



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“La dinámica de las interneuronas
colinérgicas del microcircuito estriatal
control y parkinsoniano”.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Lic. Bioquímica Diagnostica

Presenta

Montserrat Padilla Orozco

Asesor: M en C. Esther Lara González

Coasesor: M en C. Raúl Sampieri Cabrera

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

ACADEMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar. Por brindarme educación, cultura, deportes, arte, y un lugar en la ciencia. Gracias por ser una casa abierta para todos los que deseamos desarrollarnos personal y profesionalmente.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, mi alma máter. Por los conocimientos que contienen tus paredes, por cada profesor que me crucé en el desarrollo de esta licenciatura, por recibir generaciones de estudiantes y formarnos.

Al Dr. José Bargas Díaz le agradezco la oportunidad de estar en su laboratorio, por la asesoría y compromiso en este trabajo. Gracias por contribuir de manera continua en el desarrollo profesional de cada uno de nosotros, sus estudiantes.

A las cDra. Esther Lara y Mariana Duhne. Les agradezco su dedicación en el desarrollo de este trabajo, por ser pilares fundamentales en mi formación profesional.

Al Fis. Juan Antonio Laville C., técnico académico del laboratorio, quien fue parte fundamental para la realización de esta tesis, y de todos los proyectos que ahí se desarrollan.

A cDra. Ariadna Aparicio J. y a la M en C. Gabriela Xóchitl Ayala M. por su compromiso en el cuidado, reproducción y genotipificación de los ratones utilizados para esta tesis, y cada trabajo hecho en el laboratorio.

Al Dr. Salvador L. Hernández López y al cDr. Diego Ernersto O. Rolon por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por el apoyo en los experimentos de esta tesis y de futuros proyectos.

Agradezco a mi jurado, a cada uno de ustedes por la asesoría y disposición en la revisión de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

PERSONALES

A mis padres por regalarme la vida, brindarme el apoyo, educarme con amor, valores y coraje, por siempre estar ahí como mi guía. Gracias por escucharme, por sus consejos y por darme todo siempre. Son mis pilares, mi hogar, mi impulso, la fuerza, los amo.

A mis hermanos porque son mi motivo e inspiración, porque siempre veo por ustedes y mis sobrinos, mi corazón. Son mis mejores amigos, compañeros de las mejores aventuras, risas, travesuras, consejeros de vida, de amor y gran apoyo para todo lo que me propongo.

A todos mis tíos Orozco, por ser tan unidos, por ser parte de mi vida en cada etapa, por seguir mi camino y creer en cada paso que he dado. A todos mis primos Orozco por crecer a mi lado, porque a ustedes les confiaría mi vida, por que pase lo que pase siempre están ahí. A Sara, Enid y Shalom, por volver a entrar a mi vida en cada aventura y confianza. Gracias a mi tía por acercarnos.

Abuelitos, gracias por darme una familia a quien acudir, por ese amor inigualable. Abuelitos Martha y Leandro, especialmente les agradezco a ustedes por darme la sabiduría de su generación, por ser cabezas de familia, mi familia.

A Isabel y Andrea mis mejores amigas, amigas que ni el tiempo puede alejar. Gracias por ser parte de mi vida, por permanecer, por hacerse mis hermanas, por aguantar el drama de mi crecimiento como persona y como profesionalista, les debo mucho.

Mis amigas de la Universidad (Mondra, Bañitos, Chio, Aline), mi equipo estrella, gracias por su amor, locuras y soporte en este, nuestro camino.

Iván, siempre te agradeceré tanto amor y paciencia, por tomar mi mano cada paso, por no dejarme caer. Gracias por ser mi compañero estos años, por que crecimos juntos, por recibir todo ese amor, en los buenos momentos y en los malos, comprenderme y por no rendirnos.

Luis y Dani, gracias por estar ahí en los momentos más importantes y difíciles, de decisiones y corazones rotos, gracias por su tiempo, por sus experiencias, por brindarme su amistad con los ojos cerrados.

A mis amigos del INNyN Carlos, Leonardo, y Gil; por su amistad, por su compañía, por cada momento de aprendizajes juntos, por esos momentos de camaradería inigualables.

Dr. José Bargas, porque toda su experiencia y sus conocimientos en el ámbito científico, cultural y social son de admirar, gracias por la libertad que nos da a los estudiantes para crear ciencia y expandir nuestras perspectivas.

A Esther, Mariana y Ari. Les agradezco la gran oportunidad que me dieron, tantas enseñanzas, tanta confianza, por enseñarme a amar la ciencia, por dejarme con ambiciones para seguir y buscar más en ella, en el día a día. Gracias por hacerme parte de su equipo, de su familia. Por ser mis tutoras de tesis, de vida. Gracias por contagiarme su pasión y por guiarme a cada momento.

Compañeros del laboratorio BL-103 del Instituto de Fisiología Celular, a ustedes por toda la ayuda, por ese lugar en el laboratorio. A Ernesto, por ser un gran amigo en quien puedo confiar, a quien quiero tanto. Y los disociados (incluyendo Janin) por tanta diversión dentro del set up y afuera de él.

Gracias a todos los profesores que contribuyeron a formarme, gracias por tanto conocimiento, admiro su labor.

Dra. Sandra Díaz B., quiero agradecer esa primera vez que confió en mí y me acercó a lo que hoy me llena, a la investigación, justo cuando no tenía ni idea de lo que me esperaba, esa oportunidad me encaminó hasta lo que soy ahora.

“Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero los hay que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles.”

B. Bretch.

INDICE

RESUMEN

0.0 ABREVIATURAS	1
1.0 INTRODUCCION	3
1.1 Enfermedad de Parkinson.....	4
1.2 Organización anatómica de los ganglios basales	7
1.3 Microcircuito estriatal	10
1.4 Interneuronas colinérgicas	12
1.5 Imagenología de calcio como herramienta para estudiar al microcircuito estriatal.	14
2.0 JUSTIFICACION	17
3.0 HIPOTESIS	17
4.0 OBJETIVOS	17
4.1 General	17
4.2 Particulares	18
5.0 METODOLOGIA	18
5.1 Animales	18
5.2 Genotipificación.....	19
5.3 Cirugía Estereotáxica.....	19
5.4 Evaluación del modelo parkinsoniano 6-OHDA	20
5.5 Preparación de rebanada, microscopia e imagenología de calcio	20
5.6 Análisis de la actividad neuronal	21
5.6 Electrofisiología.....	22
5.7 Análisis estadístico.....	23
6.0 RESULTADOS	24
7.0 DISCUSION	44
8.0 CONCLUSIONES	49
9.0 BIBLIOGRAFIA	50
10.0 ANEXOS	57

RESUMEN

La actividad oscilatoria y periódica es abundante en el sistema nervioso. Y las oscilaciones neuronales en el circuito cerebelo-tálamo-cortical y en los ganglios basales se exacerban en condiciones patológicas como en la Enfermedad de Parkinson. Esta aparición de oscilaciones se correlaciona específicamente con la actividad de las neuronas tónicamente activas (TAN) y una de ellas es la interneurona colinérgica. Por eso el propósito de esta investigación es saber si estas interneuronas que liberan acetilcolina en el cuerpo estriado muestran hiperactividad periódica y sincrónica cuando se ha quitado la dopamina. Que podría explicar la hipercolinergia que existe en la enfermedad de Parkinson. A través de registros de imagenología de calcio con la proteína GCamp6f para seguir la actividad de todas las neuronas del microcircuito estriatal y al mismo tiempo marcando a las interneuronas colinérgicas con la proteína tdTomato condicionada por la expresión la proteína ChAT en un ratón transgénico ChAT-Cre, y así seguir la actividad tónica de decenas de interneuronas colinérgicas en condiciones normales, usamos dos controles: uno silente y otro activado por NMDA para estudiar al microcircuito ante una entrada excitatoria, y en un modelo de lesión unilateral con 6-OHDA para quitar la DA del microcircuito estriatal. Encontramos que las interneuronas colinérgicas tienen un porcentaje mayor en la función del microcircuito estriatal que su representación anatómica. Al quitar la dopamina hay hiperactividad en las interneuronas colinérgicas, además aumenta la actividad periódica y sincrónica con respecto al control silente y activado por NMDA.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Español	Ingles
6-OHDA	6-hidroxidopamina	6-hydroxydopamine
ACh	Acetilcolina	Acetylcholine
AChE	Acetilcolinesterasa	Acetylcholinesterase.
AAV	Virus adenoasociado	Adenoassociated virus
ChAT	Colin acetiltransferasa	Choline acetyltransferase
ChI	Interneurona colinérgica	Cholinergic Interneuron
DA	Dopamina	Dopamine
dSPNs	Neuronas Espinosas de Proyección de la Vía Directa	Direct Spiny Projection Neurons
FS	Disparo rápido	Fast Spiking
GABA	Ácido γ -aminobutírico	γ -Aminobutyric acid
GCamp	Proteína GFP-Calmodulina	GFP Calmodulin Protein
GCCIs	Indicadores de Calcio Genéticamente Modificados	Genetically Codified Calcium Indicators
GPe	Globo Pálido Externo	Globus Pallidus Externus
GPI	Globo Pálido Interno	Globus Pallidus Internus
iSPNs	Neuronas Espinosas de Proyección de la Vía Indirecta	Indirect Spiny Projection Neurons
Kd	Constante de Disociación	Dissociation Constant
LDT	Núcleo Laterodorsal Tegmental	Laterodorsal Tegmental Nuclei
mAChRs	Receptores muscarínicos de acetilcolina	Muscarinic Acetylcholine Receptors

NAc	Núcleo Accumbens	Nucleus Accumbens.
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina	Nicotinic Acetylcholine Receptors
NGF	Neurogliaforme	Neurogliaform
NMDA	N-Metil D-Aspartato	N-Methyl D-Aspartate
NOS	Óxido Nítrico Sintasa	Nitric Oxide Synthase
NPY	Neuropéptido Y	Neuropeptide Y
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
PLTS	Disparo Persistente de Bajo Umbral	Persistent Low Threshold Spike
PPN	Núcleo Pedunculopontino	Pedunculopontine Nucleus
PV	Parvalbumina	Parvalbumin
MLR	Región Locomotora Mesencefálica	Mesencephalic Locomotor Region
SNC	Sustancia Nigra Compacta	Substantia Nigra Compacta
SNr	Sustancia Nigra Reticulata	Substantia Nigra Reticulata
SO	Oscilaciones Sincrónicas	Synchronus Oscillations
SOM	Somatostatina	Somatostatin
TAN	Neuronas Tónicamente Activas	Tonic Active Neurons
TH	Tirosinhidroxilasa	Tyrosine hydroxylase
VACHT	Transportador Vesicular de Acetilcolina	Vesicular Acetylcholine Transporter

1. INTRODUCCION

La generación de respuesta ante un estímulo positivo como la recompensa o negativo como alguna experiencia adversa, requiere de la función de los ganglios basales. La habilidad de adaptar el comportamiento a diferentes condiciones ambientales, es esencial para los mecanismos de adaptación y sobrevivencia (Brasted, 1999). El control y el aprendizaje motor de movimientos voluntarios y de los no intencionales se basan en patrones espaciales y temporales de contracción muscular que se inician y coordinan por diferentes estructuras subcorticales (Albin, 1995). Se integran entradas de las regiones límbicas y corticales incluyendo información sensorial y motivacional, por lo que la intención dirige la acción en condiciones no patológicas, por tanto, la pérdida de la función en estos circuitos genera desórdenes tales como la enfermedad de Parkinson, las de Huntington o la esquizofrenia (Mink, 2003).

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales responsables del control del movimiento voluntario, aprendizaje de habilidades motoras y de postura, por lo que su caracterización anatómica y funcional provee de información útil en el estudio fisiológico de estos desórdenes motores hipocinéticos e hipercinéticos (Lanciego, 2012).

A pesar de que una gran variedad de neurotransmisores que participan en los circuitos que regulan el control motor y cognitivo, existen muchas evidencias experimentales que sugieren que la acetilcolina modula la flexibilidad cognitiva (Ragozzino, 2003). El cerebro se encuentra ampliamente innervado por neuronas colinérgicas; en particular, el estriado, núcleo de entrada de los ganglios basales, contiene elevados niveles de acetilcolina, siendo su principal fuente las interneuronas colinérgicas caracterizadas por su disparo tónico (Pisani, 2011).

Las interneuronas colinérgicas inervan a las neuronas espinosas de proyección, ejerciendo una modulación a través de la activación de receptores muscarínicos que regulan corrientes iónicas dependientes de voltaje (Galarraga et al., 1999), entre las que se encuentran las corrientes persistentes de sodio (Carrillo-Reid et al., 2009),

facilitando los cambios en los patrones temporales de salida en función del entorno al que se debe responder (Prado et al., 2017).

El estriado también tiene una gran inervación dopaminérgica proveniente de la sustancia nigra, ésta aferencia es objeto de modulación colinérgica. Las terminales dopaminérgicas del circuito nigroestriatal expresan receptores M4 y nicotínicos (subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$) (Wada, 1989). A su vez, la dopamina liberada por las neuronas dopaminérgicas que llegan al estriado modula la actividad de las diversas poblaciones neuronales del estriado mediante los receptores dopaminérgicos D1, D2, D3 y D5. Las interneuronas colinérgicas expresan los receptores dopaminérgicos D2, mediante los cuales se suprime su actividad marcapaso (Deng et al. 2007) y disminuye la liberación de acetilcolina (Surmeier, 2012); y receptores D5, que aumentan su excitabilidad promoviendo la apertura de canales catiónicos no selectivos y el cierre de canales de potasio. (Deng et al. 2007).

Por todo lo anterior, entender cuál es la participación de las interneuronas colinérgicas (ChI) en el microcircuito estriatal es importante para empezar a elucidar las reglas de funcionamiento de los microcircuitos neuronales en condiciones control y patológicas, usando por ejemplo un modelo animal de la Enfermedad de Parkinson. Aquí nos preguntamos cómo está la actividad de las interneuronas colinérgicas durante la enfermedad.

1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) es neurodegenerativa, de carácter crónico y progresivo, afecta las zonas del cerebro encargadas del control y coordinación del movimiento, del tono muscular y de la postura. A nivel mundial, la enfermedad de Parkinson ocupa la segunda posición como la enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia justo después del Alzheimer (Secretaría de Salud, 2017). Su etiología es multifactorial, por lo que se considera a la enfermedad como un

producto de la suma de una gran variedad de factores como lo son la predisposición genética, el envejecimiento, y exposiciones a tóxicos ambientales.

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

A mediados del siglo XX se describió que en la enfermedad de Parkinson ocurre la pérdida pronunciada de neuronas productoras de dopamina que se localizan en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y que proyectan al estriado (Bergman et al., 1998). Se planteó como causa la acumulación de alfa-sinucleína descrita en pacientes de EP en varias áreas cerebrales (Polymeropoulos et al. 1997), debida en parte a mutaciones puntuales en los pacientes estudiados. Sin embargo, son pocos los casos que se pueden explicar por causas genéticas (Wood-Kaczmar et al, 2006). Otro signo de la EP, detectado en pacientes no medicados es la presencia de oscilaciones anormales en frecuencia beta y gamma en registros de actividad cerebral (Brown et al, 2001). Estas ráfagas oscilatorias híper-sincrónicas (SO), se observan tanto en los GB (particularmente en el STN y el GPe) (Bevan et al, 2002), como en la corteza y el tálamo (Bergman et al, 2002; Rivlin-Etzion, et al., 2006).

A consecuencia de la degeneración celular dopaminérgica, disminuye su acción inhibitoria sobre la vía indirecta de los ganglios basales, lo que genera como consecuencia una actividad subtalámica y palidal excesivas, que conlleva a una menor activación tálamo-cortical y una reducción en los movimientos tanto

espontáneos como automáticos. Esto genera acinesia o bradicinesia, rigidez, e inestabilidad postural (Nelson et al., 2014).

En la enfermedad de Parkinson la pérdida de terminales dopaminérgicas en el estriado remueve la regulación inhibitoria sobre las interneuronas colinérgicas, generando incremento en su actividad, un subsecuente re-arreglo del circuito estriatal y la aparición de síntomas motores como temblor en las extremidades (Brown, 2007). Basado en observaciones clínicas, está demostrado que los fármacos anticolinérgicos alivian el temblor (Lang, 2002) mientras que los agonistas de dopamina son efectivos para abatir los síntomas motores presentes en la enfermedad de Parkinson.

En condiciones control, el disparo tónico de las neuronas dopaminérgicas parece pausar la actividad colinérgica en el estriado, sugiriendo que las neuronas dopaminérgicas inhiben directamente el disparo de las interneuronas colinérgicas (Schulz and Reynolds, 2013). Aunque se sabe que las neuronas dopaminérgicas presentan conexiones monosinápticas con las interneuronas colinérgicas, las conexiones funcionales aun no son descritas.

Para la investigación experimental se han desarrollado y empleado una gran variedad de modelos animales descritos para estudiar la enfermedad de Parkinson. Actualmente, se dividen en dos categorías: modelos genéticos y neurotóxicos. Dentro de los modelos genéticos predominan aquellos en los que se produce la delección de genes implicados en mecanismos potenciales para el desarrollo de la enfermedad, como son los genes que expresan parkinas (*PARK2*), α -sinucleína (*PARK1/4*), la proteína PINK1 (*PARK6*) y DJ-1 (*PARK7*) principalmente. Estos modelos presentan la desventaja de que no siempre producen degeneración neuronal en los roedores y por tanto el desarrollo del fenotipo característico de la enfermedad no siempre ocurre (Bezard et al. 2011). Por ésta razón se recurre a los modelos con neurotoxinas que se inyectan en la SNc o fibras del haz medial, donde se induce neurotoxicidad de las neuronas dopaminérgicas. Los modelos más comunes son: La lesión por MPTP ($C_{12}H_{15}N$) en monos (Langston et al, 1984; 1989)

y la lesión unilateral de la SNc por 6-OHDA ($C_8H_{11}NO_3$) en ratón (Ungerstedt, 1968) y rata (Schultz et al, 1982). La 6-OHDA es un análogo hidroxilado de la dopamina que induce degeneración de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas por la alta afinidad a sus transportadores de membrana (Luthman et al. 1989). Una vez en el citosol, ésta molécula es oxidada, generando especies reactivas de oxígeno que llevan a la neurona a muerte por estrés oxidativo. Los modelos animales con neurotoxinas coinciden en síntomas y signos con los pacientes con EP, como la presencia de SO en monos tratados con MPTP (Nini et al, 1995). Esto ha permitido estudiar las oscilaciones en la actividad eléctrica de los ganglios basales, sobretodo en el STN y GPe en el modelo murino lesionado en la SNc por 6-OHDA (Bevan et al, 2002; Wichmann & DeLong, 1999). En el mismo modelo se ha reportado actividad espontanea sincronizada de las neuronas del estriado utilizando la preparación de rebanadas cerebrales mantenidas in vitro (Plata et al., 2008; Jaidar et al, 2010; Pérez-Ortega et al., 2016).

