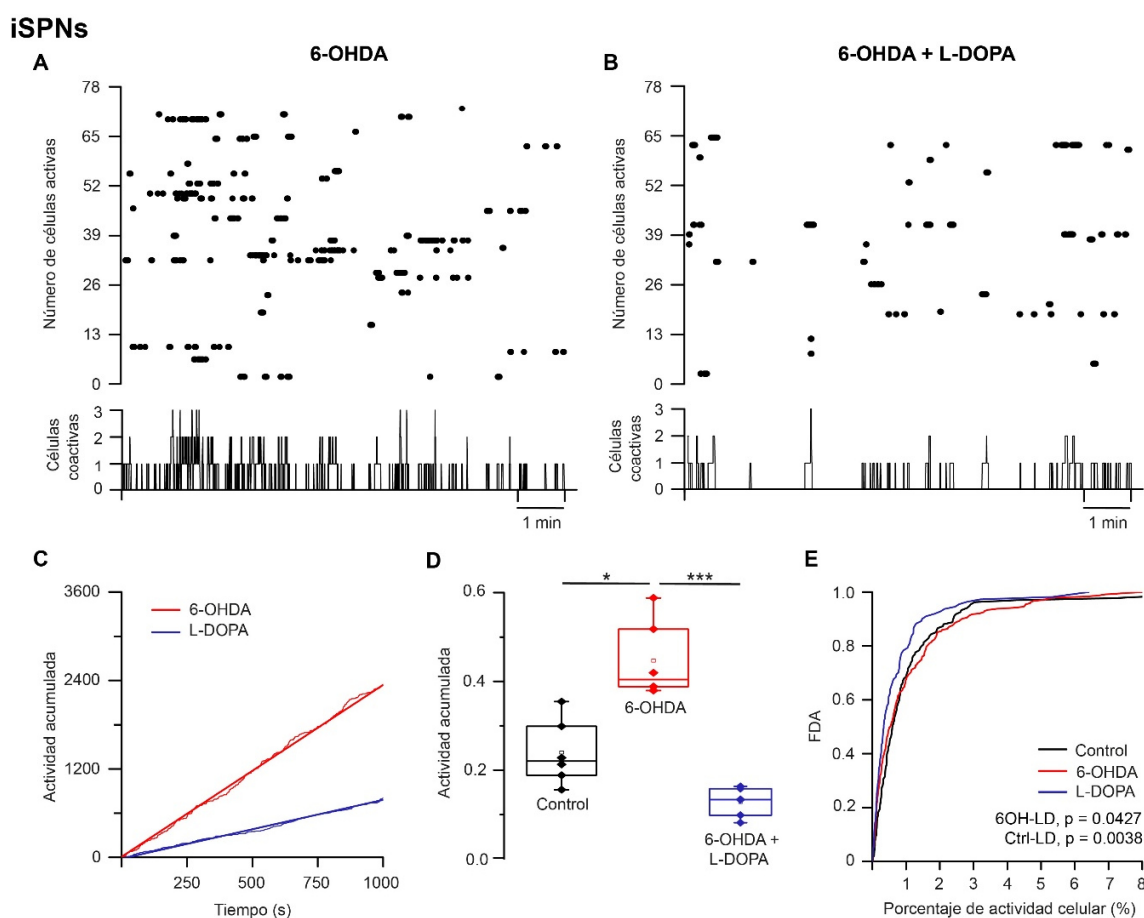


**Figura 6. La actividad espontánea de las dSPNs en el microcircuito parkinsoniano no sufre cambios durante la aplicación de L-DOPA. A)** Gráfico tipo ráster e histograma de coactividad correspondientes a la actividad espontánea de dSPNs privadas de dopamina. **B)** Ráster e histograma de coactividad de la actividad espontánea de dSPNs en el modelo privado de dopamina durante la administración de L-DOPA. **C)** Ejemplos representativos de gráficos de AA de la misma población neuronal en el modelo 6-OHDA, antes y durante la aplicación del precursor dopaminérgico. **D)** Diagrama estadístico de caja que compara la AA de dSPNs en las condiciones control, privada de dopamina antes y durante la administración del fármaco. Se observa que la actividad de las dSPNs, disminuida tras la privación de dopamina, permanece sin cambios durante la aplicación de L-DOPA cuando se comparan muestras diferentes (6-OHDA = 6 experimentos de 6 animales diferentes, 6-OHDA + L-DOPA = 6 experimentos de 6 animales diferentes; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc  $p = 0.9139$ ), por lo que la diferencia entre la actividad control y parkinsoniana tratada farmacológicamente es significativa (control = 6 experimentos de 6 animales distintos; \*\*Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc  $p = 0.0049$ ). **E)** FDAs correspondientes a las dSPNs en control y en el modelo de Parkinsonismo antes y durante el tratamiento farmacológico. Se puede apreciar que cuando se compara la población total de neuronas registradas sí existe diferencia significativa entre las curvas del modelo privado de dopamina antes y durante la adición de L-DOPA (6-OHDA = 135 neuronas de 6 experimentos, 6-OHDA + L-DOPA = 104 neuronas de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0079$ ).

### Neuronas estriatales de proyección de la vía indirecta (iSPNs)

La actividad espontánea de las neuronas de proyección iSPNs en el modelo 6-OHDA decrece en presencia de L-DOPA (Fig. 7A,B). Esta diferencia es significativa al comparar la AA total antes y durante el tratamiento farmacológico (experimentos/condición: 6-OHDA

= 6 experimentos de 6 animales distintos, 6-OHDA + L-DOPA = 6 experimentos de 6 animales distintos; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p < 0.001$ ), pero no así cuando esta última se compara con la AA control (control = 6 experimentos de 6 animales distintos; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc  $p = 0.0836$ ) (Fig. 7D). El contraste de las FDAs demuestra diferencias significativas entre la condición carente de dopamina antes y durante la administración de L-DOPA (6-OHDA = 242 neuronas de 6 experimentos, 6-OHDA + L-DOPA = 111 neuronas de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0427$ ), así como entre el control y el tratamiento con el fármaco (control = 134 células de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov  $p = 0.0038$ ) (Fig. 7E).

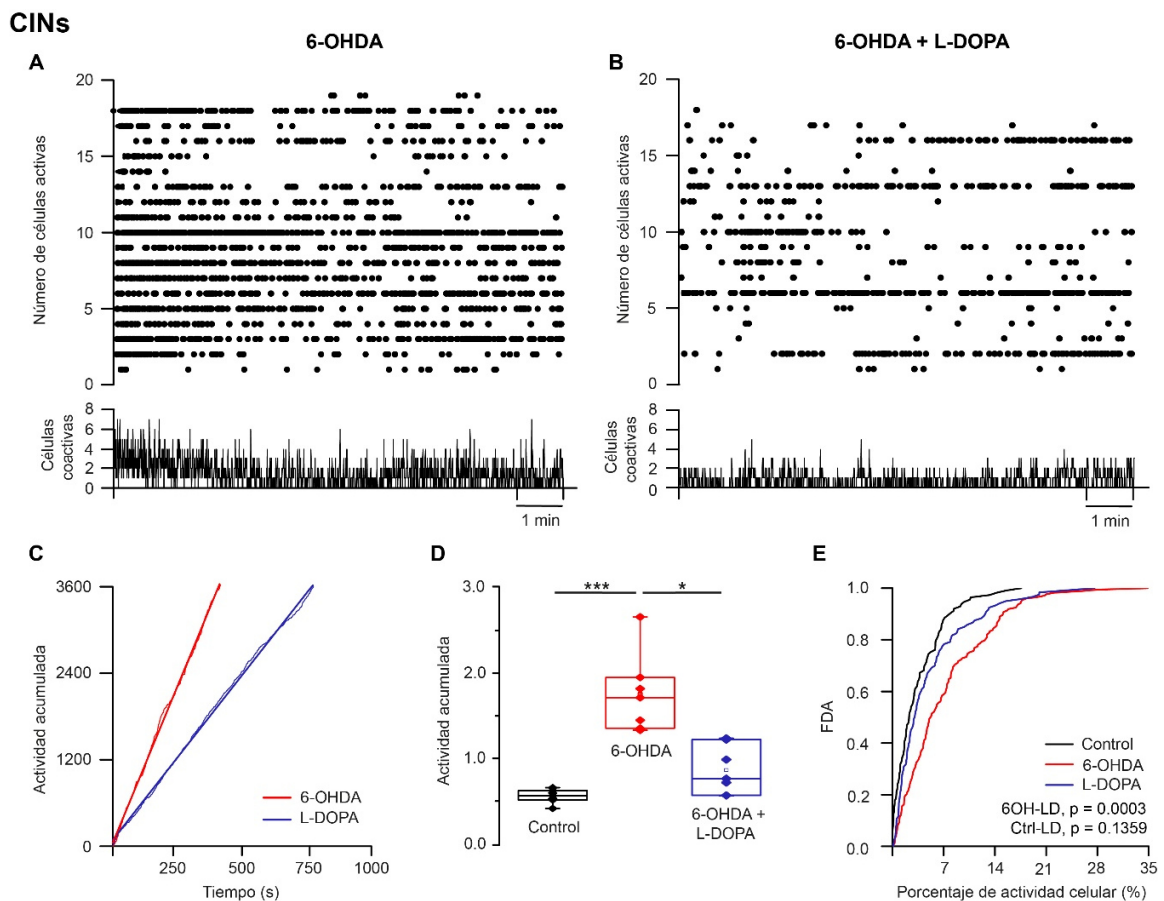


**Figura 7. La actividad espontánea de las iSPNs en el microcircuito parkinsoniano decrementa en presencia de L-DOPA. A)** Gráfico tipo ráster e histograma de coactividad de la actividad espontánea de iSPNs en ausencia de dopamina. **B)** Ráster e histograma de coactividad correspondientes a la actividad espontánea de iSPNs en el modelo privado de dopamina durante la adición de L-DOPA. **C)** Gráficos representativos de la actividad acumulada de iSPNs en el modelo 6-OHDA antes y durante la aplicación del fármaco. **D)** Gráfica de cajas que compara las distribuciones de AA de iSPNs en las condiciones control, carente de dopamina antes y durante la administración del precursor dopaminérgico. Es posible apreciar que la cantidad de actividad de las iSPNs aumentada tras la privación de dopamina y disminuye por la administración de L-DOPA (6-OHDA = 6

experimentos de 6 animales diferentes, 6-OHDA + L-DOPA = 6 experimentos de 6 animales diferentes; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc  $p < 0.001$ ) a un valor similar al del control, de forma que no se observa una diferencia significativa entre ambas condiciones (control = 6 experimentos de 6 animales distintos; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc  $p = 0.0836$ ). E) FDAs de iSPNs en condiciones control y privada de dopamina, antes y durante el tratamiento con el fármaco. Se puede notar que existen diferencias significativas entre las curvas del modelo 6-OHDA antes y durante la administración de L-DOPA (6-OHDA = 242 neuronas de 6 experimentos, 6-OHDA + L-DOPA = 104 neuronas de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0427$ ), así como entre las correspondientes a la condición control y el modelo tratado farmacológicamente (control = 134 neuronas de 6 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0038$ ).

