Biblioteca Digital
FCEN-UBA

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Canales Kv1.3 median la hiperexcitabilidad de las interneuronas colinérgicas estriatales en un modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson

Tubert, Cecilia

2016-09-01

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Tubert, Cecilia. (2016-09-01). Canales Kv1.3 median la hiperexcitabilidad de las interneuronas colinérgicas estriatales en un modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Tubert, Cecilia. "Canales Kv1.3 median la hiperexcitabilidad de las interneuronas colinérgicas estriatales en un modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-09-01.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Canales Kv1.3 median la hiperexcitabilidad de las interneuronas colinérgicas estriatales en un modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

CECILIA TUBERT

Director de Tesis: Dr. M Gustavo Murer

Director Asistente: Dra. Lorena Rela

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales,

Grupo de Neurociencia de Sistemas, IFIBIO "Houssay", FMED, UBA

Buenos Aires, 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Gustavo Murer y Lorena Rela por darme la posibilidad de trabajar con ellos y por enseñarme todo con infinita paciencia y buena predisposición. Me siento muy afortunada de haber tenido el placer de realizar el doctorado bajo su dirección.

Gracias a Irene Taravini y Juan Belforte, quienes siempre me ayudaron cuando necesité una mano.

Quiero agradecerles a Eleonora Katz y Francisco Urbano por todas las discusiones sobre el trabajo que ayudaron a que sea lo mejor posible.

Gracias a Gonzalo Sánchez por haber hecho los experimentos preliminares que dieron lugar a mi trabajo de tesis.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, quienes hacen que el ambiente de trabajo sea divertido e inspirador. En especial a Anita, Ceci, Ettel y Gregorio, que se convirtieron en grandes amigos con lo que da alegría trabajar.

Gracias a mi familia y amigos por su amor y apoyo incondicional todos los días.

Por último, quiero mencionar a las instituciones que hacen posible que se lleven a cabo los proyectos de investigación, como la Universidad de Buenos Aires, el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnologica.

Evaluación de la participación de Kv1.3 en la excitabilidad de las interneuronas colinérgicas estriatales en ratones control y en un modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson

RESUMEN

La acetilcolina y la dopamina son los principales moduladores de la función córticoestriatal. Desbalances en su disponibilidad pueden resultar en desórdenes neuropsiquiátricos como la enfermedad de Parkinson. La acetilcolina es liberada por las interneuronas colinérgicas estriatales (ICE), que presentan actividad tónica dependiente de mecanismos intrínsecos, y respuestas fásicas a entradas excitatorias talámicas que codifican eventos ambientales relevantes como recompensas. Un trabajo reciente demostró que las ICE se encuentran hiperactivas en un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson. Nuestro primer objetivo fue identificar las corrientes que regulan la excitabilidad de las ICE en rodajas de cerebro de ratón, utilizando la acomodación (disminución de la descarga de potenciales de acción durante una despolarización sostenida) como indicador. Encontramos que la margatoxina, así como otros bloqueantes selectivos y el *knock out* de la subunidad Kv1.3, reducen fuertemente la acomodación de las ICE y la corriente de K^+ subyacente. También encontramos que este canal regula la actividad tónica de estas neuronas, como así también la integración sináptica de inputs glutamatérgicos. Sorprendentemente, también encontramos que este canal participa de la corriente IsAHP de las ICE, descripta clásicamente como una corriente de K^+ sensible a Ca^{2+}, pero de la cual hasta el momento no se habían identificado sus componentes. Luego nos propusimos evaluar si cambios en los canales que contienen la subunidad Kv1.3 contribuyen generar las alteraciones de excitabilidad que se observan en ICE de ratones modelo de la enfermedad de Parkinson. Observamos que, al igual que en ratas, las ICE tienen una excitabilidad aumentada en ratones modelos de la enfermedad de Parkinson, la cual es insensible a la margatoxina. También encontramos que las ICE de los ratones parkinsonianos poseen una integración sináptica aumentada y que las corrientes sensibles a margatoxina son de menor amplitud. En conjunto, nuestros resultados revelan un rol importante de los canales que contienen la subunidad Kv1.3 en la excitabilidad de las ICE, en la regulación de su actividad tónica y en la integración de señales externas. En animales modelo de la enfermedad de Parkinson la función de estos canales estaría alterada, contribuyendo a su fenotipo hiperexcitable. Estos resultados nos permiten pensar en los canales Kv1.3 como un potencial nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Palabras clave: Interneuronas colinérgicas estriatales; excitabilidad, IsAHP, Parkinson, Kv1.3.

Kv1.3 channels mediate the hyperexcitability of striatal cholinergic interneurons in a mouse model of Parkinson's disease

ABSTRACT

Acetylcholine (ACh) and dopamine are the main modulators of corticostriatal function. Disbalances in their availability may result in neuropsychiatric disorders like Parkinson´s disease (PD). ACh is released by striatal cholinergic interneurons (SCINs), which present tonic activity that depends on intrinsic mechanisms, and phasic responses to excitatory thalamic inputs that codify salient stimuli like rewards. Recent work showed hyperactive SCINs in a rat model of PD. Here our first aim was to identify currents that regulate SCINs excitability in mouse brain slices, using accommodation (reduction of firing during a sustained depolarization) as an index of excitability. Our results show that margatoxin, as well as other selective blockers and the knock-out of Kv1.3 subunit, reduce accommodation and the underlying K^+ current in SCINs. We also found that this channel regulates tonic activity and integration of glutamateric inputs in SCINs. Surprisingly, we also found that in SCINs this channel contributes to the IsAHP current, which so far is described as a Ca^{2+} dependent K^+ current whose molecular correlates have not been identified. We then decided to evaluate if changes in the kv1.3 current contribute to alterations observed in SCINs excitability in a mouse model of PD. As it is the case in rats, SCINs become hyperactive after chronic nigrostrital degeneration in the mouse. Importantly, hiperexcitable SCINs are insensitive to margatoxin in the mouse PD model. Moreover, SCINs of parkinsonian mice have an increased synaptic integration and smaller margatoxin sensitive currents compared to sham mice SCINs. Altogether, our results reveal an important role of channels containing Kv1.3 subunit in SCINs excitability, in the regulation of their tonic activity and in their synaptic integration of external signals. In PD the function of these channels might be altered, contributing to their hyperexcitable phenotype. These results let as nominate Kv1.3 channels as potential new target of antiparkinsonian therapy.

Key words: Striatal cholinergic interneurons; excitability; IsAHP; Parkinson's disease; Kv1.3.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 7

I.1. Ganglios de la base 8

I.1.1. Circuito general 8

I.1.2. Función de los ganglios de la base y regulación por dopamina 11

I.2. Interneuronas colinérgicas estriatales 13

I.2.1. Generalidades 13

I.2.2. Actividad espontánea y excitabilidad 15

I.2.3. Respuesta a aferencias sinápticas 20

I.2.4. Respuesta de pausa 21

I.2.5. Efecto de la ACh en el circuito estriatal 26

I.3. Canales de K^+ 28

I.4. Enfermedad de Parkinson 31

I.4.1. Descripción general de la enfermedad y su tratamiento 31

I.4.2. Alteraciones circuitales que siguen a la degeneración dopaminérgica 35

I.4.3. Modelos animales de la enfermedad de Parkinson 38

I.4.4. Interneuronas colinérgicas en la enfermedad de Parkinson 40

OBJETIVOS E HIPÓTESIS 44

MATERIALES Y MÉTODOS 47

M.1. Animales 48

M.2. Cirugía estereotáxica 49

M.2.1. Inyección de vector lentiviral con ChR2-YFP 49

M.2.2. Lesión dopaminérgica 49

M.3. Ensayos conductuales 51

M.4. Electrofisiología 52

M.4.1. Obtención de tejido *ex vivo* para registros electrofisiológicos 52

M.4.2. Registros electrofisiológicos 52

M.4.3. Estimulación 53

M.4.3.1. Estimulación eléctrica 53

M.4.3.2. Estimulación optogenética 54

M.4.4. Manipulaciones farmacológicas 54

M.4.5. Análisis de registros electrofisiológicos 55

M.5. Inmunofluorescencia 57

M.5.1. Protocolos 57

M.5.2. Adquisición de imágenes 59

M.5.3. Análisis de las imágenes 59

M.6. Evaluación de la expresión de ARN 60

M.6.1. Captura láser 60

M.6.2. Aislamiento de ARN y RT-PCR 61

M.7. Análisis estadístico 63

RESULTADOS 64

Capítulo 1: Validación del modelo ChAT-Cre;tdT 65

R.1.1.Caracterización del ratón ChAT-Cre;tdT 66

Capítulo 2: Regulación de la excitabilidad de las interneuronas colinérgicas estriatales 69

R.2.1. Cambios en la excitabilidad de las ICE durante el desarrollo postnatal 70

R.2.2. Los bloqueantes de canales Kv1 atenúan la acomodación 73

R.2.3. Las ICE expresan una corriente sensible a MgTx 83

R.2.4. Las ICE expresan la subunidad Kv1.3 85

R.2.5. La corriente sensible a MgTx contribuye a la IsAHP 87

R.2.6. Los canales que contienen la subunidad Kv1.3 regulan la actividad tónica y la integración sináptica de las ICE 89

Capítulo 3: Contribución de la subunidad Kv1.3 en la excitabilidad de las ICE de ratones parkinsonianos 95

R.3.1. Las ICE de ratones parkinsonianos son más excitables 96

R.3.2. La excitabilidad de las ICE no cambia con el bloqueo agudo de receptores de dopamina 101

R.3.3. Las ICE de ratones parkinsonianos son insensibles a MgTx 102

R.3.4. Las ICE de ratones parkinsonianos tienen una corriente sensible a MgTx de amplitud reducida 105

R.3.5. La IsAHP está disminuida en las ICE de ratones parkinsonianos 107

R.3.6. La expresión del canal Kv1.3 no está alterada en ratones parkinsonianos .108

R.3.7. Cambios en RGS4 no afectan la excitabilidad de las ICE 108

DISCUSIÓN 112

D.1. Validación del modelo ChAT-Cre;tdT 113

D.2. Excitabilidad de las ICE 114

D.3. Influencia de Kv1.3 sobre patrones fisiológicos de actividad de las ICE 118

D.4. Rol del Kv1.3 en la enfermedad de Parkinson 120

BIBLIOGRAFÍA......123

Introducción

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson es causada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que proyectan preferencialmente al estriado. La dopamina y la acetilcolina modulan la función del circuito córticoestriatal y regulan el control motor (Barbeau, 1962; Cragg, 2006, Pisani y col., 2007). De acuerdo a la visión clásica, en la enfermedad de Parkinson se pierde la inhibición que ejerce la dopamina sobre la liberación de acetilcolina, lo que resulta en un estado "hipercolinérgico" (Barbeau, 1962). Actualmente se acepta que las interacciones entre la dopamina y la acetilcolina son más complejas de lo propuesto clásicamente (Wang y col., 2006, Threlfell y col., 2012; Nelson y col., 2014). Sin embargo, la utilización de anticolinérgicos como terapia antiparkinsoniana fue ampliamente utilizada antes de la aparición de la L-DOPA como tratamiento principal (Barbeau, 1962), y se sigue utilizando en algunos casos como complemento de esta última. Estudios más recientes apoyan la idea de que la acetilcolina juega un rol importante en la patofisiología de la enfermedad de Parkinson (Ding y col., 2006; Sanchez y col., 2011; Ding y col., 2011; Maurice y col., 2015), por lo que prevenir los cambios que ocurren en las neuronas que la liberan puede resultar en un potencial beneficio terapéutico (Deffains y Bergman, 2015).

I.1. Ganglios de la base

I.1.1. Circuito general

Los ganglios de la base son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que procesan la información proveniente de la corteza cerebral y modulan su actividad a través de circuitos de retroalimentación tálamo-corticales (Figura i.1). El estriado dorsal (caudado y putamen en primates) y el núcleo accumbens son los principales núcleos

de entrada de los ganglios de la base, y reciben proyecciones directamente desde la corteza cerebral. Corriente abajo se encuentran los núcleos intermedios, que incluyen al globo pálido (GP, globo pálido externo en primates) y núcleo subtalámico (NST). Por último, siguen los núcleos de salida, que incluyen el núcleo entopeduncular (EP, globo pálido interno en primates) y la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr). La sustancia *nigra pars compacta* (SNc) y el área tegmental ventral (ATV) cumplen un rol clave en la regulación de los ganglios de la base, liberando dopamina en el estriado, tanto en su región dorsal como en el núcleo accumbens.

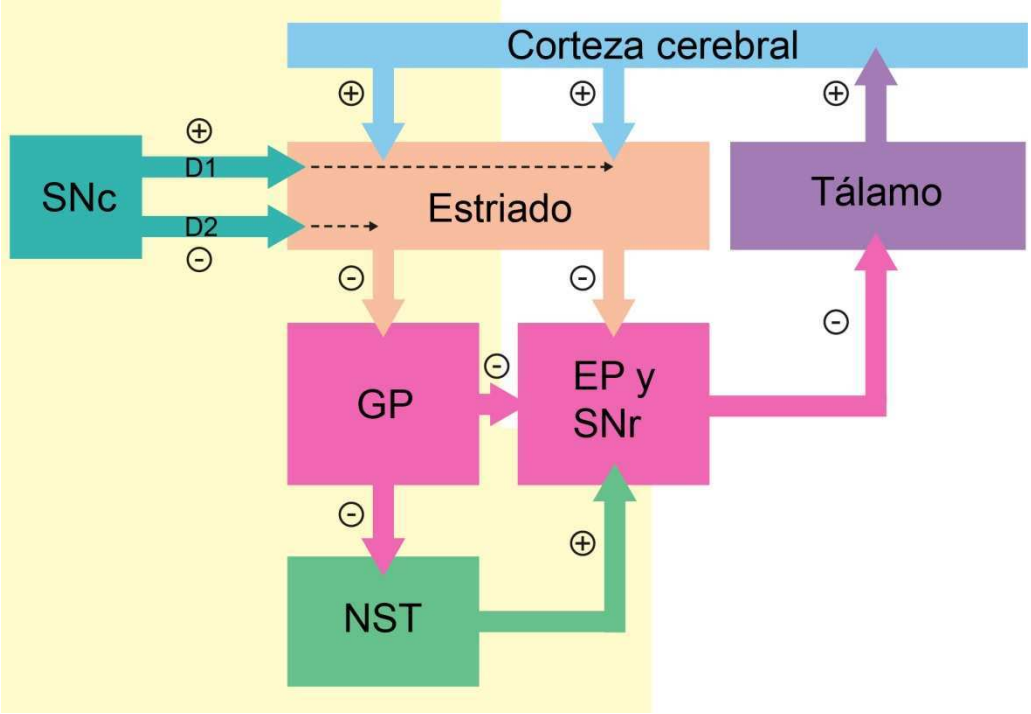

Figura i.1: Esquema general de los núcleos que forman parte de los ganglios de la base. SNc: sustancia *nigra pars compacta*; GP: globo pálido; NST: núcleo subtalámico; EP: núcleo entopeduncular; SNr: sustancia *nigra pars reticulata*. ⊕: proyecciones excitatorias;⊖: proyecciones inhibitorias. El fondo amarillo delimita la vía indirecta. (Adaptado de Neuroscience - Purves, 3ª Edición).

El estriado recibe proyecciones glutamatérgicas desde prácticamente toda la corteza cerebral y desde los núcleos intralaminares y específicos del tálamo (Figura i.2). El

95% de las neuronas que lo forman son conocidas como "neuronas espinosas medianas" (NEM). El restante 5% corresponde a distintos tipos de interneuronas, incluyendo un 3 a 4% de interneuronas GABAérgicas y un 1 a 2% de interneuronas colinérgicas (Figura i.2). A pesar de ser pocas, las interneuronas ejercen un gran control sobre la actividad a nivel local.

El procesamiento de información cortical en los ganglios de la base ocurre a través de dos vías: la vía directa y la vía indirecta (Albin *y col.*, 1989). Estas vías tienen origen en dos subtipos de NEM, que se caracterizan por sus diferentes proyecciones axonales y patrones de expresión génica (Gerfen *y col.,* 1990; Smith *y col.*, 1998). La vía directa se origina en las NEM estriatonigrales (dNEM), que proyectan de manera monosináptica a los núcleos de salida (EP y SNr) y expresan principalmente el receptor de dopamina D1. Los núcleos de salida envían proyecciones GABAérgicas hacia el tálamo, quien, a su vez, envía proyecciones glutamatérgicas a la corteza (Figura i.1). El efecto neto de la activación de esta vía es la desinhibición de las neuronas excitatorias tálamocorticales. En el circuito motor, la activación de esta vía promueve el movimiento. La vía indirecta se origina en las NEM estriatopalidales (iNEM), quienes expresan principalmente el receptor de dopamina D2 y proyectan por una vía multisináptica involucrando al GP y al NST hacia los núcleos de salida (EP y SNr) (Figura i.1). El efecto de la activación de esta vía es la inhibición de las neuronas tálamocorticales, y en el circuito motor esto supone a la inhibición del movimiento.

Si bien el conexionado que mostramos esquematizado en la Figura i.1 muestra la descripción clásica del circuito de los ganglios de la base, el panorama es bastante más complejo: por ejemplo, existen proyecciones directas de la corteza al NST (formando la vía hiperdirecta) (Nambu *y col*., 2002), proyecciones directas del GP a los núcleos de salida (Bolam *y col.*, 1993) y al estriado (Bevan *y col.*, 1998), proyecciones de NEM de la vía directa al GP (Wei *y col*., 2013) y recientemente se han descripto conexiones desde el GP hacia la corteza prefrontal (Saunders y Sabatini, 2015).

I.1.2. Función de los ganglios de la base y regulación por dopamina

La dopamina (DA) juega un rol fundamental en la función normal de los ganglios de la base. El estriado está densamente inervado por fibras dopaminérgicas que se originan en la SNc y en el ATV. Una fibra dopaminérgica hace contactos sinápticos sobre el cuello de las espinas dendríticas de muchas NEM a lo largo de una amplia región del estriado (Bolam *y col*., 2000). Además, a través de varicosidades sin clara relación con sitios postsinápticos, cada fibra dopaminérgica libera DA a distancia de los receptores postsinápticos, teniendo efectos de transmisión "por volumen" (Bergstrom *y col*., 2011; Dreyer *y col.*, 2014). Las NEM estriatales exhiben numerosas conductancias iónicas que influyen sobre las propiedades de disparo, muchas de las cuales son sensibles a neuromoduladores como la DA. La visión clásica y más aceptada propone que la DA excita a las neuronas dNEM e inhibe a las iNEM a través de la activación de los receptores D1 y D2 respectivamente (Gerfen *y col.*, 1990).

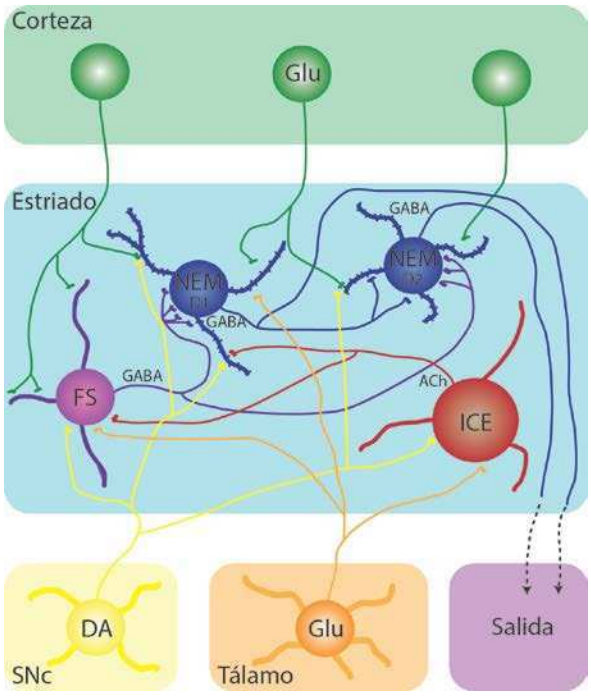

Figura i.2: Esquema general del estriado con sus proyecciones y neuronas que lo conforman. NEM: neuronas espinosas medianas; FS: interneuronas *fast spiking*; ICE: interneuronas colinérgicas estriatales; ACh: acetilcolina; SNc: sustancia *nigra pars compacta*; DA: dopamina; Glu: glutamato. (Adaptado de Tepper y Bolam 2004).

Nota: además de las FS hay otros subtipos de interneuronas GABAérgicas, no incluidas en el esquema (NPY+, NOS+, entre otras).