1.2 ORGANIZACIÓN ANATÓMICA DE LOS GANGLIOS BASALES

Existen cinco núcleos que conforman los ganglios basales. El núcleo estriado, los globos pálidos externo e interno, el núcleo subtalámico, y la sustancia nigra *pars* reticulata. La gran interconexión que presentan permite categorizar funcionalmente a estos núcleos de tres maneras: núcleo de entrada, núcleos de salida, y núcleos intermedios. El estriado es considerado el núcleo de entrada, recibe información principalmente la corteza, el tálamo, la sustancia nigra *pars* compacta, el tallo cerebral y el mismo GPe. El GPe y el STN constituyen los núcleos intermedios, encargados del relevo de información entre los núcleos de entrada y los de salida. Finalmente, los núcleos de salida son el GPi y la SNr, que mandan la información procesada por los ganglios basales al tálamo. Desde el tálamo ésta información regresa hacia la corteza cerebral formando el loop tálamo-cortical (Albin, 1995). Las proyecciones de los núcleos de salida también se dirigen a las capas profundas del colículo superior, el núcleo pedunculopontino (PPN), y la región locomotora mesencefálica (MLR), estructuras premotoras que están asociadas con la iniciación

y el control de movimientos locomotores, tono muscular y ajustes posturales (Le Ray et al., 2011) (ver Imagen 1)

Investigaciones dirigidas por Kemp y Powell en 1971 enfatizan que los ganglios basales y los circuitos cerebelares convergen en el tálamo y mandan señales integradas a la corteza motora. De ésta manera, describen a los ganglios basales como filtros de entrada de diversas áreas corticales. Sin embargo, este circuito de los ganglios basales y la corteza actúa de manera paralela, generando circuitos corticales y subcorticales reverberantes que modulan la salida motora (Sidelberg et al., 2015).

En el estriado, cerca del 90% son neuronas GABAérgicas denominadas espinosas de proyección (SPNs), que presentan receptores dopaminérgicos D1 o D2, sólo aproximadamente el 6% de éstas neuronas de proyección poseen los dos receptores dopaminérgicos (Matamales et al., 2009). El receptor dopaminérgico D1 se expresa selectivamente en las SPNs que dan inicio a la vía directa. Llamada así pues proyecta sin relevos a los núcleos de salida de manera monosináptica: al GPi y la SNr, ésta entrada GABAérgica reduce la inhibición tónica de estos núcleos sobre los núcleos ventral anterior y ventral lateral del tálamo, a los que proyectan. Por lo tanto, el circuito de la vía directa disminuye la inhibición sobre el loop-tálamo cortical y así facilita el movimiento (Gerfen, 1992).

Las MSNs que expresan al receptor D2 inician la vía indirecta de los ganglios basales. Estas neuronas GABAérgicas proyectan hacia el GPe que está inhibiendo tónicamente a las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico. A su vez, el núcleo subtalámico dirige sus eferencias excitadoras tónicas a los núcleos de salida GPi/SNr que inhiben tónicamente al tálamo. De modo que cuando el estriado inhibe al GPe, este deja de inhibir al núcleo subtalámico que a la vez excita a los núcleos de salida (Spann, 1991). El efecto neto de la vía indirecta es aumentar el nivel de la inhibición sobre el tálamo, al excitarse los núcleos de salida que son GABAérgicos.

De ésta manera el loop tálamo-cortical es interrumpido y no se promueve la salida motora, por lo tanto hay inhibición del movimiento (Gerfen, 1992).

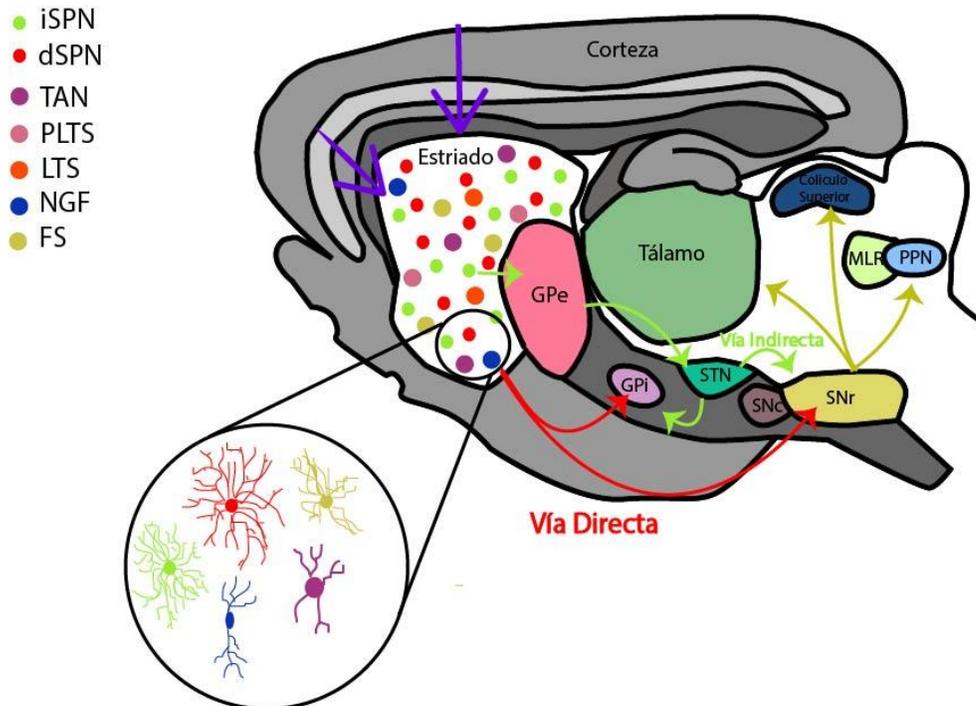


Imagen modificada de Gerfen et al, 2011.

Imágen 1. Organización funcional de los ganglios basales. Esquema de los ganglios basales en corte sagital. De acuerdo con el modelo de las dos vías, las proyecciones corticales llegan al estriado (flechas moradas), el cual envía eferencias mediante las neuronas espinosas de proyección (SPN) a los diferentes núcleos que conforman los ganglios basales, formando la vía directa (rojo) y la vía indirecta (verde). Estas dos vías proyectan a los núcleos de salida (GPI y SNr), o a núcleos intermedios (GPe) en el caso de la vía indirecta. El tálamo, el núcleo pedúnculo-pontino (PPN) y la región locomotora (MLR) reciben aferencias de los núcleos de salida. La heterogeneidad del estriado se observa ejemplificada en la imagen, ya que además de las neuronas de proyección (iSPN y dSPN), el estriado posee interneuronas GABAérgicas (FS, PLTS, NGF) y colinérgicas (TAN). Cada tipo neuronal tiene una morfología característica (ampliación esquemática).

1.3 MICROCIRCUITO ESTRIATAL

Un microcircuito neuronal se define como un conjunto mínimo de neuronas (o módulo) que interaccionan entre sí de manera funcional; es decir, presentan actividad sincrónica o generan patrones temporales y espaciales de actividad de manera espontánea o en respuesta a algún tipo de estímulo (Carrillo-Reid, 2008). En el estriado este microcircuito se conforma de las neuronas de proyección y de un pequeño grupo de interneuronas. Las interneuronas regulan dinámicamente las propiedades de los circuitos neuronales en cada una de las regiones del cerebro (Kruglikov et al., 2008). Hay una amplia diversidad de subtipos de interneuronas en el hipocampo, la corteza y el estriado.

En el estriado, un 5-7% de las células estriatales corresponden a interneuronas GABAérgicas, cuyas proyecciones locales inhibitorias tienen los tres tipos de disparo: disparo rápido (FS), persistentes de bajo umbral de disparo (PLTS), las de bajo umbral de disparo (LTS) que expresan calretinina. Las interneuronas de disparo rápido se distinguen por su expresión de parvalbúmina (PV); proteína quelante de calcio, mientras que las interneuronas persistentes de bajo umbral de disparo expresan neuropéptidos como somatostatina (SOM), neuropéptido Y (NPY), la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la enzima tirosina-hidroxilasa (TH) o el receptor 5HT3a (Munoz-Manchado et al., 2016; Tepper et al., 2010). Las células restantes son las interneuronas colinérgicas, que conforman aproximadamente de 1 al 3% de células en el cuerpo estriado, y se distinguen por su patrón de disparo tónico y la expresión de la enzima acetilcolintransferasa (ChAT) (Woolf et al., 1981)

Estas poblaciones neuronales del estriado se encuentran finamente reguladas por los neuromoduladores: dopamina, acetilcolina, serotonina, diversos neuropéptidos incluyendo a las encefalinas (Graybiel., 1990). La densa inervación de neuronas dopaminérgicas de la SNc al estriado sugiere que la modulación del microcircuito es importante para la toma de decisiones y ejecución de acciones. De éstas neuronas dopaminérgicas, es característica su actividad de disparo tipo marcapasos que provee tónicamente de dopamina al estriado (Surmeier et al., 2011). La acetilcolina reduce la probabilidad de liberación de glutamato a través de

los receptores muscarínicos de las terminales corticoestriatales presinápticas en el estriado (Higley et al., 2009); por lo tanto, un aumento en la tasa de disparo de las interneuronas colinérgicas, reduce la transmisión excitatoria sobre las SPNs (Ding et al., 2010). También modulan la actividad del circuito a través de los receptores nicotínicos que se expresan en las terminales presinápticas que llegan de la corteza (subunidad $\alpha 7$) (Campos et al., 2010), y en las terminales dopaminérgicas de la SNc (subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$) (Grady et al., 2007), regulando la liberación de dopamina.

Para conocer el resultado de la modulación de cada uno de estos neurotransmisores en el microcircuito estriatal se han realizado diversos trabajos con imagenología de calcio, técnica que permite resolución de célula única y observar el comportamiento de las neuronas que conforman el microcircuito en su conjunto. Al estudiar el microcircuito estriatal, se demostró que la actividad espontánea control de las neuronas es silente, pero que al añadir NMDA como entrada excitatoria se inducen diversos patrones de disparo en ráfaga de las neuronas parecida a la observada en vivo (Carrillo-Reid et al., 2008), mismos que se correlacionan con la ejecución de un movimiento (Grillner et al., 2006). Para estudiar la modulación colinérgica del microcircuito, se añadió muscarina, y se mostró que la activación de los receptores muscarínicos incrementa significativamente la actividad de la red neuronal, acompañada por la formación de diversos ensambles neuronales e incremento en la coactividad de las neuronas (Carrillo-Reid et al., 2009). Esta sincronización de las neuronas en los ganglios basales está correlacionada con la generación de movimientos, almacenamiento de memoria de procedimientos, y formación de hábitos (Singer et al., 2009). Por otra parte, al activar los receptores nicotínicos en el microcircuito estriatal se reduce la actividad neuronal inducida con NMDA en tejido control (Plata et al., 2013).

En ausencia de dopamina hay hiperactividad espontánea e incremento en la sincronización neuronal (Jadjar et al., 2010). Se sugiere que la hiperactividad neuronal en la enfermedad de Parkinson se debe a la elevación crónica de la acetilcolina en el estriado por la pérdida de modulación dopaminérgica de las interneuronas colinérgicas. Se ha encontrado que al activar los receptores

nicotínicos en el microcircuito estriatal parkinsoniano se reduce la actividad neuronal espontánea (Plata et al., 2013). Sin embargo, no ha sido descrita la actividad de estas interneuronas en el microcircuito estriatal, que es el propósito de este trabajo.

1.4 INTERNEURONAS COLINÉRGICAS

Las interneuronas colinérgicas están localizadas en un eje continuo que va desde los núcleos de los nervios craneales en el tronco encefálico hasta el tegmento medular, pasando de manera rostral del diencefalo al telencefalo (Kasa, 1996). Hay dos sistemas colinérgicos principales: El sistema de proyección, en el cual las neuronas colinérgicas proyectan principalmente a la corteza y al hipocampo y el sistema local en el estriado, en donde las interneuronas colinérgicas proveen de una gran inervación (Zhou, 2002). El estriado también recibe proyecciones de neuronas colinérgicas que provienen del PPN y LDT (Dautan et al., 2014).

Las interneuronas colinérgicas reciben dos entradas sinápticas principalmente: proyecciones excitatorias que provienen de la corteza y el tálamo (Bolam, 2000), mediadas por los receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA y Kainato (Calabresi et al., 1998b), y la inervación dopaminérgica proveniente de la SNc mediada por los receptores D2 y D5 que disminuyen o incrementan su excitabilidad neuronal respectivamente (Yan et al., 1997).

Las interneuronas colinérgicas son fáciles de identificar morfológicamente, ya que el diámetro del soma puede exceder 40 μm mientras que el soma de las NEMs mide de 12 a 15 μm aproximadamente (Kawaguchi, 1995). Las características electrofisiológicas incluyen disparo tónico de potenciales de acción en un rango de 3-10Hz, potencial de membrana en reposo de -72 ± 1.7 mV, resistencia de entrada (aproximadamente 242 ± 43 M Ω), prominente corriente catiónica activada por hiperpolarización (I_h), y amplia duración del potencial de acción (2.35 ± 0.135 ms) (Arias-García et al., 2017). Estas interneuronas liberan acetilcolina (ACh) como neurotransmisor, y tienen una serie de características neuroquímicas que las

distinguen y se utilizan como marcadores celulares. La acetilcolintransferasa (ChAT), enzima que cataliza la transferencia de un grupo acetil de la molécula acetil coenzima A para la biosíntesis de acetilcolina, el transportador vesicular de ACh (VAChT); y la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de la degradación de acetilcolina en acetato y colina (Butcher, 1984).

La diversidad de receptores colinérgicos expresados en el estriado localizados tanto presinápticamente como postsinápticamente, sugieren que las interneuronas colinérgicas ejercen una gran influencia en el funcionamiento estriatal (Goldberg et al., 2012). Esta gran variedad de efectos en el estriado se debe principalmente a la señalización provocada por sus dos tipos de receptores: Muscarínicos (mAChRs), y Nicotínicos (nAChRs). Los mAChRs son una subfamilia de receptores acoplados a proteínas G altamente expresados en el estriado, principalmente en las MSNs (Kreitzer, 2009). Los cinco receptores muscarínicos identificados en las neuronas colinérgicas se encuentran clasificados en dos familias basadas en las cascadas de señalización intracelular a la que están acoplados. Los receptores M1, M3, y M5 están asociados con el subtipo Gq de la subunidad α de la proteína G, y los receptores M2 y M4 están generalmente acoplados a la proteína Gi. Dentro del estriado, existe una expresión predominante de los receptores M1 y M4 localizados en las neuronas espinosas medianas.

La activación muscarínica en las SPNs reduce las corrientes de calcio del tipo N, P, y L. (Surmeier, 1995), lo que causa un cambio por hiperpolarización en el rango de voltaje que mantiene activa la corriente de potasio tipo A (Akins, 1990). De ésta manera se relaciona la pausa sincronizada que presentan las TANs en su disparo con la reducción transitoria de la activación muscarínica que aumenta la entrada de las corrientes de calcio dependientes de voltaje. La importancia de estos cambios dados por la influencia colinérgica recae en las respuestas eléctricas de las mismas SPNs, por lo que ésta evidencia sugiere que la gran variabilidad de respuesta de las neuronas de proyección en el estriado depende en gran medida de los receptores dopaminérgicos y los receptores colinérgicos (mAChRs).

Tepper y Koos en 2008 reportaron que la liberación de acetilcolina por las interneuronas colinérgicas altera la fuerza de inhibición de las interneuronas GABAérgicas de disparo rápido, ejercida sobre las SPNs pues un subtipo de nAChR media su despolarización. Esta actividad nicotínica puede alterar rápidamente la inhibición de las SPNs. Lo cual evidencia que la actividad colinérgica está modulando al microcircuito estriatal (Tepper, 2008).

En modelos de la enfermedad de Parkinson se observan alteraciones en el disparo de las interneuronas colinérgicas, sugiriendo mayor sincronización y ritmo (Raz et al., 1996) además de que su excitabilidad aumenta (Tubert et al., 2016). Los síntomas motores de ésta enfermedad correlacionan con oscilaciones exageradas en la frecuencia beta (15-30Hz) en los circuitos cortico-basales (Brown, 2007). Mediante estimulación de las interneuronas colinérgicas por optogenética y electrofisiología se mostró el aumento reversible de las oscilaciones alfa, beta y gamma en el estriado y las capas profundas de la corteza sensoriomotora. Lo que sugiere que una exacerbada actividad de éstas interneuronas podría correlacionarse con la bradicinesia y rigidez presentes en los pacientes con enfermedad de Parkinson (Kondabolu et al., 2016).

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

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

Sin embargo, existe otra forma de hacer registros de grupos de neuronas: La imagenología de calcio, técnica que permite seguir decenas de neuronas en el tiempo con resolución de célula única. Esta técnica se lleva a cabo a través de moléculas fluorescentes que al unirse al calcio libre emiten una señal, por lo tanto, permite detectar si ocurrió un cambio en la concentración de este catión dentro de

una neurona (Göbel, 2007). En reposo, la concentración de calcio intracelular en una neurona es de 50-100 nM, que puede elevarse transitoriamente de 10 hasta 100 veces durante el disparo de potenciales de acción (Berridge, 2003). Por lo tanto, un aumento en la concentración de calcio intracelular libre es indicativo de actividad neuronal. Además, con el uso de ratones transgénicos es posible registrar selectivamente poblaciones de células tanto en registros in vivo como in vitro (Göbel, 2007).

El desarrollo de moléculas fluorescentes al calcio ha sido importante para mejorar la técnica de imagenología. Primero se usaron moléculas permeables a la membrana celular como el FLUO-4AM, Calcium Orange, OregonGreen, entre otros. Pero su vida media y su permeabilidad son limitadas, de modo que, usando herramientas de biología molecular, se han desarrollado recientemente moléculas fluorescentes a calcio que son genéticamente codificadas, llamados: Indicadores de Calcio Genéticamente Codificados (GCCIs). La familia más representativa de estos GCCIs son las proteínas GCaMP, que han sido ampliamente utilizadas en experimentos de imagenología in vivo (Göbel, 2007).

Las proteínas GCaMP están conformadas por una proteína verde fluorescente (EGFP) flanqueada en un extremo por la proteína de unión a calcio; calmodulina, y por el otro extremo por el péptido de unión a calmodulina M13 (Nakai et al., 2001). En presencia de calcio, la interacción de la calmodulina con M13 provoca un cambio conformacional que permite un incremento en la fluorescencia. Aunque pertenecen a la misma familia, las proteínas GCaMP difieren en su afinidad al calcio por las variantes de las constantes de disociación (Kd). Los diferentes miembros de la familia GCaMP presentan distintas Kd provocadas por diferentes mutaciones entre el péptido M13 y la calmodulina, que hace que cambie la conformación molecular del cromóforo.