### Interneuronas colinérgicas (CINs)

La actividad aumentada de las interneuronas colinérgicas debido al agotamiento dopaminérgico disminuye durante la administración de L-DOPA en el microcircuito parkinsoniano (Figs. 8A, B). El cotejo de la AA denota la actividad total antes y después de la adición del fármaco revelando una diferencia significativa (6-OHDA = 7 experimentos de 7 animales distintos, 6-OHDA + L-DOPA = 7 experimentos de 7 animales distintos; Kruskal-



**Figura 8.** La actividad espontánea de las CINs en el microcircuito privado de dopamina disminuye por la administración de L-DOPA. A) Gráfico tipo ráster e histograma de coactividad correspondientes a la actividad espontánea de las interneuronas colinérgicas en ausencia de dopamina. B) Ráster e histograma de coactividad

de la actividad espontánea de CINs en el modelo privado de dopamina durante el tratamiento con L-DOPA. **C)** Gráficos representativos de la AA de este mismo tipo neuronal en el modelo 6-OHDA antes y durante la aplicación del precursor dopaminérgico. **D)** Diagrama estadístico de cajas que compara la distribución de AA en las condiciones control, privado de dopamina antes y durante la administración del fármaco. Se puede ver que la cantidad de actividad de las interneuronas colinérgicas, aumentada tras la privación de dopamina, disminuye con la administración de L-DOPA (6-OHDA = 7 experimentos de 7 animales diferentes, 6-OHDA + L-DOPA = 7 experimentos de 7 animales diferentes; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p < 0.001$ ) a valores parecidos a los del control, de forma que no se observa una diferencia significativa entre estas condiciones (control = 7 experimentos de 7 animales distintos; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc  $p = 0.1317$ ). **E)** FDAs de CINs en condiciones control y en ausencia de dopamina, antes y durante el tratamiento con el fármaco. Se aprecia que existen diferencias significativas entre las distribuciones de probabilidad del modelo 6-OHDA antes y durante la adición de L-DOPA (6-OHDA = 173 células de 7 experimentos, 6-OHDA + L-DOPA = 120 células de 7 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0003$ ), pero no así en la condición control y el modelo tratado farmacológicamente (control = 113 neuronas de 7 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.1359$ ).

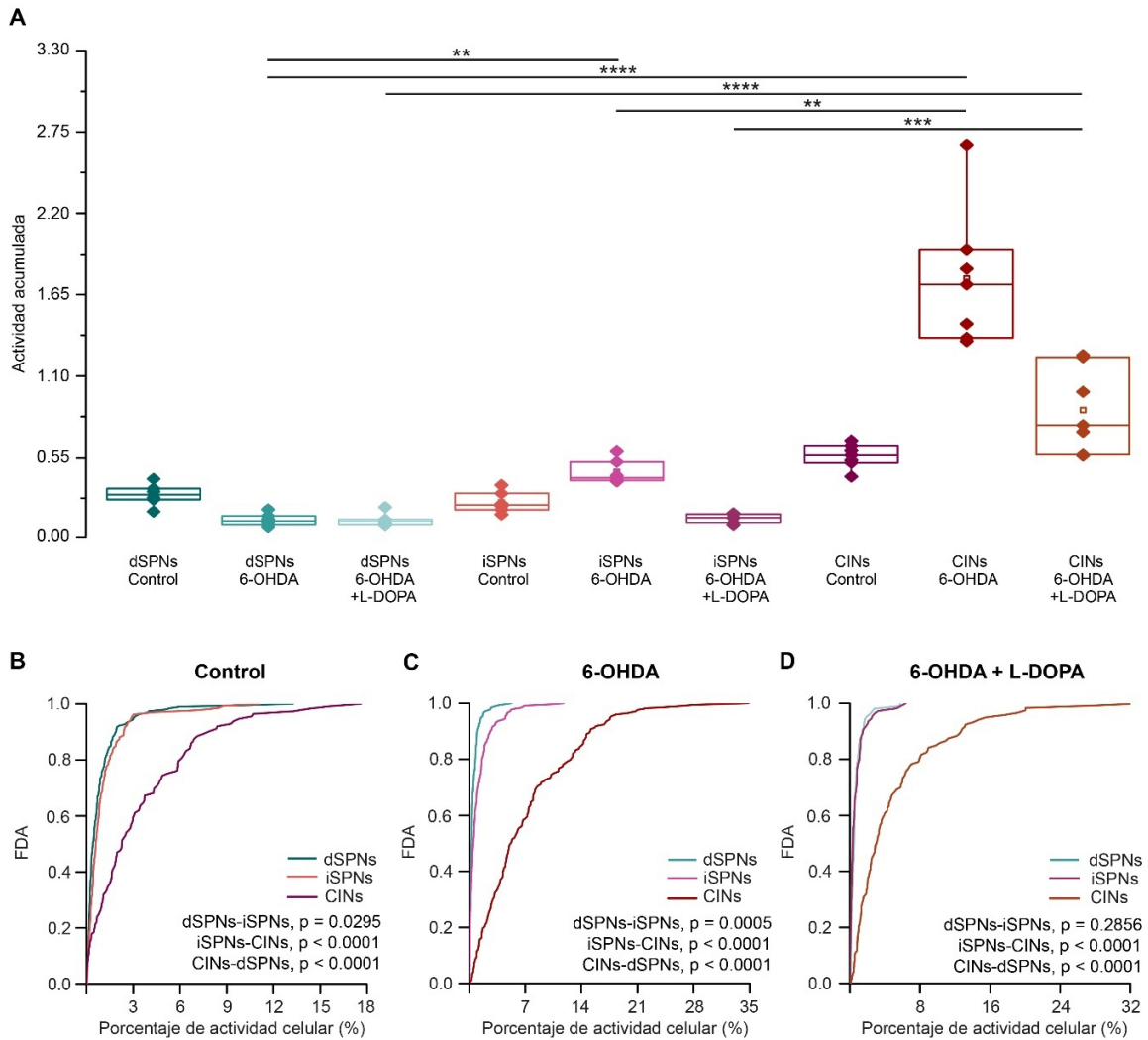
Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p < 0.001$ ), mientras que el cotejo de la AA perteneciente a la condición control y al tratamiento no muestra diferencia (control = 7 experimentos de 7 animales diferentes; Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p = 0.1317$ ) (Figs. 8 C,D), lo que sugiere que la L-DOPA tiende a normalizar la actividad de las CINs. La comparación de las FDAs evidencia diferencias en la condición privada de dopamina antes y después de la adición de L-DOPA (6-OHDA = 173 neuronas de 7 experimentos, 6-OHDA + L-DOPA = 120 neuronas de 7 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0003$ ), pero no entre el control y el tratamiento con el fármaco (control = 113 células de 7 experimentos; Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.1359$ ) (Fig. 8E).

### *Microcircuito estriatal*

Con el fin de apreciar la actividad espontánea conjunta de las poblaciones estriatales en la condición control, tras la privación de dopamina antes y después de su exposición a L-DOPA, se construyó un diagrama de cajas en el que se compara la AA de cada linaje bajo todas las condiciones, así como gráficos de FDAs que incluyen a todos los linajes en cada condición.

En la figura 9A, se aprecian diferencias significativas al contrastar la AA de los siguientes grupos neuronales (dSPNs = 6 experimentos/condición, iSPNs = 6 experimentos/condición, CINs = 7 experimentos/condición) en el microcircuito parkinsoniano antes: dSPNs-iSPNs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p = 0.0096$ ), dSPNs-CINs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p < 0.0001$ ), iSPNs-CINs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p = 0.0347$ ) y durante la aplicación de L-DOPA: dSPNs-CINs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p < 0.0001$ ), iSPNs-CINs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p = 0.0002$ ). Cuando se compararon las FDAs se encontraron las siguientes

diferencias en la probabilidad de actividad entre las poblaciones, control (células/población neuronal: n-dSPNs = 194, n-iSPNs = 134, n-CINs = 113 neuronas en cada población): dSPNs-iSPNs (Kolmogorov-Smirnov  $p = 0.0295$ ), iSPNs-CINs (Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.0001$ ), CINs-dSPNs (Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 9B); deficiente de dopamina (células/población neuronal: n-dSPNs = 135, n-iSPNs = 242, n-CINs = 173 neuronas en cada población): dSPNs-iSPNs (Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0005$ ), iSPNs-CINs (Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.0001$ ), CINs-dSPNs (Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 9C) y durante la administración de L-DOPA (células/población neuronal: n-dSPNs = 104, n-iSPNs = 111, n-CINs = 120 neuronas en cada población): dSPNs-iSPNs (Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.2856$ ), iSPNs-CINs (Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.0001$ ), CINs-dSPNs (Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 9D).