De modo muy general, se ha descripto que la corteza frontal junto con el estriado dorsomedial y el núcleo accumbens forman parte del circuito medial cognitivo, mientras que las cortezas sensorial y motora junto al estriado dorsolateral forman parte del circuito lateral motor. En conjunto, ambos circuitos cumplen un rol importante en distintas fases del aprendizaje instrumental (Everitt y Robbins, 2005; Yin y Knowlton, 2006; Graybiel, 2008). Este tipo de aprendizaje consta de dos etapas. La primera involucra la asociación entre una acción determinada y su consecuencia, por ejemplo, la posibilidad de alcanzar una recompensa. En esta etapa, las conductas se caracterizan por ser flexibles y se las denomina conductas dirigidas a obtener metas. La segunda etapa se caracteriza por la automatización de la conducta, la cual es disparada por ciertas claves ambientales y es ejecutada aunque no se obtenga la recompensa. Un ejemplo cotidiano es entrar a una habitación a oscuras (clave ambiental) y apretar la perilla de la luz (acción) aún sabiendo que la lamparita está quemada. Este tipo de conducta se denomina hábito. Esta fase puede ser extinguida con el tiempo, pero esto ocurre de manera muy lenta.

Mediante estudios con lesiones químicas y bloqueos farmacológicos ha sido posible estudiar el rol de las regiones del estriado en cada fase del aprendizaje. El "circuito cognitivo" (estriado medial - núcleo caudado) establece las asociaciones entre conducta y consecuencia, y de esta forma sustenta las conductas orientadas a obtener metas, mientras que el "circuito motor" (estriado lateral - putamen) participa de las asociaciones entre la conducta y las claves ambientales que predicen la obtención de la recompensa y sustenta un desempeño conductual más automatizado, contribuyendo a la formación de un hábito (Everitt y Robbins, 2005; Yin y Knowlton, 2006; Graybiel, 2008). Se ha propuesto que el aprendizaje orientado a obtener metas se convierte en un hábito con el sobre-entrenamiento.

La DA cumple un rol fundamental en la adquisición de conductas dirigidas a metas (Wise, 2004). El bloqueó de la transmisión dopaminérgica temprano durante el entrenamiento impide la adquisición de estas conductas. Además, la administración de bloqueantes dopaminérgicos una vez que fue adquirida la conducta, debilita la acción aunque los animales consigan la recompensa (Wise y Schwatz, 1981; Spyraki *y col*.,

1982, 1983, 1987; Mendelson, 1966). Así, la DA estaría involucrada tanto en la obtención inmediata de una recompensa como en el refuerzo de una memoria que asocia una acción con la recompensa obtenida (Wise, 2004).

Las neuronas dopaminérgicas codifican estímulos salientes que son clave para la adquisición de dichas conductas. En registros electrofisiológicos en animales realizando tareas de tipo instrumental, se observó que las neuronas dopaminérgicas son activadas por la presencia de la recompensa, o por estímulos que la predicen (Ljungberg *y col*., 1992). Además, la señal emitida por las neuronas dopaminérgicas cumple con muchas predicciones de la teoría llamada de "predicción de error de recompensa", es decir, es positiva cuando la recompensa es mayor a la esperada, negativa cuando es menor a la esperada, y está ausente cuando es igual a la esperada (Schultz, 2002).

La DA regula la plasticidad de las sinapsis córticoestriatales (Pisani *y col*., 2003), mecanismo que sustentaría la adquisición de conductas dirigidas a alcanzar metas. Por otro lado, la DA participaría en la selección de la conducta mejor adaptada al contexto actual a través de sus efectos agudos sobre la neurotransisión córticoestriatal y excitabilidad de neuronas estriatales. En particular, la regulación del balance entre las actividades de las dNEM e iNEM sería clave para seleccionar aquellas acciones aprendidas que resultan más adaptativas en el contexto actual. Probablemente es debido a la falta de las señales motivacionales producidas por las neuronas dopaminérgicas que se presentan déficits motores severos en patologías como la enfermedad de Parkinson.

I.2. Interneuronas colinérgicas estriatales

I.2.1. Generalidades

Las interneuronas colinérgicas estriatales (ICE) fueron descubiertas y descriptas por primera vez por Kölliker (1896) como interneuronas gigantes. Son muy pocas,

comprendiendo entre el 1-2% de las neuronas presentes en el estriado (Kemp y Powell, 1971; Bolam *y col*., 1984; Phelps *y col*., 1985). Desde una perspectiva fisiológica fueron descriptas como neuronas tónicamente activas (TANs, por sus siglas en inglés), ya que en registros realizados *in vivo*, en animales anestesiados y sin anestesia, se observó que tienen actividad tónica de 3-10 Hz, aún en animales decorticados (Wilson *y col.*, 1990). Más adelante, mediante la tinción de las TANs registradas, se pudo determinar que corresponden a las neuronas estriatales que expresan Colina Acetil-Transferasa (ChAT) (Wilson *y col.*, 1990; Kawaguchi, 1992). Estas neuronas tienen un soma de alrededor de 50 μm de diámetro y entre dos y 4 dendritas primarias, que se dividen y extienden a través de un gran área del estriado (Chang y Kitai, 1982; DiFiglia y Carey, 1986; DiFiglia, 1987; Kawaguchi, 1992, 1993) (Figura i.3A). Al ser registradas en rodajas, *in vitro*, estas neuronas conservan su actividad espontánea (Jiang y North, 1991). Antes del advenimiento de las técnicas genéticas que permiten marcarlas, para registrarlas *in vitro* eran distinguidas del resto de las neuronas estriatales por su gran tamaño y por sus propiedades electrofisiológicas, descriptas por primera vez por Kawaguchi (1993): en respuesta a un pulso despolarizante, presentan "adaptación de frecuencia de disparo" comúnmente seguida por una acomodación (interrupción de los disparos de potenciales de acción durante una despolarización sostenida) (Figura i.3B). Los potenciales de acción son anchos y están seguidos por una hiperpolarización (AHP, por sus siglas en inglés, *after hyperpolarization*), llamada mAHP (*médium after hyperpolarization*), que dura entre 100 y 200 ms. Al final de un pulso despolarizante, las ICE presentan una AHP de varios segundos de duración, conocida como sAHP (*slow after hyperpolarization*) (Figura i.3B). En respuesta a un pulso hiperpolarizante, las ICE presentan un "sag": al comienzo del pulso alcanzan cierto valor de potencial de membrana que luego lentamente se va despolarizando hasta estabilizarse. Este "sag" se debe a la activación de canales catiónicos (HCN) que se activan por hiperpolarización y por los que pasa una corriente despolarizante (Figura i.3B). Al finalizar un pulso hiperpolarizante aparece una despolarización de rebote, a menudo acompañada por al menos un potencial de acción (Figura i.3B). Además al registrar las ICE puede observarse su actividad tónica, que puede presentarse como un patrón regular, irregular, o en salvas, de disparos de potenciales de acción. Pasados 10 a 15

minutos de registro de tipo *whole cell* las ICE dejan de disparar, presumiblemente debido a la diálisis de su interior celular, pero aún presentan oscilaciones subumbrales del potencial de membrana (Figura i.3B).

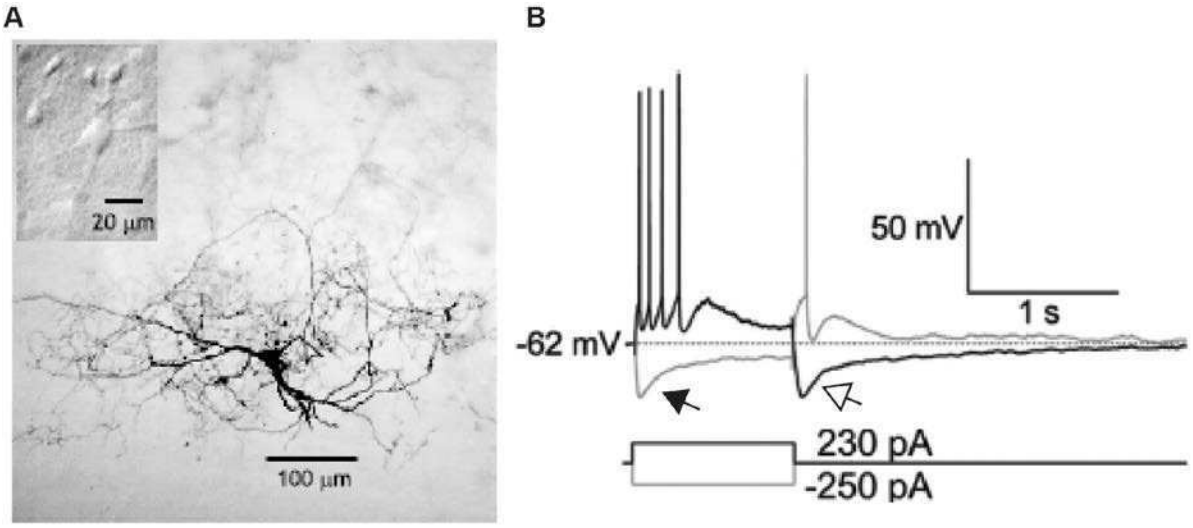

Figura i.3: Características morfológicas y fisiológicas de las interneuronas colinérgicas estriatales. (A) Microfotografía de una ICE marcada con biocitina y revelada con nickel. Se ve su soma grande y las dendritas que salen de él, que se bifurcan densamente. La punta de flecha blanca muestra el axón bifurcándose. *Inset*: Imagen en IR-DIC de una ICE (soma grande) con otras neuronas estriatales de menor tamaño (Kawaguchi, 1992). **(B)** Registro representativo de una ICE en respuesta a un pulso despolarizante de 230 pA y uno hiperpolarizante de -250 pA, en *whole cell current clamp*. El pulso despolarizante genera una adaptación de frecuencia de disparo seguida de acomodación, y al finalizar se observa la sAHP, indicada con una flecha blanca. El pulso hiperpolarizante genera la aparición del sag (indicado con una flecha negra), y al finalizar se ve un potencial de acción de rebote, seguido de oscilaciones subumbrales (Sanchez *y col*., 2011).

I.2.2. Actividad espontánea y excitabilidad

La actividad espontánea de las ICE ha sido estudiada principalmente en registros extracelulares (*loose patch o cell attached*) o en registros intracelulares en modo *perforated patch*, de modo de no alterar el contenido del interior de la célula. Dos tipos de evidencias apoyan la idea de que su actividad espontánea es autónoma. Por un lado, no desaparece en presencia de bloqueantes de receptores AMPA, NMDA, $GABA_A$, muscarínicos o de DA presentes en las ICE (Bennett y Wilson, 1999). Por otro

lado, se describieron los mecanismos intrínsecos de las ICE que subyacen a su actividad espontánea (Bennett *y col*., 2000).

Como mencionamos anteriormente, las ICE pueden disparar espontáneamente con un patrón regular, en salva de potenciales de acción o de manera irregular (Figura i.4).

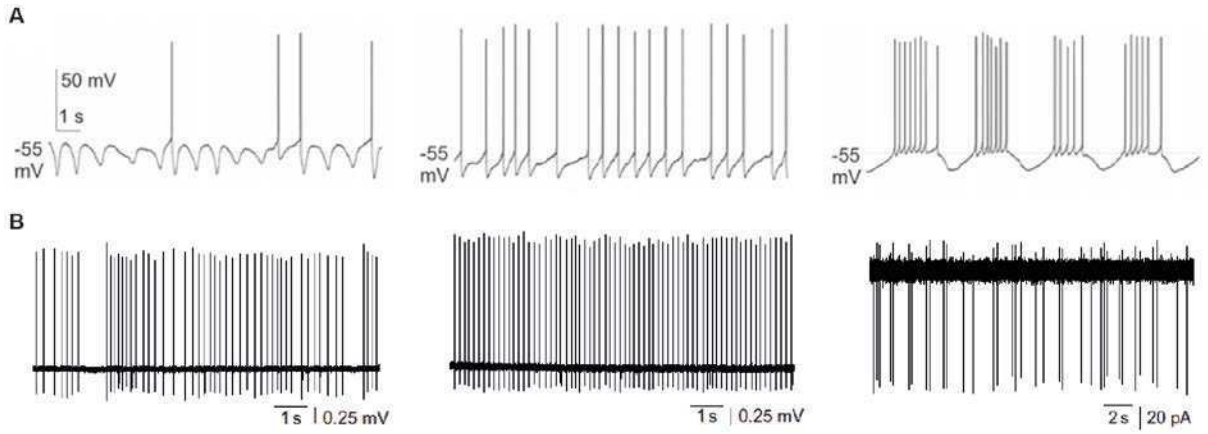

Figura i.4: Patrones de actividad espontánea de las ICE. (A) Ejemplo de una ICE con un patrón de disparo espontáneo irregular (izquierda), regular (medio) o en salvas de potenciales de acción (derecha), registradas en rodajas de estriados de ratas en *whole cell current clamp*, recién abierto el sello (Sanchez *y col*., 2011). **(B)** Ejemplo de una ICE con un patrón de disparo espontáneo irregular (izquierda), regular (medio) o en salvas de potenciales de acción (derecha), registradas en rodajas de estriados de ratas en *cell attached current clamp* (irregular y regular) o *voltage clamp* (en salvas) (Bennett y Wilson, 1998).

Su umbral está en el rango entre -40 y -50 mV. Su potencial de acción necesita de la activación de canales de Na^+ dependientes de voltaje, y de canales de K^+ rectificadores tardíos (*delayed rectifiers*) (Maurice *y* col., 2004; Song *y col*., 1998). Además de estas corrientes, durante el potencial de acción se abren canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (principalmente de tipo Q y N) que permiten que el Ca^{2+} ingrese a las células y active corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+}. La apertura de canales $Ca_v2.1$ (tipo Q) activa una corriente de K^+ mediada por canales BK, la cual a su vez genera una hiperpolarización rápida, conocida como fAHP (*fast after hyperpolarization*), que participa en la repolarización del potencial de acción (Bennett *y col*., 2000; Goldberg y Wilson, 2005). La apertura de canales $Ca_v2.2$ (tipo N) activa la corriente de K^+ mediada por los canales SK. Esta genera la hiperpolarización que ocurre luego de cada

potencial de acción, conocida como mAHP (*medium after hyperpolarization*), que dura entre 100 y 200 ms y lleva al potencial de membrana por debajo de -60 mV (Bennett *y col*., 2000; Goldberg y Wilson, 2005). La corriente SK es responsable de los intervalos entre potenciales de acción. La mAHP activa la corriente catiónica despolarizante mediada por los canales HCN, conocida como I_h (responsable del sag descripto previamente). I_h despolariza a la ICE y la lleva a un voltaje de activación de la corriente persistente de Na^+ (Bennett *y col*., 2000). Esta corriente lleva al potencial de membrana nuevamente al umbral y se genera un nuevo potencial de acción. Este ciclo de corrientes es el que lleva a las ICE a disparar potenciales de acción de manera regular. En cambio, si el patrón de disparos es en forma de salvas de potenciales de acción, entre cada salva aparece una nueva corriente hiperpolarizante, denominada sAHP, de algunos segundos de duración (*slow after hyperpolarization*) (Golberg y Wilson, 2005). Se propone que esta corriente es dependiente de Ca^{2+} debido a que se observó en experimentos de *imaging* que se producen grandes transientes de Ca^{2+} antes de cada salva, a diferencia de lo que ocurre en el patrón regular sin salvas de potenciales de acción. Bloqueando la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares la IsAHP no se atenuó, por lo que el Ca^{2+} que la activa entraría por algún canal, presumiblemente de tipo L ya que en las ICE no se expresa el tipo T (Bennet *y col*., 2000), y el Q y N participarían selectivamente en la activación de las fAHP y mAHP (Golberg y Wilson, 2005). Esta hiperpolarización inter-salvas finaliza con la activación de la corriente I_h, la activación de las corrientes persistentes de Na^+, y el regreso al umbral de disparo. Ambos patrones de disparo, regular o en salvas de potenciales de acción, son mutuamente excluyentes: en un momento dado, solo uno de los dos puede expresarse. El patrón que se expresa dependería de qué corriente de K^+ es dominante en ese momento (I_{SK} o IsAHP) (Golberg y Wilson, 2005). Markram y colaboradores (1998) propusieron que el hecho de que se active una u otra corriente depende de las corrientes transitorias de Ca^{2+} reclutadas por la despolarización: si son rápidas se activa I_{SK}, mientras que si son lentas y subumbrales se activa IsAHP. Finalmente, fluctuaciones en la disponibilidad de Ca^{2+} subumbral desencadenarían patrones de disparo irregulares, donde participarían tanto SK como IsAHP.

Las mismas corrientes que gobiernan la actividad espontánea de las ICE regulan los disparos inducidos durante la inyección de corriente en el soma (excitabilidad intrínseca). Así, el bloqueo de I_{SK} reduce el intervalo entre potenciales de acción, mientras que el de I_h lo incrementa. Menos se conoce sobre el mecanismo que media la acomodación. En un trabajo publicado por Sanchez y colaboradores (2011), se demostró que hay una buena correlación entre la magnitud de la IsAHP y el grado de acomodación de las ICE. Los autores propusieron que la acomodación dependería de los mismos canales que median la sAHP, hipótesis que no pudo ser verificada porque los canales que median la IsAHP continúan siendo desconocidos. Por otro lado, Sanchez y colaboradores (2011) revelaron que el bloqueo de canales de Ca^{2+} sensibles a dihidropiridinas, que presumiblemente constituyen la fuente de Ca^{2+} para activar la IsAHP, no bloquea la acomodación de las ICE, lo que sugirió la participación de un canal de K^+ no canónico, potencialmente dependiente de voltaje, en la acomodación e IsAHP de las ICE.

Como vimos, la contribución de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} en la fisiología de las ICE ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, el rol que cumplen los canales de K^+ dependientes de voltaje no se estudió en detalle en estas células. Se sabe que hay corrientes de K^+ mediadas por canales Kv4.1 y Kv4.2 que contribuyen a la forma de la mAHP y a dictar la duración del potencial de acción (Song *y col.*, 1998; Hattori *y col*., 2003). Por otro lado, las ICE expresan tanto canales Kv7 (Cooper *y col*., 2001) como Kv1 (Song *y col*., 1998; Deng *y col.*, 2005), pero el rol que cumplen en su fisiología no ha sido estudiado. Estos canales Kv median la acomodación en distintos tipos neuronales. Por ejemplo, en neuronas de hipocampo, los canales Kv7 median la acomodación (Tzingounis y Nicoll, 2008; Peters *y col*., 2005; Yue y Yaari, 2004) mientras que en neuronas de amígdala ésta depende de canales Kv1 (Sciamanna y Wilson, 2011; Dodson *y col*., 2002; Faber y Sah, 2004). La contribución de canales Kv7 a la IsAHP es debatida (Tzingounis y Nicoll, 2008), y no existen reportes sobre una posible participación de Kv1 en la IsAHP.

En resumen, las ICE poseen múltiples corrientes de K^+ que proveen retroalimentación negativa durante una despolarizción (Figura i.5A). Estas corrientes pueden explicar

tanto la dinámica de generación de potenciales de acción durante la actividad espontánea como la respuesta observada frente a la inyección de corriente. El rol de las corrientes dependientes de Ca^{2+} es mejor conocido que el de las dependientes de voltaje, restando determinar la identidad molecular de IsAHP y su contribución funcional. Especulativamente, la IsAHP podría generar la acomodación observada en las ICE durante un pulso despolarizante (Figura i.5 B-C). Como veremos a continuación, el rol de IsAHP y otras conductancias de K^+ en regular la respuesta de las ICE a aferencias sinápticas es menos conocido.