Las neuronas tienen cambios de concentración de calcio muy rápido porque los potenciales de acción suceden en milisegundos, así que seguir estos cambios depende de la Kd de cada GCCIs. GCaMP6f (Kd~375 nM) puede emitir una señal

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

Existen diferentes formas de expresar GCCIs en las neuronas. Una de ellas es la transfección viral, insertando un constructo en un vector viral, este puede infectar de manera específica un área del cerebro. Muchos vectores virales pueden ser utilizados para introducir un GCCI a la neurona de interés, pueden ser lentivirus, virus de la rabia, herpes o adenoasociados (AAV), la diferencia radica en el tamaño del genoma que va a llevar. Por ejemplo, los vectores basados en AAV están restringidos a 4.7 kb, mientras que los lentivirus pueden contener hasta 9 kb. Ambos están catalogados como virus de gran infección que presentan pocos efectos adversos (Kumar, 2001).

Ahora bien, es importante asegurar la especificidad de la infección y marcar solamente las neuronas de interés, por ésta razón se utilizan promotores específicos de cada tipo celular o estrategias como el uso del sistema Cre-Lox. Este sistema se deriva del bacteriófago P1, y es un potente sistema que permite controlar la expresión de genes de manera específica en una población neuronal. La proteína Cre recombinasa reconoce los 34 pb, la localización y orientación de los sitios loxP, que es determinante para que material genético sea expresado. (Addgene.org, 2017). En el caso de las neuronas colinérgicas, se utilizó un transgénico cuya Cre recombinasa estuviera regulada por la enzima ChAT. Este diseño experimental nos permite seguir selectivamente la actividad de las neuronas ChAT positivas marcadas con la proteína *tomato* en el estriado. Que al mismo tiempo expresan GCamp6f bajo el promotor de sinapsina. Se puede registrar en diversas condiciones: control quasi-silente, control activado con NMDA y el circuito parkinsoniano.

2.0 JUSTIFICACION

El núcleo estriado muestra una tinción densa para los marcadores colinérgicos debido a las interneuronas colinérgicas que forman parte de este microcircuito, estas modulan la excitabilidad de las neuronas de proyección a través de la activación de receptores muscarínicos que regulan corrientes iónicas dependientes de voltaje, tanto presináptica como postsinápticamente. Esto también es cierto para la actividad de las otras interneuronas. Por lo tanto, hay un efecto sobre el microcircuito, si se activan los receptores muscarínicos del estriado incrementa la sincronía entre las diferentes neuronas, mostrando picos de sincronía (Carrillo-Reid 2009). En la Enfermedad de Parkinson existe hipercolinergia (Barbeau, 1962). Al registrar el microcircuito estriatal en condición parkinsoniana las neuronas estriatales exhiben picos sincrónicos espontáneos, que no se exhiben en una condición control, y que pueden ser abolidos por la aplicación de nicotina (Plata et al., 2013). Por lo anterior, se busca evaluar la actividad de las interneuronas colinérgicas del cuerpo estriado en la dinámica del microcircuito estriatal, para empezar a entender la dinámica de la red en condiciones normales y patológicas en un modelo parkinsoniano.

3.0 HIPOTESIS

Las interneuronas colinérgicas muestran hiperactividad en el microcircuito estriatal privado de dopamina, además en ésta condición, exhiben mayor actividad periódica y sincrónica que en un microcircuito estriatal control.

4.0 OBJETIVOS

4.1 General

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

4.2 Particulares

- Identificar a las interneuronas colinérgicas mediante registros simultáneos de imagenología de calcio y electrofisiología utilizando la técnica de *patch clamp* en célula entera.
- Obtener el porcentaje de neuronas positivas a la enzima ChAT en el microcircuito estriatal para comparar la participación funcional y anatómica de estas neuronas con respecto a las neuronas identificadas como no colinérgicas, en control y en condiciones patológicas.
- Cuantificar la actividad de las neuronas ChAT positivas durante registros de imagenología de calcio en las condiciones control, NMDA y el modelo parkinsoniano, y compararla con la actividad de las neuronas tdT negativas.
- Caracterizar la actividad individual de las neuronas ChAT positivas en las tres diferentes condiciones y compararla con la actividad individual de las neuronas tdT negativas.

5.0 METODOLOGIA.

5.1 ANIMALES.

Para facilitar la localización de las neuronas colinérgicas en el estriado se utilizaron 20 ratones knock-in Acetilcolintransferasa (ChAT)-IRES-Cre de ambos sexos de 21-23 días de edad criados en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. En donde se mantuvieron bajo condiciones de aire, temperatura y humedad relativa controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h con libre acceso a comida y agua, en instalaciones que cumplen con lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5.2 GENOTIPIFICACION.

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

Las PCRs se realizaron en un termociclador iCycler Thermal (Bio-Rad), y los productos de PCR se visualizaron a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Finalmente, se obtuvo la imagen de los amplicones utilizando GelRed y un escáner digital con el sistema de adquisición Bio-Vision (Vilber-Lourmat). (Ver Anexo. Fig S.1)

5.3 CIRUGIA ESTEROTÁXICA.

Para la transfección viral y lesión con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con: clorhidrato de ketamina (85 mg/kg ip) /Xilazina (15 mg/kg ip) (ANESKET®) y fueron colocados en un aparato estereotáxico (Stoelting Co™).

Para la transfección viral se inyectaron 0.5 µL una mezcla de los vectores AAV1-Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 y AVV1.CAG.Flex.tdTomato.WPRE.bGII (1:1) (pennCore) en las coordenadas desde bregma: Anteroposterior +1 mm, ventrolateral -1.5 mm, y dorsomedial -3 mm. Después de 8 min de difusión, cada ratón se suturo, y mantuvo en el vivario con comida, calefacción y agua *ad libitum*. Para el modelo parkinsoniano se realizó una lesión unilateral derecha con 0.6 µL de 6-OHDA en la sustancia nigra pars compacta (Anteroposterior – 2.4 mm, ventrolateral -1.5 mm, y dorsomedial -4.5 mm, desde bregma). Después de 8 min de difusión, cada ratón se suturo, y mantuvo en el vivario con comida y agua *ad libitum*.

5.4 EVALUACION DEL MODELO PARKINSONIANO 6-OHDA

Para la evaluación del modelo se siguió un protocolo de conducta de giro en el que se cuentan los giros dados por el sujeto experimental lesionado 3-7 días después de la cirugía con el software RotaCount. Para la cuantificación de los giros se sujetó cada ratón a un arnés conectado al contador controlado por el software, y se administraron subcutáneamente 1ml/Kg de peso de apomorfina (concentración 0.5 mg/ml), agonista dopaminérgico no selectivo. Después de 15 minutos de la administración se realizó el conteo de los giros a 180° y 360° en ambas direcciones por 60 minutos. Se eligieron los ratones con más de 50 giros completos en dirección contra lateral a la lesión.

5.5 PREPARACION DE REBANADAS, MICROSCOPIA E IMAGENOLOGÍA DE CALCIO.

Se anestesiaron los animales con: clorhidrato de ketamina (85 mg/kg ip)/ xilazina (15 mg/kg ip) (ANESKET®). Después, se sometieron a perfusión cardiaca con 5 mL de solución de sacarosa fría (que contiene: 234 mM sacarosa; 7 mM dextrosa; 28mM NaHCO₃; 2.5mM KCl; 7mM MgCl₂; 1.44mM NaH₂PO₄ y 0.4mM CaCl₂). Posteriormente se realizó la craneotomización y extracción del cerebro. Se obtuvieron rebanadas para horizontales de 250 µm utilizando un vibratomo Tissue slicer PELCO easiSlicer®, embebidas en solución de sacarosa fría. Las rebanadas de 250 µm se transfirieron a una solución de Krebs saturada con 95% de O₂ y 5% de CO₂; pH: 7.4, osmolaridad de 300 ± 5 mOs/L (que contiene: 126 mM NaCl; 11 mM dextrosa; 26 mM NaHCO₃; 0.2mM tiourea; 0.2mM ac. ascórbico; 3 mM KCl; 1 mM MgCl₂ y 2 mM CaCl₂) donde se dejaron reposar por media hora a temperatura ambiente antes de continuar.

Las rebanadas se transfirieron a una cámara de perfusión en el escenario de un microscopio vertical equipado con un objetivo de inmersión en agua 20x (LUMPlanFI, Olympus, Center Valley, 0.50 AN). La excitación y emisión de las proteínas tdTomato y GCamp6fast se obtuvo con una $\lambda=560$ nm / 581nm y 490nm / 500nm respectivamente. Las imágenes se tomaron con una cámara digital a 6 imágenes por segundo con el software *impatch@* desarrollado en el laboratorio (www.impatch.org). El campo de observación fue de 800 x 800 μ m.

5.6. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD NEURONAL

El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo usando Image J, programas escritos en Labview o MATLAB. Las neuronas se seleccionaron manualmente identificando todos los somas fluorescentes del campo para medir su fluorescencia en función del tiempo, las señales de calcio provocadas por los potenciales de acción fueron detectadas basándose en el valor del umbral obtenido por su primera derivada en el tiempo (Figura 1). Se considera únicamente actividad, a aquellos valores de la primera derivada del transitorio de calcio que sobrepasen el umbral de 2.5 desviaciones estándar. Se obtuvieron matrices binarias C x F, donde C representa el número de células activas y F el número de imágenes en cada video, donde 1 representa actividad y 0 inactividad neuronal a un tiempo dado. Con los valores de las matrices binarias se construyeron gráficas tipo ráster siendo las células activas las filas (ordenadas) y el tiempo de su actividad las abscisas (columnas). Todos los videos registrados se examinaron manualmente con la finalidad de optimizar el análisis de cada célula individualmente y eliminar cualquier tipo de artefacto.

La probabilidad de actividad de cada célula durante cada experimento se obtuvo contando el número de cuadros activos entre el total de cuadros de cada registro. Se construyeron histogramas en donde se grafica la distribución de la probabilidad de actividad de la población total en intervalos de 0.05. Para comparar cada distribución se sumaron los eventos de ocurrencia por intervalo de probabilidad para

construir curvas de probabilidad acumulada de todos los experimentos y en cada condición.

La actividad de todas las células en cada cuadro de registro se sumó para obtener un histograma de coactividad. Para determinar significancia en la coactividad se utilizaron simulaciones de Monte Carlo en donde se ordena aleatoriamente la actividad de cada célula en el tiempo y se obtienen nuevos histogramas de coactividad (1000 simulaciones) (Aparicio-Juárez et al., 2017) Cada histograma obtenido a partir de las simulaciones se compara con el original, contando las células que estuvieron activas al mismo tiempo en cada cuadro del registro. De esta manera se obtiene un umbral de significancia al establecer el valor mínimo en el cual los datos experimentales muestran mayor probabilidad de eventos de coactividad que el 95% de los eventos de coactividad generados al azar.

Para cuantificar los picos de coactividad significativos por minuto, el número de cuadros en los que el número de células coactivas fuera mayor al umbral determinado por la prueba de Monte Carlo fue dividido por la duración total del experimento en minutos.

5.7. ELECTROFISIOLOGIA

Se empleó la técnica de célula entera con fijación de voltaje (Bargas et al., 1994). Los electrodos de registro fueron estirados a partir de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (AM Systems, Inc, Carlsborg, WA). Utilizando un Micropipette Puller Modelo p-47, Sutter instrument Co (Axon Instruments Foster City, CA). Las pipetas obtenidas se llenaron con una solución interna pH 7.2 de 275 – 285 mOsm/L que contiene: 140 mM K-gluconato, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM ácido etilen glicol-bis (alfa-aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), 5 mM NaCl, 2 mM Na₂ATP, 0.3 mM Na₃GTP, 1.5% de biocitina. Las rebanadas se superperfundieron con la solución externa

Los registros se obtuvieron con un amplificador para fijación de corriente BVC-700A (Dagan corp., Minneapolis, MN) controlado con impatch. La resistencia de los electrodos es típicamente entre 6-10 M Ω medidos en la solución extracelular.

El microcircuito estriatal se estimuló agregando 1.7 μ M NMDA en solución Krebs en la cámara de perfusión simulando una entrada excitatoria para producir actividad secuencial (Grillner, 2006, Carrillo-Reid et al 2008, Perez -Ortega et al 2016). En estas condiciones se registró la actividad del microcircuito de la misma manera que en condiciones control.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizaron las siguientes pruebas no paramétricas:

-Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas para detectar diferencias significativas de los porcentajes de neuronas activas en las condiciones de actividad espontánea e inducida con NMDA.

-Prueba de Kruskal-Wallis es un prueba no pareada utilizada para evaluar diferencias significativas tanto de los porcentajes de neuronas activas entre grupo control espontaneo y con entrada excitatoria con el grupo parkinsoniano, de la misma manera se utilizó para medir diferencias significativas de la probabilidad de formación de picos coactivos entre cada población neuronal en las diferentes condiciones.

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov es una prueba que se emplea para probar el grado de concordancia entre dos distribuciones de datos empíricos. Por esta razón, se utiliza para determinar diferencias significativas entre distribuciones de probabilidad de actividad celular en donde una $p < 0.05$ acepta la hipótesis alternativa que las muestras experimentales comparadas tienen diferente distribución.

Prueba de Chi cuadrada de bondad de Ajuste. La prueba se basa en la comparación de resultados obtenidos con los resultados esperados de dos variables independientes. El ajuste obtenido entre la frecuencia de eventos en una muestra observada y las frecuencias esperadas que se obtienen a partir de la distribución hipotética. La utilizamos para la evaluación de los histogramas de probabilidad de coactividad. Para evaluar la diferencia entre el porcentaje de neuronas ChAT (+) con periodicidad y sin periodicidad en control y el modelo de Parkinson se obtuvo el valor de Chi cuadrada y se aplicó la prueba de Fischer.

- ANOVA de una vía con pruebas Tukey *post hoc*. ANOVA de una vía evalúa si existe una diferencia significativa entre grupos de medias; presupone que existe homogeneidad de varianza. Tras encontrar una diferencia significativa, se pueden aplicar pruebas *post hoc* en la variable independiente para examinar las diferencias entre los grupos. La prueba *post hoc* de Tukey utiliza el estadístico del rango obtenido con ANOVA para realizar todas las comparaciones por pares entre los grupos. Establece la tasa de error por experimento como la tasa de error para el conjunto de todas las comparaciones por pares. Mediante estas pruebas determinamos diferencias entre las medias de picos coactivos por minuto de las tres condiciones experimentales: Control, Parkinsoniano y NMDA.

6.0 RESULTADOS

Las interneuronas colinérgicas en el estriado se pueden identificar morfológicamente por el diámetro de su soma que es aproximadamente 4 veces mayor que el de las demás neuronas existentes en este núcleo. Bajo este hecho se realizó un registro electrofisiológico de *patch clamp* (Figura 1A) en configuración de célula entera a una interneurona colinérgica que fue identificada posteriormente con inmunocitoquímica contra ChAT (Figura 1B). La célula mostró actividad tónica y corriente despolarizante activada pro pasos hiperpolarizantes de -140 pA a -10 pA con pasos de ± 20 pA, que ha sido descrito como generada por la corriente I_h (Figura 1C), corriente prominente de las interneuronas colinérgicas. Por otra parte, se

monitoreó la señal de fluorescencia simultáneamente a la señal de voltaje (Figura 1D), notando que cada vez que se produce un potencial de acción o un cambio en la frecuencias de disparo hay un incremento en la señal fluorescente a la que llamaremos transitorio de calcio. Al calcular la primera derivada del transitorio de calcio, esta corresponde a la duración de los disparos de potenciales de acción. Por lo tanto, la imagenología de calcio es una herramienta con la que es posible seguir indirectamente la actividad eléctrica de las neuronas ChAT (+)

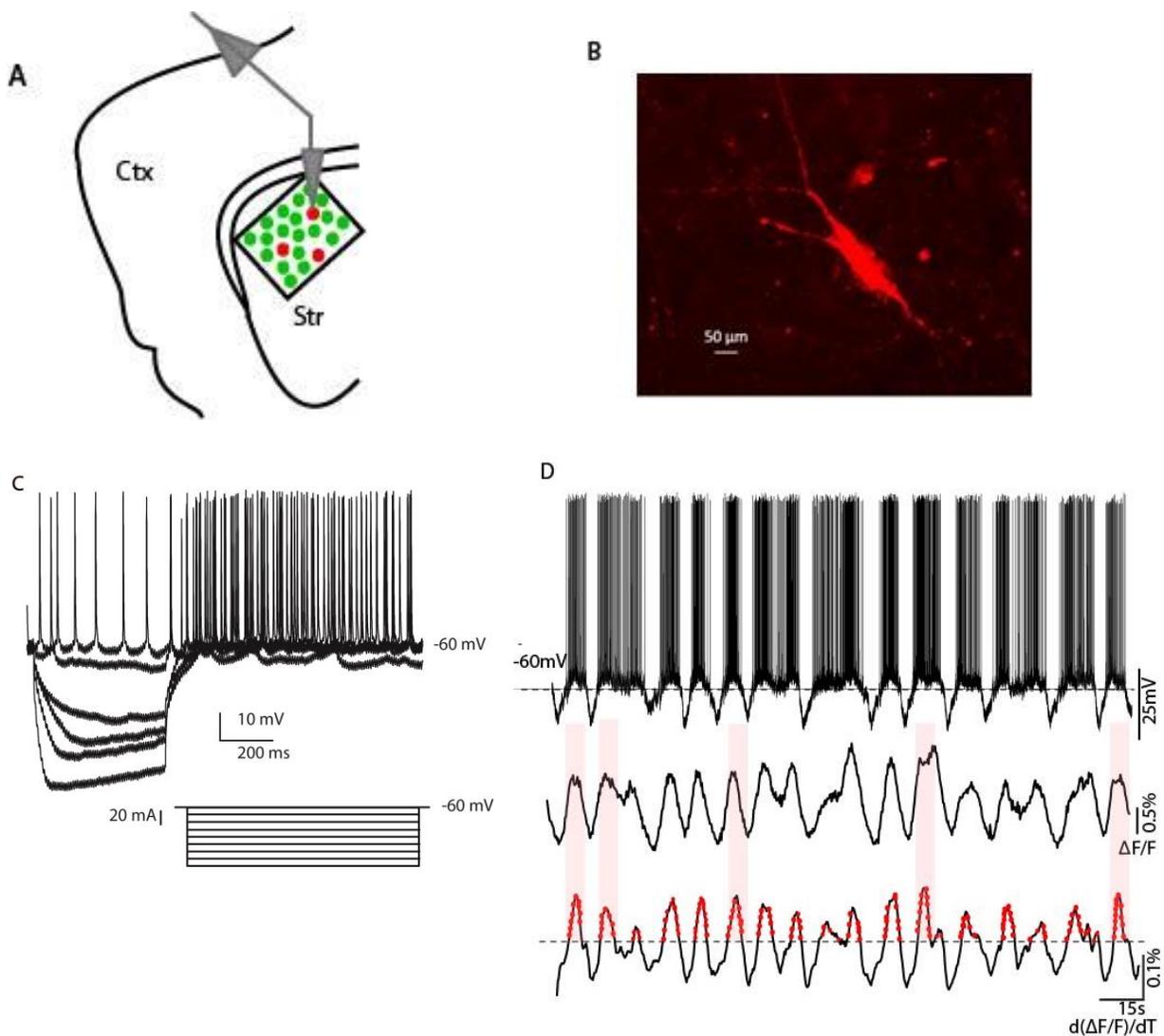


Figura 1. Identificación de interneuronas colinérgicas estriatales por imagenología de calcio y registros electrofisiológicos. (A) Esquema anatómico del estriado. El área delimitada por un cuadrado representa el área ($800 \times 800 \mu\text{m}$) donde se realizaron los registros simultáneos de imagenología de calcio y patch-clamp de célula entera. (B) Interneurona colinérgica utilizada para el ejemplo del registro simultáneo marcada con biocitina. (C) Registro de patch clamp de célula entera. Respuestas de voltaje evocadas por inyecciones hiperpolarizantes de corriente. (D) Registros simultáneos de disparo neuronal (superior), los transitorios de calcio durante el disparo neuronal ($\Delta F/F$) (al centro), y la derivada en el tiempo de los transitorios de calcio seleccionados con 2.5 desviaciones estándar (línea punteada) (inferior).