**Figura 9. Comparaciones de la actividad espontánea de neuronas de proyección D1, A<sub>2A</sub> e interneuronas ChAT en el microcircuito control y privado de dopamina, antes y durante la aplicación de L-DOPA. A)** Diagrama estadístico de cajas que contrasta el conjunto de pendientes de actividad acumulada de cada linaje neuronal en condición control, carente de dopamina antes y durante la adición de L-DOPA (dSPNs = 6 experimentos/condición, iSPNs = 6 experimentos/condición, CINs = 7 experimentos/condición). Se observaron diferencias significativas al contrastar las siguientes poblaciones en la condición privada de dopamina antes: dSPNs-iSPNs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p = 0.0096$ ), dSPNs-CINs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p < 0.0001$ ), iSPNs-CINs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p = 0.0347$ ) y durante la aplicación de L-DOPA: dSPNs-CINs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p < 0.0001$ ), iSPNs-CINs (Kruskal-Wallis con prueba de Dunn post hoc,  $p = 0.0002$ ). **B)** Funciones de distribución acumulada en condición control de las poblaciones estudiadas, en el diagrama se presentan los valores para  $p$  en cada comparación realizada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (células/población neuronal: dSPNs = 194, iSPNs = 134, CINs = 113). **C)** Funciones de distribución acumulada tras la privación de dopamina de las poblaciones estudiadas, se presenta el valor de  $p$  obtenido mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (células/población neuronal: dSPNs = 135, iSPNs = 242, CINs = 173) para cada comparación. **D)** Funciones de distribución acumulada de las poblaciones estudiadas durante la aplicación de L-DOPA en el modelo carente de dopamina. Se muestran los valores de  $p$  para cada comparación hecha a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov (células/población neuronal: dSPNs = 104, iSPNs = 111, CINs = 120).

## Discusión

La actividad del microcircuito estriatal a nivel histológico se describió en términos de la actividad de algunos linajes neuronales que lo integran, caracterizando la actividad espontánea de tres de ellos: dSPNs, iSPNs y CINs en tres condiciones distintas sin estimular al tejido química o eléctricamente: control, privado de dopamina antes y durante la administración del fármaco L-DOPA. Para lograrlo, monitoreamos la actividad celular mediante imagenología de calcio con resolución de célula única y por medio de la expresión específica de indicadores genéticamente codificados que permitieron la identificación confiable de las células registradas. Investigamos los cambios en la actividad neuronal con dos tipos de métrica: la actividad acumulada a lo largo del tiempo (AA) en diferentes grupos de experimentos en cada condición, y en la probabilidad de actividad de neuronas individuales de cada población (FDA) usando como muestra todas las neuronas de todos los experimentos en la misma condición para observar si el tipo de medición puede condicionar los resultados.

Las SPNs disparan muy poco cuando no son activadas durante la actividad motora (Carrillo-Reid et al., 2008; Crutcher & DeLong, 1984; Jáidar et al., 2010; Kimura, 1992; Liang et al., 2008; Vautrelle et al., 2009), debido a rectificadores entrantes intrínsecos de K<sup>+</sup> y fuertes corrientes de K<sup>+</sup> activadas por despolarización (Bargas et al., 1989, 1999; Galarraga et al., 1994; Nisenbaum & Wilson, 1995; Tepper et al., 2004). Como las SPNs son la mayoría de las neuronas, esta característica hace que el neostriado sea clasificado como un núcleo “cuasi-silente” en estado de reposo, muy diferente a otros núcleos que disparan todo el

tiempo (e.g., Ibáñez-Sandoval et al., 2007; Kita & Kitai, 1991; Nakanishi et al., 1987). Sin embargo, este núcleo puede ser activado desde la corteza, el tálamo o la adición de fármacos *in vitro* (e.g.: NMDA), de forma que grupos de neuronas comienzan a disparar persistente y recurrentemente (Mahon et al., 2006; Vautrelle et al., 2009; Vergara et al., 2003). Pero la activación del núcleo, *in vivo* o *in vitro*, puede hacerse de varias formas, y es en medio de esta variedad fisiológica, donde se ha probado la acción de la dopamina sobre el circuito, lo que probablemente ha llevado a un sinnúmero de discrepancias en los resultados (ver Introducción). Es por eso que en el presente trabajo decidimos partir del estado más fundamental del circuito: el reposo, sin estimulación de ningún tipo, para preguntarle al tejido cuales son las acciones de la dopamina sobre tres diferentes linajes neuronales en esta condición. Esto representó una dificultad técnica: si las neuronas disparan poco, se hace difícil recolectar su actividad. Sin embargo, esto se pudo lograr gracias al multirregistro con imagenología de calcio.

Por otro lado, desde hace más de 45 años se sabe que la denervación dopaminérgica produce un exceso de actividad neuronal en el neocórtex ipsilateral a la lesión (e.g.: Arbuthnott, 1974; Jáidar et al., 2010; Schultz, 1982). Lo que nos preguntamos en la presente tesis es cuál es la participación de diversos linajes neuronales en este aumento de actividad.

#### *Neuronas estriatales de proyección de la vía directa (dSPNs)*

Los receptores dopaminérgicos, actúan de forma indirecta sobre canales iónicos, a través de proteínas G, modulando la excitabilidad de la membrana celular (Nicola et al., 2000), facilitando o frenando la aparición de potenciales de acción (Hernández-López et al., 1997, 2000; Jáidar et al., 2012). Esta acción moduladora está mediada diferencialmente por los receptores D1 (facilitadores o moduladores positivos) y D2 (repretores o moduladores negativos) que se segregan en las vías estriatales directa e indirecta, respectivamente (West et al., 2003).

De acuerdo con el modelo clásico (Albin et al., 1989) aún en boga, la privación de dopamina debe disminuir la actividad de las dSPNs ya que los receptores D1, que ellas expresan, facilitan el disparo (Hernández-López et al., 1997), así que si falta la concentración basal de este modulador la actividad disminuye. Para probar esta hipótesis, hicimos los experimentos ilustrados en la Fig. 3. Estos muestran una disminución en la actividad de las dSPNs al reducirse la dopamina, lo que coincide con algunos resultados previos (Mallet et

al., 2006). Los registros muestran poca actividad espontánea (Figs. 3A, B). La Fig. 3C muestra ejemplos de dos experimentos representativos de AA, y la Fig. 3D compara dos muestras experimentales, notando que AA decrece significativamente tras la depleción dopaminérgica respecto al tejido control. En cuanto a la distribución de probabilidad de actividad (FDA) de las neuronas se aprecia una diferencia significativa entre las distribuciones (Fig. 3E) predicha por los cambios de excitabilidad neuronal en ausencia de dopamina (Hernández-López et al., 1997; Ryan et al., 2018) además de otros efectos como el agotamiento de dopamina en otros elementos del microcircuito que originan la facilitación de las sinapsis excitatorias (Arbuthnott & Garcia-Munoz, 2017; Calabresi et al., 1993; Galarraga et al., 1987; Tang et al., 2001), así como el incremento de la inhibición GABAérgica sobre las dSPNs (Barroso-Flores et al., 2015; Gittis & Kreitzer, 2012). Estas observaciones contrastan con trabajos recientes donde se describe un aumento de la actividad espontánea de dSPNs tras la privación de dopamina (e.g.: Jáidar et al., 2019; ver también: Costa et al., 2006; Sharott et al., 2017). Estas discrepancias podrían explicarse por el uso de fluoróforos de calcio permeables en muchos de los experimentos, en lugar de usar indicadores genéticamente modificados de manera exclusiva como en este caso. Estos indicadores se asociaron a células con el receptor D1, el cual no es exclusivo de las dSPNs. A pesar de lo cual, una concordancia con el trabajo citado se puede resaltar: el número de neuronas negativas a la marca (D1 o D2 de las SPNs) exhibe mayor actividad tanto en situación control como ante la reducción de dopamina, aunque en dicho trabajo no se investigó cuál podría ser el linaje de dichas neuronas, y se asumió, simplemente basándose en los datos anatómicos, que estas deberían ser mayoritariamente SPNs. Otra discrepancia podría surgir del análisis, en esta tesis nos enfocamos en la actividad total y no en los eventos de coactividad o sincronidad.

La terapia de reemplazo de dopamina con L-DOPA es la principal línea de tratamiento para la EP, siendo eficaz para aliviar las deficiencias motoras en las etapas tempranas de la enfermedad, por lo que hipotetizamos encontrar un aumento de la actividad total de las dSPNs en nuestro ensayo al administrar el fármaco, tal como lo predice el modelo clásico (Albin et al., 1989) y confirman los experimentos *in vivo* (Lahiri & Bevan, 2020; Maltese et al., 2021; Parker et al., 2018; Sagot et al., 2018). Sin embargo, cuando se analizó dicho parámetro en tejido no estimulado, privado de dopamina antes y después de la administración del fármaco, no se apreciaron diferencias significativas (Fig. 6D). Lo anterior puede ser explicado teniendo en consideración que nuestra preparación no tiene ningún

tipo de estimulación y estaba aislada de gran parte de sus aferentes; las dSPNs son las neuronas que supuestamente responden a la activación de las cortezas motoras para realizar movimientos, y si no son suficientemente facilitadas por las razones que se explicaron arriba, quizás no debemos de esperar un aumento en su actividad. Habría que hacer experimentos donde se incorpore la estimulación del tejido (e.g.: Aparicio-Juárez et al., 2019; Lara-González et al., 2019) para mejor comparar los resultados con los hallados *in vivo*.

Tras el agotamiento del neuromodulador se producen alteraciones en la señalización del receptor D1, que van desde la disminución en su expresión hasta la alteración en su sensibilidad (Gerfen et al., 1990; Marshall et al., 1989; Young et al., 1986). Todo esto ocurre en pacientes y modelos crónicos donde estas alteraciones son modificadas a través de la estimulación pulsátil de largo plazo con L-DOPA; por lo que, en nuestro modelo, que corresponde a parkinsonismo temprano estudiado en tejido *in vitro* sin estimular y con la aplicación de una única dosis de L-DOPA en el baño, no se aprecian efectos notables.