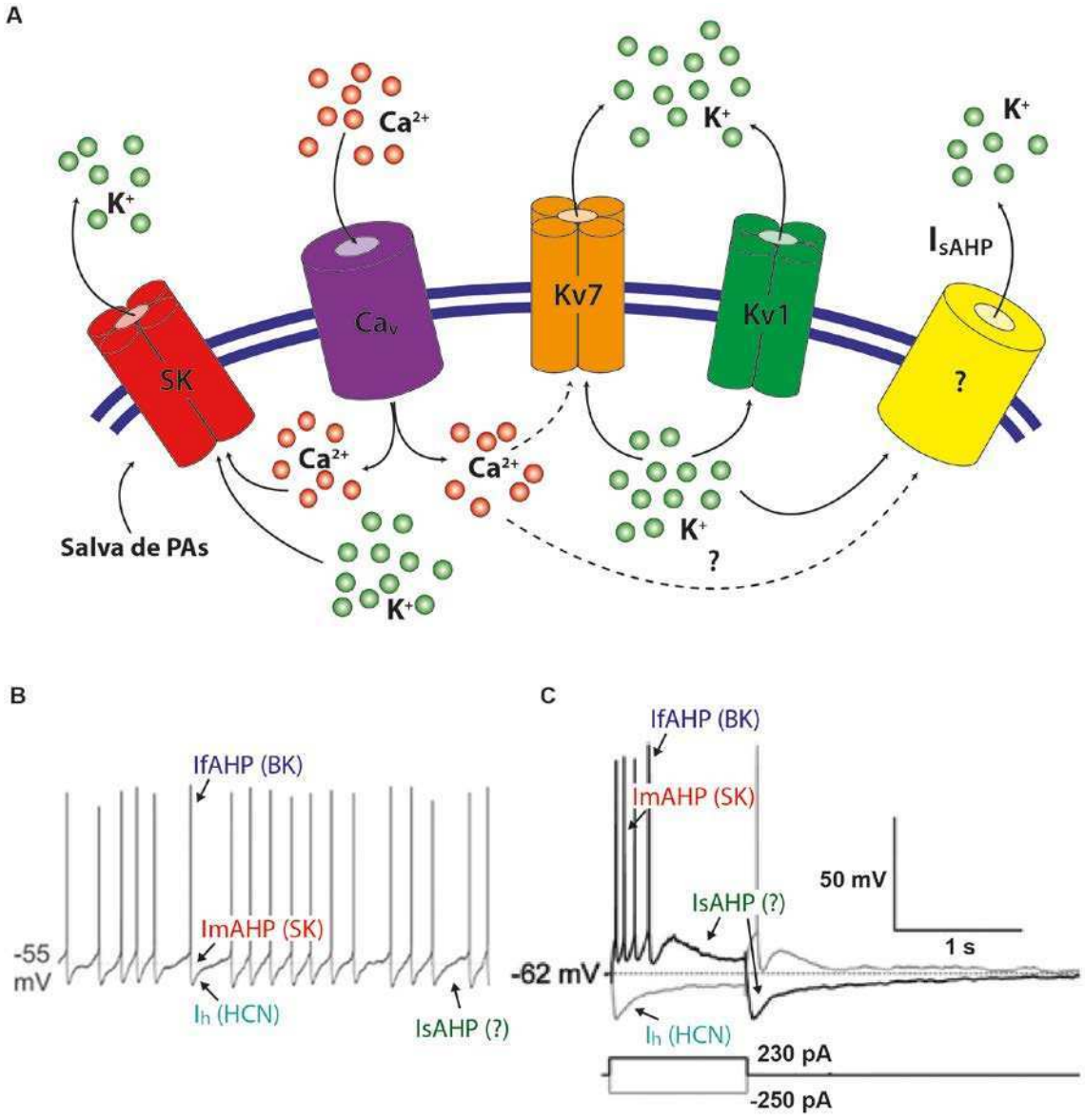

Figura i.5: Excitabilidad de las ICE. (A) Esquema de posibles canales involucrados en la excitabilidad de las ICE. **(B-C)** Corrientes principales involucradas en la generación de potenciales de acción espontáneos (B) y en respuesta a la inyección de corriente despolarizante o hiperpolarizante (C).

I.2.3. Respuesta a aferencias sinápticas

Las ICE reciben *inputs* glutamatérgicos tanto de la corteza cerebral como de los núcleos intralaminares del tálamo. Los *inputs* corticales llegan a las dendritas distales, mientras que los talámicos llegan tanto a las dendritas proximales como al soma (Wilson *y col.*,1990; Lapper y Bolam, 1992; Kawaguchi, 1993; Bennett y Wilson, 1998; Thomas *y col*., 2000). Por lo tanto, las proyecciones talámicas probablemente influyan más sobre las ICE que las corticales (Sidibè y Smith, 1999). El glutamato actúa sobre receptores ionotrópicos adelantando el próximo potencial de acción (Bennet y Wilson, 1998). Además, a través de receptores metabotrópicos puede despolarizarlas (grupo I) (Takeshita *y col*., 1996) o reducir la liberación de ACh de sus terminales (grupo II) (Pisani *y col*., 2002, 2003).

Las ICE también reciben *inputs* GABAérgicos provenientes de interneuronas (Sullivan *y col*., 2008) y posiblemente también de colaterales axonales de NEM. El GABA genera en ellas potenciales inhibitorios postsinápticos (PIPS) que retrasan el próximo potencial de acción (Bennet y Wilson, 1998).

Además, las ICE expresan receptores presinápticos M_2 y M_4 inhibitorios, que disminuyen su frecuencia de disparo tónico (Calabresi *y col*., 1998c; Bonsi *y col*., 2008; Ding *y col*., 2006). Por otro lado, la activación de estos receptores disminuye las corrientes de Ca^{2+} mediadas por canales Ca_v2, lo que resulta en un patrón de disparos de potenciales de acción irregular (Ding *y col*., 2006).

La serotonina (5-HT), proveniente de proyecciones de los núcleos del rafe (Steinbusch, 1981), también aumenta la tasa de disparo de las ICE a través de la activación de receptores metabotrópicos (Blomeley y Bracci, 2005; Bonsi *y col*., 2007).

Tal vez el más importante modulador de la actividad colinérgica estriatal es la DA. El estriado tiene la más alta expresión de receptores para DA de todo el cerebro. Los receptores para DA de tipo D1 incluyen a los receptores D1 y D5, y activan a la adenilatociclasa. Los de tipo D2 incluyen al D2, al D3 y al D4, los cuales inhiben a la adenilatociclasa. Las ICE expresan los receptores D2 y D5 (Yan *y col*., 1997). Se ha visto, por un lado, que la activación de los receptores D5 aumenta la actividad de las ICE (Aosaki *y col*., 1998). Sin embargo, también se observó que su activación aumenta la mAHP, lo que disminuiría su frecuencia de disparo (Bennett y Wilson, 1998). La activación de los receptores D2 inhibe tanto la corriente persistente de Na^+ (Maurice *y col*., 2004) como la I_h (Deng *y col*., 2007), de manera que disminuirían la frecuencia de disparos espontáneos de las ICE. Sin embargo, otros resultados demostraron que su activación reduce la corriente mediada por los canales $Ca_v2.2$, reduciendo la mAHP, y entonces genera la aparición de salvas de potenciales de acción (Yan *y col*., 1997; Goldberg y Wilson, 2005). Por lo tanto, es probable que el efecto de los receptores para DA sobre la actividad de las ICE dependa de factores adicionales, como ser qué inputs se encuentran activos o cuál es el patrón de actividad espontánea (regular, irregular, en salvas) cuando la DA los estimula.

En resumen, las ICE muestran una actividad tónica que depende de mecanismos intrínsecos y que es modificada de manera fásica por sus *inputs* sinápticos, incluyendo a neuromoduladores como la DA y la ACh misma. Como veremos más adelante, la falta de DA que ocurre en la enfermedad de Parkinson puede desencadenar un estado "hipercolinérgico" afectando mecanismos que en parte dilucidamos durante el desarrollo de esta tesis.

I.2.4. Respuesta de pausa

Durante el aprendizaje orientado a alcanzar metas se establecen asociaciones entre el contexto ambiental y las acciones que resultan efectivas para obtener una recompensa. Dado que los ganglios de la base son importantes en la adquisición de este tipo de

conductas, es probable que cuenten con mecanismos de refuerzo de dichas asociaciones (Balleine *y col*., 2009; Wickens *y col*., 2007). Junto a las neuronas dopaminérgicas, las ICE son jugadores clave en el control de la función estriatal durante el aprendizaje instrumental (Schulz y Reynolds, 2013). Registros realizados en monos despiertos demostraron que las TANs no responden al movimiento per se (Crutcher y DeLong, 1984), pero sí lo hacen cuando el animal recibe una recompensa. La respuesta que presentan es una interrupción en su actividad tónica, que dura algunos cientos de milisegundos, y se conoce como "respuesta de pausa" (Kimura *y col*., 1984; Apicella *y col*., 1997) (Figura i.6A). En estudios posteriores se demostró que la pausa aparece en respuesta al estímulo sensorial asociado a la recompensa, y que si la asociación entre ambos desaparece, la respuesta de pausa también lo hace (Aosaki *y col*., 1994b), lo que la clasifica como el correlato neuronal de un condicionamiento clásico. Ahora está ampliamente aceptado que la pausa aparece frente a estímulos salientes relacionados con recompensas tanto aversivas como apetitivas, en paradigmas de condicionamiento clásico y operante (Ravel *y col*., 1999; Apicella*l*, 2002; Morris *y col*., 2004). Es interesante que la pausa de las ICE ante eventos prominentes y recompensas está sincronizada con la descarga en salvas que las neuronas dopaminérgicas producen ante esos mismos eventos (Morris *y col*., 2004), de modo que durante unos 200-300 ms cambia sustancialmente el balance ACh/DA que regula la plasticidad y excitabilidad del microcircuito estriatal (Exley y Cragg, 2008). Registrando varias ICE juntas en un mono despierto, Bergman y colaboradores (1990) descubrieron que todas presentan la respuesta de pausa al mismo tiempo frente a un estímulo saliente. Este resultado sugiere que las ICE funcionan de manera sincrónica modulando el *output* GABAérgico del estriado hacia el resto de los núcleos de los ganglios de la base (Graybiel *y col*., 1994; Raz *y col*., 1996).

En realidad, la respuesta "de pausa" de las ICE consta comúnmente de 3 fases: una excitación inicial seguida por una pausa, y una excitación final (Kimura *y col*., 1984; Aosaki *y col*., 1994b; Aosaki *y col*., 1995; Morris *y col*., 2004), pero las excitaciones inicial y/o final pueden no presentarse y esto podría depender de la región del estriado estudiada (Chuhma *y col*., 2014; Wieland *y col*., 2014). La naturaleza de la pausa continúa siendo desconocida y controversial. Distintas evidencias plantean distintas

posibles explicaciones a su generación: que ocurra como una respuesta inhibitoria directa frente a *inputs* sinápticos, o que resulte de una respuesta intrínseca de las ICE que sigue a una excitación inducida por *inputs* talámicos o corticales. A continuación detallamos algunas evidencias que apoyan una u otra hipótesis.

Como mencionamos anteriormente, estudios anatómicos demostraron que las ICE reciben proyecciones excitatorias de los núcleos intralaminares del tálamo (Lapper y Bolam, 1992; Van der Werf *y col*., 2002). Estos a su vez reciben aferencias de núcleos sensitivos y responden a los mismos estímulos que las ICE (Matsumoto *y col*., 2001). Sumado a que la pausa se encuentra ausente cuando el tálamo es inhibido aplicando localmente agonistas de receptores GABA-A (Matsumoto *y col*., 2001) (Figura i.6B), se planteó que la pausa sigue a una excitación desencadenada por *inputs* glutamatérgicos talámicos. De acuerdo con esta hipótesis, la estimulación de aferencias talámicas en rodajas estriatales de ratón genera una pausa en las ICE (Ding *y col*., 2010). Resultados publicados por Oswald y colaboradores (2009) muestran que la pausa inducida por excitación talámica se mantiene aún en presencia de bloqueantes GABAérgicos en el estriado, lo que indicaría que no se debe a una inhibición directa GABAérgica sobre las ICE. Sin embargo, Suzuki y colaboradores (2001) encontraron que la pausa inducida por estimulación eléctrica estriatal (que reculta aferentes tanto talámicos como corticales) es bloqueada por inhibidores de receptores para GABA y proponen que las NEM o interneuronas GABAérgicas reclutadas paralelamente por los *inputs* talámicos son responsables de la misma (Figura i.7A). Aunque el rol de las neuronas GABAérgicas en la generación de la pausa continúa siendo controversial, es claro que las aferencias excitatorias pueden inducir una pausa independiente de la actividad GABAérgica local que dependería de las mismas corrientes que retroalimentan negativamente la excitación durante la actividad tónica espontánea o la inyección de corriente en el soma (Figura i.7B). En este sentido, por la duración de la pausa, son candidatas las corrientes que median la sAHP y la acomodación (Reynolds *y col.*, 2004; Wilson y Goldberg, 2006; Sanchez *y col*., 2011). Finalmente, la aparición de una excitación siguiendo a la pausa podría responder al mismo mecanismo intrínseco que desencadena potenciales de acción de rebote luego de una hiperpolarización sostenida (Figura i.7B).

Además de estos mecanismos, es necesario contemplar el rol de la DA, ya que la pausa se encuentra ausente en animales modelo de la enfermedad de Parkinson (Aosaki *y col*., 1994a) (Figura i.6C). Sumado a esto, la pausa coincide temporalmente con la salva de potenciales de acción de las neuronas dopaminérgicas en presencia de una recompensa, tal como explicamos anteriormente (Fiorillo *y col*., 2003; Morris *y col*., 2004). Finalmente, un trabajo reciente muestra que la ablación selectiva del receptor D2 de las ICE reduce la pausa que sigue a la activación de aferencias excitatorias (Kharkwal *y col*., 2016). Esta evidencia sugiere que la pausa podría deberse a una inhibición de las ICE causada por la DA liberada por las neuronas nigroestriatales y mediada por la activación de los receptores de tipo D2 presentes (Figura i.7C). De acuerdo con esta hipótesis se hicieron trabajos en rodajas en los que se registraron las respuestas de las ICE frente a la estimulación optogenética de las terminales dopaminérgicas, y se encontró que su activación genera una pausa que puede o no estar precedida de una salva de potenciales de acción, y cuya aparición dependería del glutamato co-liberado por las terminales dopaminégicas (Chuhma *y col*., 2014; Straub *y col.*, 2014; Wieland *y col*., 2014) (Figura i.7C). Así, las neuronas dopaminérgicas podrían por sí solas generar una respuesta de excitación seguida de pausa.

Alternativamente, la DA podría contribuir a la pausa modulando las corrientes intrínsecas que la generan. En ratas con denervación nigroestriatal modelo de la enfermedad de Parkinson, las ICE tienen la IsAHP disminuida (Sanchez *y col*., 2011), por lo que la falta de DA en el estriado podría estar afectando la respuesta intrínseca de las ICE frente a la activación sináptica. Además, la DA modula I_h, que podría contribuir a terminar la pausa y generar la excitación que la sigue (Deng *y col*., 2007). Esto plantea una tercera posibilidad en la que la DA podría estar actuando como un modulador de la interacción entre las aferencias sinápticas talámicas y las propiedades intrínsecas de las ICE, más que ser la causa directa de la respuesta de pausa (Schulz y Reynolds, 2013).

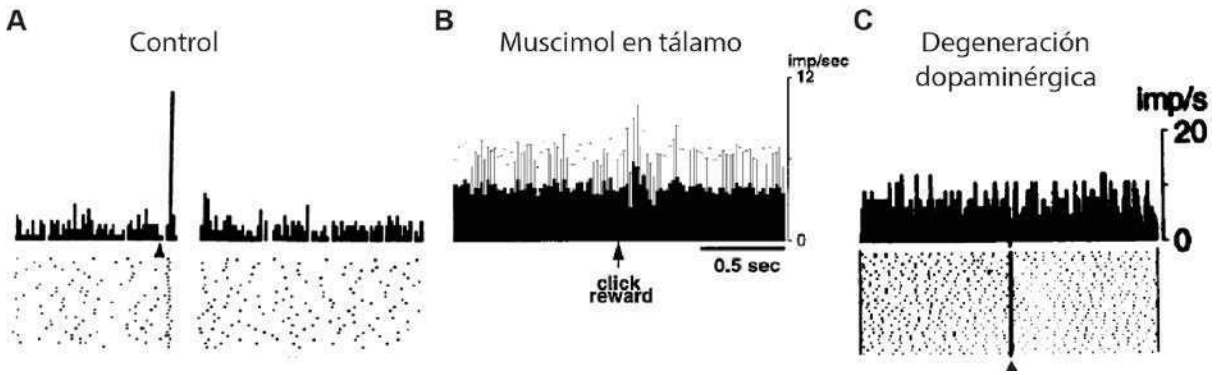

Figura i.6: Respuesta de pausa de las ICE. (A) *Raster plot* (abajo) e histograma (arriba) ejemplo de la respuesta de pausa de una ICE en un mono despierto con el circuito intacto (Kimura *y col*., 1984). **(B)** Histograma ejemplo de la respuesta de pausa de una ICE en un mono despierto con inhibición talámica mediante la administración intratalámica de muscimol (agonista de receptores $GABA_A$) (Matsumoto *y col*., 2001). **(C)** *Raster plot* (abajo) e histograma (arriba) ejemplo de la respuesta de pausa de una ICE en un mono despierto con degeneración nigroestriatal (Aosaki *y col*., 1994a). En todos los casos la punta de flecha indica el "*click*" que precede a la recompensa.

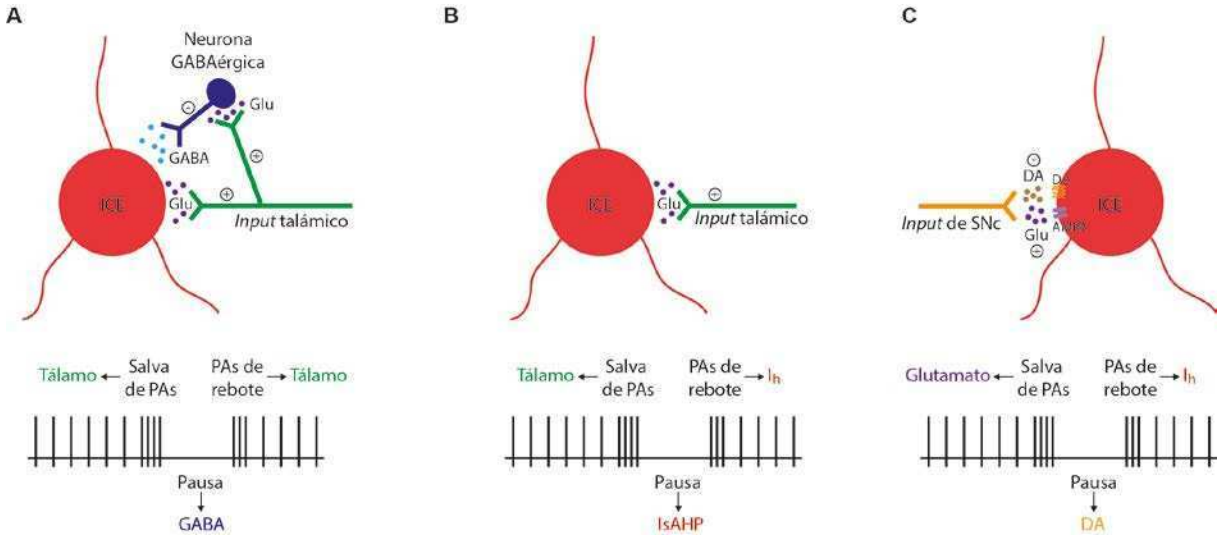

Figura i.7: Modelos de la respuesta de pausa de las ICE. (A-C) Esquema de la respuesta de pausa generada por una respuesta sináptica de la ICE frente a la activación talámica (A), por una respuesta intrínseca de las ICE frente a la activación talámica (B), o por una inhibición dopaminérgica siguiendo a la activación glutamatérgica producida por las mismas neuronas que liberan DA (C).

I.2.5. Efecto de la ACh en el circuito estriatal

El estriado contiene uno de los niveles más elevados de ACh de todo el cerebro, la cual es principalmente liberada por las interneuronas colinérgicas (Mesulam *y col*., 1992; Contant *y col*., 1996). A través de su densa inervación local modifican la excitabilidad neuronal y la transmisión y plasticidad sináptica del circuito estriatal. La mayoría de los efectos conocidos de la ACh en el estriado son mediados por receptores muscarínicos (Koós y Tepper, 2002; Zhou *y col*., 2002; Wilson, 2004), incluidos los efectos sintomáticos en la enfermedd de Parkinson (Katzenschlager *y col*., 2003). Aunque se han descripto múltiples acciones de la ACh sobre distintos tipos de neuronas estriatales, actualmente resulta difícil establecer si la ACh aumenta o disminuye de manera neta la actividad de las NEM que dan origen a las vías directa e indirecta.

A través de receptores M_1 presentes en las NEM, la ACh aumenta su excitabilidad, reduciendo su AHP y aumentando la tasa de disparos evocada (Perez-Rosello *y col*., 2005). Sin embargo, también pueden reducir la frecuencia de disparo de las NEM indirectamente ya que estimulan a las interneuronas GABAérgicas *fast spiking*, quienes poseen receptores nicotínicos para ACh (Koós y Tepper, 2002) (Figura i.8).