Para medir la actividad de muchas interneuronas colinérgicas al mismo tiempo, se utilizaron ratones transgénicos ChAT-Cre y el vector viral AVV1.CAG.Flex.tdTomato.WPRE.bGII, para expresar la proteína roja Td-Tomato sólo en las neuronas ChAT positivas que se observan fluoresciendo en rojo. Para medir la actividad neuronal a través de transitorios de calcio, se agregó el vector viral AAV1-Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40, cuyo promotor es la sinapsina, proteína que se encuentra en todas las neuronas, y por lo tanto todas las neuronas del estriado expresaron GCaMP6f, que es un fluoróforo de calcio genéticamente codificado que fluoresce en 560 nm (color verde), al unirse a calcio.

Con este diseño experimental fue posible seguir los transitorios de calcio de todas las neuronas del estriado que expresaron GCaMP6f en una rebanada de cerebro de ratón ChAT-Cre (Figura 2A). Para identificar los transitorios pertenecientes a las neuronas ChAT positivas se toma una imagen de las neuronas que expresan la proteína Td-Tomato en el mismo campo del estriado donde se realiza el registro de todos los transitorios de calcio. Posteriormente se superpusieron las imágenes y se identificaron las células que colocalizan Td-Tomato con GCaMP6f, mismas que son interneuronas colinérgicas (Figura 2B).

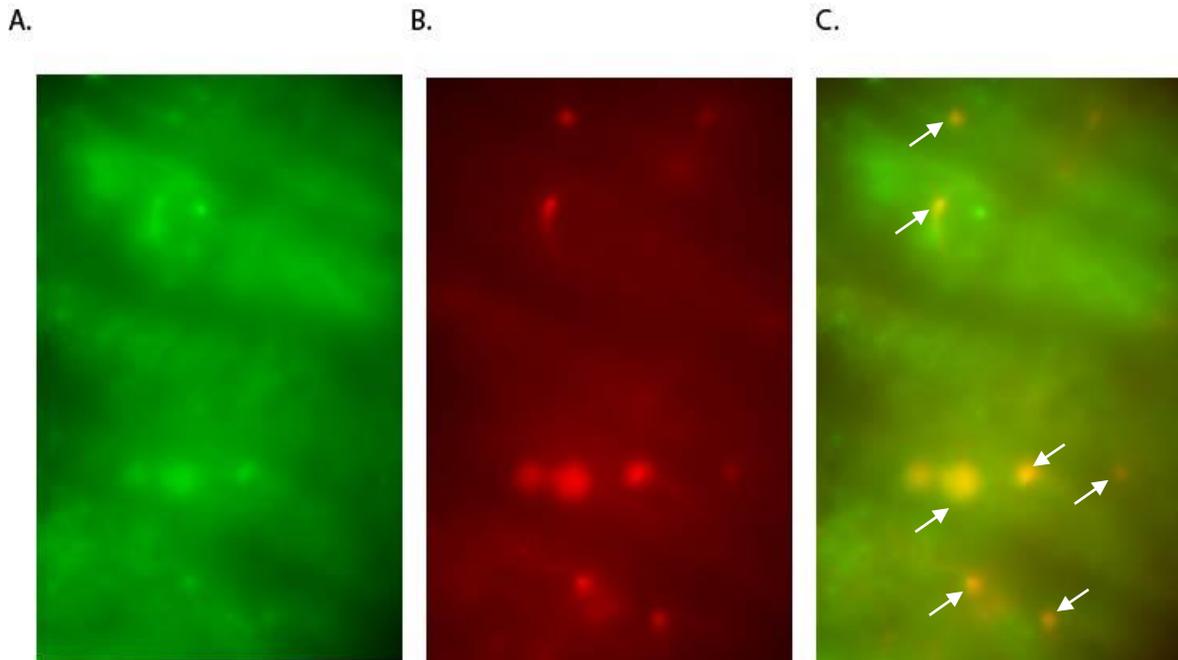
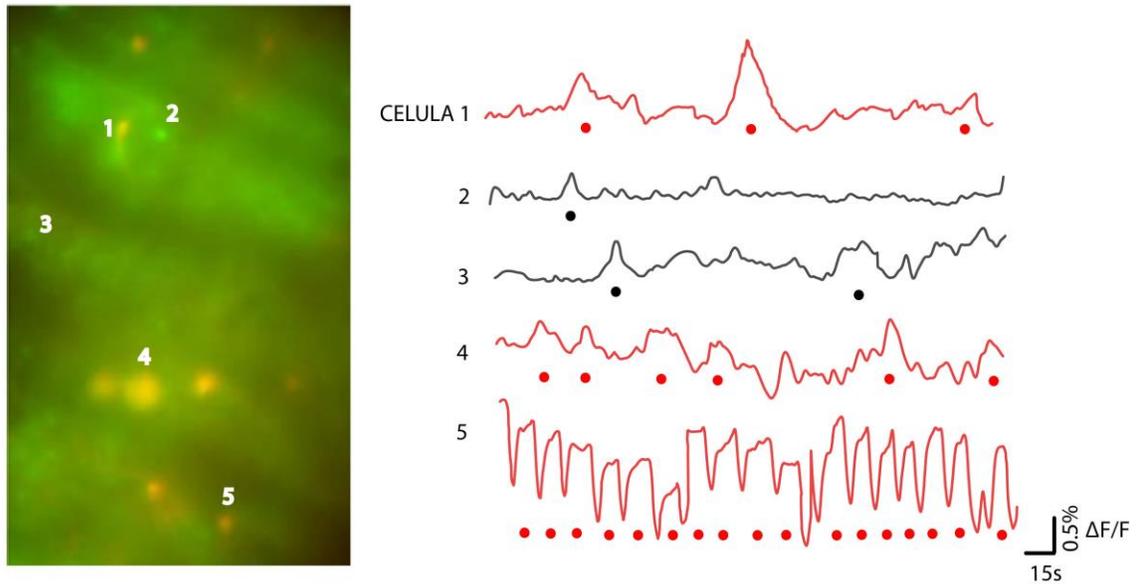


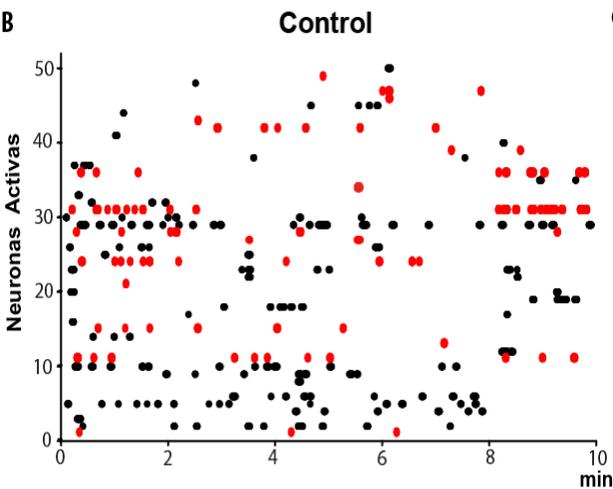
Figura. 2. Identificación de neuronas ChAT positivas mediante fluorescencia (A). Neuronas estriatales que expresan la proteína GCamp6f. Longitud de fluorescencia: 560 nm. (B) Neuronas estriatales que expresan la proteína td Tomato (ChAT positivas). Longitud de fluorescencia: 490 nm (C) Superposición de imágenes que muestra con flechas blancas las neuronas que colocalizan ambos marcadores (ChAT positivas).

Al calcular y analizar los transitorios de calcio (Figura 3A) de cada neurona en el estriado fue posible construir gráficas tipo ráster que representan la actividad neuronal registrada en el tiempo en condiciones control (Figura 3B; n=7), en el modelo parkinsoniano (Figura 3B; n=7) y de neuronas cuya actividad se indujo con NMDA como entrada excitatoria (Anexo 2; n=7). En rojo se observan las neuronas ChAT(+) y en negro el resto de las neuronas que estuvieron activas a las que llamaremos tdT(-). Las filas representan la actividad individual de cada neurona a través del tiempo donde cada punto representa el disparo de potenciales de acción. Se observa que la actividad espontánea del modelo parkinsoniano es mayor en comparación con la actividad espontánea control.

A.



B



C

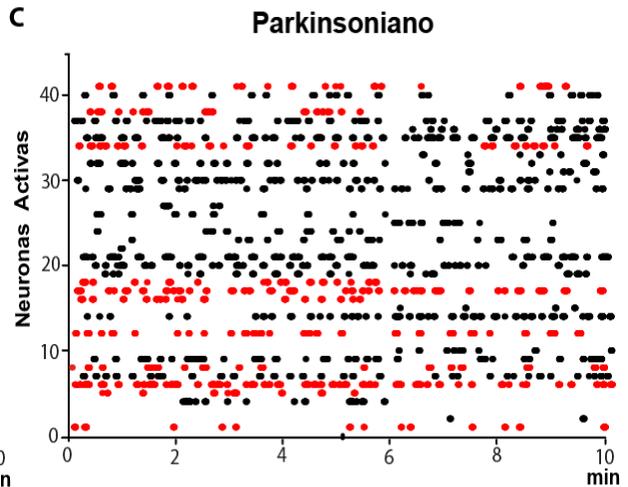


Figura 3. El microcircuito estriatal presenta diferencias en la actividad neuronal espontánea control, y la exhibida en un modelo parkinsoniano (Privado de Dopamina). (A) Neuronas ChAT positivas (colocalización en rojo) y tdT negativas (color verde) en el estriado. Del lado derecho se muestran los transitorios de calcio de cada neurona numerada. (B) Gráfica tipo ráster que representa la actividad espontánea de 50 neuronas registradas simultáneamente. (C) Gráfica tipo ráster que representa la actividad espontánea de 45 neuronas registradas simultáneamente en el modelo parkinsoniano 6OH-DA. En cada gráfica, las filas muestran la actividad individual de cada neurona en el tiempo de registro. Los colores utilizados denotan un tipo neuronal diferente, las ChAT positivas en rojo y las tdT negativas en negro.

En el estriado, usando inmunocitoquímica, el porcentaje de interneuronas colinérgicas reportado es del 1-3% (Kawaguchi et al., 1991) por esta razón nos preguntamos ¿Qué porcentaje de ChAT (+) participan en cada una de las condiciones experimentales? Para contestar esta pregunta se calculó el porcentaje de ChAT (+) que mostró actividad durante el registro, al que denominamos porcentaje funcional. La mediana del porcentaje de las neuronas activas que en la condición control son ChAT (+) es de 25 %, y para la condición parkinsoniana es de 27 %. Ya que el estriado control es casi silente, se utilizó NMDA como entrada excitatoria para comparar también las neuronas ChAT(+) en una condición control activa con . En ninguna de las tres condiciones hubo diferencia significativa bajo una prueba de Kruskal-Wallis (análisis de varianza de una vía; Figura 4).

El porcentaje funcional de las ChAT (+) fue mayor a lo reportado con inmunocitoquímica, porque tomamos en cuenta solo las neuronas activas en el microcircuito. Para incluir a todas las neuronas que expresan Gcamp6f pero no estuvieron activas durante el registro despolarizamos la preparación con KCl 0.5M al final de cada experimento. De esta forma obtuvimos un transitorio de calcio de todas las neuronas que expresaron GCamp6f que nos sirvió para calcular la proporción total de neuronas ChAT (+) activas respecto de las demás neuronas. La mediana fue de 12% para la condición control mientras que para el microcircuito parkinsoniano fue de 13%. El porcentaje total fue menor al porcentaje funcional debido a que las SPNs se mantienen silentes. En la Figura 4B se muestra las gráficas de caja de los porcentajes totales y funcionales de las neuronas ChAT (+) que para cada condición control silente y parkinsoniana, son significativamente diferentes ($P = 0.0006$; Kruskal-Wallis, análisis de varianza *post-hoc* Dunn). Porque el porcentaje total está tomando en cuenta todas las neuronas que expresan GCamp6f, y el funcional solo las que participan en los ensambles neurales.

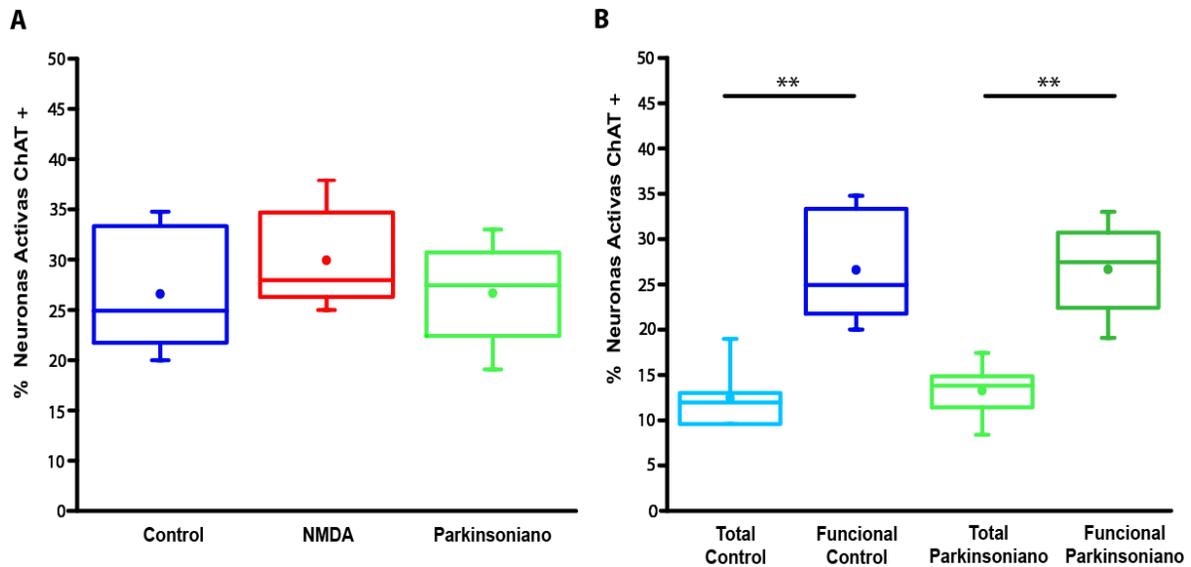


Figura 4. La participación de las neuronas colinérgicas en el microcircuito estriatal es mayor al 3% en las diferentes condiciones (A) Diagrama estadístico de caja que muestra el porcentaje de neuronas ChAT (+) que presentaron actividad durante el registro en el estriado en condiciones control, con NMDA como entrada excitatoria y en el modelo parkinsoniano ($*p < 0.05$). (B) Diagrama estadístico de caja que representa el porcentaje de neuronas ChAT (+) activas en el microcircuito funcional, y el porcentaje que toma en cuenta la población total del campo registrado ($n=7$, rebanadas de diferentes animales).

La proporción de células ChAT(+) no está cambiando en el microcircuito parkinsoniano. Sin embargo, es posible apreciar un incremento en la actividad de estas interneuronas (puntos rojos) en la condición privada de dopamina, como lo muestra el ráster parkinsoniano en la Figura 5. A la derecha de cada uno de los rústers, de las tres condiciones: control, parkinsoniano y activado con NMDA, está el histograma de la suma de la actividad de cada neurona en el tiempo. Se observa que el porcentaje máximo de cuadros activos en la condición control es del 1%, mientras que en el modelo parkinsoniano llega hasta el 5% de cuadros activos, aun mayor que la condición control activada (NMDA). Además en la condición parkinsoniana muchas de las neuronas con más actividad son ChAT (+). Esto nos indica que la actividad de la población neuronal cambia cuando el microcircuito estriatal está privado de dopamina. Este comportamiento se observó en las siete rebanadas parkinsonianas registradas.