Sin embargo, cuando estudiamos las distribuciones (FDAs) de todas las muestras de dSPNs individuales obtenida a partir de las neuronas de todos los experimentos, antes y durante el tratamiento con el precursor dopaminérgico, notamos que la disminución de la probabilidad de ser activadas, producida por la ausencia de dopamina, es restaurada por la aplicación de L-DOPA hasta valores similares a los observados en el control (Fig. 6E). Lo que sugiere que tomando la probabilidad de actividad de una muestra más grande de neuronas, sí es posible observar el efecto esperado de la L-DOPA, a pesar de la falta de estimulación, sugiriendo una elevación compensatoria de la excitabilidad intrínseca en las dSPNs en respuesta a la deficiencia de dopamina (Fieblinger et al., 2014). Esto muestra que las diferentes métricas pueden por sí mismas arrojar resultados distintos, e.g.: muestras pequeñas vs. muestras más grandes.

#### *Neuronas estriatales de proyección de la vía indirecta (iSPNs)*

Respecto a las SPNs de la vía indirecta el modelo clásico (Albin et al., 1989) predice el aumento de su actividad en ausencia de dopamina, hipótesis que encuentra apoyo experimental al observar que la activación del receptor D2 inhibe el disparo de estas neuronas (Hernández-López et al., 2000; Soares et al., 2004; Galvan et al., 2015). Esto concuerda con los resultados obtenidos con la presente preparación: hay un incremento de

la actividad en comparación con el control no estimulado al reducir la concentración de dopamina (Fig. 4D) cuando se compara la AA de muestras experimentales en las dos condiciones.

Por otro lado, las comparaciones en las distribuciones de probabilidad (FDAs) entre la actividad de neuronas individuales del control vs. el modelo privado de dopamina no reflejan diferencias (Fig. 4E), mostrando, otra vez, la diferencia entre los resultados de las dos métricas usadas. Se ha reportado que tras la pérdida de dopamina, las iSPNs presentan excitabilidad intrínseca reducida (Fieblinger et al., 2014), como una respuesta que busca resarcir, homeostáticamente, la ausencia de inhibición mediada por receptores D2. Sin embargo, la modulación positiva que ejerce la activación de receptores M1 (expresados en las iSPNs) (Hernández-Flores et al., 2015) favorecida por el elevado tono colinérgico (Galarraga et al., 1999; Tanimura et al., 2018), podría compensar la excitabilidad reducida y mantener la actividad individual, en muestras más grandes, semejante a la observada en tejido estriatal control. Por otro lado, estudios in vivo también reportan ausencia de cambios en las iSPNs ante la reducción de dopamina (Ketzer et al., 2017; Parker et al., 2018; Ryan et al., 2018). Adicionalmente, cuando se efectúan registros individuales de iSPNs en animales que se encuentran inmóviles o en sueño de ondas lentas (SWA), se muestra el aumento de su actividad (Sharott et al., 2017); lo que también podría sugerir una fuerte influencia del estado cerebral del ratón en esta observación.

Sin embargo, de manera reiterada se tiene que algunos de estos estudios se realizaron en células individuales (Ryan et al., 2018; Sharott et al., 2017) y de las que no se puede descartar cierto grado de varianza entre las neuronas registradas, mientras que otros trabajos consideran los valores individuales en promedio (Parker et al., 2018; Jáidar et al., 2019)

El trabajo de Maltese et al. (2021) analiza el cambio en el tamaño de los conjuntos de iSPNs activas en distintos momentos tras la lesión con 6-OHDA en su modelo de EP, del que concluyen que este linaje celular desarrolla adaptación homeostática, pues a los dos días de la lesión observan el incremento drástico en el número de neuronas que exhiben actividad y que, al transcurrir 14 días, esta actividad se reduce, siendo similar a la observada en tejido estriatal intacto. Esta conclusión se contrapone a nuestras observaciones, ya que en nuestro modelo estudiamos la depleción dopaminérgica al menos 21 días después de lesionar la SNc y notamos que, midiendo AA, la actividad de iSPNs continúa siendo más

grande que la registrada en control. Discrepancia que podría deberse a diferencias en la identificación neuronal. Maltese y colaboradores realizan un registro simultáneo de ambas SPNs en un modelo que sólo permite identificar dSPNs con precisión y cataloga como iSPNs a las neuronas que no son dSPNs, asumiendo los datos anatómicos que dicen que la mayor parte de las neuronas en el circuito son SPNs, por lo que no se puede descartar la posibilidad de haber incluido interneuronas en el registro correspondiente a iSPNs (Howe et al., 2019). Así mismo, los registros efectuados por Maltese fueron *in vivo*, en un modelo que realizaba una tarea motora mientras que los nuestros se llevaron a cabo en tejido *in vitro* sin estimular.

El análisis de la actividad acumulada total en rebanadas privadas de dopamina, antes y durante la adición de L-DOPA arrojó diferencias significativas, exponiendo un decremento de la AA de iSPNs en presencia del fármaco (Liang et al., 2008) y con ello, su reducción a valores ligeramente menores que los de la condición control (Fig. 7D). En cuanto a las FDAs, notamos una disminución significativa entre los valores obtenidos antes y después de la administración del fármaco en el tejido privado de dopamina (Fig. 7E), que se adjudica a la regulación inhibitoria que ejerce la L-DOPA por la activación de receptores D2 en las iSPNs (Gurevich et al., 2016; Lara-González et al., 2019), sumada a la modulación indirecta efectuada sobre los receptores D2 de interneuronas colinérgicas, cuya activación disminuye la síntesis de acetilcolina (DeBoer et al., 1996) y reduce la probabilidad de activación de receptores M1 en las iSPNs. En ambos casos, AA y FDA, se observa que el tratamiento farmacológico de las neuronas privadas de dopamina disminuye a valores menores que los observados en el control (Fig. 7E), sugiriendo que una vez ejercida la acción moduladora de la L-DOPA sobre los receptores D2 estriatales, se debilita la excitabilidad intrínseca de las iSPNs debida a la privación dopaminérgica (Fieblinger et al., 2014). Esta observación es similar a las obtenidas por Parker y colaboradores (2018), en su estudio también analizaron el efecto de dos dosis de L-DOPA (1 y 6 mg/kg) sobre la actividad de iSPNs privadas de dopamina en su modelo *in vivo* en reposo; cuando usan 1 mg/kg reportan la reducción de la tasa de disparo hasta valores similares a los registrados en condiciones control (ellos describen que las iSPNs exhiben una tasa de disparo mayor cuando su modelo permanece inmóvil, como ya se ha referido anteriormente), pero al administrar 6 mg/kg la actividad baja inclusive a valores menores que los obtenidos en estriado control, igual que en nuestro caso. Esto sugiere una posible dependencia entre la concentración de L-DOPA administrada y la actividad neuronal exhibida, lo que también podría contribuir a

explicar por qué la AA y FDA que registramos en este trabajo se reduce a valores por debajo de los normales, pues la concentración de L-DOPA empleada fue relativamente elevada (10  $\mu$ M), pudiendo acentuar el efecto inhibitorio del tratamiento sobre las iSPNs.

Justo se debe notar, que si el papel de la L-DOPA es restituir el balance en la actividad entre dSPNs e iSPNs, perdida por la privación de dopamina, esta restitución la logra el fármaco, aunque a un valor menor que el encontrado a nivel control (Fig. 9A).

### *Interneuronas colinérgicas*

Las interneuronas colinérgicas estriatales han sido reconocidas durante mucho tiempo como un nodo crítico para equilibrar la señalización de la dopamina y regular el movimiento. La alteración del sistema colinérgico generada por la pérdida de dopamina contribuye al desbalance que postula el modelo clásico, en el que se favorece la actividad de la vía indirecta y da lugar a la aparición de los síntomas motores de la EP (Liu, 2020). Esta alteración es producto de la ausencia de inhibición mediada por el receptor D2 y por fallas en los mecanismos de autorregulación en las CINs que derivan en una considerable elevación de su actividad neuronal espontánea, frecuencia de disparo y sincronía (Ding et al., 2006). Dichos cambios están estrechamente relacionados con los altos niveles de acetilcolina reportados tras la depleción dopaminérgica (Galarraga et al., 1999; Raz et al., 2001; Tanimura et al., 2018) y han sido respaldados por múltiples trabajos previos (Ding et al., 2006; Sanchez et al., 2011; Tubert & Murer, 2021).

Pese a lo anterior, también existen estudios que argumentan lo contrario (Choi et al., 2020; McKinley et al., 2019): una reducción de la actividad espontánea de las CINs en ausencia de dopamina. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos de investigación, tanto los que han observado un aumento como aquellos que han descrito la disminución de la actividad de las CINs han sido efectuados en registros electrofisiológicos de neuronas individuales, en los que la varianza entre células es grande. Por lo que nuestra configuración experimental, que posee la capacidad de seguir la actividad de múltiples neuronas de manera simultánea, puede aportar mayor claridad a este debate.

Nuestros resultados muestran que la AA de las CINs se eleva considerablemente tras la privación dopaminérgica (Figs. 5A, B) lo que también se refleja en la probabilidad de disparo, FDA. Ambas mediciones concuerdan, revelando un aumento significativo respecto al control no estimulado (Figs. 5D, E).

Cuando se aplicó L-DOPA al microcircuito parkinsoniano se observó una disminución significativa de la AA y la FDA de las interneuronas colinérgicas, alcanzando valores similares a los observados en el control sin estimular (Figs. 8D, E); debido muy probablemente a la activación de los receptores D2 en este linaje neuronal (Pisani et al., 2000), como se ha mencionado previamente.

La cuantificación de las CINs totales que presentaron actividad en las distintas condiciones mostró que la probabilidad de encontrar interneuronas activas incrementó tras la depleción dopaminérgica y que se redujo una vez que se administró L-DOPA (Fig. 8E); por lo que las diferencias observadas en la actividad a nivel de experimentos individuales (Fig. 8D) se debieron tanto a las modificaciones que presentó la actividad individual como a la cantidad de neuronas activas en cada situación.