Una buena parte de los efectos de la ACh en el estriado es mediado por receptores presinápticos. Como mencionamos anteriormente, las propias ICE tienen autoreceptores M_2 y M_4, los cuales al activarse generan una disminución en su tasa de disparo de potenciales de acción (Calabresi *y col*., 1998c; Ding *y col*., 2006; Zhao *y col*., 2016) (Figura i.8). Las NEM poseen receptores muscarínicos inhibitorios presinápticos M_2 en sus colaterales axonales, que al activarse por ACh reducen su transmisión sináptica hacia otras neuronas estriatales (Koós y Tepper, 2002; Perez-Rosello *y col*., 2005; Calabresi *y col.*, 1998b, 2000) (Figura i.8). La ACh, actuando también a través de receptores muscarínicos presinápticos ubicados en terminales córticoestriatales, reduce la respuesta de las NEM a inputs glutamatérgicos corticales (Pakhotin y Bracci, 2007) (Figura i.8). Finalmente, la ACh también tiene efectos importantes sobre la liberación de DA. Las terminales dopaminérgicas en el estriado tienen receptores nicotínicos (Jones *y col*., 2001), cuya activación puede facilitar o

suprimir la liberación de DA dependiendo de la tasa de disparos de potenciales de acción de las neuronas dopaminérgicas (Figura i.8). Si las neuronas de la SNc tienen una tasa de disparo baja y tónica, los receptores nicotínicos se desensibilizan y disminuye la liberación de DA. En cambio, si las neuronas dopaminérgicas disparan en salvas de potenciales de acción, la activación nicotínica aumenta la liberación de DA (Rice y Cragg, 2004; Zhang y Sulzer, 2004; Exley y Cragg, 2008). Como los niveles de ACh presentes en el estriado dependen de la actividad de las ICE, el efecto de la ACh sobre las terminales dopaminérgicas también depende de su patrón de disparo. Se ha propuesto que a su frecuencia de disparo *in vivo* prima el efecto de aumento en la liberación de DA (Wilson *y col*., 1990; Zhou *y con*., 2002).

Por último, también se ha visto que la ACh tiene efectos en la plasticidad sináptica dentro del estriado. Se estudiaron principalmente los efectos de la ACh en las sinapsis glutamatérgicas córticoestriatales, y, en términos generales, se observó que la activación de los receptores M_1 favorece la LTP, mientras que la activación de los receptores M_2 promueve la LTD (Pisani *y col*., 2007; Calabresi *y col*., 1998b).

Como conclusión, la ACh actúa como un modulador del circuito estriatal, y sus efectos dependen del patrón de disparo de las ICE. Es probable que la ACh liberada durante una salva de potenciales de acción sea más eficiente sobre las neuronas vecinas, debilitando los *inputs* glutamatérgicos o induciendo plasticidad, que la liberada durante los disparos tónicos. Por otra parte, las salvas de potenciales de acción son intermitentes por naturaleza, por lo que surge la hipótesis de que el patrón de disparo en salvas y la respuesta de pausa sean clave para mantener períodos de alta versus baja ACh, permitiendo diferentes modos de procesamiento estriatal (Goldberg y Wilson, 2010).

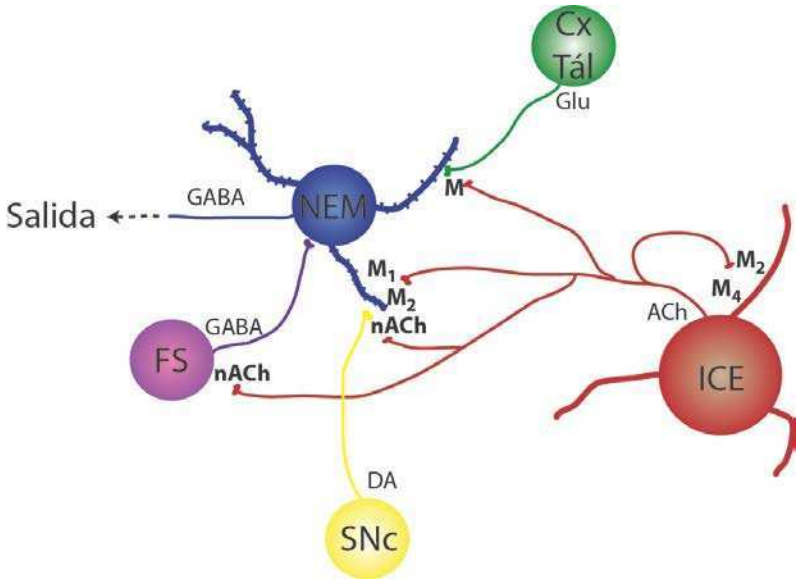

Figura i.8: Esquema del efecto de la ACh en el circuito estriatal. NEM: neuronas espinosas medianas; FS: interneuronas *fast spiking*; ICE: interneuronas colinérgicas estriatales; Cx: corteza; Tál: tálamo; ACh: acetilcolina; SNc: sustancia *nigra pars compacta*; DA: dopamina; Glu: glutamato. nACh: receptores nicotínicos; M: receptores muscarínicos. (Adaptado de Goldberg y Wilson, 2010).

Desde una perspectiva funcional, las acciones de la ACh sobre la plasticidad serían complementarias de las de la DA durante la adquisición de conductas orientadas a alcanzar metas (Balleine *y col*., 2009). Además, se ha postulado que los efectos agudos de la ACh sobre el microcircuito estriatal contribuirían a la selección de acciones, en particular, interrumpiendo el curso de acción actual y favoreciendo redireccionar la atención a estímulos novedosos (Ding *y col*., 2010). La degradación de las señales emitidas por las ICE ante estimulos salientes podría contribuir a la aparición de los signos clínicos de la enfermedad de Parkinson (Aosaki *y col*., 1994a).

I.3. Canales de K^+

Existe una gran variedad de canales de K^+. Esta diversidad se origina, en parte, por el gran número de genes que codifican sus subunidades, pero también existen distintos procesos, como el *splicing* alternativo, la heteromultimerización, la posible edición del ARN y las modificaciones postraduccionales, que aumentan su variabilidad (Coetzee *y col*., 1999). Los canales de K^+ clásicamente fueron asociados a la repolarización del potencial de membrana luego de un potencial de acción, y a la determinación del

potencial de reposo de las células. Ahora se sabe que gobiernan estos parámetros, pero además participan en la finalización de períodos de actividad intensa, en determinar los intervalos entre potenciales de acción, limitar la liberación de neurotransmisor, y en general, de disminuir la efectividad de *inputs* excitatorios sobre las neuronas (Hille, 2001). Los canales de K^+ pueden ser reconocidos por ciertas características comunes a todos ellos. Todos se forman con 4 subunidades. Estas subunidades pueden ser todas iguales, formando un homotetrámero, o distintas, formando un heterotetrámero. La funcionalidad del canal depende de las subunidades que lo forman (Coetzee *y col*., 1999). La posibilidad de formar distintos canales de K^+ con distintas subunidades provee a la célula con la capacidad de modular el sistema aumentando la diversidad de canales de K^+ con un número limitado de genes (Coetzee *y col*., 1999). Existen también proteínas auxiliares que pueden alterar las propiedades electrofisiológicas o biofísicas de los canales (Coetzee *y col*., 1999).

Todos los canales de K^+ tienen un poro formado por una secuencia de aminoácidos conservada y compartida, que provee la especificidad al canal (Heginbotham *y col*., 1994). Flanqueando la región del poro, en cada subunidad, hay al menos 2 segmentos transmembrana (TMD, por sus siglas en inglés), pero puede haber 2, 4 o 6 TMD, según el tipo de canal (Hille, 2001). Existen distintos tipos de canales de K^+, incluyendo los dependientes de voltaje, los activados por Ca^{2+}, los *inward rectifier*, los de fuga y los activados por Na^+. Siguiendo un criterio estructural, los canales de K^+ pueden clasificarse en 3 grupos según las propiedades estructurales de las subunidades que los conforman (Figura i.9). El primer grupo se conforma por canales formados por subunidades que contienen 6TMD. En este grupo se ubican los canales activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) y los dependientes de voltaje (Kv). El segundo grupo reúne a los canales formados por subunidades que tienen 2TMD. Este grupo comprende a los canales *inward rectifier* (Kir). El tercer grupo está formado por canales que tienen subunidades de 4TMD, conocidas como "subunidades de dos poros", y forman los canales de fuga de K^+. Cada uno de estos grupos luego se divide en subfamilias, con miembros altamente relacionados dentro de cada una (Coetzee *y col*., 1999). En particular, en el primer grupo de canales de K^+ se encuentran los sensibles a Ca^{2+}, como el SK y el BK, y los dependientes de voltaje, que comprenden las subfamilias Kv1-Kv9 (Coetzee *y*

col., 1999). Estos últimos a su vez se subdividen en Kv*m.n*, siendo *m* la subfamilia y *n* el orden en que se lo descubrió (Hille, 2001). Estos canales llevan el nombre de rectificadores tardíos (*delayed rectifiers*) ya que su activación ocurre con una latencia luego de un pulso de voltaje despolarizante (Hodgkin *y col*., 1949).

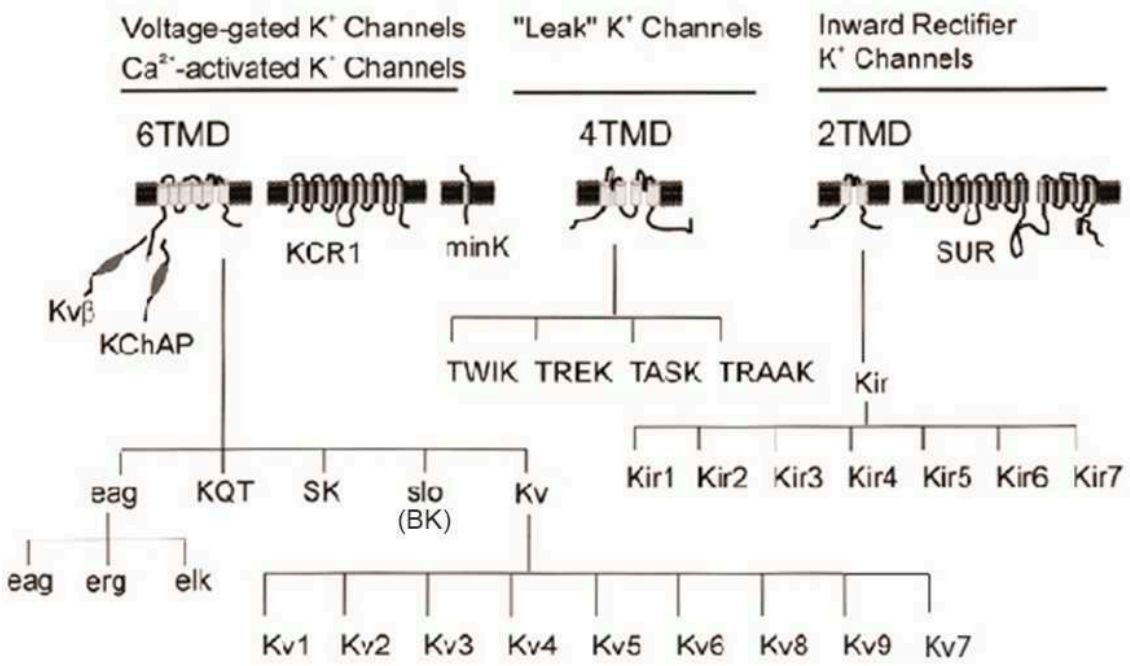

Figura i.9: Canales de K^+. Grupos de de canales de K+ clasificadas según los pasos transmembrana (TMD) de las subunidades que los forman (Adaptado de Coetzee *y col*., 1999).

Para estudiar las características de las corrientes que pasan por los distintos canales se realizan experimentos de electrofisiología con farmacología específica para cada tipo de canal (Coetzee *y col*., 1999). Generalmente pueden expresarse las subunidades deseadas en sistemas de expresión heterólogos, como oocitos de *Xenopus laevis*. Sin embargo, las propiedades de estas corrientes pueden ser distintas a las observadas en sistemas nativos ya que en estos últimos pueden ocurrir modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones, que modifican la corriente, o acoplamiento con canales o proteínas existentes en las células nativas, que les confieren propiedades

específicas (Coetzee *y col*., 1999). Para establecer una conexión entre la corriente de un canal expresado en sistemas heterólogos con la observada en células nativas deben cumplirse ciertos criterios como: relación cercana en sus propiedades biofísicas y sensibilidad a la farmacología; el tejido nativo debe expresar el ARNm y la proteína de esa subunidad; se deben tener consideraciones acerca de su posible acoplamiento con proteínas auxiliares; y posible causalidad de efectos observados por cambios en su expresión, ya sea deleción o sobreexpresión de las subunidades de estudio. Actualmente existen además animales transgénicos en los que puede manipularse selctivamente la expresión de una subunidad y estudiar los efectos electrofisiológicos y consecuencias comportamentales.

En esta tesis nos enfocamos principalmente en los efectos de los canales Kv en la excitabilidad de las ICE, ya que, como mencionamos anteriormente, han sido poco estudiados.

I.4. Enfermedad de Parkinson

I.4.1. Descripción general de la enfermedad y su tratamiento

La enfermedad de Parkinson es una patología neurodegenerativa de distribución universal, que presenta una incidencia anual de alrededor de 11 casos por cada 100000 habitantes. De acuerdo a datos publicados por la *Parkinson's Disease Foundation*, entre 7 y 10 millones de personas padecen esta patología alrededor de todo el mundo, lo que la ubica como la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, siendo la enfermedad de Alzheimer la primera. La edad habitual de inicio es de más de 60 años, y la evolución fluctúa entre 10 y 25 años. Una pequeña proporción de pacientes desarrolla la enfermedad siendo más jóvenes, y se la denomina "de aparición temprana" si aparecen síntomas antes de los 40 años de edad. En general, estos pacientes muestran una evolución más rápida, y distintos estudios han demostrado que una importante proporción de ellos tiene un origen genético.

El examen anátomo-patológico macroscópico del cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson revela atrofia frontal leve con pérdida del pigmento de neuromelanina normal del mesencéfalo. En el examen microscópico, se observa degeneración de las neuronas dopaminérgicas y presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas y cuerpos remanentes de la SNc, de otros núcleos del tronco encefálico y regiones como la corteza temporal, límbica y frontal.

Actualmente no existen marcadores biológicos ni estudios por imágenes patognomónicos, por lo que, para efectuar el diagnóstico, el profesional médico utiliza criterios clínicos bien establecidos. Usualmente, cuando los pacientes son diagnosticados, alrededor del 50-70% de las neuronas dopaminérgicas de la SNc ya ha degenerado (Bezard *y col*., 2001).

La degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc ocurriría como consecuencia de una combinación de factores que incluyen vulnerabilidad genética y factores ambientales (Wider y Wszolek, 2007) que resultan en estrés oxidativo (Dryanovsky *y col*., 2013; Gao *y col*., 2008, 2011; Hwang, 2013), disfunción proteosómica (Demartini *y col*., 2014, Triplett *y col*., 2015), y mitocondrial (Zhu y Chu, 2010). A pesar de los progresos realizados, la etiología última permanece desconocida, hecho que ha impedido el desarrollo de tratamientos que permitan detener el proceso degenerativo (Lees, 2009). El blanco principal de las neuronas dopaminérgicas de la SNc es el estriado, y la denervación de esta estructura junto con la disfunción del circuito de los ganglios de la base, están implicados en la aparición de los principales signos motores de la enfermedad (Figura i.10).

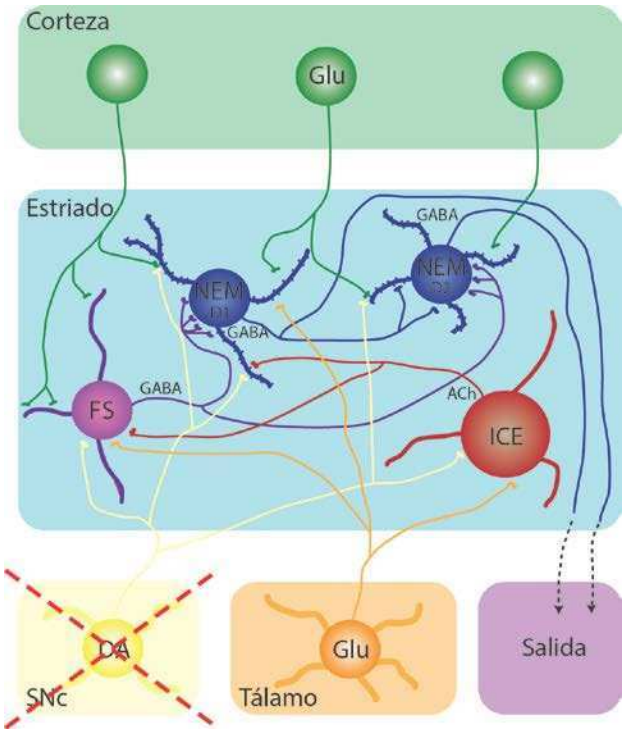

Figura i.10: Esquema general del estriado con sus proyecciones y neuronas que lo conforman, con las neuronas dopaminérgicas de la SNc degeneradas. NEM: neuronas espinosas medianas; FS: interneuronas *fast spiking*; ICE: interneuronas colinérgicas estriatales; ACh: acetilcolina; SNc: sustancia *nigra pars compacta*; DA: dopamina; Glu: glutamato. (Adaptado de Tepper y Bolam 2004). Se indica la degeneración dopaminérgica con una cruz roja.

Los criterios de diagnóstico del Banco de Cerebros de la Sociedad de la enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UK PSDBB) establecen que para hacer el diagnóstico tiene que evidenciarse bradicinesia y al menos uno de los siguientes: rigidez muscular, temblor en reposo de 4-6 Hz, o inestabilidad postural no causada por disfunción visual primaria, vestibular, cerebelar o propioceptiva. Durante los primeros años de la enfermedad los trastornos motores no suelen ser incapacitantes. Sin embargo, progresivamente ocurre un deterioro motor significativo con alteración de las actividades de la vida cotidiana, como la ambulación, el lenguaje, la alimentación y el aseo personal, produciéndose una total dependencia del tratamiento sintomático.

La bradicinesia, además de ser la manifestación más habitual de la enfermedad, es la más incapacitante. Se observan también diversos síntomas no motores, como depresión (presente en hasta en el 50% de los pacientes) y ansiedad, alteraciones cognitivas, trastornos del sueño, anormalidades sensoriales y dolor, anosmia y alteraciones de la función autonómica. Trastornos urinarios, hipotensión ortostática y alteraciones neuropsiquiátricas como demencia, alucinaciones y delirios, suelen

hacerse evidentes luego de varios años de desarrollo de la enfermedad y en alguna medida responden a interacciones entre la patología y su tratamiento farmacológico crónico.

La principal terapéutica utilizada hoy en día se basa en recomponer la actividad neuronal en los núcleos privados de inervación dopaminérgica mediante la administración de fármacos que la modulan positivamente, como la levodopa y los agonistas de receptores D2. La levodopa (o L-DOPA), es un precursor de la dopamina (así como también de todas las catecolaminas), y es el tratamiento más utilizado hoy en día. Al administrar L-DOPA a los pacientes, las neuronas dopaminérgicas remanentes la captan y pueden aumentar la liberación de DA en el estriado. Para que las neuronas catecolaminérgicas del sistema nervioso periférico no aumenten la síntesis de sus neurotransmisores, la L-DOPA se co-administra con un inhibidor de la DOPA decarboxilasa, como la carbidopa o benserazida, que no atraviesa la barrera hematoencefálica. Esta combinación de fármacos sigue siendo la terapéutica más efectiva sobre la sintomatología motora, y su introducción en el tratamiento de la enfermedad incrementó enormemente la esperanza de vida de los pacientes (Parkinson y Group, 2004). Tras el inicio del tratamiento se produce un importante beneficio clínico durante 5-7 años. Luego pueden presentarse efectos adversos, como complicaciones motoras conocidas como fluctuaciones y discinesias. Las discinesias son movimientos involuntarios que pueden adoptar la forma de corea, balismo, distonia, atetosis, estereotipías o mioclonías. Hasta el 50% de los pacientes con enfermedad de Parkinson tratados en un lapso de cinco años con L-DOPA desarrollan estas complicaciones. Los tratamientos con la administración de agonistas dopaminérgicos o con inhibidores de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B, que degrada la DA en la brecha sináptica) también son clínicamente efectivos al comienzo de la enfermedad (Goudreau *y col*., 2016), pero en última instancia casi todos los pacientes deben recibir L-DOPA.

Debido a la aparición de estos severos efectos adversos, en muchos casos también se practican tratamientos neuroquirúrgicos para paliar los signos clínicos (Benabid *y col*., 2009). La principal técnica neuroquirúrgica utilizada es la estimulación a alta frecuencia

del NST. Suele utilizarse luego de que los pacientes desarrollan discinesias, y se ha observado una disminución en su aparición y de la dosis de L-DOPA requerida, que se refleja en una mejoría clínica significativa (Benabid *y col*., 2009).

Previo a la aparición de la L-DOPA como tratamiento antiparkinsoniano, los "anticolinérgicos" (antagonistas de receptores muscarínicos) eran el mejor tratamiento existente para la enfermedad (Barbeau, 1962). La terapia se basaba en la idea de que balance entre DA y ACh se encuentra alterado resultando en un estriado "hipercolinérgico" (Barbeau, 1962). Su uso disminuyó por su menor eficacia relativa comparada con la de la L-DOPA, y a falta de experimentos bioquímicos que demostrasen los cambios en la liberación de ACh o en la actividad de las ICE en ese momento. Además, los anticolinérgicos tienen efectos secundarios cognitivos y autonómicos que aun limitan su utilidad clínica (Katzenschlager *y col*., 2003). Sin embargo, a veces se utilizan como terapia conjunta con L-DOPA para aliviar algunos síntomas como el temblor (Lester *y* col., 2010; Duvoisin, 1967; Katzenschlager *y col*., 2003). Resta establecer si terapias mejor dirigidas a re-establecer la función de las ICE, en lugar de afectar globalmente los receptores muscarínicos, tienen valor en el tratamiento de la enfermedad. En ese sentido, un estudio reciente demostró que la inhibición por técnicas de optogenética de las ICE reduce los sígnos de déficit motor en un modelo de parkinsonismo en ratón (Maurice, *y col*., 2015).