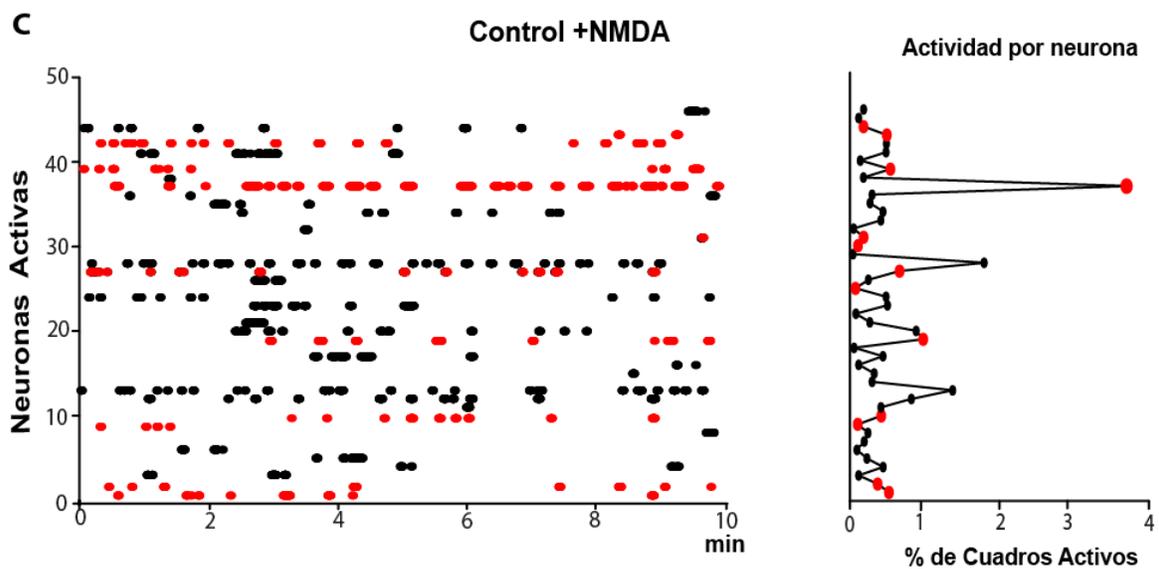
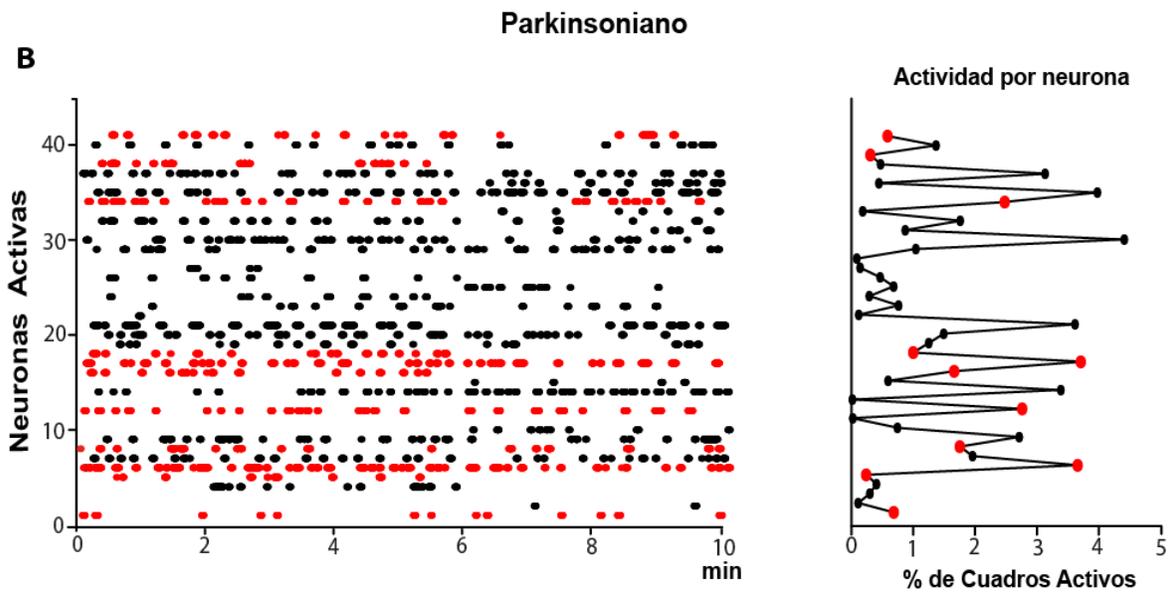
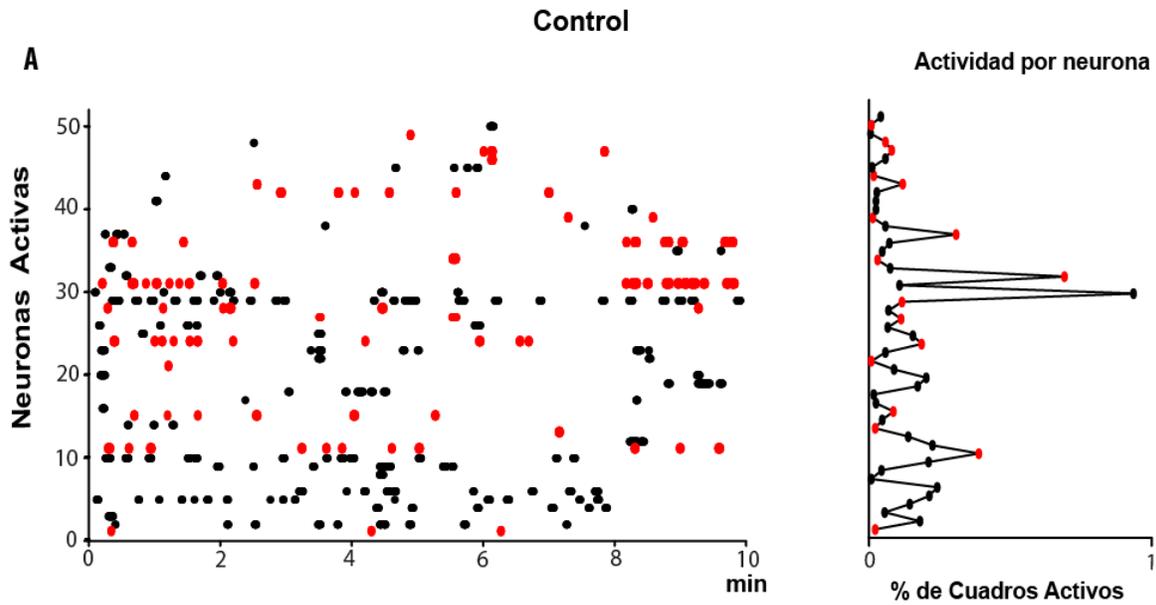


Figura 5. La actividad neuronal en el microcircuito estriatal es diferente en las tres condiciones experimentales (A) Gráfica tipo ráster que representa la actividad espontánea control de 50 neuronas registradas simultáneamente (B) Gráfica tipo ráster que representa la actividad espontánea en el modelo parkinsoniano de 45 neuronas registradas simultáneamente. (C) Gráfica tipo ráster que representa la actividad inducida con NMDA de 45 neuronas registradas simultáneamente. A la derecha de cada ráster se encuentra un histograma que representa la suma de la actividad por neurona en el tiempo de registro. Las diferentes poblaciones neuronales se representan en color rojo (ChAT positivas) y negro (tdT negativas).

Para evidenciar esta diferencia en la actividad celular, tomamos ventaja de la resolución de célula única de la imagenología de calcio y se calculó la probabilidad de actividad, que es la suma de la actividad entre el número de cuadros adquiridos. Con esto se construyen los histogramas de probabilidad de actividad en cada condición (Figura 6). La probabilidad de la actividad celular del microcircuito control es baja (<0.05 ; Figura 6A), mientras que en el microcircuito parkinsoniano encontramos una población importante de neuronas cuya probabilidad de actividad está entre 0.05 y 0.25 (Figura 6B). Cuando se activa el microcircuito control con NMDA, aumenta la probabilidad de la actividad neuronal, pero la mayoría de las células se mantienen con baja probabilidad de estar activas (< 0.05 ; Figura 6C). Al comparar las distribuciones de probabilidad de actividad de las tres condiciones, la distribución del microcircuito parkinsoniano fue significativamente diferente de la distribución con NMDA y de la del microcircuito control ($P=0.04$ y $P=0.002$; prueba Kolmogorov-Smirnov; Figura 6D). Con esto probamos que no está cambiando el porcentaje de células de la condición control y cuando privamos al microcircuito estriatal de DA. Si no que hay hiperactividad de las neuronas ChAT(+) en el modelo parkinsoniano.

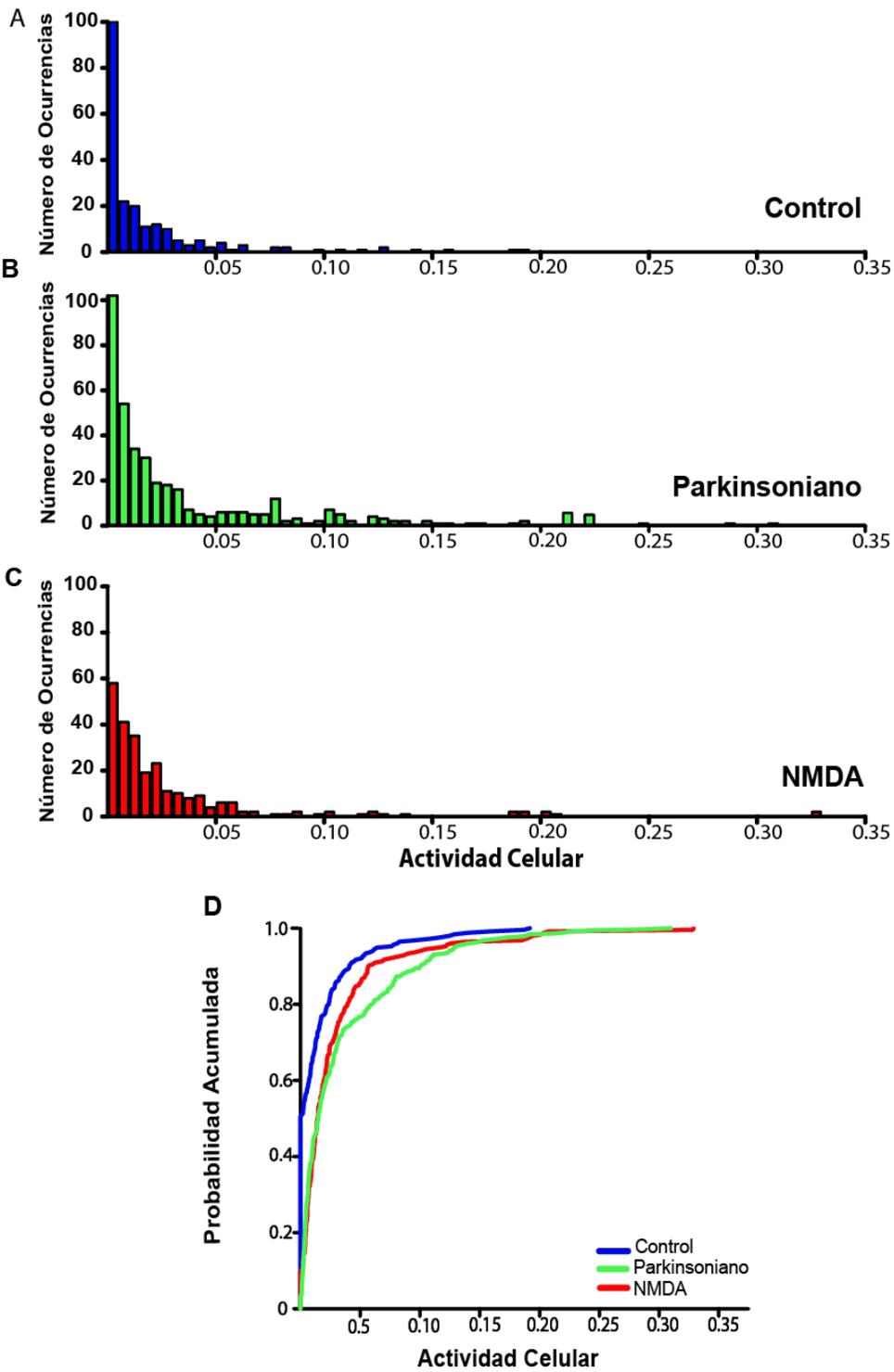


Figura 6. Probabilidad de actividad neuronal en las tres condiciones experimentales. (A) Histograma de la actividad espontánea control de toda la población neuronal, (B) Histograma de la actividad espontánea en el modelo parkinsoniano de toda la población neuronal. (C) Histograma de la actividad inducida con NMDA en tejido control de toda la población neuronal. (D) La gráfica muestra la comparación de la probabilidad acumulada de las diferentes muestras: control (azul), modelo parkinsoniano (verde) y control con NMDA (rojo) (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.005$). Esta curva muestra la suma de la distribución de actividad mostrada en cada histograma individual.

Lo siguiente por investigar es si las células que se encuentran en los intervalos de probabilidad de actividad mayores a 0.05 en la distribución de la muestra parkinsoniana corresponden en gran medida a las neuronas ChAT (+). Para confirmar esto, construimos los histogramas de probabilidad de actividad de las neuronas ChAT (+) y de las neuronas tdT(-) por separado (Figura 7). En los histogramas de probabilidad de actividad que se muestran a la izquierda de la figura 7, se observa que las interneuronas colinérgicas están aumentando su actividad cuando se privado de DA al microcircuito estriatal, porque las neuronas ChAT (+) se encuentran en intervalos de actividad mayores a 0.05, y esto no ocurre en el microcircuito estriatal control silente ni en el control activo (NMDA) (Figura 7A-C, izquierda). Por lo tanto la distribución de probabilidad de actividad de las ChAT (+) en condición Parkinsoniana es diferente de los controles, silente y activo ($P=0.001$, control; $P=0.02$ en control con NMDA; prueba Kolmogorov-Smirnov; Figura 7D, izquierda). El histograma de actividad de las neuronas tdT(-) de la condición parkinsoniana muestra como la mayoría de población neuronal sigue estando en intervalos de actividad menores a 0.05, aunque si aparecen algunas neuronas en intervalos mayores que pueden ser las otras neuronas de disparo tónico del estriado (Figura 7, derecha). Cuando se compararon las distribuciones de probabilidad de las tdT(-) parkinsonianas con las condiciones control usando la prueba Kolmogorov-Smirnov, resultó significativamente diferente del control silente ($P=0.005$) pero no del control activado por NMDA ($p=0.09$) aunque las distribuciones entre el control silente y el control activo si fue diferente del control en ambas muestras de neuronas ($P=0.03$; Figura 7D).

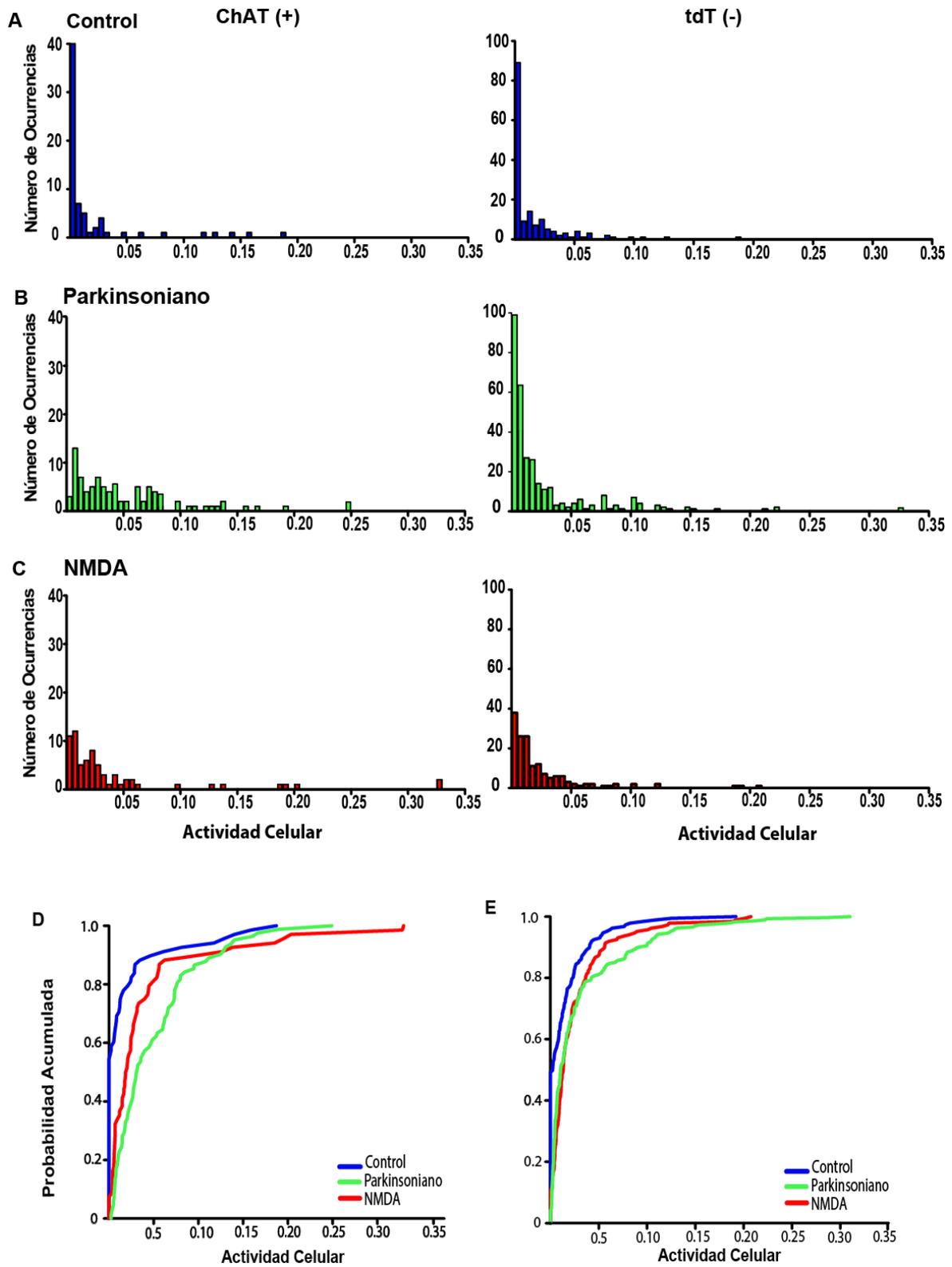


Figura 7. Probabilidad de actividad total en las tres condiciones experimentales. (A) Histograma de la actividad espontánea control. (B) Histograma de la actividad espontánea en el modelo parkinsoniano. (C) Histograma de la actividad inducida con NMDA. (D) La gráfica muestra la comparación de la probabilidad acumulada de la actividad de toda población neuronal de las muestras control (azul), modelo parkinsoniano (verde) y control con NMDA (rojo) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$). Estas curvas muestran la distribución acumulada de actividad mostrada en cada histograma individual.