#### *Microcircuito estriatal*

La explicación de los mecanismos que impulsan la elevada actividad espontánea del microcircuito estriatal en el modelo privado de dopamina (e.g.: Jáidar et al., 2010) precisa del estudio de los diferentes linajes neuronales que componen el circuito. No obstante, se requiere de la caracterización de su dinámica en sujetos control con el propósito de tener un punto de comparación. Hasta ahora se habían comparado los linajes dSPNs e iSPNs sin tomar en cuenta a las interneuronas (e.g.: Jáidar et al., 2019; Maltese et al., 2021), en este estudio se consideran CINs para ver su participación en el aumento de actividad. Por lo que faltaría estudiar en trabajos futuros otros linajes, como las ya referidas interneuronas GABAérgicas y analizar también su participación.

Al realizar contrastes de experimentos en las diferentes condiciones encontramos que la AA de los linajes estudiados en tejido estriatal control sin estimulación cambian de manera diferencial su actividad (Fig. 9A), participando de distinta forma en el aumento total de actividad. La privación dopaminérgica resulta en un marcado desbalance entre las dSPNs e iSPNs, tal como lo postula el modelo clásico (Albin et al., 1989) pues ambos linajes neuronales cambian en sentido diferente: las dSPNs disminuyen mientras que las iSPNs aumentan su actividad, de acuerdo a lo reportado *in vivo* con animales en reposo (Parker et al., 2018). No obstante, no todo el aumento de actividad parkinsoniana se debe a las iSPNs, como lo muestra este trabajo.

La actividad de las CINs presenta un incremento drástico que destaca en las comparaciones (Fig. 9A), con lo que muestra ser la población estudiada que más participa

en la elevada actividad espontánea reportada en el microcircuito estriatal parkinsoniano (Aparicio-Juárez et al., 2019; Arbuthnott, 1974; Jáidar et al., 2010; Lara-González et al., 2019; Pérez-Ortega et al., 2016; Plata et al., 2013; Schultz, 1982;). Esta conclusión contrasta con un trabajo en el que Sharott y colegas (2017) adjudican a las iSPNs la hiperactividad estriatal que orquesta la aparición de oscilaciones beta, críticas para la emergencia de estos ritmos en los núcleos GPe-STN durante la EP (Kumar et al., 2011). Dado que, de las poblaciones que estudiamos, las CINs exhiben una actividad considerablemente mayor a la de iSPNs y dSPNs tras el agotamiento de dopamina (Fig. 9A), se sugiere que, en realidad, las interneuronas colinérgicas podrían ser las verdaderas responsables de estas oscilaciones anormales (Deffains & Bergman, 2015; Kondabolu et al., 2016). Aunque no debe perderse de vista la contribución que los estímulos de largo alcance tienen en los experimentos de Sharott et al. (2017), los cuales fueron realizados *in vivo*.

En este sentido, Kondabolu et al. (2016) activa optogenéticamente y farmacológicamente interneuronas colinérgicas en estriado control, registrando la aparición de oscilaciones beta y gamma que remiten cuando la activación cesa. Dichas oscilaciones están correlacionadas con la aparición de los síntomas motores de la EP como la bradicinesia (Bevan et al., 2002; Kondabolu et al., 2016), por lo que la inhibición de CINs en modelos *in vivo* de la EP ha reportado la mejora de estos síntomas (Maurice et al., 2015).

Al cotejar la actividad poblacional bajo la influencia de L-DOPA es notable el hecho de que la diferencia antes vista por la deficiencia de dopamina entre dSPNs y iSPNs haya desaparecido, restableciendo el balance entre ambas vías, reduciendo también la actividad de las interneuronas colinérgicas y llevándola a valores similares a los vistos en el control, siendo consistente con resultados previos en los que la actividad espontánea aumentada del microcircuito parkinsoniano decrece en presencia de L-DOPA (Lara-González et al., 2019; Plata et al., 2013).

El contraste entre las FDA en control revela que las iSPNs presentan una actividad ligeramente mayor a la de las dSPNs en reposo (Fig. 9B), similar a la observada en otros ensayos *in vitro* (Kravitz et al., 2010; Mallet et al., 2006; Reig & Silberberg, 2014) y en animales en reposo (Ketzef et al., 2017). Dicha diferencia se acentúa con la reducción de dopamina, separando las curvas de distribución (Fig. 9B) y evidenciando el desbalance entre las dos vías (Parker et al., 2018). La administración de L-DOPA revierte esta

alteración, recuperando el balance en la actividad de ambas poblaciones de neuronas de proyección (Fig. 9C).

Las alteraciones en la actividad de cada población neuronal tras la privación dopaminérgica fueron analizadas en un modelo de parkinsonismo temprano (21 días post lesión). El estudio del efecto de L-DOPA sobre dicha actividad se realizó con la administración única de 10  $\mu$ M en el baño de la preparación *in vitro*, por lo que la investigación de los cambios que presenta la actividad de dSPNs, iSPNs y CINs en modelos crónicos de la enfermedad, así como con la administración crónica de L-DOPA, requieren ser estudiados posteriormente.

## Conclusiones

- ❖ En el estriado mantenido *in vitro* sin estimulación y sin influencias de largo alcance, las dSPNs disminuyen su actividad poblacional tras la privación de dopamina. La adición de L-DOPA restituye su actividad a un nivel menor que el control.
- ❖ Las iSPNs aumentan su actividad en ausencia de dopamina sin modificar su distribución de probabilidad en la actividad. La administración de L-DOPA reduce su actividad a valores incluso menores que los observados en tejido estriatal control.
- ❖ Por lo tanto, la reducción en la dopamina estriatal produce un desbalance entre las dSPNs e iSPNs que se restituye con L-DOPA.
- ❖ De los tres linajes estudiados, las CINs son las que más incrementan su actividad después de la reducción de dopamina. En presencia de L-DOPA la actividad control tiende a restablecerse.
- ❖ La dopamina ejerce un efecto importante en el tipo y cantidad de neuronas que se reclutan en condiciones control y patológica, por lo que el estudio de esta relación brindaría información valiosa de su influencia a nivel poblacional en el estriado. Lo cual invita al estudio de la participación de otros linajes neuronales.
- ❖ Las interneuronas colinérgicas participan importantemente en la elevada actividad espontánea que exhibe el microcircuito estriatal parkinsoniano.
- ❖ El efecto terapéutico del fármaco L-DOPA se ejerce primordialmente a través de receptores D2, reduciendo la actividad total de iSPNs y de las interneuronas colinérgicas.
- ❖ La imagenología de calcio en rebanadas *in vitro* sin estimulación semeja algunas de las observaciones en experimentos *in vivo*, en animales en reposo, por lo que resulta

sumamente útil en el estudio de la fisiopatología de la EP y padecimientos relacionados. Así mismo permite evaluar la eficacia de tratamientos farmacológicos alternativos.

### *Perspectivas*

Nuestras observaciones enfatizan en la importancia de los receptores dopaminérgicos D2 en la regulación de la actividad estriatal durante la privación de dopamina.

El estudio de los otros linajes de interneuronas usando la metodología aquí presentada, enriquecería la información obtenida en este trabajo, brindándonos un panorama más completo sobre la dinámica global del estriado durante la enfermedad de Parkinson y su respuesta a la L-DOPA.

Estudios similares, pero en tejido activado o estimulado, permitirían la reinterpretación de la influencia de los distintos linajes estriatales en ausencia de dopamina.

## Bibliografía

- Abudukeyoumu, N., Hernandez-Flores, T., Garcia-Munoz, M., & Arbuthnott, G. W. (2019). Cholinergic modulation of striatal microcircuits. *European Journal of Neuroscience*, *49*(5), 604–622. <https://doi.org/10.1111/ejn.13949>
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, *12*(10), 366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Aosaki, T., Miura, M., Suzuki, T., Nishimura, K., & Masuda, M. (2010). Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: An update. *Geriatrics and Gerontology International*, *10*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2010.00588.x>
- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., & Bargas, J. (2019). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *European Journal of Neuroscience*, *49*(6), 834–848. <https://doi.org/10.1111/ejn.13806>
- Arbuthnott, G. W. (1974). Proceedings: Spontaneous activity of single units in the striatum after unilateral destruction of the dopamine input. *The Journal of Physiology*, *239*(2), 121P—122P. <http://europepmc.org/abstract/MED/4415288>
- Arbuthnott, G. W., & Garcia-Munoz, M. (2017). Are the Symptoms of Parkinsonism Cortical in Origin? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *15*, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.10.006>
- Balleine, B. W., Delgado, M. R., & Hikosaka, O. (2007). The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *Journal of Neuroscience*, *27*(31), 8161–8165. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1554-07.2007>
- Bargas, J., Ayala, G. X., Vilchis, C., Pineda, J. C., & Galarraga, E. (1999). Ca<sup>2+</sup>-activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience*, *88*(2), 479–488. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00211-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00211-5)
- Bargas, J., Galarraga, E., & Aceves, J. (1989). An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Experimental Brain Research*, *75*(1), 146–156. <https://doi.org/10.1007/BF00248538>
- Barroso-Flores, J., Herrera-Valdez, M. A., Lopez-Huerta, V. G., Galarraga, E., & Bargas, J. (2015). Diverse short-term dynamics of inhibitory synapses converging on Striatal projection neurons: Differential changes in a rodent model of Parkinson's disease. *Neural Plasticity*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/573543>
- Bennett, B. D., & Wilson, C. J. (1999). Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *Journal of Neuroscience*, *19*(13), 5586–5596. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-13-05586.1999>
- Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J. F., Pappy, M., Levenson, R., & Goldman-Rakic, P. S. (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *Journal of Neuroscience*, *15*(12), 7821–7836. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-12-07821.1995>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of

- calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21.  
<https://doi.org/10.1038/35036035>
- Bevan, M. D., Magill, P. J., Terman, D., Bolam, J. P., & Wilson, C. J. (2002). Move to the rhythm: Oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends in Neurosciences*, 25(10), 525–531. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02235-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02235-X)
- Bezard, E., & Przedborski, S. (2011). A tale on animal models of Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 26(6), 993–1002. <https://doi.org/10.1002/mds.23696>
- Blumenstock, S., & Dudanova, I. (2020). Cortical and Striatal Circuits in Huntington's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 14(February).  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00082>
- Bolam, P. J. (2013). Microcircuits of the Striatum. In G. M. Sheperd & S. Grillner (Eds.), *Handbook of Brain Microcircuits* (1st ed., pp. 109–119). Oxford University Press.  
<https://doi.org/10.1093/med/9780195389883.003.0011>
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211, 51–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Brown, P. (2003). Oscillatory nature of human basal ganglia activity: Relationship to the pathophysiology of parkinson's disease. *Movement Disorders*, 18(4), 357–363.  
<https://doi.org/10.1002/mds.10358>
- Burke, D. A., Rotstein, H. G., & Alvarez, V. A. (2017). Striatal local circuitry: A new framework for lateral inhibition. *Neuron*, 96(2), 267–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.019>
- Burkhardt, J. M., Jin, X., & Costa, R. M. (2009). Dissociable effects of dopamine on neuronal firing rate and synchrony in the dorsal striatum. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 3(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/neuro.07.028.2009>
- Calabresi, P., Mercuri, N. B., Sancesario, G., & Bernardi, G. (1993). Electrophysiology of dopamine-denervated striatal neurons. Implications for Parkinson's disease. *Brain*, 116(2), 433–452. <https://doi.org/10.1093/brain/116.2.433>
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, 17(8), 1022–1030. <https://doi.org/10.1038/nn.3743>
- Campos, F. L., Carvalho, M. M., Cristovão, A. C., Je, G., Baltazar, G., Salgado, A. J., Kim, Y. S., & Sousa, N. (2013). Rodent models of Parkinson's disease: Beyond the motor symptomatology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(NOV), 1–11.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00175>
- Carrillo-Reid, L., Hernández-López, S., Tapia, D., Galarraga, E., & Bargas, J. (2011). Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: Receptor-specific configuration of cell assemblies. *Journal of Neuroscience*, 31(42), 14972–14983.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3226-11.2011>
- Carrillo-Reid, L., Miller, J. E. K., Hamm, J. P., Jackson, J., & Yuste, R. (2015). Endogenous sequential cortical activity evoked by visual stimuli. *Journal of Neuroscience*, 35(23), 8813–8828. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5214->

14.2015

- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibáñez-Sandoval, O., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., & Bargas, J. (2009). Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *Journal of Neurophysiology*, *101*(2), 737–749. <https://doi.org/10.1152/jn.90975.2008>
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., & Bargas, J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *Journal of Neurophysiology*, *99*(3), 1435–1450. <https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>
- Centonze, D., Grande, C., Usiello, A., Gubellini, P., Erbs, E., Martín, A. B., Pisani, A., Tognazzi, N., Bernardi, G., Moratalla, R., Borrelli, E., & Calabresi, P. (2003). Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *Journal of Neuroscience*, *23*(15), 6245–6254. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-15-06245.2003>
- Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., & Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, *499*(7458), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
- Choi, S. J., Ma, T. C., Ding, Y., Cheung, T., Joshi, N., Sulzer, D., Mosharov, E. V., & Kang, U. J. (2020). Alterations in the intrinsic properties of striatal cholinergic interneurons after dopamine lesion and chronic l-dopa. *eLife*, *9*, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.56920>
- Clarke, R., & Adermark, L. (2015). Dopaminergic regulation of striatal interneurons in reward and addiction: Focus on alcohol. *Neural Plasticity*, *2015*(814567), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/814567>
- Costa, R. M., Lin, S. C., Sotnikova, T. D. D., Cyr, M., Gainetdinov, R. R. R., Caron, M. G. G., & Nicolelis, M. A. A. L. (2006). Rapid Alterations in Corticostriatal Ensemble Coordination during Acute Dopamine-Dependent Motor Dysfunction. *Neuron*, *52*(2), 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.07.030>
- Crutcher, M. D., & DeLong, M. R. (1984). Single cell studies of the primate putamen - II. Relations to direction of movement and pattern of muscular activity. *Experimental Brain Research*, *53*(2), 244–258. <https://doi.org/10.1007/BF00238154>
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Gut, N. K., Valencia, M., Kondabolu, K., Kim, Y., Gerdjikov, T. V., & Mena-Segovia, J. (2020). Cholinergic midbrain afferents modulate striatal circuits and shape encoding of action strategies. *Nature Communications*, *11*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15514-3>
- DeBoer, P., Heeringa, M. J., & Abercrombie, E. D. (1996). Spontaneous release of acetylcholine in striatum is preferentially regulated by inhibitory dopamine D2 receptors. *European Journal of Pharmacology*, *317*(2–3), 257–262. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(96\)00761-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00761-3)
- Deffains, M., & Bergman, H. (2015). Striatal cholinergic interneurons and cortico-striatal synaptic plasticity in health and disease. *Movement Disorders*, *30*(8), 1014–1025. <https://doi.org/10.1002/mds.26300>
- DeLong, M., & Wichmann, T. (2009). Update on models of basal ganglia function and

- dysfunction. *Parkinsonism and Related Disorders*, 15(SUPPL. 3), S237–S240. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70822-3](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70822-3)
- Ding, J., Guzman, J. N., Tkatch, T., Chen, S., Goldberg, J. A., Ebert, P. J., Levitt, P., Wilson, C. J., Hamm, H. E., & Surmeier, D. J. (2006). RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nature Neuroscience*, 9(6), 832–842. <https://doi.org/10.1038/nn1700>
- Do, J., Kim, J. I., Bakes, J., Lee, K., & Kaang, B. K. (2013). Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. *Learning and Memory*, 20(1), 21–28. <https://doi.org/10.1101/lm.025015.111>
- Duhne, M., Lara-González, E., Laville, A., Padilla-Orozco, M., Ávila-Cascajares, F., Arias-García, M., Galarraga, E., & Bargas, J. (2020). Activation of parvalbumin-expressing neurons reconfigures neuronal ensembles in murine striatal microcircuits. *European Journal of Neuroscience*, September 2019, 1–16. <https://doi.org/10.1111/ejn.14670>
- Duty, S., & Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1357–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x>
- Ericsson, J., Stephenson-Jones, M., Pérez-Fernández, J., Robertson, B., Silberberg, G., & Grillner, S. (2013). Dopamine differentially modulates the excitability of striatal neurons of the direct and indirect pathways in lamprey. *Journal of Neuroscience*, 33(18), 8045–8054. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5881-12.2013>
- Fieblinger, T., Graves, S. M., Sebel, L. E., Alcacer, C., Plotkin, J. L., Gertler, T. S., Chan, C. S., Heiman, M., Greengard, P., Cenci, M. A., & Surmeier, D. J. (2014). Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6316>
- Galarraga, E., Bargas, J., Martínez-Fong, D., & Aceves, J. (1987). Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neuroscience Letters*, 81(3), 351–355. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90409-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90409-5)
- Galarraga, E., Hernández-López, S., Reyes, A., Miranda, I., Bermudez-Rattoni, F., Vilchis, C., & Bargas, J. (1999). Cholinergic modulation of neostriatal output: A functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *Journal of Neuroscience*, 19(9), 3629–3638. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-09-03629.1999>
- Galarraga, E., Pacheco-Cano, M. T., Flores-Hernández, J. V., & Bargas, J. (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Experimental Brain Research*, 100(2), 239–249. <https://doi.org/10.1007/BF00227194>
- Galvan, A., Devergnas, A., & Wichmann, T. (2015). Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the Parkinsonian State. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(FEB), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00005>
- Garas, F. N., Kormann, E., Shah, R. S., Vinciati, F., Smith, Y., Magill, P. J., & Sharott, A. (2018). Structural and molecular heterogeneity of calretinin-expressing interneurons in the rodent and primate striatum. *Journal of Comparative Neurology*, 526(5), 877–898. <https://doi.org/10.1002/cne.24373>
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susei, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of

- striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 7(250), 1429–1432.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.2147780>
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 441–466.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>
- Gittis, A. H., & Kreitzer, A. C. (2012). Striatal microcircuitry and movement disorders. *Trends in Neurosciences*, 35(9), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.008>
- Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, 73(5), 862–885. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011>
- Grillner, S, & Graybiel, A. M. (Eds.). (2006). *Microcircuits: The Interface between Neurons and Global Brain Function*. Cambridge, MA: The MIT Press.
- Grillner, Sten, & Robertson, B. (2016). The Basal Ganglia Over 500 Million Years. *Current Biology*, 26(20), R1088–R1100. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.041>
- Grillner, Sten, Robertson, B., & Stephenson-Jones, M. (2013). The evolutionary origin of the vertebrate basal ganglia and its role in action selection. *Journal of Physiology*, 591(22), 5425–5431. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.246660>
- Gurevich, E. V., Gainetdinov, R. R., & Gurevich, V. V. (2016). G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions. *Pharmacological Research*, 111(5), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.010>
- Haber, S. N. (2016). Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1), 7–21. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6434-1\\_135-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6434-1_135-1)
- Hammond, C., Bergman, H., & Brown, P. (2007). Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends in Neurosciences*, 30(7), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.05.004>
- Hernández-Flores, T., Hernández-González, O., Pérez-Ramírez, M. B., Lara-González, E., Arias-García, M. A., Duhne, M., Pérez-Burgos, A., Prieto, G. A., Figueroa, A., Galarraga, E., & Bargas, J. (2015). Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M4-type receptors. *Neuropharmacology*, 89, 232–244. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.028>
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., & Galarraga, E. (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *Journal of Neuroscience*, 17(9), 3334–3342. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-09-03334.1997>
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., & Surmeier, D. J. (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLCβ1-IP3-Calcineurin-signaling cascade. *Journal of Neuroscience*, 20(24), 8987–8995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-08987.2000>
- Howe, M., Ridouh, I., Mascaro, A. L. A., Larios, A., Azcorra, M., & Dombeck, D. A. (2019). Coordination of rapid cholinergic and dopaminergic signaling in striatum during spontaneous movement. *eLife*, 8, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.44903>
- Huerta-Ocampo, I., Mena-Segovia, J., & Bolam, J. P. (2014). Convergence of cortical and