I.4.2. Alteraciones circuitales que siguen a la degeneración dopaminérgica

Dado que el estriado es el blanco principal de la inervación dopaminérgica, la fisiopatología de la enfermedad está vinculada con la disfunción de este núcleo y su impacto sobre otras estructuras del circuito. Como mencionamos anteriormente la DA actúa como modulador del circuito estriatal y su carencia repercute en el funcionamiento de las vías directa e indirecta de los ganglios de la base. Se producen cambios en la ganancia de ambas vías que resultan en una mayor inhibición de las

proyecciones tálamocorticales y la aparición de los rasgos hipocinéticos de la enfermedad (Figura i.11).

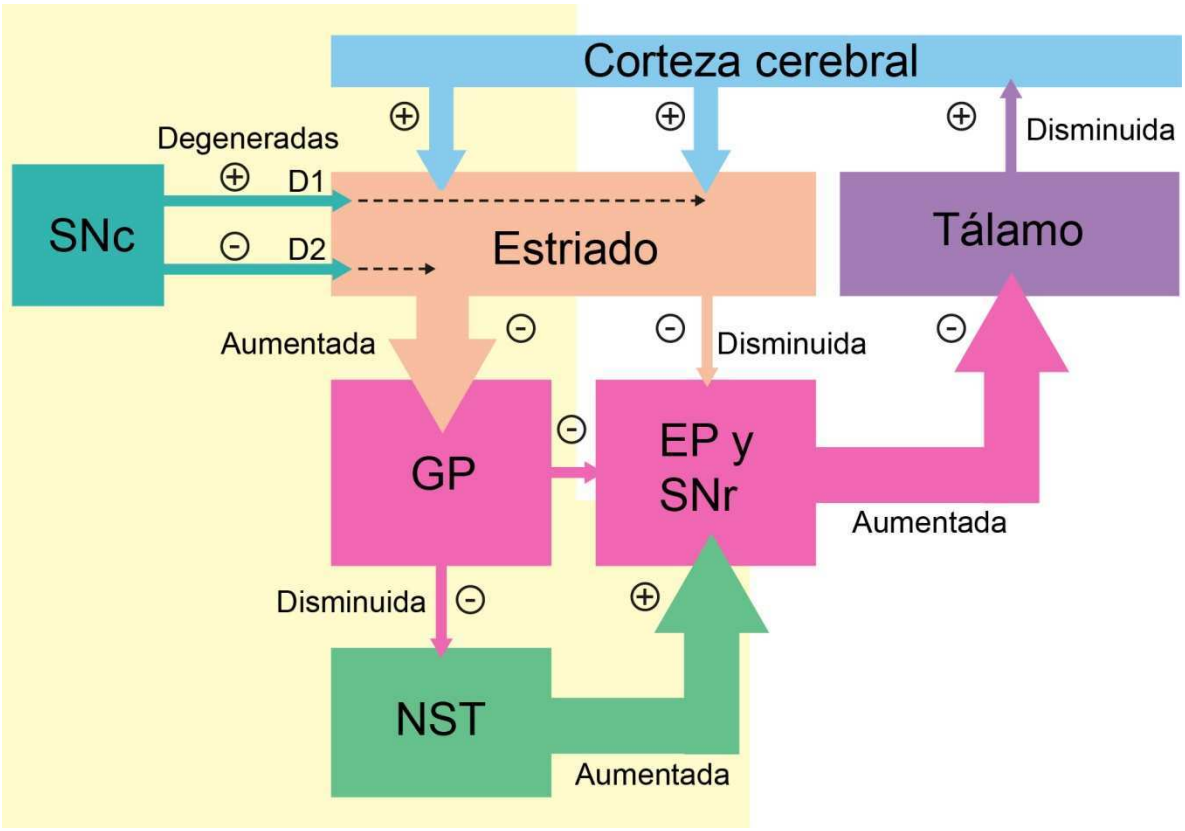

Figura i.11: Alteraciones en el circuito de los ganglios de la base en la enfermedad de Parkinson. SNc: sustancia *nigra pars compacta*; GP: globo pálido; NST: Núcleo subtalámico; EP: núcleo entopeduncular; SNr: sustancia *nigra pars reticulata*. ⊕: proyecciones excitatorias; ⊖: proyecciones inhibitorias. El fondo amarillo delimita la vía indirecta. (Adaptado de Neuroscience - Purves, 3ª Edición).

Esta hipótesis fue examinada con modelos animales en los que se lesionó la SNc y se realizaron registros electrofisiológicos y se vieron alteradas las actividades de ambas vías (Mallet *y col.*, 2006; Escande *y col*., 2016). Paralelamente, se demostró utilizando técnicas de opto-y fármaco-genética que la manipulación de la actividad de las vía directa e vía indirecta produce cambios en la actividad motora según lo provisto en

dicho modelo (Kravitz *y col.,* 2010). Además, diversos trabajos mostraron que incrementar los niveles estriatales de DA consiguen disminuir la acinesia en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Ciesielska *y col*., 2011). Este modelo interpreta entonces a la acinesia y bradicinesia no como signos negativos que se originan por una pérdida del funcionamiento del circuito, sino como signos positivos que emergen como resultado de una actividad anormal excesiva de la vía indirecta. Supone además que los signos clínicos de la enfermedad ocurren como consecuencia de cambios tónicos en la frecuencia de disparo de las neuronas de los distintos núcleos. Sin embargo, a medida que pasaron los años y más grupos de investigación comenzaron a estudiar el circuito de los ganglios de la base, se presentaron contradicciones entre las predicciones del modelo y hallazgos experimentales. Por ejemplo, lesiones en los núcleos talámicos que reciben proyecciones de los núcleos de salida no inducen parkinsonismo, sino que incluso son beneficiosos en el tratamiento del temblor y rigidez. Por otro lado, diversos estudios fallaros en encontrar cambios en la frecuencia de disparo de las neuronas del GP (Boraud *y col*., 2002), tálamo (Pessiglione, 2005) y corteza motora (Goldberg *y col*., 2002) en monos modelo de la enfermedad de Parkinson, y enfatizaron la aparición de cambios en el patrón de disparo, como ser la aparición de oscilaciones y sincronizción neurnal exageradas (Bergman *y col*., 1998; Tseng *y col*., 2001ab; Magill *y col*., 2001). Todos estos descubrimientos sugieren que otros factores, además del cambio en la frecuencia de disparos de las NEM, son importantes en el desarrollo de la enfermedad. No está claro cómo el estado hipercolinérgico descripto se conecta con los cambios que ocurren en ambas vías de los ganglios de la base y contribuye a los síntomas de la enfermedad. Estudios recientes sugieren que el amento estriatal de ACh promovería la aparición de oscilaciones de actividad neuronal que recuerdan a las que se presentan en modelos animales y pacientes con enfermedad de Parkinson (Kopell *y col*., 2006).

I.4.3. Modelos animales de la enfermedad de Parkinson

Para estudiar la enfermedad de Parkinson en los laboratorios se hace uso de modelos animales, ya que la enfermedad no ocurre de manera natural en otras especies. Los modelos se obtienen induciendo la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Para que un modelo pueda ser considerado como tal, debe tener validez de apariencia (*face validity*), es decir, debe presentar síntomas similares a los de la enfermedad; o bien validez predictiva, es decir, debe responder a la terapéutica de igual manera que lo hace el paciente; o debería tener validez de constructo, es decir, debe presentar el mismo agente etiológico que la enfermedad a modelar.

Existen distintos modelos animales de la enfermedad de Parkinson. Algunos son modelos genéticos, como por ejemplo el modelo de α-synucleína (α-syn). Se sabe que la α-syn forma parte de los cuerpos de Lewy y que hay una alta correlación entre los niveles de expresión de α-syn y la severidad de la enfermedad (Ross *y col*., 2008), y se utilizan animales genéticamente modificados en los que se sobre-expresa α-syn como modelo de la enfermedad de Parkinson (Schirinzi *y col*., 2016). Los modelos genéticos son ampliamente utilizados para aumentar nuestra comprensión de la etiología de la enfermedad, pero aún no ha sido posible reproducir una degeneración neuronal tan completa, de comienzo en el adulto y selectiva de las neuronas DA como la que se observa en los pacientes, mediante manipulaciones genéticas.

Sin embargo, existen modelos con validez de apariencia en los que se induce degeneración de la SNc, o bloqueo de la liberación de DA, para simular la lesión que ocurre en la enfermedad de Parkinson, que son ampliamente utilizados para estudiar la fisiopatología de la enfermedad. Estos modelos son muy populares ya que han permitido desarrollar terapias farmacológicas sintomáticas (validez predictiva) que, si bien no afectan el curso natural de la degeneración, producen un beneficio clínico notable en los pacientes. Así, experimentos realizados en ratones tratados con reserpina, fármaco que vacía de DA las terminaciones dopaminérgicas, demostraron que la acinesia resultante es revertida por L-DOPA (Carlsson *y col*., 1957), abriendo el camino a la terapéutica que aún hoy es la más utilizada para tratar a los enfermos.

El modelo más utilizado en monos es inducido por la toxina MPTP, que, como es capaz de atravesar barreras como la hematoencefálica, induce degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc cuando se lo administra por vía sistémica. Los monos inyectados con esta toxina presentan acinesia y temblor similar a lo que aparece en pacientes, y responden al tratamiento con L-DOPA (Aosaki *y col*., 1994a). Como los animales sufren una lesión bilateral y carecen de autonomía para alimentarse si no reciben L-DOPA, a veces se practica la inyección intracarotídea unilateral de MPTP, de manera que se logra una lesión unilateral que provoca sígnos motores solo del lado contralaeral del cuerpo.

En roedores hay modelos farmacológicos en los que no se induce degeneración, y otros en los que se destruyen las neuronas dopaminérgicas con toxinas. El modelo de reserpina continúa siendo utilizado. La reserpina bloquea los transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT) de manera irreversible, por lo que no pueden cargase de DA las vesículas sinápticas. Esta droga se administra de manera intraperitoneal durante entre 3 y 5 días consecutivos y gradualmente provoca la aparición de déficits cognitivos y motores (Santos *y col*., 2013). Los síntomas motores son reversibles luego de 30 días de finalizado el tratamiento (Santos *y col*., 2013), lo que lo hace diferir de la enfermedad de Parkinson.

Aunque el MPTP también induce cierto grado de degeneración de neuronas DA en roedores, es más utilizada la toxina 6-OHDA dado el alto riesgo que implica para los investigadores manipular el MPTP. La 6-OHDA es captada por los transportadores de DA (y de noradrenalina) y destruye a las neuronas a través de la formación de radicales libres. Dado que no atraviesa la barrera hematoencefálica, generalmente se la inyecta en el haz medial del cerebro anterior (*medial forebrain bundle*, MFB), que es la región por donde pasan los axones de las neuronas dopaminérgicas que se dirigen al estriado. También puede inyectarse directamente en estriado o en la SNc. La neurodegeneración dopaminérgica obtenida es permanente y semeja la observada en la enfermedad de Parkinson. Usualmente esta toxina se inyecta de un solo lado del cerebro, generando así una lesión unilateral, hecho que permite que el animal se nutra de manera autónoma. Este modelo tiene validez de apariencia, ya que presenta déficits

motores similares a los presentados por pacientes con enfermedad de Parkinson, como la hipocinesia y bradicinesia (Simola *y col*., 2007). Además tiene validez predictiva, ya que al tratar a estos animales con L-DOPA, revierten los síntomas parkinsonianos, y luego de varias presentaciones del fármaco, una gran proporción desarrolla discinesias que también recuerdan a las que ocurren en los pacientes (Cenci, 2002).

I.4.4. Interneuronas colinérgicas en la enfermedad de Parkinson

Se ha postulado por mucho tiempo que en la enfermedad de Parkinson el balance entre DA y ACh se encuentra alterado resultando en un estriado "hipercolinérgico" (Barbeau, 1962). De hecho, los antagonistas de receptores muscarínicos eran las drogas de elección para el tratamiento de la enfermedad antes del descubrimiento de los efectos benéficos de la L-DOPA. Aún se acepta que las drogas anticolinérgicas poseen un efecto terapéutico, pero los efectos adversos periféricos y relacionados con la función cognitiva limitan su utilidad (Katzenschlager *y col*., 2003). Diversos estudios demostraron un aumento en la concentración extracelular de ACh en el estriado en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (DeBoer *y col*., 1996). Los mecanismos subyacentes al estado hipercolinérgico permanecen inciertos.

Como mencionamos anteriormente, la DA modula la frecuencia de disparo de las ICE (Bennett y Wilson, 1998). Sin embargo, su frecuencia de disparo espontánea no se modifica en monos parkinsonianos (Aosaki *y col*., 1994a; Raz *y col*, 1996, 2001). En estos trabajos tampoco se encontraron cambios en el grado de sincronización de las ICE, aunque sí un aumento en su actividad oscilatoria. Sin embargo, no resulta claro que el aumento de actividad oscilatoria pueda explicar el estado "hipercolinérgico" estriatal.

Ding y colaboradores (2006) propusieron una hipótesis alternativa sobre el origen del desbalance ACh/DA. Los autoreceptores M_4 presentes en las ICE están acoplados a proteínas G inhibitorias, que al activarse disminuyen la liberación de ACh a la brecha

sináptica mediante la regulación de canales Ca_v2. Existe un tipo de proteínas reguladoras de proteína G (RGS por sus siglas en inglés), que funcionan como aceleradoras de GTPasas. Ding y colaboradores demostraron que la RGS4, a diferencia de otras RGS, se encuentra elevada en las ICE de ratones parkinsonianos. Dicho aumento reduciría la actividad de la proteína G_i acoplada al M_4, atenuando la influencia inhibitoria de este receptor sobre la liberación de ACh. No se conoce el mecanismo por el cual la falta de DA desregula la expresión de RGS4 en las ICE, pero sí se sabe que su expresión está regulada negativamente por la proteín-kinasa A (PKA) en algunos sistemas (Ni *y col*., 1999; Pepperl *y col*., 1998). Por lo tanto, los autores propusieron que la falta de DA resultaría en una disminución de la activación de los receptores D5 y una menor activación de la PKA, resultando en un aumento de la expresión de RGS4 (Ding *y col*., 2006). Este mecanismo explicaría el aumento de la liberación de ACh sin cambios en la frecuencia de disparo de las ICE (Ding *y col*., 2006).

Por otro lado, Sanchez y colaboradores (2011) demostraron que las ICE de ratas lesionadas con 6-OHDA son más excitables que las de ratas control. Específicamente, mostraron una disminución en su acomodación (Figura i.12A-B) y en su IsAHP (Figura i.12C). En paralelo, demostraron que la acomodación y una componente de la IsAHP son sensibles a Ba^{2+} (bloqueante de canales de K^+) (Figura i.12D-F). Estos resultados les perimitieron proponer que la acomodación de las ICE depende de un canal de K^+ sensible a Ba^{2+} que subyace a una componente de la IsAHP, la cual estaría alterada en ratas parkinsonianas, confiriéndoles un fenotipo hiperexcitable. Sin embargo, dado que se desconoce qué canal media la IsAHP no fue posible analizar en más detalle el correlato molecular de los cambios observados.

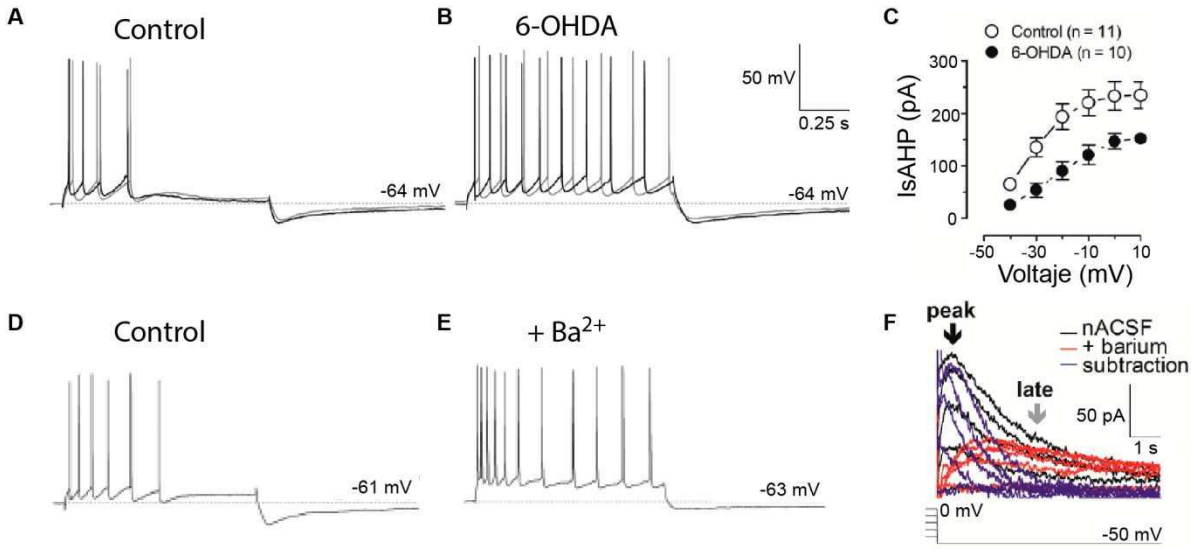

Figura i.12: Aumento de excitabilidad de ICE en ratas parkinsonianas. (A-B) Registros representativos de una ICE que acomoda de una rata control (A) y una que no acomoda de una rata 6-OHDA (B) en respuesta a un pulso de corriente despolarizante (negro: 140 pA; gris: 230 pA). **(C)** IsAHP para distintos voltajes para ICE de ratas control y 6-OHDA. **(D-E)** Registros representativos de una ICE antes (D) y después (E) de la aplicación de Ba^{2+} (200 μM) en respuesta a un pulso de corriente despolarizante. **(F)** Registro representativo de la IsAHP medida en una ICE antes (negro) y después (rojo) de la aplicación de Ba^{2+} (200 μM). En violeta se muestra la corriente sensible a Ba^{2+}. En todos los casos se muestra Media±EE. (Todos los resultados son de Sanchez *y col*., 2011).

Por otro lado, como mencionamos anteriormente, frente a la aparición de un evento saliente durante un aprendizaje orientado a obtener metas, las ICE presentan una respuesta de pausa que desaparece en animales modelo de la enfermedad de Parkinson (Aosaki *y col*., 1994a) (Figura i.6B). Por un lado, Deng y colaboradores (2007) proponen que la DA inhibe la corriente I_h mediante la activación del receptor D2, prolongando la pausa. En un animal parkinsoniano, la pausa se reduciría dado que I_h no estaría inhibida por DA. Paralelamente, Sanchez y colaboradores (2011) proponen que una disminución de IsAHP causada por la degeneración dopaminérgica podría contribuir a la desaparición de la respuesta de pausa de las ICE.

Remarcando la importancia del rol de las ICE en modelos animales de la enfermedad de Parkinson, en un trabajo reciente publicado por Maurice y colaboradores (2015) se demostró que la inhibición mediante optogenética de las ICE en un ratón parkinsoniano

reduce los síntomas motores. Además observaron que la depleción dopaminérgica nigroestriatal aumenta la excitabilidad de las dNEM, y la inhibición de las ICE la disminuye, contribuyendo a la recomposición del balance entre las vías directa e indirecta, lo que probablemente también contribuya al alivio de los síntomas motores de la enfermedad observado al inhibir las ICE.

En resumen, las ICE sufren cambios en su actividad y liberación de ACh, que contribuyen a producir los déficit motores en modelos animales y posiblemente pacientes que sufre la enfermedad de Parkinson. Una mejor comprensión de los mecanismos que originan el estado hipercolinérgico podría ayudar a mejorar las estrategias terapéuticas disponibles y la calidad de vida de los pacientes con enfermedad de Parkinson.