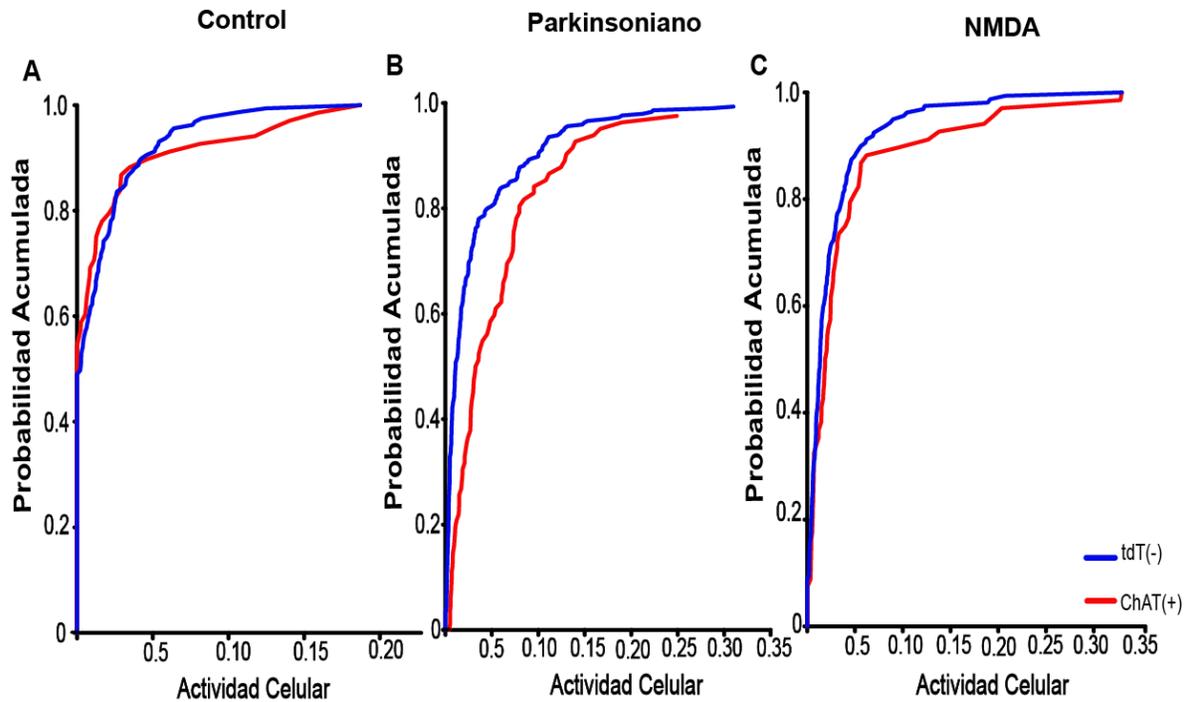


Figura 8. Comparación de las poblaciones ChAT (+) y tdT (-) en las tres condiciones experimentales. (A) Curvas de probabilidad acumulada de actividad de las neuronas ChAT(+) y tdT (-) en condición control ($P < 0.05$) (B) Curvas de probabilidad acumulada de la actividad de las neuronas ChAT(+) y tdT (-) en el modelo parkinsoniano (** $P < 0.005$). (C) Curvas de probabilidad acumulada de la actividad de las neuronas ChAT(+) y tdT (-) en presencia de NMDA (* $P < 0.05$).

Si las distribuciones de actividad de las ChAT(+) son diferentes en las tres condiciones, ahora queremos saber si el aumento de la actividad de las interneuronas colinérgicas es diferente de las otras poblaciones neuronales del estriado. Para eso comparamos la distribución de actividad la población de células ChAT(+) con la de tdT(-) por condición. Sólo en la condición parkinsoniana la actividad de las neuronas ChAT(+) son significativamente diferentes de la actividad

de las tdT (-) ($p= 0.006$, parkinsoniano; $p= 0.82$, control; $p=0.06$, NMDA; Prueba de Kolmogorov-Smirnov; Figura 8). Este resultado muestra que al quitar la dopamina del microcircuito estriatal, la actividad de las interneuronas colinérgicas está más incrementada que las otras poblaciones neurales del estriado. Sugiriendo que las ChAT(+) pueden estar dominando la actividad del estriado y posiblemente recluten otras poblaciones de neuronas. Para probar esa idea, se deben realizar otros registros donde se activen selectivamente ChAT(+) por medio del canal de rodopsina, y así probar causalidad en la activación de las diferentes poblaciones del estriado.

Datos experimentales previos describen que las neuronas de disparo tónico (TANs) son las interneuronas colinérgicas y las interneuronas GABAérgicas LTS (NPY-SOM). Ambas TANs podrían presentar actividad oscilatoria, rítmica y sincrónica en modelos Parkinsonianos de primates no humanos, dando sincronización exacerbada (patológica) en los ganglios basales (Raz et al. 1996, Bergman, 2001; 2016). Aquí mostramos que las interneuronas colinérgicas muestran hiperactividad en el microcircuito privado de dopamina. Pero nos preguntamos si dicha actividad es periódica. Para lo cual cuantificamos los intervalos entre los transitorios de calcio, es decir el número de cuadros que ocurren entre transitorio y transitorio de la misma célula, esto para todas las ChAT(+) en las tres condiciones experimentales. En la Figura 9A se graficó el número de eventos intertransitorios por segundo, se observa que en la condición control la distribución de los eventos intertransitorio es plana, es decir, la ocurrencia de los eventos se reparte a lo largo de los minutos, no muestra un tiempo preferente, por lo tanto en la condición control las neuronas ChAT(+) no tienen periodo definido. La distribución de los intervalos intertransitorio de las interneuronas colinérgicas a las que se les aplicó NMDA, si muestran varios picos de ocurrencia de los eventos intertransitorios, es decir, hay neuronas que si tienen periodos pero ninguno es dominante, la población de interneuronas ChAT (+) no tiene un patrón temporal preferente aunque si aumenta su actividad ante una entrada excitatoria. Sin embargo, la distribución de los intervalos intertransitorios de estas interneuronas en la rebanada privada de dopamina muestra claramente un pico alrededor de los 8 s, es decir, en esta condición patológica hay un

comportamiento periódico de la actividad de las interneuronas colinérgicas (Figura 9A). La distribución de probabilidad de los intertransitorios de las ChAT(+) en la condición parkinsoniana es significativamente diferente a ambos controles, silente y activo. Las distribuciones del control silente no fueron diferente del control activado por NMDA ($p= 0.001$; $p= 0.2$; Prueba de Kolmogorov-Smirnov) (Figura 9B).

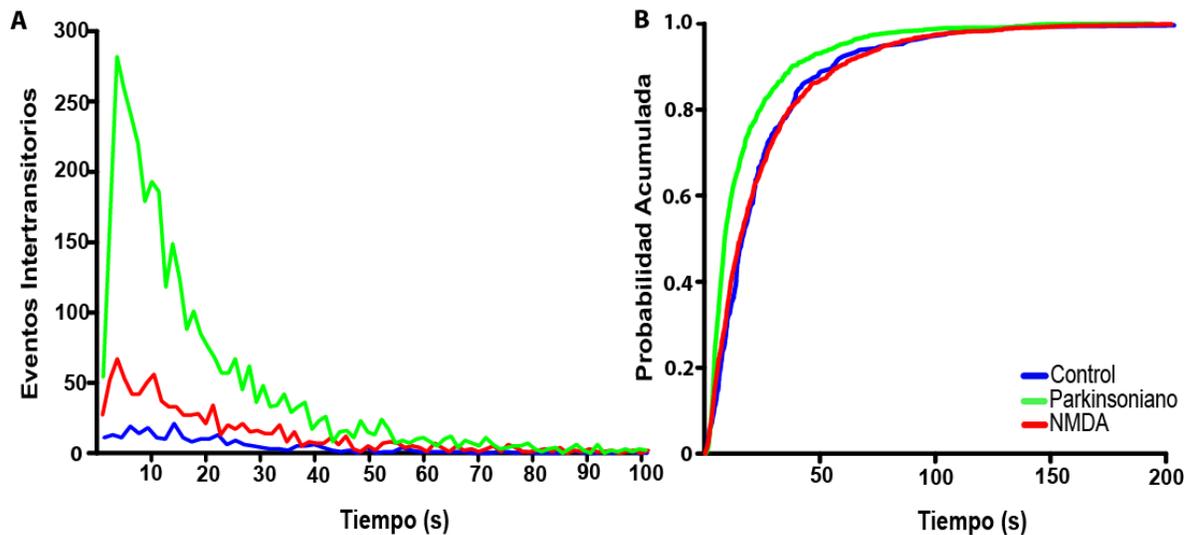


Figura 9. La actividad de las interneuronas colinérgicas presenta periodicidad. (A) Gráfica que representa la distribución de los eventos entre los transitorios de calcio. La actividad de las neuronas ChAT positivas en control, y en control + NMDA vs. el modelo 6-OHDA (azul, rojo y verde respectivamente) mostrando cuantos eventos intertransitorios se tienen respecto al tiempo de registro (segundos). (B) Curvas de probabilidad acumulada de eventos intertransitorios de las neuronas ChAT(+) en condición control espontanea, inducida con NMDA y el modelo parkinsoniano (** $P<0.001$; Control espontaneo vs. Parkinsoniano y control+NMDA vs. Parkinsoniano)

Además para cuantificar la presencia de oscilaciones en neuronas ChAT (+), se realizó el autocorrelograma de cada neurona registrada en condición control espontánea y en el modelo parkinsoniano (Figura 10). Para esto se toma la actividad de cada neurona a lo largo de todo el tiempo, se desfasa en una unidad y se multiplica por el valor original, de tal manera que si hay coincidencia en actividad hay un 1 y si no la hay, un 0, se suman todos los valores para obtener el valor de

autocorrelación. Se repite esta operación desfasando hasta 200 cuadros en ambos sentidos y se grafica el valor obtenido de la suma que es el autocorrelograma, si hay mucha actividad coincidente indica actividad periódica (Figura 10B). En la condición control hay un 80% de las interneuronas colinérgicas cuya actividad no muestra periodo y 20% son periódicas (Figura 10C). En el modelo de de la enfermedad de Parkinson disminuyó el porcentaje de neuronas sin periodo a 69%, aumentando significativamente el porcentaje de interneuronas ChAT(+) periódicas a 31% ($p=0.005$; prueba exacta de Fisher). Esto demuestra que la hiperactividad de las neuronas ChAT(+) se convierte en periódica en el microcircuito estriatal es parkinsoniano.

Autocorrelogramas neurona ChAT Positiva

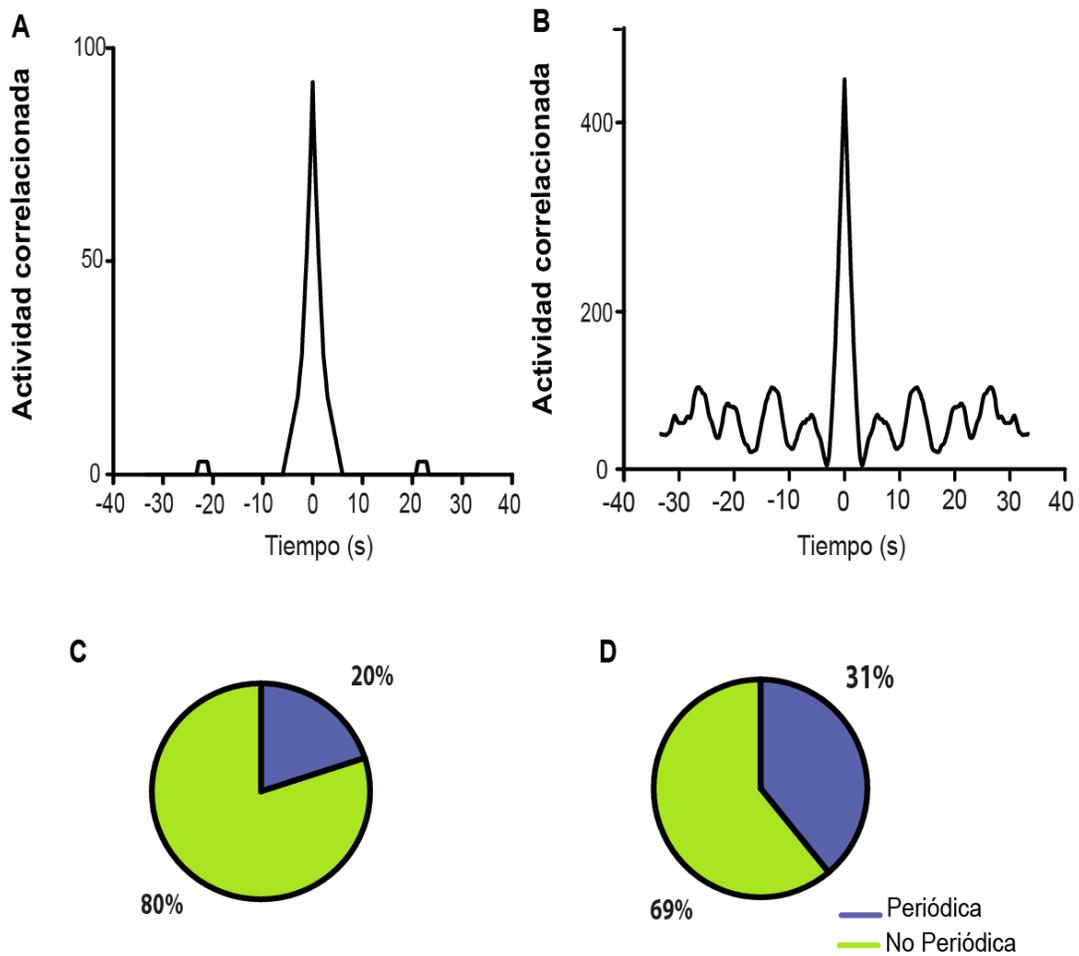


Figura 10. Autocorrelograma de una neurona ChAT positiva. Esta gráfica muestra la función de autocorrelación para revelar la periodicidad de una neurona colinérgica al empalmar su actividad durante varias ventanas de tiempo. Cada pico nos permite observar la correlación en la actividad de la neurona. (A) Autocorrelograma de neurona ChAT positiva con actividad no periódica. (B) Autocorrelograma de una neurona ChAT positiva con actividad periódica. (C) Diagrama tipo pastel donde se representa el porcentaje de neuronas ChAT positivas en control cuyo autocorrelograma mostró periodicidad (20% en azul) y el porcentaje de neuronas que no mostraron periodo en su actividad (80% en verde). (D) Diagrama tipo pastel donde se representa el porcentaje de neuronas ChAT positivas en el modelo parkinsoniano cuyo autocorrelograma mostró periodicidad (31% en azul) y el porcentaje de neuronas que no mostraron periodo en su actividad (69% en verde).

Una vez probado que la actividad periódica de las interneuronas ChAT aumenta cuando hay privación de DA nos preguntamos si la sincronía entre estas interneuronas también aumenta. Para contestar esta pregunta construimos histogramas de coactividad de las ChAT (+) (ver Métodos), en las tres condiciones, control silente, control activado con NMDA y parkinsoniano (Figura 11). Como se muestra en la figura 11B, el ráster parkinsoniano tiene más células coactivas en una ventana de tiempo, mostrando picos de coactividad. Por lo tanto para comparar las tres condiciones obtuvimos la distribución de probabilidad de los picos coactivos (Figura 12). De esta manera se sabe la probabilidad de que se sincronicen 1, 2 o 3 células en una ventana de tiempo, la ventana de tiempo utilizada fue de una imagen. Estas distribuciones de probabilidad evidencian el aumento de sincronía en el microcircuito parkinsoniano porque en la condición control silente (Figura 12A) el número máximo de células sincronizadas por cuadro es de 3 y para el control activado con NMDA es de 4 (Figura 12B). Sin embargo, en el estriado privado de la sincronía llega a ser de 7 interneuronas colinérgicas (Figura 12C, 6-OHDA). Se aprecia claramente que la probabilidad de coactividad del microcircuito parkinsoniano es mayor comenzando con 3 interneuronas coactivas. Las tres distribuciones de probabilidad de picos coactivos fueron significativamente diferentes ($p < 0.001$; $gl=6$; Chi cuadrada de bondad de ajuste). No obstante, esta cuantificación de la distribución de probabilidad de los picos coactivos incluye coincidencias temporales de neuronas que podrían deberse al azar, así que para eliminar esta posibilidad, tomamos sólo los picos de coactividad significativos según

la prueba de Montecarlo (ver métodos). La prueba de Montecarlo se hizo para cada ráster de ChAT(+) en cada condición, para quedarnos sólo con los picos significativos por minuto. En la figura 12D se muestran las medias \pm error estándar del control silente, parkinsoniano y control activo, que son significativamente diferentes ($p=0.01$; ANOVA, post-hoc Tukey). Por lo tanto concluimos que las interneuronas colinérgicas sí tienen mayor sincronía en un circuito estriatal parkinsoniano.

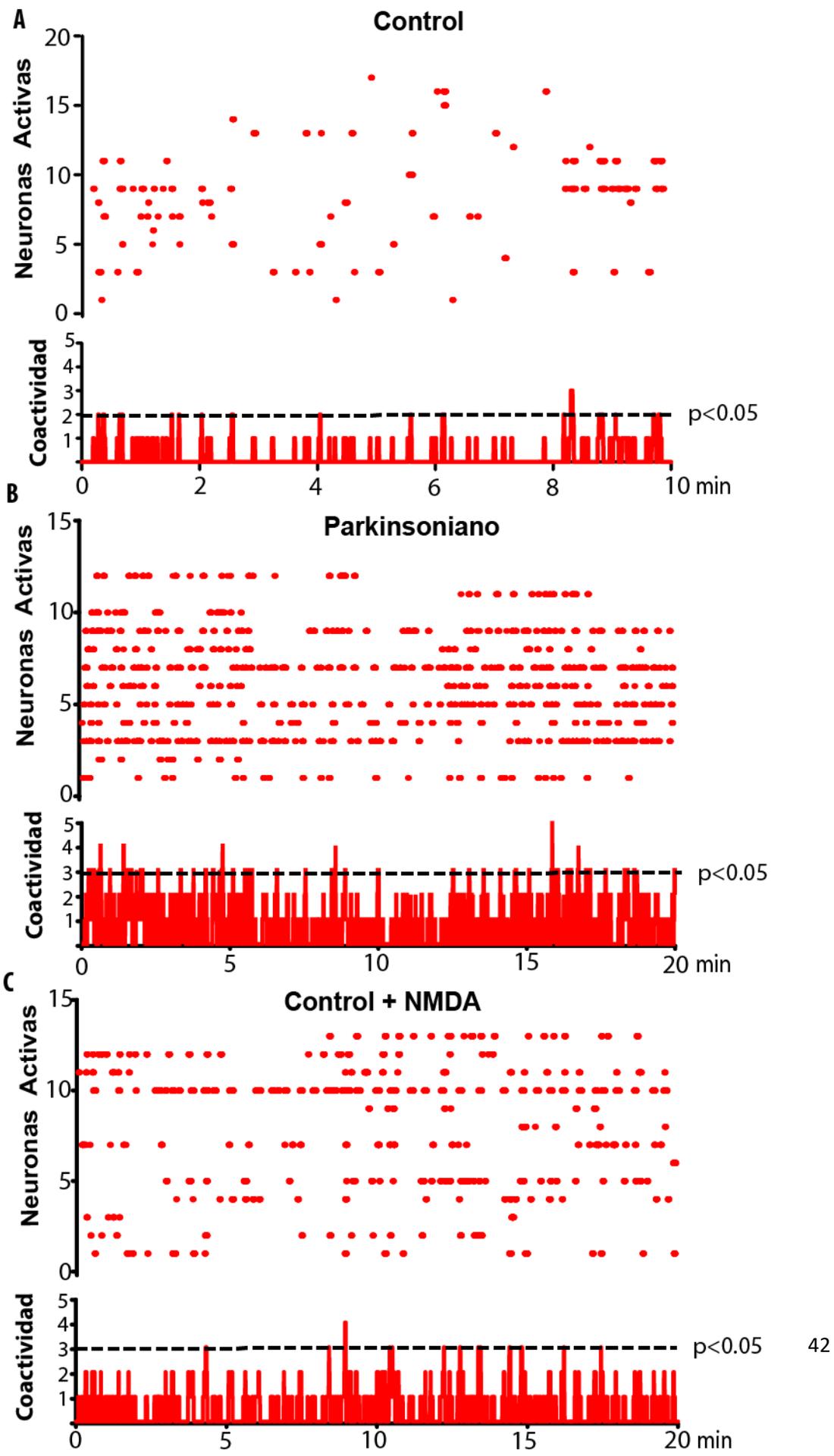


Figura 11. La actividad neuronal de las ChAT (+) en las tres condiciones experimentales. (A) Gráfica tipo ráster que representa la actividad espontánea control de 17 neuronas ChAT (+) registradas simultáneamente. (B) Gráfica tipo ráster que representa la actividad espontánea en el modelo parkinsoniano de 15 neuronas ChAT (+) registradas simultáneamente. (C) Gráfica tipo ráster que representa la actividad control inducida con NMDA de 15 neuronas ChAT (+) registradas simultáneamente. En la parte inferior de cada ráster se encuentra un histograma que representa las neuronas coactivas en cada cuadro de registro. El umbral de significancia ($p < 0.01$ Control; $p < 0.05$ NMDA y Parkinsoniano) está representado con línea punteada según la prueba de Montecarlo. Nótese que NMDA sólo tiene un pico que rebasa mientras que en el privado de DA hay 7.