- thalamic input to direct and indirect pathway medium spiny neurons in the striatum. *Brain Structure & Function*, 219(5), 1787–1800. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0601-z>
- Ibáñez-Sandoval, O., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Mendoza, E., Gomora, J. C., Aceves, J., & Bargas, J. (2007). Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: Possible relevance for Parkinson disease. *Journal of Neurophysiology*, 98(4), 2311–2323. <https://doi.org/10.1152/jn.00620.2007>
- Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. (2017). *Enfermedad de Parkinson*. [www.innn.salud.gob.mx/interna/medica/padecimientos/parkinson.html](http://www.innn.salud.gob.mx/interna/medica/padecimientos/parkinson.html)
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., & Bargas, J. (2012). Comparison of Normal and Parkinsonian Microcircuit Dynamics in the Rodent Striatum. *Mechanisms in Parkinson's Disease - Models and Treatments*, 311–322. <https://doi.org/10.5772/21036>
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., & Hernández-Cruz, A. (2010). Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: Entrainment into a dominant network state. *Journal of Neuroscience*, 30(34), 11326–11336. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1380-10.2010>
- Jáidar, Omar, Carrillo-Reid, L., Nakano, Y., Lopez-Huerta, V. G., Hernandez-Cruz, A., Bargas, J., Garcia-Munoz, M., & Arbutnott, G. W. (2019). Synchronized activation of striatal direct and indirect pathways underlies the behavior in unilateral dopamine-depleted mice. *European Journal of Neuroscience*, 49(11), 1512–1528. <https://doi.org/10.1111/ejn.14344>
- Jin, X., & Costa, R. M. (2015). Shaping action sequences in basal ganglia circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 33, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.011>
- Jin, X., Tecuapetla, F., & Costa, R. M. (2014). Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nature Neuroscience*, 17(3), 423–430. <https://doi.org/10.1038/nn.3632>
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, 18(12), 527–535. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)98374-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)98374-8)
- Ketzel, M., Spigolon, G., Johansson, Y., Bonito-Oliva, A., Fisone, G., & Silberberg, G. (2017). Dopamine Depletion Impairs Bilateral Sensory Processing in the Striatum in a Pathway-Dependent Manner. *Neuron*, 94(4), 855-865.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.004>
- Kimura, M. (1992). Behavioral modulation of sensory responses of primate putamen neurons. *Brain Research*, 578(1–2), 204–214. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90249-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90249-9)
- Kita, H., & Kitai, S. T. (1991). Intracellular study of rat globus pallidus neurons: membrane properties and responses to neostriatal, subthalamic and nigral stimulation. *Brain Research*, 564(2), 296–305. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91466-E](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91466-E)
- Kondabolu, K., Roberts, E. A., Bucklin, M., McCarthy, M. M., Kopell, N., & Han, X. (2016). Striatal cholinergic interneurons generate beta and gamma oscillations in the corticostriatal circuit and produce motor deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), 3159–3168.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1605658113>

- Konnova, E. A., & Swanberg, M. (2018). Parkinson's Disease: Pathogenesis and clinical aspects. In T. B. Stoker & J. C. Greenland (Eds.), *Parkinson's disease: Pathogenesis and clinical aspects* (1st ed., pp. 83–106). Codon Publications.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.p1r>
- Kouli, A., Torsney, K. M., & Kuan, W.-L. (2018). *Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis* (T. B. Stoker & J. C. Greenland (Eds.); pp. 3–26). Codon Publications.
- Kozlov, A., Huss, M., Lansner, A., Kotaleski, J. H., & Grillner, S. (2009). Simple cellular and network control principles govern complex patterns of motor behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(47), 20027–20032. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906722106>
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, *466*(7306), 622–626.  
<https://doi.org/10.1038/nature09159>
- Kumar, A., Cardanobile, S., Rotter, S., & Aertsen, A. (2011). The role of inhibition in generating and controlling Parkinson's disease oscillations in the basal ganglia. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *5*(OCTOBER 2011), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00086>
- Lahiri, A. K., & Bevan, M. D. (2020). Dopaminergic Transmission Rapidly and Persistently Enhances Excitability of D1 Receptor-Expressing Striatal Projection Neurons. *Neuron*, *106*(2), 277-290.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.028>
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(12), 1–20.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>
- Lara-González, E., Duhne, M., Ávila-Cascajares, F., Cruz, S., & Bargas, J. (2019). Comparison of Actions between L-DOPA and Different Dopamine Agonists in Striatal DA-Depleted Microcircuits In Vitro: Pre-Clinical Insights. *Neuroscience*, *410*, 76–96.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.058>
- Liang, L., DeLong, M. R., & Papa, S. M. (2008). Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *Journal of Neuroscience*, *28*(30), 7537–7547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-08.2008>
- Liu, C. (2020). Targeting the cholinergic system in Parkinson's disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, *41*(4), 453–463. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0380-z>
- Magill, P. J., Pogosyan, A., Sharott, A., Csicsvari, J., Bolam, J. P., & Brown, P. (2006). Changes in functional connectivity within the rat striatopallidal axis during global brain activation in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(23), 6318–6329. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0620-06.2006>
- Mahon, S., Vautrelle, N., Pezard, L., Slaght, S. J., Deniau, J. M., Chouvet, G., & Charpier, S. (2006). Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural

- sleep-wake cycle. *Journal of Neuroscience*, 26(48), 12587–12595.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3987-06.2006>
- Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C., & Gonon, F. (2006). Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *Journal of Neuroscience*, 26(14), 3875–3884.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4439-05.2006>
- Mallet, N., Leblois, A., Maurice, N., & Beurrier, C. (2019). Striatal cholinergic interneurons: How to elucidate their function in health and disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10(December), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01488>
- Maltese, M., March, J. R., Bashaw, A. G., & Tritsch, N. X. (2021). Dopamine differentially modulates the size of projection neuron ensembles in the intact and dopamine-depleted striatum. *ELife*, 10, 1–24. <https://doi.org/10.7554/elife.68041>
- Mao, B. Q., Hamzei-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R. C., & Yuste, R. (2001). Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron*, 32(5), 883–898.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00518-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00518-9)
- Marras, C., Beck, J. C., Bower, J. H., Roberts, E., Ritz, B., Ross, G. W., Abbott, R. D., Savica, R., Van Den Eeden, S. K., Willis, A. W., & Tanner, C. (2018). Prevalence of Parkinson's disease across North America. *Npj Parkinson's Disease*, 4(1), 1–7.  
<https://doi.org/10.1038/s41531-018-0058-0>
- Marshall, J. F., Navarrete, R., & Joyce, J. N. (1989). Decreased striatal D1 binding density following mesotelencephalic 6-hydroxydopamine injections: an autoradiographic analysis. *Brain Research*, 493(2), 247–257. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91160-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91160-8)
- Marsot, A., Guilhaumou, R., Azulay, J., Blin, O., & Pharmacologie, S. De. (2017). Levodopa in Parkinson's Disease : A Review Pharmacokinetics / Pharmacodynamics Analysis of Population. *Jornal of Pharmacy and and Pharmaceutical Science*, 20, 226–238.
- Maurice, N., Liberge, M., Jaouen, F., Ztaou, S., Hanini, M., Camon, J., Deisseroth, K., Amalric, M., Kerkerian-Le Goff, L., & Beurrier, C. (2015). Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal Ganglia Function in Experimental Parkinsonism. *Cell Reports*, 13(4), 657–666.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.034>
- McGregor, M. M., & Nelson, A. B. (2019). Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease. *Neuron*, 101(6), 1042–1056. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.004>
- McKinley, J. W., Shi, Z., Kawikova, I., Hur, M., Bamford, I. J., Sudarsana Devi, S. P., Vahedipour, A., Darvas, M., & Bamford, N. S. (2019). Dopamine Deficiency Reduces Striatal Cholinergic Interneuron Function in Models of Parkinson's Disease. *Neuron*, 103(6), 1056-1072.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.06.013>
- Mink, J. W. (1996). The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Progress in Neurobiology*, 50(4), 381–425.  
[https://doi.org/doi:10.1016/s0301-0082\(96\)00042-1](https://doi.org/doi:10.1016/s0301-0082(96)00042-1)
- Nakanishi, H., Kita, H., & Kitai, S. T. (1987). Electrical membrane properties of rat subthalamic neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Research*, 437(1), 35–44.