Objetivos e hipótesis

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Las ICE regulan la función estriatal por dos mecanismos: i. la generación de un tono local de ACh debido primariamente a la descarga tónica de potenciales de acción; ii. señales fásicas que emiten en respuesta a aferencias principalmente talámicas en relación con eventos ambientales relevantes como ser recompensas. Aunque se conoce que tanto la actividad tónica como las respuestas a inputs excitatorios son reguladas por corrientes intrínsecas, su regulación por corrientes de K^+ dependientes de voltaje no había sido estudiada en las ICE. Por otro lado, aunque se sabe que la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc desencadena cambios en las ICE que contribuyen a los síntomas parkinsonianos, qué cambios ocurren y cuáles son los mecanismos subyacentes a los mismos son tema de debate. Esta tesis se enmarca en el **objetivo general de caracterizar los mecanismos intrínsecos que gobiernan la actividad de las ICE en condiciones fisiológicas y patológicas, con foco en corrientes de Kv y la enfermedad de Parkinson,**

En particular, Sanchez y colaboradores (2011) encontraron que las ICE presentan un fenotipo ¨acomodador¨ frente a la inyección de corriente despolarizante que dependería de una IsAHP no canónica, ya que IsAHP es considerada como dependiente de Ca^{2+} pero la acomodación fue insensible al bloqueo de los canales Ca_v que activarían IsAHP. **Como primer objetivo específico nos propusimos identificar cuáles son los mecanismos que regulan la excitabilidad de las ICE, bajo la hipótesis que IsAHP podría tener un componente dependiente de voltaje en estas neuronas.** Esta visión está en línea con estudios que muestran que la acomodación depende de distintos tipos de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y voltaje en distintos tipos neuronales (Tzingounis y Nicoll, 2008; Faber y Sah, 2004). Por otro lado, poco se conoce sobre el rol de IsAHP, y de manera más general, de las corrientes Kv, en la regulación de los patrones fisiológicos de actividad de las ICE. Por lo tanto, **nuestro segundo objetivo específico fue determinar el rol de estas corrientes en su actividad tónica y capacidad de integración de *inputs* glutamatérgicos.** Hipotetizamos que las corrientes que median la acomodación de las ICE limitan su

actividad espontánea y la integración de las señales provenientes del tálamo, pudiendo generar pausas (AHPs) que serían relevantes para comprender la respuesta de las ICE frente a eventos ambientales prominentes.

Por último, Sanchez y colaboradores (2011) encontraron que tanto la acomodación como la IsAHP se encuentran reducidas en ICE de ratas parkinsonianas, pero no determinaron la identidad farmacológica-molecular del canal implicado en dicha hiperexcitabilidad, ni si la hiperexcitabilidad incide sobre la respuesta de las ICE a los inputs sinápticos que generan su respuesta ante recompensas. Por ello, como **tercer objetivo nos propusimos caracterizar el fenotipo hiperexcitable en ratones, y particularmente, establecer si dicha hiperexcitbilidad se asocia a una respuesta alterada a inputs excitatorios. Finalmente, nos propusimos determinar el mecanismo subyacente a la hiperexcitabilidad observada en el parkinsonismo.** Nuestra hipótesis fue que la disminución de una corriente Kv explica el fenotipo hiperexcitable de las ICE en el parkinsonismo.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

M.1. Animales

Utilizamos ratones C57/BL6 y ratones que expresan la proteína fluorescente roja tdTomato en todas las neuronas que expresan la proteína Colina Acetil-Transferasa (a los que llamaremos ChAT-Cre;tdT). Obtuvimos estos ratones como la F1 de la cruza de ChAT-Cre (B6;129S6-Chat$^{tm2(crc)Lowl}$/J, Stock 6410) (Rossi *y col.*, 2011) y Rosa-CAG-LSL-tdTomato-WPRE (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor$^{tm14(CAG-tdTomato)Hze}$/J, stock 7914)(Madisen*y col*., 2010), ambos obtenidos de Laboratorios Jackson. Armamos jaulas de cría con un macho y 1 o 2 hembras de más de 9 semanas de edad. Utilizamos tanto machos como hembras juveniles (de 14 a 45 días posnatales) y adultos (de 60 a 250 días posnatales) de la F1 obtenida de los apareos recién mencionados. Los animales experimentales se mantuvieron en un máximo de 6 por jaula, y fueron alimentados *ad libitum* con ciclos de 12:12 horas de ciclo luz:oscuridad (la luz se enciende a las 7 am). Se respetaron los cuidados establecidos institucionalmente (IACUC de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) y gubernamentales (SENASA, Argentina).

Para algunos experimentos utilizamos ratones *knockout* de Kv1.3 (KO Kv1.3) (B6;129S1-Kcna3^{tm1Lys}/J) y controles de la misma colonia. Los experimentos con estos ratones se realizaronen la Universidad Rosalind Franklin de Chicago, Illinois, Estados Unidos, siguiendo los protocolos experimentales aprobados por la Universidad y directivas del NIH.

M.2. Cirugía estereotáxica

M.2.1. Inyección de vector lentiviral con ChR2-YFP

Para realizar la cirugía los ratones fueron anestesiados con isofluorano (4% en O_2 para la inducción, 0,5-1% para mantenimiento) y montados en un marco estereotáxico (Kopf Instruments; USA). Realizamos una única inyección de un vector viral que expresa channelrhodopsin 2 (ChR2) acoplado a la proteína fluorescente YFP (ChR2-YFP) en el tálamo del hemisferio izquierdo, siguiendo las siguientes coordenadas medidas desde el Bregma: -1,3 mm anteroposterior, 0,8 mm lateral y -3 mm dorsoventral desde la dura madre (Paxinos y Franklin, 2001). Realizamos las inyecciones a una tasa de 0,5 μl/min usando una cánula de 300 μm de diámetro, unida a una aguja Hamilton de 25 μl, controlada por una bomba motorizada (Bioanalytical Systems, USA). Luego de la inyección, esperamos al menos 1 mes para realizar los experimentos. Para comprobar la efectividad de la transfección perfundimos y cortamos 2 cerebros (ver más adelante) a la altura de tálamo y estriado y los observamos al microscopio confocal (ver más adelante y Figura r.15).

M.2.2. Lesión dopaminérgica

Para inducir la degeneración dopaminérgica nigroestriatal inyectamos la neurotoxina 6-hidroxidopamina HBr (6-OHDA) en el haz medial del cerebro anterior (*medial forebrain bundle*, MFB), el tracto por el que pasan los axones de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* en su trayecto hacia el cerebro anterior (Figura m.1A). Utilizamos anestesia inhalatoria siguiendo los mismos procedimientos que detallamos anteriormente. La 6-OHDA (Sigma Aldrich AB) fue disuelta en salina-ácido ascórbico 0,1%, en una concentración de 4 μg/μl de droga base. Utilizamos hembras adultas (de alrededor de 90 días de edad). Inyectamos 1 μl de la solución en el MFB del hemisferio izquierdo siguiendo las siguientes coordenadas: 1 mm anteroposterior,

1,1 mm lateral y 4,8 mm dorsoventral medidos desde la dura madre (Paxinos y Franklin, 2001). La velocidad de inyección fue de 0,5 μl/min, y utilizamos una cánula de 300 μm de diámetro unida a una jeringa Hamilton controlada por una bomba motorizada (Bioanalytical Systems, USA). Mantuvimos la cánula en el sitio de inyección por 6 minutos luego de la inyección, y la retiramos lentamente y cuidando que no hubiera reflujo de la toxina. Los animales control (sham) recibieron una inyección de salina-ácido ascórbico 0,1% en el MFB y fueron manipulados de igual manera que los que recibieron la 6-OHDA. La asignación de cada ratón a cada tratamiento fue hecha al azar. Luego de la cirugía, durante todos los días, los ratones fueron pesados y recibieron una inyección subcutánea de solución salina y fueron alimentados con una dieta rica en azúcares y grasas para que recuperen su peso (alrededor de 20 días luego de la cirugía). Una vez recuperados, los ratones pasaron por una serie de ensayos conductuales para evaluar los signos de parkinsonismo. Al menos 7 días después de los ensayos conductuales realizamos los registros electrofisiológicos y fijamos la parte del cerebro que contiene la sustancia *nigra pars compacta* y, al menos 3 días después, realizamos el análisis de expresión de tirosina hidroxilasa (TH) por inmunohistoquímica para confirmar el grado de lesión dopaminérgica (ver más adelante y Figura m.1B).

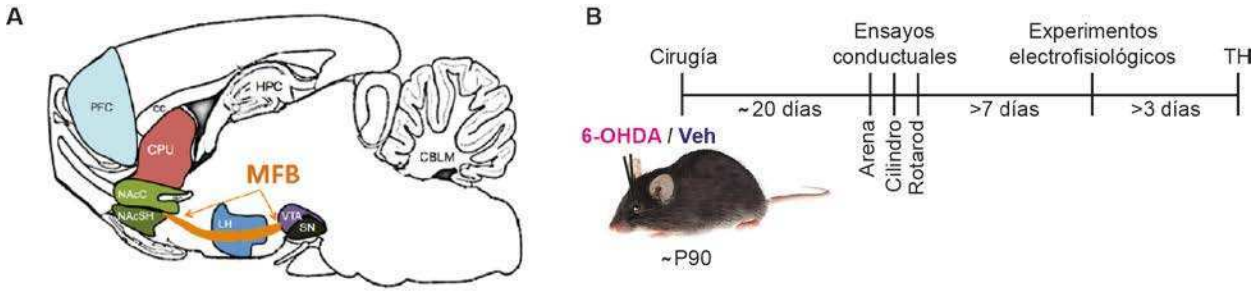

Figura m.1: Inyección de 6-OHDA. (A) Esquema de corte parasagital de un cerebro de un ratón en el que se detalla el *medial forebrain bundle* (MFB), que va desde la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) y área tegmental ventral (VTA) hacia el estriado (CPU y NAc) (Modificado de Negus y Miller, 2014). **(B)** Esquema que muestra el protocolo experimental utilizado. Entre cada ensayo conductual hubo al menos 1 día de separación.Veh: vehículo.

M.3. Ensayos conductuales

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

Arena abierta: medimos la cantidad de rotaciones espontáneas de los ratones en una arena abierta (40 x 40 cm) durante 15 minutos. Durante todo el ensayo la actividad de los ratones fue filmada por una cámara cenital, y la posición de los ratones en función del tiempo fue determinada por el sistema de rastreo automático ANY-maze. Calculamos el índice de rotaciones ipsilaterales como el número de rotaciones ipsilaterales sobre el número de rotaciones totales (ver Figura r.16).

Cilindro: Introdujimos al ratón en un cilindro vertical de acrílico transparente de 10 cm de diámetro y 14 cm de alto. El test consiste en contar cuántas veces el ratón usa la pata delantera contralateral, la ipsilateral o ambas juntas, para apoyarse en la pared al realizar una exploración vertical durante 5 minutos. Todo el ensayo fue filmado con una videocámara lateral. Calculamos un índice de asimetría como el número de veces que apoya la pata contralateral respecto al total.

Rotarod: Pusimos a los ratones a caminar en un rotarod acelerado (de 4 a 40 rpm en 3 minutos; Ugo Basile, Italia) y evaluamos la latencia a caerse del rodillo. Cada animal fue testeado 5 veces seguidas separadas por 5 minutos cada una.

M.4. Electrofisiología

M.4.1. Obtención de tejido *ex vivo* para registros electrofisiológicos

Anestesiamos a los ratones con hidrato de cloral (600 mg/kg, i.p.) y luego los decapitamos. Rápidamente sacamos el cerebro y lo pusimos en una solución de corte fría y carbogenada (95% O_2 / 5% CO_2) que contenía: 125 mMNaCl, 2,5 mMKCl, 1,3 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 26 mM NaHCO3, 0,5 mM $CaCl_2$, 2,5 mM $MgCl_2$ y 10 mM glucosa. Preparamos el cerebro para realizar cortes coronales a la altura del estriado en un vibrátomo (Pelco T series 1000, Ted Pella). Cortamos rodajas de 300 μm de espesor y las transferimos a una cámara conteniendo la misma solución, las mantuvimos a 34ºC durante 30 minutos y luego las dejamos a temperatura ambiente hasta el momento de registro.

M.4.2. Registros electrofisiológicos

Para realizar los registros transferimos las rodajas a una cámara de registro perfundida mediante un bomba peristáltica (Ismatec, Alemania) con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF por sus siglas en inglés) a una tasa de 3 ml/min. El ACSF contenía: 125 mMNaCl, 2,5 mMKCl, 1,3 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 26 mM NaHCO3, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$ y 10 mM glucosa. La temperatura en la cámara fue de 34ºC mantenida con un controlador de temperatura TC-344B (Warner Instruments). Antes de realizar los registros dejamos equilibrar las rodajas durante 10 minutos en la cámara. Registramos ICE de la región dorsolateral del estriado, la cual corresponde a la región motora. Identificamos las neuronas registradas con un microscopio Nikon Eclipse equipado con un objetivo de inmersión en agua 40x, con óptica DIC y para fluorescencia, y una cámara infraroja conectada a un monitor y a la computadora. Utilizamos pipetas de registro de borosilicato estirados con un *puller* (P-97, Sutter Instruments), de resistencia entre 4 y 7 MΩ.Para los registros en *whole cell*, llenamos las pipetas con

solución intracelular: 20 mMKCl, 120 mM K-gluconato, 1 mM HEPES, 2 mM Na_2ATP, 0,3 mMNaGTP, 0,1 mM EGTA, 10 mMfosfocreatina y 2 mM $MgCl_2$, pH 7,3 ajustado con KOH. Para los registros de las ICE de ratones KO Kv1.3 incluimos neurobiotina en la solución intracelular para luego verificar su morfología celular. Para los registros en *cell attached* llenamos las pipetas con ACSF. Ralizamos los registros con un amplificador Axoparch-1D (Molecular Devices), con excepción de los registros en ratones KO Kv1.3, que realizamos en la Universidad RosalindFranklin de Chicago, Illinois, Estados Unidos, con un amplificador Multiclamp 200B (Molecular Devices), a una frecuencia de muestreo de 20 kHz (Digidata 1322A, Molecular Devices) en una computadora equipada con pClamp 9.2 (Molecular Devices). Las células consideradas para analizar superaban los siguientes criterios: resistencia en serie entre 10 y 30MΩ, potencial de acción mayor o igual a 50 mV desde el umbral al pico y con "overshoot", y potencial de membrana en reposo entre -75 y -45 mV. Para los registros en *voltage clamp* compensamos la capacitancia y la resistencia en serie (mínimo 60%). No hicimos la substracción de la conductancia de fuga (*leak conductance*).

M.4.3. Estimulación

M.4.3.1. Estimulación eléctrica

Para evaluar la integración sináptica realizamos estimulación eléctrica intraestriatal con un electrodo bipolar fabricado en el laboratorio con alambre teflonado de 76μm, retorcido. Establecimos la intensidad de corriente de estimulación con una unidad aisladora de estímulos (Isoflex). Utilizamos cinco pulsos de 0.3 ms de duración a 20 Hz. Calibramos la intensidad de estimulación para que la respuesta postsináptica fuera subumbral y mantuvimos la misma intensidad antes y después del agregado de drogas. Apoyamos el electrodo sobre el tejido a alrededor de 500 μm de la célula registrada y

confirmamos que no estábamos estimulando eléctricamente la célula registrada bloqueando la transmisión glutamatérgica (ver Figura r.14).

M.4.3.2. Estimulación optogenética

Para realizar la estimulación optogenéticautilizamos un láser LED de 447 nM, 1W (Tolket, Argentina) y una fibra óptica de 200 μm de diámetro situada a menos de 300 μm de la célula de registro. Aplicamos cinco pulsos de luz a 20 Hz, cada pulso duró 10 ms.

M.4.4. Manipulaciones farmacológicas

Preparamos todas las drogas como soluciones stock en H_2O (salvo indicación en contrario) que luego diluimos en ACSFy aplicamos mediante la perfusión. Utilizamos las siguientes drogas en las siguientes concentraciones finales: ADWX-1 (0,1, 1 y 10 nM, Alomone labs), $CdCl_2 \cdot H_2O$ (200 μM, Sigma), SCH23390 (1 μM, Sigma), ZD7288 (30 μM, Sigma), Tetrodotoxina (TTX, 1 μM, Alomone labs), CNQX (50 μM, stock preparado en DMSO, Sigma), picrotoxina (100 μM, stock preparado en DMSO, Sigma), sulpiride (10 μM, stock preparado en DMSO, Santa Cruz Biotechnology), Tityustoxin (TsTx, 100 nM, stock preparado en *buffer* recomendado, Alomone labs), Agitoxin-2 (AgTx-2, 30 nM, stock preparado en *buffer* recomendado, Alomone labs), α-Dendrotoxin (α-DTX, 100 nM, stock preparado en *buffer* recomendado, Alomone labs) y Margatoxin (MgTx, 300 nM, stock preparado en *buffer* recomendado, Alomone labs). *Buffer* recomendado: 0,1% BSA, 100 mMNaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA. Algunas drogas fueron incluidas en la solución de registro en la pipeta: RGS4 (50 pM y 1 nM, GenwayBiotech), CCG63802 (100 μM, preparado en DMSO, R&D Systems),

anticuerpo anti-Kv1.3 que reconoce el epítope intracelular (10 μg/ml, Neuromab) y *goat* anti-*guinea pig*biotinilado (10 μg/ml, Vector).

M.4.5. Análisis de registros electrofisiológicos

Utilizamos el *software* ClampFit (Molecular Devices). Para realizar gráficos y comparaciones utilizamos GraphPadPrism versión 6 (GraphPad Software). Evaluamos si los datos cumplían normalidad y homocedacea utilizando el programa SigmaPlot 11. Clasificamos a las ICE como acomodadoras o no acomodadoras realizando un análisis de *clusters* multivariado no supervisado (*tree clustering* basado en el método de Ward, utilizando distancias Euclideanas) con el programa STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.). Calculamos la conductancia sensible a MgTx como $G_{MgTx}=I_{MgTx}$ / (Vm-E_k), donde I_{MgTx} es la corriente MgTx-sensible generada por el protocolo de rampa en *voltage clamp* (de -100 a +40 mV, con una rampa de 33 mV/segundo), Vm es el comando de voltaje y E_k es el potencial de reversión del K^+ estimado en nuestras condiciones (E_k=-107 mV). Calculamos el V_{50} a partir del ajuste de la curva de conductancia a la ecuación de Boltzman $\{G=G_{min}+[(G_{max}-G_{min})/1+e^{(V50-X)/pendiente}]\}$ para cada ICE por separado (Figura m.2A). Calculamos el potencial de membrana en reposo en la línea de base antes de la inyección de pulsos de corriente en los protocolos de *current clamp* (Figura m.2C). Calculamos la resistencia de entrada como $\Delta V/\Delta I$ en respuesta a la inyección de corriente hiperpolarizate de -10 pA durante 1 segundo (Figura m.2D). Medimos la amplitud del sag como la diferencia entre el mínimo de voltaje generado por un pulso de corriente hiperpolarizante de -40 pA y el estado estacionario al que llega el potencial al final del pulso de 1 segundo de duración (Figura m.2C). Medimos la amplitud de la sAHP como la diferencia entre el Vm antes de iniciar el pulso y el mínimo de voltaje observado luego de finalizar el pulso despolarizante de 140 pA (Figura m.2F). Definimos la reobase como el menor pulso de corriente inyectado que generó al menos un potencial de acción, de una serie de pulsos de corriente de 1 segundo de duración, desde +20 a +380 pA, subiendo cada 30 pA (Figura m.2E). Medimos el umbral del

potencial de acción a partir de gráficos de fase del potencial de acción como el punto al cual la derivada del potencial de membrana dV/dt se desvía de la media al menos por 2 desvíos estándar (Figura m.2B) (Atherton y Bevan, 2005). Medimos el ancho del potencial de acción al 50% de la amplitud máxima, que fue medida desde el umbral al pico (Figura m.2E). Medimos el umbral, el ancho y la amplitud del potencial de acción únicamente para el primer potencial de acción observado en la reobase. Calculamos la amplitud de la AHP como la diferencia entre el potencial en reposo y el mínimo de voltaje en una ventana de un segundo luego de la estimulación que desencadena la respuesta (Figura m.2G). Medimos la latencia a partir del primer estímulo (Figura m.2G).