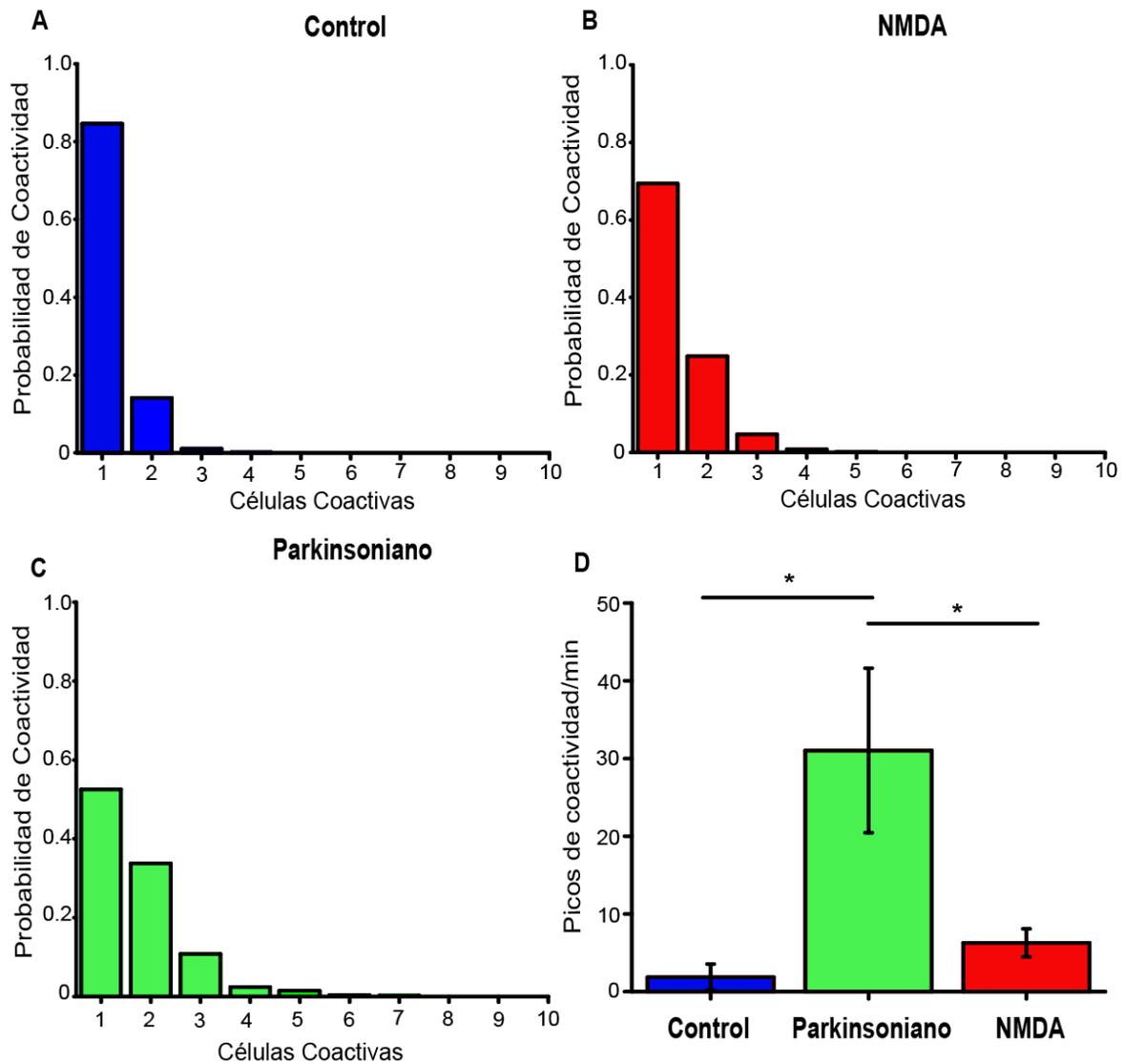


Figura 12. Las neuronas ChAT (+) muestran mayor coactividad en el modelo Parkinsoniano en comparación con el microcircuito control y el activado con NMDA (A) Histograma que representa la distribución de probabilidad de coactividad de las neuronas ChAT (+) en el microcircuito control. (B) Histograma que representa la distribución de probabilidad de coactividad de las neuronas ChAT (+) en el microcircuito activado con NMDA. (C) Histograma que representa la distribución de probabilidad de coactividad de las neuronas ChAT (+) en el microcircuito parkinsoniano. (D) Diagrama de barras de las medias \pm error estándar de los picos de coactividad por minuto de las tres condiciones experimentales. (*P=0.01).

7.0 DISCUSION

La actividad oscilatoria y periódica es abundante en el sistema nervioso (Gray, 1994). Las oscilaciones neuronales se exacerban en condiciones patológicas, como en la Enfermedad de Parkinson y es postulada como la causa del temblor en reposo y debido a las proyecciones de los núcleos de salida con el tallo cerebral (PPN), de la rigidez (Helmich et al., 2012). Sin embargo definir el sustrato neuronal que genera el temblor postural y de reposo en esta enfermedad es un problema conceptual. Muchos investigadores se han enfocado en la manipulación del fenómeno del temblor, obteniendo la habilidad de atenuarlo o modularlo por estimulación en ciertas estructuras del cerebro donde la actividad neuronal correlaciona con el temblor. Esta correlación ha sido encontrada en el circuito cerebelo-tálamo-cortical (Kondylis et al., 2016) y en el circuito STN-GPe (Plenz, Herrera-Marschitz and Kitai, 1998; Bevan, 2002). No necesariamente los únicos generadores del temblor, porque la correlación no implica causalidad. Particularmente, en el estriado no se había encontrado actividad neuronal correlacionada con el temblor a la frecuencia encontrada en los modelos animales parkinsonianos, esto es, porque las neuronas de proyección del estriado no muestran tal actividad periódica. Pero cuando se registraron neuronas de disparo tónico (TANs) se hizo evidente la actividad periódica que correlaciona con el temblor (Bergman, et al., 2016). Las TANs del estriado incluyen a dos tipos de interneuronas, una GABAérgica de tipo LTS y la otra es la interneurona colinérgica (Inokawa et al., 2010; Schulz et al., 2011; Sharott

et al., 2012). En esta tesis investigamos la participación si las interneuronas colinérgicas en el microcircuito estriatal en el modelo murino de la Enfermedad de Parkinson eran parte de las TANs que que participan en las oscilaciones que originan el temblor. Para lo cual se utilizó imagenología de calcio usando GCamp6f-Syn en ratones transgénicos ChAT-Cre, lo que permitió seguir indirectamente la actividad eléctrica de las neuronas del estriado e identificar cuál de estas señales pertenece a las interneuronas colinérgicas (Figura 2). Los transitorios de de calcio ocurren cada vez que hay disparos de potenciales de acción (Figura 1). Además, en este diseño experimental se demostró la hiperactividad que aparece cuando el microcircuito estriatal se le priva de dopamina (i.e.: se vuelve parkinsoniano; Figura 3). Lo cual coincide con lo reportado usando otros fluoróforos como FLUO 4AM (Jaidar et al., 2008; Plata et al., 2007,) y Calcium Orange (Aparicio-Juárez et al., 2017). Pero en esos trabajos no se identificaron poblaciones neuronales porque se hicieron en roedores silvestres.

Es cierto que la cantidad reportada de interneuronas en el estriado es del 5-10% y que de ese porcentaje sólo del 1-3% son interneuronas colinérgicas (Kawaguchi, 1991). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales el número de neuronas colinérgicas activas respecto de las no colinérgicas llega a ser hasta del 35% en las tres condiciones que probamos: control silente, control activado por NMDA y privado de dopamina (Figura 4A). Esto es porque no todas las neuronas estriatales participan en un ensamble neuronal al mismo tiempo (Klaus et al, 2017) sino que existe una alternancia y recurrencia de los ensambles (Carrillo-Reid et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2016) además de que aún se sigue investigando el tipo y la proporción de neuronas que participan en la dinámica de los mismos. Para incluir a todas las neuronas que pueden en un momento dado participar en el circuito pues expresan GCamp6f, al final del experimento despolarizamos la preparación con KCl. Así se evidenció a todas las neuronas potencialmente activas en el microcircuito estriatal. Al tomarlas en cuenta el porcentaje de neuronas ChAT(+) disminuyó hasta un 7 % (Figura 4B). Este porcentaje encontrado aún es mayor al reportado con inmunocitoquímica. Porque nuestra señal depende de la efectividad de transfección, que para el GCamp6f es de 84% +/- 6% (Tsai-Wen et al., 2014) y

la mayor parte de las neuronas de proyección son silentes durante largos periodos de tiempo. Lo anterior demuestra que las interneuronas colinérgicas tienen una participación relevante en la fisiología neuronal aunque anatómicamente constituyan una pequeña población. ¿Cómo es posible que un porcentaje tan pequeño de neuronas provoque hipercolinergia durante el Parkinsonismo? La importancia fisiológica de las interneuronas colinérgicas del estriado ya había sido evidenciada con la estimulación optogenética selectiva de las neuronas ChAT (+). Esta estimulación amplificó las oscilaciones beta y gama, en el estriado y se detectaron hasta en las cortezas sensoriomotoras. Es decir, la actividad de éstas interneuronas puede influenciar al circuito tálamo-cortical (Kondabulu, et al., 2016).

El porcentaje de neuronas ChAT(+) no es diferente en las tres condiciones, entonces la hiperactividad espontánea del microcircuito privado de dopamina podría deberse a un aumento en la actividad de las interneuronas colinérgicas (Figura 5 y 6), lo que explicaría la hipercolinergia en la EP (Barbeau, 1962). Al construir la distribución de probabilidad de actividad de la población neuronal en ésta condición, las interneuronas ChAT(+) son las que exhiben una cola mayor en la distribución. En ésta misma condición patológica la distribución de probabilidades de las neuronas tTd(-) también muestra algunas neuronas que exhiben una cola larga en distribución (Figura 7 y 8). Podrían ser interneuronas colinérgicas que no logran marcarse con tdT, porque la expresión de ésta proteína es también dependiente de la efectividad de la transfección 80% +/- 10% (Besser S. et al., 2015), pero podrían ser las otras neuronas de disparo tónico: LTS que expresan somatostatina-NPY, porque en el mismo modelo parkinsoniano, las corrientes postsináptica inhibitoras de las espinosas de proyección están aumentadas en presencia de somatostatina (Lopez-Huerta et al., 2008) además de que está probada una regulación mutua en los disparos de las ChAT+ y las LTS-SOM/NPY (Elghaba, et al., 2016).

Las ChAT(+) tienen tres patrones de disparo: irregular, rítmico de un sólo potencial de acción tipo marcapaso y rítmico en ráfagas (irregular = 0.5s/potencial; ráfaga= 0.31s/potencial) (Bennet and Wilson, 1999). La imagenología de calcio con GCamp6f puede resolver desde un potencial de acción, gracias a la cinética de

quelacion de calcio de ésta proteína que tiene una τ de subida de 0.04s, y una τ 1/2 de bajada de 0.1s) (Tsai-Wen et al., 2014). Por lo tanto, nuestra estrategia experimental nos permite seguir los diferentes tipos de disparo de las interneuronas colinérgicas. Esto puede observarse en el histograma de intervalos entre los transitorios de calcio (Figura 9). La ocurrencia de estos intervalos en los controles silente y activo con NMDA se distribuye en diferentes tiempos. Durante la privación de dopamina hay distribución de intervalos en diferentes tiempos pero se distingue además un pico máximo de ocurrencia de los mismos a los 8 s que no se encuentra en el histograma de intervalos de las tTd (-) (datos no mostrados). Por consiguiente, la actividad regular de las interneuronas colinérgicas está aumentando y probablemente se deba a disparos en ráfagas. Para confirmarlo será necesario hacer registros electrofisiológicos simultáneos a los de calcio. Los autorreogramas de las interneuronas colinérgicas en privación de dopamina (Figura 10), confirman que hay un aumento de la periodicidad, 11% más que el control (Youdim et al., 1997). Es posible que en un modelo crónico de la enfermedad la periodicidad de éstas interneuronas aumente ya que el temblor en los pacientes de la enfermedad de Parkinson empeora conforme avanza la enfermedad (Lang et al., 2002; Suchowersky et al., 2006). Con este resultado estamos comprobando que son las interneuronas colinérgicas las que tienen actividad periódica. Ya se sabía por registros extracelulares del disparo espontaneo que las TANs en primates tratados con MPTP exhiben tazas de disparo oscilatorio en el rango de 10-20Hz (Raz et al., 1996; Goldberg et al., 2004). Por lo que concluimos que las interneuronas ChAT (+) están contribuyendo a las oscilaciones en las que se enganchan los ganglios basales en la Enfermedad de Parkinson (Kondabolu et al., 2016). En otros núcleos de los ganglios basales como el subtálamo y la SNr, éstas oscilaciones ha sido muy evidentes pero no lo había sido para el estriado porque las neuronas espinosas de proyección no muestran actividad periódica en los modelos parkinsonianos (Daffanis, et al., 2016)

Por último, una pregunta recurrente sobre la actividad de las interneuronas colinérgicas es si las oscilaciones que presentan exhiben sincronía. Los potenciales de acción de algunas TANs, presumiblemente colinérgicas, muestran coherencia

variable con la actividad del potencial de campo de la corteza visual cuando se estimula visualmente (Schultz et al., 2011). En la condición de privación de dopamina inducida por MPTP, las TANs llegan a estar significativamente más sincronizadas con las oscilaciones presentes en la corteza y los demás ganglios basales (Goldberg et al., 2004). Nuestros resultados confirman que las interneuronas colinérgicas en el estriado están más sincronizadas entre sí cuando hay privación de dopamina (Figura 11 y 12). La causa de ésta sincronización se desconoce pero se sugiere que puede provenir de las entradas corticales, talámicas, o por la ausencia de modulación que la dopamina ejerce sobre ellas (Goldberg and Reynolds 2011). Resultados preliminares del laboratorio muestran que un agonista dopaminérgico de la clase D2, el quinolorane, disminuye la actividad de las ChATs (+) y por consiguiente la sincronización. Está bien descrito que cuando se quita la dopamina del estriado, la pausa y rebote que normalmente ocurre en las TANs ante un estímulo talámico o cortical, está abolida hasta en un 80%, y ésta pausa-rebote regresa con una terapia de reemplazamiento de dopamina con apomorfina, un agonista dopaminérgico no selectivo (Aosaki et al., 1994a). Existe entonces una fina regulación dopaminérgica sobre la interneurona colinérgica, que necesita ser restaurada antes de recibir una entrada excitatoria. Esto podría explicar porque al dar un estímulo cortical en un microcircuito estriatal sin dopamina, el ensamble hiperactivo de neuronas nunca es abolido, y es solo hasta que se aplica L-DOPA cuando el microcircuito estriatal se habilita para recibir un estímulo excitatorio proveniente de corteza (Aparicio-Juárez et al., 2017). Este trabajo muestra como al perder la inhibición dopaminérgica del disparo de las ChATs (+), la actividad de éstas interneuronas aumenta significativamente. La hiperactividad es más periódica que cuando hay tono dopaminérgico, porque parece estar cambiando el disparo de tónico a regular con ráfagas, que es lo siguiente por investigar realizando registros de potenciales de acción. También ésta hiperactividad colinérgica es sincronizada, lo que contribuye a la hiperactividad espontánea que aparece en el microcircuito estriatal parkinsoniano. Aunque si es necesario ver las otras neuronas del estriado en esta condición patológica y de forma más importante, saber sobre cómo interaccionan, pero este tema espera está fuera del alcance de ésta investigación.

8.0 CONCLUSIONES

La imagenología de calcio con GCamp6f puede seguir la actividad tónica de decenas de interneuronas colinérgicas en condiciones normales y patológicas, para llegar a la siguiente conclusión:

Las interneuronas colinérgicas tienen una mayor de participación en la función del microcircuito estriatal que su representación anatómica. Al suprimir la dopamina en el modelo 6-OHDA de parkinsonismo en el roedor, aparece hiperactividad en las interneuronas colinérgicas con actividad periódica y sincrónica aumentadas con respecto al control silente y al control activado por NMDA.