[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91524-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91524-1)

- Nelson, A. B., & Kreitzer, A. C. (2014). Reassessing Models of Basal Ganglia Function and Dysfunction. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 117–135. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013916>
- Neve, K. A., Seamans, J. K., & Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 24(3), 165–205. <https://doi.org/10.1081/RRS-200029981>
- Nicola, S. M., Surmeier, D. J., & Malenka, R. C. (2000). Dopaminergic Modulation of Neuronal Excitability in the Striatum and Nucleus Accumbens. *Annual Review of Neuroscience*, 23(1), 185–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.185>
- Nisenbaum, E. S., & Wilson, C. J. (1995). Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection-neurons. *Journal of Neuroscience*, 15(6), 4449–4463. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-06-04449.1995>
- Palubinsky, A. M., Lizama-Manibusan, B. N., Miller, D., & McLaughlin, B. A. (2015). Genetic Models of Parkinson's Disease: Behavior, Signaling, and Pathological Features. In *Environmental Factors in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800228-5.00014-5>
- Parker, J. G., Marshall, J. D., Ahanonu, B., Wu, Y. W., Kim, T. H., Grewe, B. F., Zhang, Y., Li, J. Z., Ding, J. B., Ehlers, M. D., & Schnitzer, M. J. (2018). Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. In *Nature* (Vol. 557, Issue 7704). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0090-6>
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., & Bargas, J. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiology of Disease*, 91, 347–361. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.023>
- Pisani, A., Bonsi, P., Centonze, D., Calabresi, P., & Bernardi, G. (2000). Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(7), 6–11. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-07-j0003.2000>
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J. E., Barroso-Flores, J., Galarraga, E., & Bargas, J. (2013). Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of parkinsonian tissue in vitro. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/519184>
- Plenz, D., & Wickens, J. R. (2016). The Striatal Skeleton: Medium Spiny Projection Neurons and Their Lateral Connections. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 24, 121–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00006-4>
- Poewe, W., Antonini, A., Zijlmans, J. C., Burkhard, P. R., & Vingerhoets, F. (2010). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. *Clinical Interventions in Aging*, 5, 229–238. <https://doi.org/10.2147/cia.s6456>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>

- Raz, A., Frechter-Mazar, V., Feingold, A., Abeles, M., Vaadia, E., & Bergman, H. (2001). Activity of pallidal and striatal tonically active neurons is correlated in mptp-treated monkeys but not in normal monkeys. *The Journal of Neuroscience*, *21*(3), 1–5. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-03-j0006.2001>
- Raz, A., Feingold, A., Zelanskaya, V., Vaadia, E., & Bergman, H. (1996). Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates. *Journal of Neurophysiology*, *76*(3), 2083–2088. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.3.2083>
- Redgrave, P., Coizet, V., Comoli, E., McHaffie, J. G., Leriche, M., Vautrelle, N., Hayes, L. M., & Overton, P. (2010). Interactions between the midbrain superior colliculus and the basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, *4*(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00132>
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y., DeLong, M. R., & Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: Implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(11), 760–772. <https://doi.org/10.1038/nrn2915>
- Reig, R., & Silberberg, G. (2014). Multisensory Integration in the Mouse Striatum. *Neuron*, *83*(5), 1200–1212. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.033>
- Rendón-Ochoa, E. A., Hernández-Flores, T., Avilés-Rosas, V. H., Cáceres-Chávez, V. A., Duhne, M., Laville, A., Tapia, D., Galarraga, E., & Bargas, J. (2018). Calcium currents in striatal fast-spiking interneurons: Dopaminergic modulation of Ca V 1 channels. *BMC Neuroscience*, *19*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0441-0>
- Rivera, A., Alberti, I., Martín, A. B., Narváez, J. A., De la Calle, A., & Moratalla, R. (2002). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *European Journal of Neuroscience*, *16*(11), 2049–2058. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02280.x>
- Ryan, M. B., Bair-Marshall, C., & Nelson, A. B. (2018). Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia. *Cell Reports*, *23*(12), 3438–3446.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.059>
- Sagot, B., Li, L., & Zhou, F. M. (2018). Hyperactive Response of Direct Pathway Striatal Projection Neurons to L-dopa and D1 Agonism in Freely Moving Parkinsonian Mice. *Frontiers in Neural Circuits*, *12*(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00057>
- Sanchez, G., Rodriguez, M. J., Pomata, P., Rela, L., & Murer, M. G. (2011). Reduction of an afterhyperpolarization current increases excitability in striatal cholinergic interneurons in rat parkinsonism. *Journal of Neuroscience*, *31*(17), 6553–6564. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6345-10.2011>
- Schultz, W. (1982). Depletion of dopamine in the striatum as an experimental model of parkinsonism: direct effects and adaptive mechanisms. *Progress in Neurobiology*, *18*(2–3), 121–166. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(82\)90015-6](https://doi.org/10.1016/0301-0082(82)90015-6)
- Serrano-Reyes, M., García-Vilchis, B., Reyes-Chapero, R., Cáceres-Chávez, V. A., Tapia, D., Galarraga, E., & Bargas, J. (2020). Spontaneous Activity of Neuronal Ensembles in Mouse Motor Cortex: Changes after GABAergic Blockade. *Neuroscience*, *446*, 304–322. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.08.025>

- Sharott, A., Doig, N. M., Mallet, N., & Magill, P. J. (2012). Relationships between the firing of identified striatal interneurons and spontaneous and driven cortical activities in vivo. *Journal of Neuroscience*, *32*(38), 13221–13236. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2440-12.2012>
- Sharott, A., Vinciati, F., Nakamura, K. C., & Magill, P. J. (2017). A population of indirect pathway striatal projection neurons is selectively entrained to parkinsonian beta oscillations. *Journal of Neuroscience*, *37*(41), 9977–9998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0658-17.2017>
- Shepherd, G. M., & Grillner, S. (Eds.). (2010). *Handbook of brain microcircuits* (1st ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Soares, J., Kliem, M. A., Betarbet, R., Greenamyre, J. T., Yamamoto, B., & Wichmann, T. (2004). Role of external pallidal segment in primate parkinsonism: Comparison of the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism and lesions of the external pallidal segment. *Journal of Neuroscience*, *24*(29), 6417–6426. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0836-04.2004>
- Surmeier, D. J., Carrillo-Reid, L., & Bargas, J. (2011). Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience*, *198*, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.051>
- Surmeier, D. J., Shen, W., Day, M., Gertler, T., Chan, S., Tian, X., & Plotkin, J. L. (2010). The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits. In *Progress in Brain Research* (Vol. 183, Issue C). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)83008-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)83008-0)
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.-A., Nairn, A. C., & Greengard, P. (2004). DARPP-32: An Integrator of Neurotransmission. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *44*(1), 269–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121415>
- Tang, K. C., Low, M. J., Grandy, D. K., & Lovinger, D. M. (2001). Dopamine-dependent synaptic plasticity in striatum during in vivo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(3), 1255–1260. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1255>
- Tanimura, A., Pancani, T., Lim, S. A. O., Tubert, C., Melendez, A. E., Shen, W., & Surmeier, D. J. (2018). Striatal cholinergic interneurons and Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, *47*(10), 1148–1158. <https://doi.org/doi:10.1111/ejn.13638>
- Tecuapetla, F., Matias, S., Dugue, G. P., Mainen, Z. F., & Costa, R. M. (2014). Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nature Communications*, *5*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms5315>
- Tepper, J. M., Koós, T., & Wilson, C. J. (2004). GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends in Neurosciences*, *27*(11), 662–669. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.007>
- Tepper, J., & Plenz, D. (2006). Microcircuits in the striatum: striatal cell types and their interaction. In S Grillner & A. M. Graybiel (Eds.), *Microcircuits: The Interface Between Neurons and global brain function* (pp. 127–148). Cambridge, MA: The MIT Press.

- Tepper, J., Tecuapetla, F., Koós, T., & Ibáñez-Sandoval, O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4(DEC), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00150>
- Tubert, C., & Murer, M. G. (2021). What's wrong with the striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease? Focus on intrinsic excitability. *European Journal of Neuroscience*, 53(7), 2100–2116. <https://doi.org/10.1111/ejn.14742>
- Ungerstedt, U., & Arbuthnott, G. W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research*, 24(3), 485–493. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90187-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90187-3)
- Vautrelle, N., Carrillo-Reid, L., & Vargas, J. (2009). Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson's Disease. *Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson's Disease*, 73–85. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-252-0>
- Vergara, R., Rick, C., Hernández-López, S., Laville, J. A., Guzman, J. N., Galarraga, E., Surmeier, D. J., & Vargas, J. (2003). Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *Journal of Physiology*, 553(1), 169–182. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.050799>
- Villalba, R. M., & Smith, Y. (2018). Loss and remodeling of striatal dendritic spines in Parkinson's disease: from homeostasis to maladaptive plasticity? *Journal of Neural Transmission*, 125(3), 431–447. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1735-6>
- Warre, R., Thiele, S., Talwar, S., Kamal, M., Johnston, T. H., Wang, S., Lam, D., Lo, C., Khademullah, C. S., Perera, G., Reyes, G., Sun, X. S., Brotchie, J. M., & Nash, J. E. (2011). Altered function of glutamatergic cortico-striatal synapses causes output pathway abnormalities in a chronic model of parkinsonism. *Neurobiology of Disease*, 41(3), 591–604. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.10.013>
- West, A., Floresco, S. B., Charara, A., Rosenkranz, J. A., & Grace, A. A. (2003). Electrophysiological Interactions between Striatal Glutamatergic and Dopaminergic Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1003, 53–74. <https://doi.org/10.1196/annals.1300.004>
- West, T. O., Berthouze, L., Halliday, D. M., Litvak, V., Sharott, A., Magill, P. J., & Farmer, S. F. (2018). Propagation of beta/gamma rhythms in the cortico-basal ganglia circuits of the parkinsonian rat. *Journal of Neurophysiology*, 119(5), 1608–1628. <https://doi.org/10.1152/jn.00629.2017>
- Yan, Z., Song, W. J., & Surmeier, D. J. (1997). D2 dopamine receptors reduce N-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C- insensitive pathway. *Journal of Neurophysiology*, 77(2), 1003–1015. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.1003>
- Yan, Z., & Surmeier, D. J. (1997). D5 dopamine receptors enhance Zn<sup>2+</sup>-sensitive GABA(A) currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron*, 19(5), 1115–1126. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80402-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80402-X)
- Young, W. S., Bonner, T. I., & Brann, M. R. (1986). Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24), 9827–9831. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.24.9827>

- Yuste, R. (2015). From the neuron doctrine to neural networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(8), 487–497. <https://doi.org/10.1038/nrn3962>
- Zhai, S., Shen, W., Graves, S. M., & Surmeier, D. J. (2019). Dopaminergic modulation of striatal function and Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 126(4), 411–422. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00702-019-01997-y>
- Ztaou, S., & Amalric, M. (2019). Contribution of cholinergic interneurons to striatal pathophysiology in Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 126(November 2018), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.02.019>