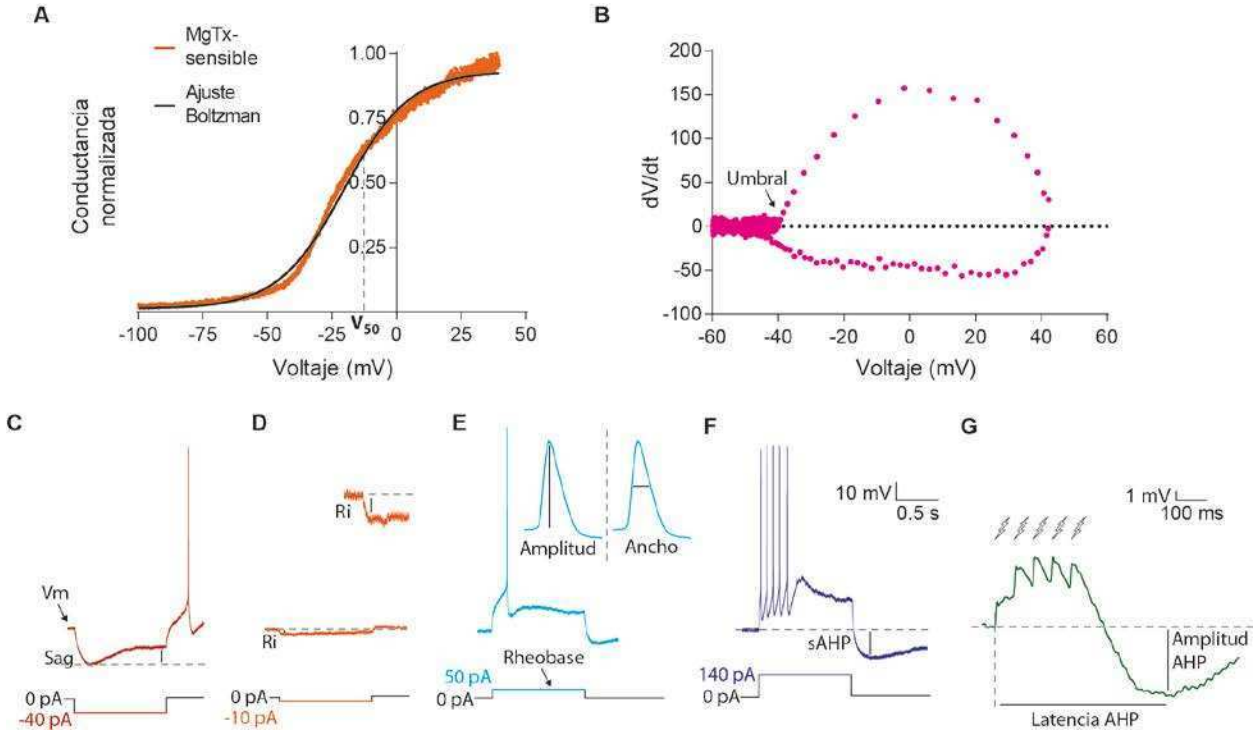

Figura m.2: Medición de parámetros fisiológicos de las ICE. (A) Curva de conductancia MgTx-sensible a la que ajustamos a la ecuación de Boltzman para determinar el V_{50}. **(B)** Gráfico de dV/dt en función del voltaje del primer PA evocado por la corriente mínima (reobase) para calcular el umbral. **(C)**Registro representativo de la respuesta de una ICE a un pulso de corriente hiperpolarizante de -40 pA. Mostramos el potencial de reposo (Vm) y la amplitud del sag. **(D)** Registro representativo de la respuesta de una ICE a un pulso de corriente hiperpolarizante de -10 pA. Mostramos dónde calculamos

la resistencia de entrada (Ri).**(E)** Registro representativo de la respuesta de una ICE a un pulso de corriente despolarizante de 50 pA, que en este caso es la reobase. Calculamos la amplitud y el ancho del 1º PA. **(F)** Registro representativo de la respuesta de una ICE a un pulso de corriente despolarizante de 140 pA. Mostramos la amplitud de la sAHP. **(G)** Registro representativo de la respuesta de una ICE a la estimulación eléctrica. Mostramos cómo definimos la amplitud y la latencia de la AHP.

M.5. Inmunofluorescencia

M.5.1. Protocolos

Realizamos las reacciones de inmunofluorescencia en cortes flotantes (*free-floating*) de cerebro fijado (Braz *y col.*, 2015). Para la inmunofluorescencia contra TH, separamos la parte del cerebro que contenía la sustancia *nigra pars compacta* el día del registro electrofisiológico y la fijamos en paraformaldehido (PFA) 4% en fosfato *buffer* salino (PBS) 0,1 M pH 7,4 durante la noche (ON), luego la crioprotegimos en sacarosa 30% en PB y finalmente realizamos cortes de 40 μm utilizando un micrótomo de congelación deslizante (Leica SM 2010R). Para realizar el resto de las inmunomarcaciones anestesiamos a los ratones con hidrato de cloral (600 mg/kg, i.p.) y luego los perfundimos a través de la aorta con solución salina con heparina (10 U/ml, Rivero, Argentina), seguida por PFA 4% en PB. Sacamos los cerebros, los post-fijamos por 2 hs en el mismo fijador y luego los pasamos a sacarosa 30% en PB. Una vez embebidos en sacarosa los cortamos como se indicó antes. Conservamos los cortes que contenían estriado o sustancia *nigra pars compacta* en PBS 0,1 M pH 7,4 con 0,1% azida de sodio,en cajas *multi-well* a 4ºC. Para la inmunomarcación, bloqueamos los cortes por 2 hs a temperatura ambiente con albúmina de suero bovino (BSA) o en suero de cabra (NGS), incubamos ON con el anticuerpo primario a 4ºC, lavamos 3 veces en PBS y luego incubamos con el anticuerpo secundario conjugado con fluoróforosAlexa (Invitrogen) o con biotina (Vector). En este último caso, lavamos los cortes nuevamente 3 veces en PBS y los incubamos con streptavidina-FITC (Vector). Para finalizar, lavamos nuevamente los cortes en PBS 3 veces y los montamos en portaobjetos de

vidrio con Vectashield (Vector) y cubreobjetos. Detallamos las especificaciones de cada inmunomarcación en la Tabla m.1.

Tabla m.1. Anticuerpos y *buffers* usados para inmunofluorescencia

Marcación	Bloqueo (en PBS pH 7,4)	Anticuerpo primario, dilución	Anticuerpo secundario, dilución, condiciones
Colina Acetil-transferasa (ChAT)	2% BSA, 0.1% TX-100	*Goat* anti-ChAT (Millipore AB144P), 1:1000	*Horse* anti-*goat* IgG-biotin(Vector BA-9500), 1:250, 2 hs Tamb FITC-streptavidina (Vector SA-5001) 1:200, 2 hs Tamb
Parvalbúmina (PV)	1% NGS, 0.3% TX-100	*Mouse* anti-PV (Swant Inc. 235), 1:3000	*Goat* anti-*mouse* IgG (Invitrogen A11029), 1:400, 3 hs Tamb
Neuropeptido Y (NPY)	2% BSA, 0.3% TX-100	*Rabbit* anti-NPY (Center forUlcerResearch and Education 8711), 1:500	*Goat* anti-*rabbit* IgG (Invitrogen A11034), 1:200, 2 hs Tamb
Oxido nítrico sintasa (NOS1)	2% BSA, 0.3% TX-100	*Rabbit* anti-NOS1 (Santa Cruz sc-1025),1:500	*Goat* anti-*rabbit* IgG (Invitrogen A11034), 1:200, 2 hs Tamb
Kv1.3 dominio intracelular	2% BSA, 0.5% TX-100	*Mouse* anti-Kv1.3 (NeuroMabL23/27), 1:100	*Goat* anti-*mouse* IgG (Invitrogen A11029), 1:1000, 2 hs Tamb
Kv1.3 dominio extracelular	1% BSA	*Rabbit* anti-Kv1.3 (Alomonelabs APC-101), 1:100	*Goat* anti-*rabbit* IgG (Invitrogen A11034), 1:500, 2 hs Tamb
Tirosina hidroxilasa (TH)	5% NGS, 0.3% TX-100	*Mouse* anti-TH (ChemiconMAB318), 1:1000	*Goat* anti-*mouse* IgG (Invitrogen A11029), 1:500, 2 hs Tamb

BSA: Seroalbúmina bovina; TX-100: Triton X-100; NGS: suero normal de cabra, Tamb: temperatura ambiente.

M.5.2. Adquisición de imágenes

Obtuvimos imágenes de los cortes inmunomarcados con un microscopio confocalOlumpus FV1000/IX81, utilizando un objetivo de inmersión en aceite (40X) u objetivos 10 o 20X.

M.5.3. Análisis de las imágenes

Para evaluar la intensidad de marca de Kv1.3 en las ICE utilizamos el programa ImageJ. Dado queel protocolo utilizado para el anticuerpo anti-Kv1.3, que reconoce un epítope extracelular del canal, no incluyó la incubación con tritón, la penetración del anticuerpo en las secciones se limitó a la superficie. Para no sesgar nuestro resultado, todas las imágenes se adquirieron en los 5 µm más superficiales del corte. Además, cada imagen fue cuantificada a ciegas del tratamiento. Sobre la imagen del canal rojo (neuronas tdT+) aplicamos la detección de partículas sobre una imagen binaria obtenida aplicando el algoritmo Otsu (Schneider *y col.*, 2012), lo cual nos permitió generar regiones de interés sobre los somas de las ICE (Figura m.3B-C). Luego trasladamos las regiones de interés (ROIs) detectadas en el canal rojo al canal verde (Kv1.3) y calculamos la intensidad de la marca Kv1.3 dentro de las ROIs (Figura m.3D). Para normalizar la intensidad de la marca entre imágenes sustrajimos a la intensidad de cada ROI la intensidad de *background*, medida en un área circular de 20x20 µm en una región de paquetes axonales (Figura m.3E). Para comparar la intensidad de marca entre ratones control y parkinsonianos promediamos los valores de las células por foto y luego promediamos por animal (medimos al menos en 3 fotos por ratón).

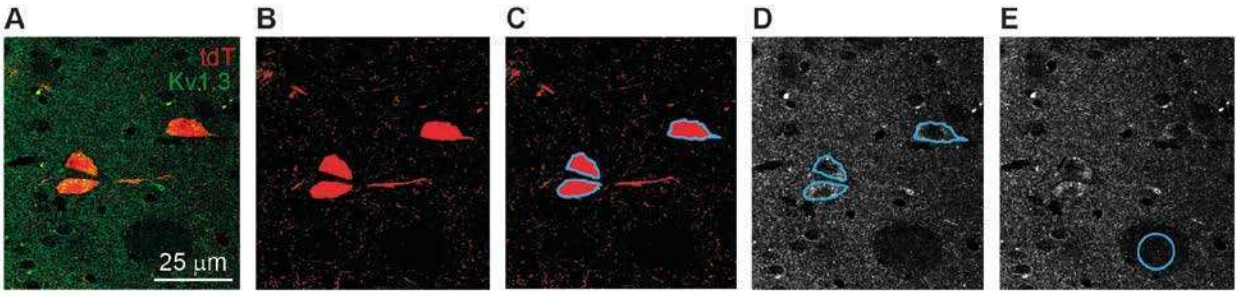

Figura m.3: Cuantificación de la intensidad de marca de Kv1.3. (A) Imagen de inmunofluorescencia anti-Kv1.3 (verde) en un corte de estriado de un ratón ChAT-Cre;tdT. **(B)** Imagen binaria obtenida a partir del canal rojo correspondiente a la inmunofluorescenciamostrada en A, luego de que aplicamos el algoritmo Otsu. **(C)** Luego de la aplicación del algoritmo Otsu realizamos la detección de partículas para detectar las ICE, que se muestran en celeste. **(D)** Canal verde correspondiente a la inmunofluorescencia de Kv1.3. Se trasladaron las partículas detectadas en el canal rojo al canal verde para calcular la intensidad de marca. **(E)** Canal verde correspondiente a la inmunofluorescencia de Kv1.3. El círculo celestemuestra la región elegida para calcular el *background* en una zona de un paquete axonal.

M.6. Evaluación de la expresión de ARN

M.6.1. Captura láser

Para realizar la captura láser anestesiamos a los ratones con hidrato de cloral (600 mg/kg, i.p.) y los perfundimos a través de la aorta con solución salina con heparina (10 U/ml, Rivero, Argentina), seguida por PFA 2% en PB y luego por sacarosa 20% en PB. Sacamos los cerebros y los congelamos rápidamente en Cryoplast (Biopack, Argentina). Luego llevamos los cerebros congelados a Pablo Pomata, quien se ocupa de realizar las capturas láser en el servicio que presta el INGEBI. Allí se cortaron los cerebros a 10 µm utilizando un criostato libre de ARNasa (ThermoCryotome E) y portaobjetos cargados positivamente. Pomata realizó la captura láser de acuerdo a lo descripto en Rossi *y col*. (2012): utilizó un láser infrarojo (Equipamiento de microdisección y captura láser Arcturus, Applied Biosystems) en combinación con un láser ultravioleta para separar las células tdTomato positivas (tdT+) del resto del tejido. Las células capturadas quedan adheridas a una cápsula (CapSure) de alta sensibilidad (AppliedBiosystems) con *film* termoplástico. Pulsando el láser infrarojo, el *film*

termoplástico forma una protrusión fina que adhiere el tejido de interés (Figura m.4A). Aproximadamente capturó 200 células en cada cápsula, correspondientes al estriado de un ratón. Como control negativo, capturó tejido tdTomato negativo (tdT-) circundante a las célular tdT+ (Figura m.4A). El servicio de captura láser entregó al menos 3 muestras independientes de mRNA extraído de tejido capturado, con el que posteriormente realizamos análisis de expresión (RT-PCR).

M.6.2. Aislamiento de ARN y RT-PCR

A partir de las muestras capturadas de tejido tdT+ y tdT- extrajimos el ARN utilizando el sistema Paradise PLUS Reagent (AppliedBiosystems), siguiendo las instrucciones del *kit*. Para mejorar el rendimiento de la reacción, digerimos las muestras con 20 μg de Proteinasa K (AppliedBiosystems) durante 16 horas a 37ºC. Incubamos las muestras con ADNasas sin ARNasas (1 unidad por μg de ARN, PromegaCorporation) a temperatura ambiente por 20 minutos, para degradar todo el ADN contaminante. Luego sintetizamos ADNc usando primers al azar (*random primers*) a partir del total del ARN obtenido en cada captura láser, utilizando el *kit* ImProm-II Reverse Transcription System (Promega), ajustando la concentración de $MgCl_2$ a 4,75 mM. Como control negativo de esta reacción, omitimos el ARN o la enzima transcriptasa reversa (TR). Luego amplificamos el ADNc con los *primers* indicados en la Tabla m.2, mediante PCR convencional de 35 ciclos, utilizando una termocicladora PTC-100 (MJ Research) y ADN Polimerasa GoTaq, siguiendo las instrucciones del proveedor con cambios menores (Utilizamos 2U de TaqPolymerasa por reacción y los *primers* en una concentración de 1,1 μM). Cada ciclo incluyó desnaturalización a 94ºC por 30 segundos, hibridación (*annealing*) a la temperatura indicada en la Tabla m.2 para cada reacción por 1 minuto y extensión a 72ºC por 1 minuto. Con los productos de PCR realizamos electroforesis en gel de agarosa 2% con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio para visualizar los productos bajo luz ultravioleta. Para confirmar el peso molecular, junto con las muestras corrimos un marcador de peso molecular (Embiotec, Argentina).

Detallamos las especificaciones de cada *primer* utilizado para cada reacción en la Tabla m.2.

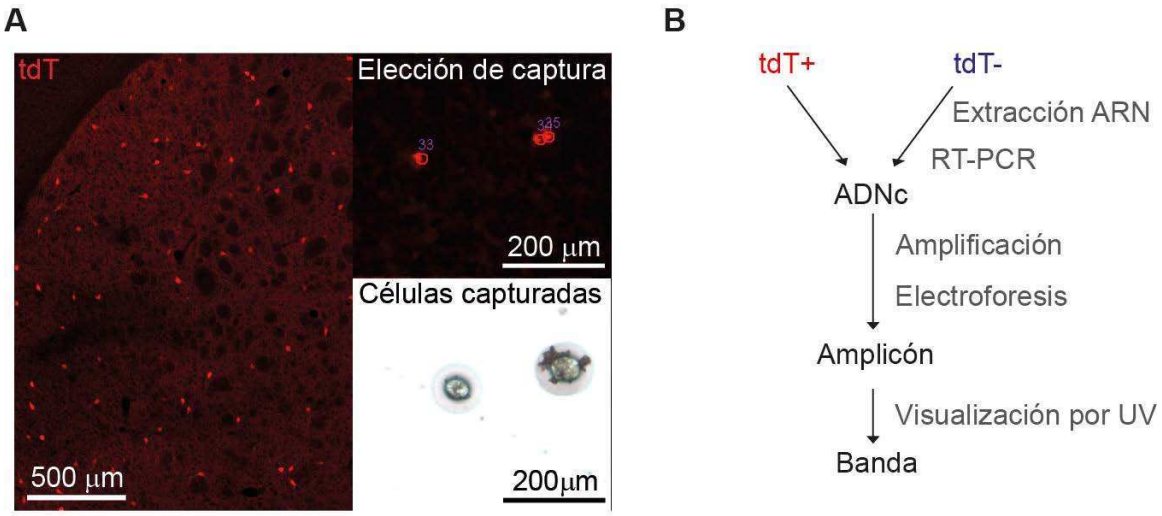

Figura m.4: Captura láser de células tdT+ y tdT-, y obtención de muestras. (A) Microfotografía de estriado de un ratón ChAT-Cre;tdT (tdT en rojo) en la que se eligieron las células a capturar por microdisección láser. A la derecha se muestra el tejido capturado. **(B)** Protocolo de RT-PCR luego de la captura láser. Se capturaron por separado células tdT+ y tejido tdT-.

Tabla m.2: Secuencias de los *primers*

Gen (proteína)	*Forward primer*	*Reverse primer*	Hibridación (ºC)	Ampli-cón(bp)
CHAT (ChAT)	5'-GGCCATTGTGAAGCGGTTTG-3'	5'-TGTATCTAAACAACCGCCTGGC-3'	52	138
PENK (Penk)	5'-GCCTTGTCAATGATGTTTCTTGTC-3'	5'-CAACATAGCCATAAGAGACCAATACTG-3'	50	151
KCNA1(Kv1.1)	5'-GGCCATCATCCCTTATTTCA-3'	5'-GCTCTTCCCCCTCAGTTTCT-3'	50	491
KCNA2 (Kv1.2)	5'-CTATGACCCAGAGGCAGACC-3'	5'-TCATCCTCCCGAAACATCTC-3'	50	324
KCNA3 (Kv1.3)	5'-AGTATATGGTGATCGAAGAGG-3'	5'-AGTGAATATCTTCTTGATGTT-3'	50	137
KCNA6 (Kv1.6)	5'-CGAGGAAGAAGATGAGGATGA-3'	5'-CCGTCTCTCGGTGGTAGAAGT-3'	52	743

M.7. Análisis estadístico

Detallamos los análisis estadísticos en los epígrafes de las figuras y los realizamos con los programas mencionados anteriormente. Para realizar *tests* paramétricos primero nos aseguramos de que los datos cumplieran los supuestos de normalidad y homocedacea. El nivel de significancia utilizado fue de $p<0,05$ y en todos los casos mostramos Media±EE, a menos que se indique otra cosa.

Resultados

Capítulo 1

Validación del modelo ChAT-Cre;tdT

R.1.1.Caracterización del ratón ChAT-Cre;tdT

Las interneuronas colinérgicas estriatales se distinguen del resto de las neuronas estriatales por su gran tamaño relativo. Sin embargo, comprenden menos del 5% del total de las neuronas presentes (Gerfen y Surmeier, 2011), por lo que es difícil encontrarlas. La expresión transgénica de proteínas fluorescentes bajo el control de las secuencias regulatorias del gen ChAT (Colin-Acetil Transferasa) facilita su localización. Cruzamos ratones en los que promotores de ChAT dirigen la expresión de la recombinasa Cre con ratones que reportan la presencia de Cre recombinasa con la proteína fluorescente tdTomato y obtuvimos los ratones que denominamos ChAT-Cre;tdT. Estos ratones mostraron una completa colocalización entre tdTomato y la inmunomarcación para ChAT a nivel de cuerpos celulares en el estriado. Por otro lado, las células tdTomato positivas no expresaron marcadores de otras poblaciones de interneuronas estriatales como parvalbumina (PV), neuropéptido Y (NPY) o óxido-nítrico sintasa (NOS) (Figura r.1A). Al realizar una cuantificación de las células marcadas por inmunohistofluorescencia no encontramos ninguna superposición entre las células tdT+ y los marcadores de interneuronas PV, NPY y NOS, mientras que el 93,6% de las células tdT+ fueron ChAT positivas (ChAT+). Además, sólo un 0,9% de las células ChAT+ fueron tdTomato negativas. Analizamos entre 3 y 5 ratones para cada inmunomarcación.

Por otro lado, registramos células positivas para tdTomato de ratones ChAT-Cre;tdT en *patch clamp* (Figura r.1B), en configuración *whole cell*, y encontramos que poseen las propiedades electrofisiológicas características de las ICE: 1) actividad espontánea (Figura r.1C); 2) presencia de "sag" en respuesta a un pulso de inyección de corriente hiperpolarizante (Figura r.1D); 3) un enlentecimiento de la frecuencia de descarga (adaptación de frecuencia), seguido por el cese de disparos (acomodación) en respuesta a un pulso de inyección de corriente despolarizante (Figura r.1D); y 4) una despolarización de rebote después de un pulso hiperpolarizante y una hiperpolarización tardía lenta (sAHP) que aparece luego de una inyección de corriente despolarizante (Figura r.1D) (Sanchez *y col.*, 2011, Bennett y Wilson, 1999, Jiang y North, 1991, Maurice *y col.*, 2004). Estas mismas propiedades aparecen en las ICE registradas en

ratones salvajes (*wild type,* WT). Además, las ICE de ratones WT y ChAT-Cre;tdT mostraron similar potencial de reposo, resistencia de entrada, amplitud del "sag", amplitud de la sAHP, reobase, umbral, y amplitud y duración del primer PA (Tabla r.1).