9.0 BIBLIOGRAFIA

- Addgene.org. (2017). *Addgene: Cre-lox system*. [online] Available at: <https://www.addgene.org/cre-lox/> [Accessed 6 May 2017].
- Akerboom J, Chen TW, Wardill TJ, Tian L, Marvin JS, Mutlu S, Calderón NC, Esposti F, Borghuis BG, Sun XR, Gordus A, Orger MB, Portugues R, Engert F, Macklin JJ, Filosa A, Aggarwal A, Kerr RA, Takagi R, Kracun S, et al. (2012) Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. *J Neurosci* 32:13819–13840.
- Akins(1990)
- Albin, R. (1995). The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, 18(2), pp.63-64.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, “prefrontal” and “limbic” functions. *Prog Brain Res*. 85:119–146.
- Aosaki T, Tsubokawa H, Ishida A, Watanabe K, Graybiel AM, Kimura M. (1998) Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J Neurosci* 14: 3969–3984.
- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E. and Bargas, J. (2017). Cortical stimulation relieves Parkinsonian pathological activity in vitro. *European Journal of Neuroscience*.
- Arias-García, M., Tapia, D., Laville, J., Calderón, V., Ramiro-Cortés, Y., Bargas, J. and Galarraga, E. (2017). Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Structure and Function*.
- Arroyo, S., Bennett, C. and Hestrin, S. (2014). Nicotinic modulation of cortical circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8.
- 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. *J. Neurosci*. 15, 7821–7836.
- Beiser DG, Hua SE, Houk JC. Network models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 7: 185–190, 1997
- Bennett BD, Wilson CJ (1998) The ionic origin of tonic activity in neostriatal cholinergic interneurons. *Int Bas Gang Soc Abstr* 6:51.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling:dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 4, 517–529.
- Bergman H, Feingold A, Nini A, Raz A, Slovín H, Abeles M, Vaadia E (1998) Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci* 21:32–38
- Besser, S., Sicker, M., Marx, G., Winkler, U., Eulenburg, V., Hülsmann, S. and Hirrlinger, J. (2015). A Transgenic Mouse Line Expressing the Red

Fluorescent Protein tdTomato in GABAergic Neurons. PLOS ONE, 10(6), p.e0129934.

- Bevan, M. (2002). Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus–external globus pallidus network. *Trends in Neurosciences*, 25(10), pp.525-531.
- Bezard E, Przedborski S (2011). A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord* (26), pp.993–1002
- Bolam, J., Hanley, J., Booth, P. and Bevan, M. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*, 196(4), pp.527-542.
- Brasted, P. J., Robbins, T. W., & Dunnett, S. B. (1999). Distinct roles for striatal subregions in mediating response processing revealed by focal excitotoxic lesions. *Behavioral Neuroscience*, 113, 253–264.
- Brown P (2007) Abnormal oscillatory synchronisation in the motor system leads to impaired movement. *Curr Opin Neurobiol* 17(6):656–664
- Butcher LL, Woolf NJ (1984) Histochemical distribution of acetylcholinesterase in the central nervous system: clues to the localization of cholinergic neurons. In: Björk-lund A, Hökfelt T, Kuhar MJ (eds) *Handbook of chemical neuroanatomy*, vol 3. Elsevier, Amsterdam, pp 1–50
- Campos, F., Alfonso, M. & Duran, R. (2010) In vivo modulation of alpha7 nicotinic receptors on striatal glutamate release induced by anatoxin-A. *Neurochem Int*, 56, 850-855
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (2000) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23:120–126
- Calabresi, P., Centonze, D., Pisani, A., Sancesario, G., Gubellini, P., Marfia, G. A., et al. (1998b). Striatal spiny neurons and cholinergic interneurons express differential ionotropic glutamatergic responses and vulnerability: implications for ischemia and Huntington's disease. *Ann. Neurol.* 43, 586–597.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R. and Bargas, J. (2008). Encoding Network States by Striatal Cell Assemblies. *Journal of Neurophysiology*, 99(3), pp.1435-1450.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibanez-Sandoval, O., Hernandez-Cruz, A., Galarraga, E. and Bargas, J. (2009). Activation of the Cholinergic System Endows Compositional Properties to Striatal Cell Assemblies. *Journal of Neurophysiology*, 101(2), pp.737-749.
- Carrillo-Reid, L., Hernandez-Lopez, S., Tapia, D., Galarraga, E. and Bargas, J. (2011). Dopaminergic Modulation of the Striatal Microcircuit: Receptor-Specific Configuration of Cell Assemblies. *Journal of Neuroscience*, 31(42), pp.14972-14983.
- Centonze D., Bracci E., Pisani A., Gubellini P., Bernardi G., Calabresi P. Activation of dopamine D1-like receptors excites LTS interneurons of the striatum. *European Journal of Neuroscience*. 2002;15(12):2049–2052.
- Chang, H. T. (1988). Dopamine-acetylcholine interaction in the rat striatum: a dual-labeling immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* 21, 295–304. doi: 10.1016/0361-9230(88)90244-4

- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I., Deisseroth, K., Bolam, J., Gerdjikov, T. and Mena-Segovia, J. (2014). A Major External Source of Cholinergic Innervation of the Striatum and Nucleus Accumbens Originates in the Brainstem. *Journal of Neuroscience*, 34(13), pp.4509-4518.
- Dimova R, Vuillet J, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L. Ultrastructural features of the choline acetyltransferase-containing neurons and relationships with nigral dopaminergic and cortical afferent pathways in the rat striatum. *Neuroscience*. 1993; 53:1059–1071.
- Deng P, Zhang Y, Xu ZC. 2007. Involvement of I(h) in dopamine modulation of tonic firing in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci*. 27:3148–56
- Douglas S., Vivek J, Loren L. Looger, & Karel S (2014) Engineering Fluorescent Calcium Sensor Proteins for Imaging Neural Activity. Janelia Research Campus Howard Hughes Medical Institute Ashburn, Virginia.
- Galarraga, E., Hernandez-Lopez, 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, 3629–3638
- Garcia-Munoz, M., Carrillo-Reid, L. and Arbutnott, G. (2010). Functional Anatomy: Dynamic States in Basal Ganglia Circuits. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4.
- Gerfen, C. (1992). The Neostriatal Mosaic: Multiple Levels Of Compartmental Organization In The Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 15(1), pp.285-320.
- Gerfen, C. and Surmeier, D. (2011). Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), pp.441-466.
- Goldberg, J. (2004). Spike Synchronization in the Cortex-Basal Ganglia Networks of Parkinsonian Primates Reflects Global Dynamics of the Local Field Potentials. *Journal of Neuroscience*, 24(26), pp.6003-6010.
- Goldberg, J.A., Ding, J.B., and Surmeier, D.J. (2012). Muscarinic modulation of striatal function and circuitry. *Handb. Exp. Pharmacol.* 208, 223–241
- Goldberg, J. and Reynolds, J. (2011). Spontaneous firing and evoked pauses in the tonically active cholinergic interneurons of the striatum. *Neuroscience*, 198, pp.27-43.
- Göbel W. and Helmchen F. (2007) In Vivo Calcium Imaging of Neural Network Function. *Physiology*, 22(1), pp.358-365.
- Grady, S.R., Salminen, O., Laverty, D.C., Whiteaker, P., McIntosh, J.M., Collins, A.C. & Marks, M.J. (2007) The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum. *Biochem Pharmacol*, 74, 1235-1246.
- Graybiel, A. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, 13(7), pp.244-254.
- Grillner S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52: 751–766, 2006.

- Helmich, R., Hallett, M., Deuschl, G., Toni, I. and Bloem, B. (2012). Cerebral causes and consequences of parkinsonian resting tremor: a tale of two circuits?. *Brain*, 135(11), pp.3206-3226.
- Hernández-Flores, T., Hernández-González, O., Pérez-Ramírez, M., Lara-González, E., Arias-García, M., Duhne, M., Pérez-Burgos, A., Prieto, G., Figueroa, A., Galarraga, E. and Bargas, J. (2015). Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M4-type receptors. *Neuropharmacology*, 89, pp.232-244.
- Higley, M., Gittis, A., Oldenburg, I., Balthasar, N., Seal, R., Edwards, R., Lowell, B., Kreitzer, A. and Sabatini, B. (2011). Cholinergic Interneurons Mediate Fast VGluT3-Dependent Glutamatergic Transmission in the Striatum. *PLoS ONE*, 6(4), p.e19155.
- Inokawa, H., Yamada, H., Matsumoto, N., Muranishi, M. and Kimura, M. (2010). Juxtacellular labeling of tonically active neurons and phasically active neurons in the rat striatum. *Neuroscience*, 168(2), pp.395-404.
- Kalia, L. and Lang, A. (2016). Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. *Nature Reviews Neurology*, 12(2), pp.65-66.
- Kasa, P. (1996) The cholinergic systems in brain and spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 26;2111-272.
- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13,4908–4923.
- Kemp JM, Powell TPS. The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biol Sciences.* 1971; 262:441–457.
- Klaus, A., Martins, G., Paixao, V., Zhou, P., Paninski, L. and Costa, R. (2017). The Spatiotemporal Organization of the Striatum Encodes Action Space. *Neuron*, 96(4), p.949.
- Kondabolu, K., Roberts, E., Bucklin, M., McCarthy, M., Kopell, N. and 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*, 113(22), pp.E3159-E3168.
- Kondylis, E., Randazzo, M., Alhourani, A., Lipski, W., Wozny, T., Pandya, Y., Ghuman, A., Turner, R., Crammond, D. and Richardson, R. (2016). Movement-related dynamics of cortical oscillations in Parkinson's disease and essential tremor. *Brain*, 139(8), pp.2211-2223.
- Kreitzer, A. (2009). Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), pp.127-147.
- Kruglikov I, Rudy B. Perisomatic GABA release and thalamocortical integration onto neocortical excitatory cells are regulated by neuromodulators. *Neuron.* 2008; 58:911–924.
- Kruse, A., Kobilka, B., Gautam, D., Sexton, P., Christopoulos, A. and Wess, J. (2014). Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7), pp.549-560.

- Kumar, M., Keller, B., Makalou, N., and Sutton, R.E. (2001). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 12, 1893–1905.
- Lanciego, J. (2012). Basal Ganglia Circuits: What's Now and Next?. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6.
- Lang, A.E. and Lees, A. (2002) Anticholinergic therapies in the treatment of Parkinson's disease. In: *Management of Parkinson's disease: an evidence-based review.* *Mov. Disord.* 17 (Suppl. 4), S7–S12
- Levy N, Horn D, Meilijson I, Ruppin E. Distributed synchrony in a cell assembly of spiking neurons. *Neural Networks* 14: 815–824, 2001
- Le Ray, D; Juvin, L; Ryczko, D; Dubuc, R (2011). "Chapter 4 - Supraspinal control of locomotion: the mesencephalic locomotor region". *Progress in Brain Research.* 188: 51–70.
- Lim, S., Kang, U. and McGehee, D. (2014). Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 6.
- Lopez-Huerta, V., Tecuapetla, F., Guzman, J., Bargas, J. and Galarraga, E. (2008). Presynaptic Modulation by Somatostatin in the Neostriatum. *Neurochemical Research*, 33(8), pp.1452-1458.
- Luthman J, Fredriksson A, Sundstrom E, Jonsson G, Archer T (1989). Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: Motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* 33, pp. 267–277
- Matamales, M., Bertran-Gonzalez, J., Salomon, L., Degos, B., Deniau, J., Valjent, E., Hervé, D. and Girault, J. (2009). Striatal Medium-Sized Spiny Neurons: Identification by Nuclear Staining and Study of Neuronal Subpopulations in BAC Transgenic Mice. *PLoS ONE*, 4(3), p.e4770.
- Mincses, V., Pinto, L., Dan, Y. and Chiba, A. (2017). Cholinergic shaping of neural correlations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.201621493.
- Mink JW (2003) The Basal Ganglia and involuntary movements:impaired inhibition of competing motor patterns.*Arch Neurol* 60:1365-1368.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 19, 137–141.
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A. and Bargas, J. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiology of Disease*, 91, pp.347-361.
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J., Hernández-Martinez, R., Rueda-Orozco, P., Galarraga, E., Drucker-Colín, R. and Bargas, J. (2013). Global actions of nicotine on the striatal microcircuit. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7.
- Pisani A, Bernardi G, Ding J, Surmeier DJ. Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci* 30: 545–553, 2007

- Plenz, D., Herrera-Marschitz, M. and Kitai, S. (1998). Morphological organization of the globus pallidus-subthalamic nucleus system studied in organotypic cultures. *The Journal of Comparative Neurology*, 397(4), pp.437-457.
- Polymeropoulos, M. (1997). Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*, 276(5321), pp.2045-2047.
- Ragozzino, ME (2003) Acetylcholine actions in the dorsomedial striatum support the flexible shifting of response patterns. *Neurobiol Learn Mem* 80:257–267
- Ravel, S., Legallet, E., and Apicella, P. (1999). Tonicly active neurons in the monkey striatum do not preferentially respond to appetitive stimuli. *Exp. Brain Res.* 128, 531–534.
- 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* 76:2083–2088
- 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. *Journal of Neuroscience* 21:RC128.
- Rice, M. and Cragg, S. (2004). Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nature Neuroscience*, 7(6), pp.583-584. Schulz JM, Reynolds JN. Pause and rebound: sensory control of cholinergic signaling in the striatum. *Trends Neurosci.* 2013; 36:41–50.
- Rivlin-Etzion, M., Marmor, O., Heimer, G., Raz, A., Nini, A. and Bergman, H. (2006). Basal ganglia oscillations and pathophysiology of movement disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(6), pp.629-637.
- Root DH, Mejias-Aponte CA, Zhang S, Wang HL, Hoffman AF, Lupica CR, Morales M (2014) . Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat Neurosci.* 17(11):1543-51.
- Schultz, W., O'Neill, M., Tobler, P. and Kobayashi, S. (2011). Neuronal signals for reward risk in frontal cortex. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1239(1), pp.109-117.
- Schulz, J., Oswald, M. and Reynolds, J. (2011). Visual-Induced Excitation Leads to Firing Pauses in Striatal Cholinergic Interneurons. *Journal of Neuroscience*, 31(31), pp.11133-11143.
- Schulz, J.M. & Reynolds, J.N. (2013) Pause and rebound: sensory control of cholinergic signaling in the striatum. *Trends Neurosci*, 36, 41-50.
- Sharott, A., Doig, N., Mallet, N. and Magill, P. (2012). Relationships between the Firing of Identified Striatal Interneurons and Spontaneous and Driven Cortical Activities In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 32(38), pp.13221-13236.
- Silberberg, G, Bolam, J. (2015). Local and afferent synaptic pathways in the striatal microcircuitry. *Current Opinion in Neurobiology*, 33, pp.182-187.
- Suchowersky, O., Reich, S., Perlmutter, J., Zesiewicz, T., Gronseth, G. and Weiner, W. (2006). Practice Parameter: Diagnosis and prognosis of new onset Parkinson disease (an evidence-based review): Report of the Quality

Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 66(7), pp.968-975.

- Surmeier, DJ. (1995) Muscarinic receptors modulate N-,P- and L- type Ca²⁺ currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J Neurosci* 15:458-459.
- Spann, B., Grofova, I. (1991). Nigropedunculopontine projection in the rat: An Anterograde tracing study with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *The journal of comparative Neurology*, 311(3), pp.375-388.
- Tepper, J., Wilson, C. and Koós, T. (2008). Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. *Brain Research Reviews*, 58(2), pp.272-281.
- Tepper, J., Tecuapetla, F., Koós, T. and Ibáñez-Sandoval, O. (2010). Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4.
- Tsai-Wen C, Wardill T., Yi Sun , Pulver S., Renninger S., Baohan A., Schreiter E., Kerr R., Michael B. Orger, Vivek Jayaraman, Loren L. Looger, Karel Svoboda and Douglas S. Kim. (2014) Ultra-sensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), pp. 295–300.
- Tseng KY, Vautrelle N, Carrillo-Reid L., Vargas J. (2009) *in Cortico-subcortical dynamics in Parkinson disease, Diversity of up-state voltage transitions during different network states*, ed. Tseng KY (Humana/Springer, New York), pp 73–85.
- Uhlhaas PJ, Pipa G, Lima B, Melloni L, Neuenschwander S, Nikolić D, Singer W (2009) Neural synchrony in cortical networks: history, concept and current status. *Front Integr Neurosci* 3:17
- Wada, E., Wada, K., Boulter, J., Deneris, E., Heinemann, S., Patrick, J. and Swanson, L. (1989). Distribution of alpha2, alpha3, alpha4, and beta2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: A hybridization histochemical study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 284(2), pp.314-335.
- Wess, J., Eglén, R. and Gautam, D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(9), pp.721-733.
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S. and Wood, N. (2006). Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 12(11), pp.521-528.
- Woolf, N.J., and Butcher, L.L. (1981). Cholinergic neurons in the caudate-putamen complex are intrinsically organized: a combined Evans blue and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res. Bull.* 7, 487–507.
- Yan, Z., Song, W.J., and Surmeier, J. (1997). D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J. Neurophysiol.* 77, 1003–1015.
- Youdim, M., Gassen, M., Glinka, Y., Jellinger, K. and Linert, W. (1997). Mechanism of 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity of nigra-striatal

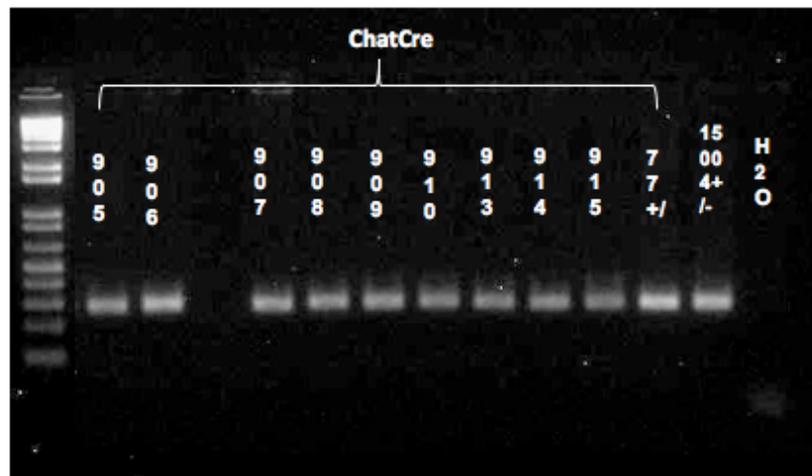
dopamine neurons. *Neuroscience Letters*, 237, pp.S53-S54. Zhou, F., Wilson, C. and Dani, J. (2002). Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *Journal of Neurobiology*, 53(4), pp.590-605.

- Zucker, R.S. (1999). Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr.Opin. Neurobiol.* 9, 305–313.

10.0 ANEXOS.

Ratones Chat, 5HTr3a con oligos para CRE1
 producto esperado: CRE1 343pb
 con Kit REDEExtract-Sigma

- 94°C- 3min
- 94°C- 0:30min
- 64°C- 0:40min
- 30X
- 72°C- 1:00min
- 72°C- 5min
- 4°C ∞



FigS.1 Genotipificación de ratones ChAT-Cre. Se realizó la extracción de DNA de la cola de cada raton utilizando el kit REDEXTRACT para la posterior amplificación con PCR y determinación de la presencia del gen de la Cre-Recombinasa. (Izq. A Der) Marcador de peso molecular DNA Ladder. Escalera de 100 pb (Rango 100 – 3000 pares de bases)