Para estudiar la excitabilidad de las ICE evaluamos la descarga de potenciales de acción durante pulsos de inyección de corriente de 1 segundo de duración y distintas intensidades. Medimos dos variables principales, el número de potenciales de acción ("frecuencia de disparo") (Figura r.1E) y la coordenada temporal del último potencial de acción ("tiempo del último PA") durante el pulso de corriente (Figura r.1F) para todas las intensidades de corriente inyectadas. No encontramos diferencias en ninguno de los dos parámetros entre ICE de ratones WT y ChAT-Cre;tdT.

Basados en estos resultados utilizamos los ratones ChAT-Cre;tdT en el resto de los experimentos presentados en esta tesis (con excepción de los registros realizados en ratones KO de la subunidad Kv1.3).

Tabla r.1: Comparación entre ICE de ratones WT y ChAT-Cre;tdT

Propiedad	WT	ChAT-Cre;tdT	p valor	Significancia
Potencial de reposo (mV)	-61,7 ± 1,5	-61,1 ± 2,1	0,802	NS
Resistencia de entrada (MΩ)	332,3 ± 37,4	362,2 ± 22,8	0,231	NS
Amplitud del sag (mV)	4,5 ± 0,8	5,8 ± 0,9	0,255	NS
Amplitud de sAHP (mV)	-11,4 ± 0,8	-10,41 ± 1,2	0,497	NS
Reobase (pA)	40 ± 5	40 ± 7,1	0,999	NS
Umbral (mV)	-39,3 ± 1,9	-35,6 ± 1,9	0,179	NS
Ancho del 1º PA (ms)	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,1	0,574	NS
Amplitud del 1º PA (mV)	69,1 ± 5,6	66,4 ± 3,1	0,677	NS

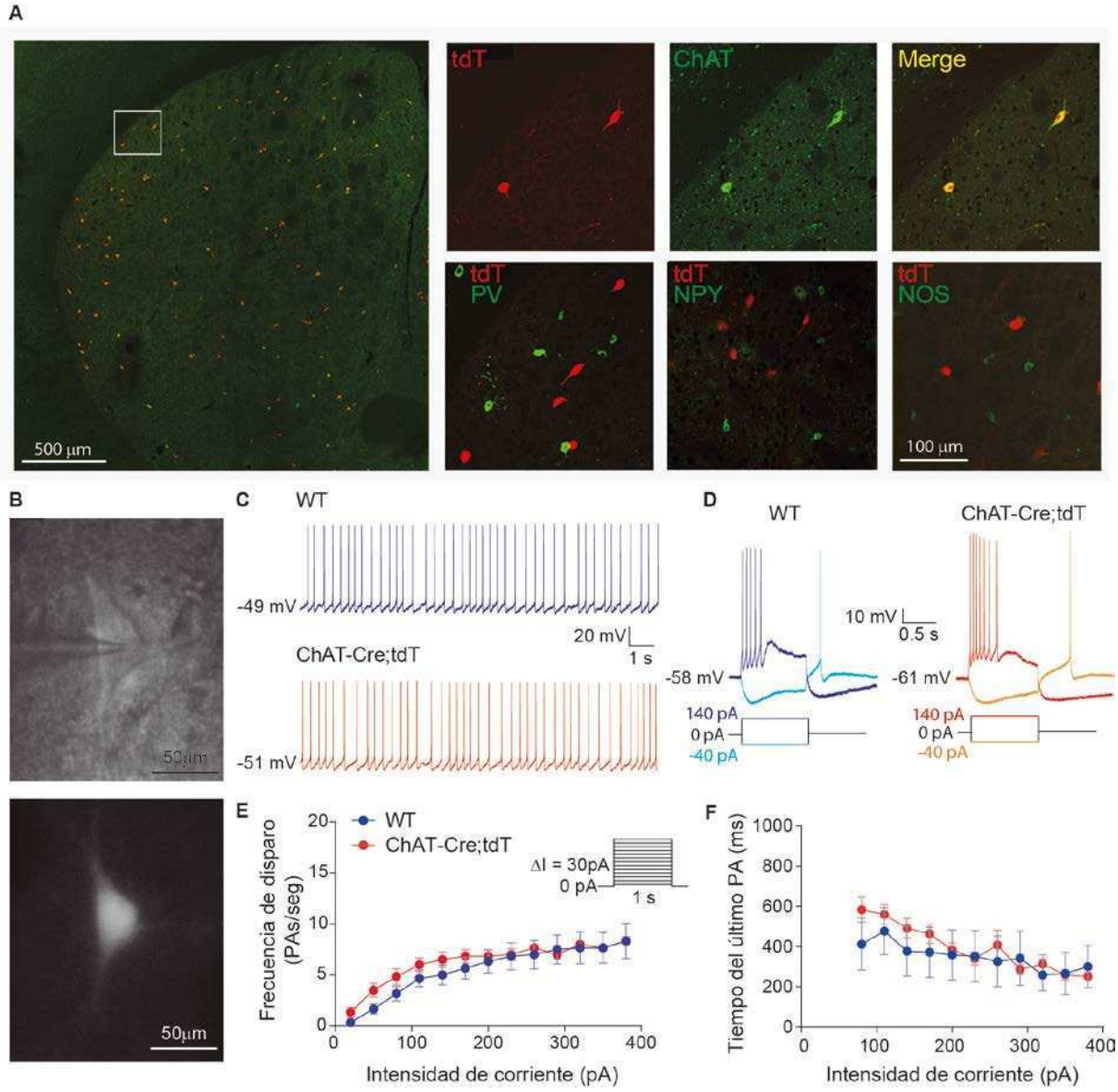

Figura r.1: Los ratones ChAT-Cre;tdT reportan ICE con las mismas propiedades que los WT. (A) Microfotografía de estriado de un ratón ChAT-Cre;tdT en la que se observa la colocalización de la proteína tdTomato (rojo) con Colina-AcetilTransferasa (ChAT, verde, izquierda y arriba). No se observó colocalización con interneuronas PV, NPY o NOS (verde, abajo). **(B)** Foto de una ICE de un ratón ChAT-Cre;tdT bajo iluminación DIC (arriba) y epifluorescente (abajo). **(C)** Registros representativos de la actividad espontánea de una ICE de un ratón WT (arriba, azul) y una de un ratón ChAT-Cre;tdT (abajo, rojo). **(D)** Registros representativos de la respuesta de una ICE de un ratón WT (izquierda) y una de un ratón ChAT-Cre;tdT (derecha) frente a la inyección de un pulso de corriente despolarizante (140 pA) y otro hiperpolarizante (-40 pA). **(E-F)** Frecuencia de disparo (E) y tiempo del último PA (F) en función de la corriente para ICE de ratones WT y ChAT-Cre;tdT (ANOVA de medidas repetidas, $p>0,05$, $n=9$ en cada grupo).

Capítulo 2

Regulación de la excitabilidad de las interneuronas colinérgicas estriatales

R.2.1.Cambios en la excitabilidad de las ICE durante el desarrollo postnatal

Sanchez y col. (2011) reportaron que la excitabilidad intrínseca de las ICE disminuye durante el desarrollo postnatal en ratas, pero no aclararon si dicho cambio se debe a modificaciones de la adaptación de frecuencia y/o la acomodación. Con el objetivo de caracterizar la dependencia de la edad de los cambios en la excitabilidad de las ICE, registramos en *whole cell* los patrones de disparo de ICE de ratones juveniles (de entre 14 y 45 días postnatales) y adultos (entre 60 y 180 días postnatales) en respuesta a la inyección de escalones de corriente de 1 segundo de duración.

Sin importar la edad, en ratones, la mayoría de las ICE acomodaban o no acomodaban (continuaban disparando potenciales de acción a lo largo de todo el pulso) (Figura r.2A) para todo el rango de pulsos de corriente despolarizante utilizado. Es decir, las ICE no cambian de patrón de disparo dependiendo de la intensidad de corriente (Figura r.2B). Patrones mixtos (con acomodación a altas intensidades de corriente y sin acomodación a intensidades bajas, o viceversa) fueron infrecuentes. Esto lo podemos ver en la Figura r.2B, en la que cada célula está indicada con un color según el tiempo del último PA en respuesta a un pulso de 140 pA (las que acomodan,representadas en la gama de los azules y las que no acomodan,en la gama de los rojos). Se ve que en general, para diferentes intensidades de corriente las azules tienden a conservar su posición en tiempos menores que las rojas para todas las intensidades de estimulación. Además, las células “no acomodadoras” no dejaron de disparar, y las “acomodadoras” no volvieron a disparar cuando el pulso de inyección de corriente duró 2 segundos en vez de 1 (Figura r.2A). Realizamos un análisis exploratorio del tiempo del último potencial de acción en función de la edad del ratón, lo que nos sugirió que la proporción de ICE “no acomodadoras” disminuye con la edad (Figura r.2C).

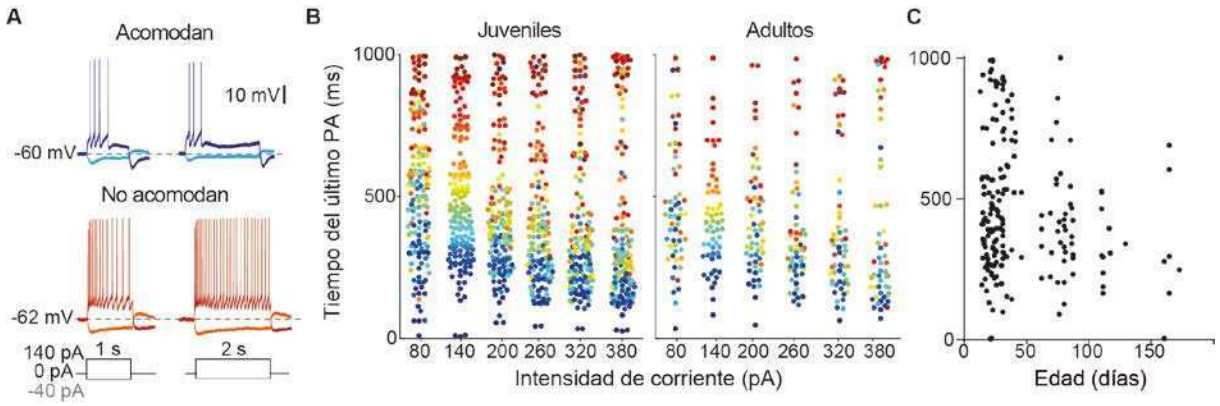

Figura r.2: Exploración de la acomodación de ICE según la edad.(A) Registros representativos de una ICE que acomoda (arriba) y una que no acomoda (abajo) en respuesta a un pulso despolarizante (140 pA) y a uno hiperpolarizante (-40 pA) de 1 segundo (izquierda) o 2 segundos (derecha) de duración. **(B)** Tiempo del último PA para todas las ICE registradas en ratones juveniles (izquierda) y adultos (derecha) en función de la intensidad de corriente. El código de color está ordenado según el tiempo del último PA para el pulso de 140 pA.**(C)** Tiempo del último PA en función de la edad del ratón para el pulso de 140 pA.

Luego nos propusimos comparar el número de ICE “acomodadoras” y “no acomodadoras” entre ratones juveniles y adultos. Clasificar a una célula como “acomodadora” o “no acomodadora” no resulta trivial, por lo que tuvimos que buscar una forma objetiva de clasificarlas. Realizamos un análisisde *clusters* multivariado no supervisado utilizando la frecuencia de disparo y el tiempo del último potencial de acciónco mo variables clasificatorias y pudimos distinguir 2 *clusters* (Figura r.3A): uno con alta frecuencia y elevado tiempo del último potencial de acción (*Cluster* 1, "no acomodadoras") y otro con baja frecuencia y bajo tiempo del último potencial de acción (*Cluster* 2, "acomodadoras") (Figura r.3B). La reobase no difirió entre los *clusters* (Figura r.3C). En cambio, encontramos que la proporción de células no acomodadoras y acomodadoras difiere entre los dos grupos etarios (Figura r.3D). Los juveniles presentaron una mayor proporción de células no acomodadoras que los adultos: 43 de 175 ICE de ratones juveniles fueron clasificadas como “no acomodadoras” (24,6%), en comparación con el 2,8% de 56 ICE de ratones adultos (Figura r.3D).

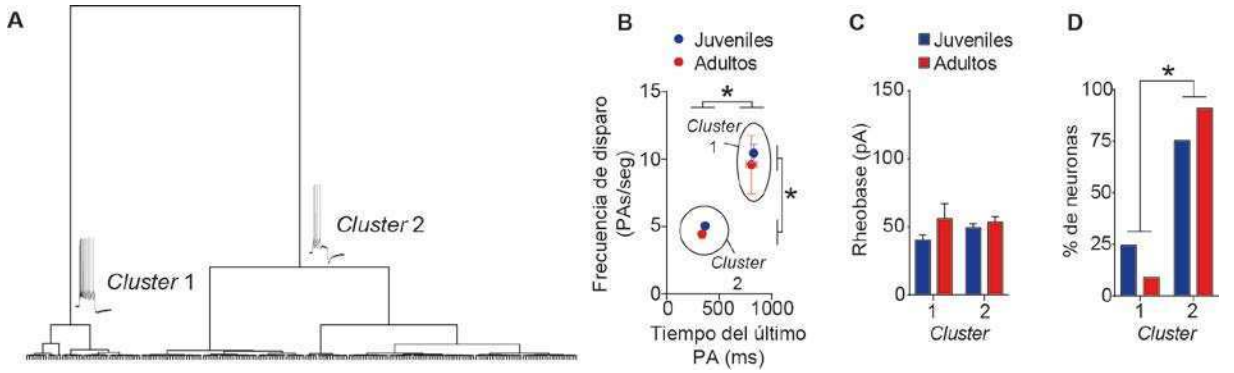

Figura r.3: El número de ICE que no acomodan disminuye en animales adultos. (A) Análisis de *clusters* multivariado no supervisado obtenido utilizando la frecuencia de disparo y el tiempo del último PA en respuesta a un pulso de 140 pA como variables clasificatorias. **(B)** Frecuencia de PAs en función del tiempo del último PA para ICE de juveniles y adultos clasificadas en los *clusters* 1 y 2 (*p<0,0001, efecto del cluster significativo en un ANOVA de 2 factores, *cluster* y edad). **(C)** Reobase de juveniles y adultos para los *clusters* 1 y 2. (ANOVA de 2 factores, NS, p>0,05). **(D)** Porcentaje de neuronas de cada *cluster* para juveniles y adultos (test exacto de Fisher, *p=0,03). En todos los casos se muestra Media±EE.

Realizamos comparaciones en varios parámetros medidos tanto en las ICE "acomodadoras" como en las "no acomodadoras", y observamos que no hay diferencias en el potencial de reposo, en el umbral del primer potencial de acción, en su amplitud y duración, en la amplitud del sag o de la sAHP, ni en la resistencia de entrada. Solo encontramos diferencias en la reobase, que resultó de menor valor en las ICE "no acomodadoras" (Tabla r.2).

Tabla r.2: Comparación entre ICE "acomodadoras" y "no acomodadoras"

Propiedad	No acomodadora	Acomodadora	p valor	Significancia
Potencial de reposo (mV)	-63,5 ± 1,4	-65,7 ± 1,9	0,337	NS
Resistencia de entrada (MΩ)	384,8 ± 37,6	370,4 ± 70,8	0,859	NS
Amplitud del sag (mV)	5,5 ± 0,8	5,3 ± 0,9	0,373	NS
Amplitud de sAHP (mV)	-11,7 ± 1,1	-13,3 ± 1,6	0,422	NS
Rheobase (pA)	28 ± 3,6	54 ± 6,5	**0,002**	**S**
Umbral (mV)	-43,9 ± 1,1	-44,6 ± 1,9	0,754	NS
Ancho del 1º PA (ms)	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,743	NS
Amplitud del 1º PA (mV)	73,3 ± 2,0	71,9 ± 2,5	0,649	NS

En resumen, las ICE pueden ser clasificadas en dos categorías, basándonos en su patrón de disparo en respuesta a un pulso de corriente, y la maduración postnatal se caracteriza por un aumento en la proporción de ICE “acomodadoras”.

R.2.2. Los bloqueantes de canales Kv1 atenúan la acomodación

Los mecanismos que subyacen a los cambios en la excitabilidad intrínseca de las ICE que ocurren tanto durante la maduración postnatal como asociados a situaciones patológicas como la enfermedad de Parkinson son desconocidos. La acomodación se define como una interrupción del disparo de potenciales de acción durante una despolarización sostenida. En principio, podría deberse a un ¨bloqueo por despolarización¨, es decir, inactivación de los canales Na_v que generan los potenciales de acción (Kuznetsova *y col*., 2010). Sin embargo, al agregar un sobrepulso a los 700 o 900 ms del comienzo del protocolo de inyección de corriente, es decir una vez que la célula ya había acomodado, siempre se observó la aparición de un potencial de acción (Figura r.4).

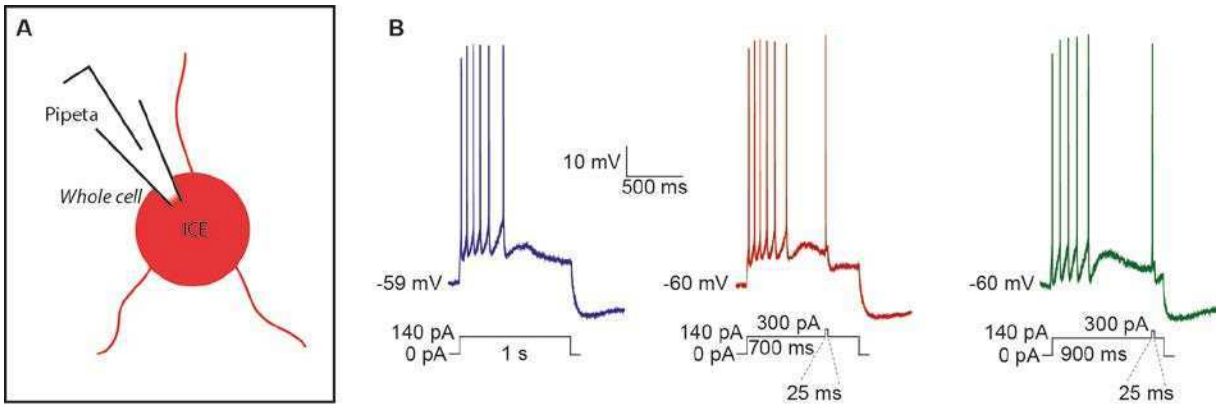

Figura r.4: La acomodación de las ICE no se debe a un bloqueo por despolarzación. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*. **(B)** Registros representativos de una ICE en respuesta a un pulso despolarizante de 140 pA (azul, izquierda) y ante el mismo estímulo con un sobrepulso de25 ms de duración y 300 pA a los 700 ms (rojo, medio) y a los 900 ms (verde, derecha) de iniciado el pulso despolarizante.

Se sabe que corrientes lentas de K^+, dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca}) o de voltaje (K_v) inducen acomodación en distintos tipos celulares (ver introducción; Tzingounis y Nicoll, 2008; Peters *y col*., 2005; Yue y Yaari, 2004; Sciamanna y Wilson, 2011; Dodson *y col*., 2002; Faber y Sah, 2004). Previamente en el laboratorio encontraron que la acomodación de las ICE prevalece en presencia de apamina, un bloqueante de canales SK (Sanchez *y col*., 2011). Por otro lado, Sanchez y colaboradores (2011) también demostraron que la acomodación es insensible a bloqueantes de los canales Ca_v sensibles a dihidropiridinas que serían responsables de la activación de la IsAHP en las ICE (Goldberg y Wilson, 2005).

Canales de K^+ dependientes de voltaje también fueron relacionados con la acomodación y la IsAHP en distintos tipos neuronales. Por ejemplo, se ha reportado que la acomodación en neuronas piramidales de hipocampo es mediada por canales Kv7 (Peters *y col*., 2005; Yue y Yaari, 2004). Estos canales también están presentes en las ICE (Cooper *y col*., 2001). Entonces, comenzamos bloqueando canales Kv7 con 2 bloqueantes distintos: el UCL2077, que bloquea Kv7.3 y 7.5, y el XE991, que bloquea todos los Kv7 (Yue y Yaari, 2004) (Figura r.5B). Ninguno de los 2 bloqueantes modificó la acomodación (Figura r.5). No encontramos diferencias ni en la frecuencia de disparos de las ICE (Figura r.5C-G) ni en la coordenada temporal del último potencial de acción (Figura r.5E-H) antes y después de los bloqueantes.

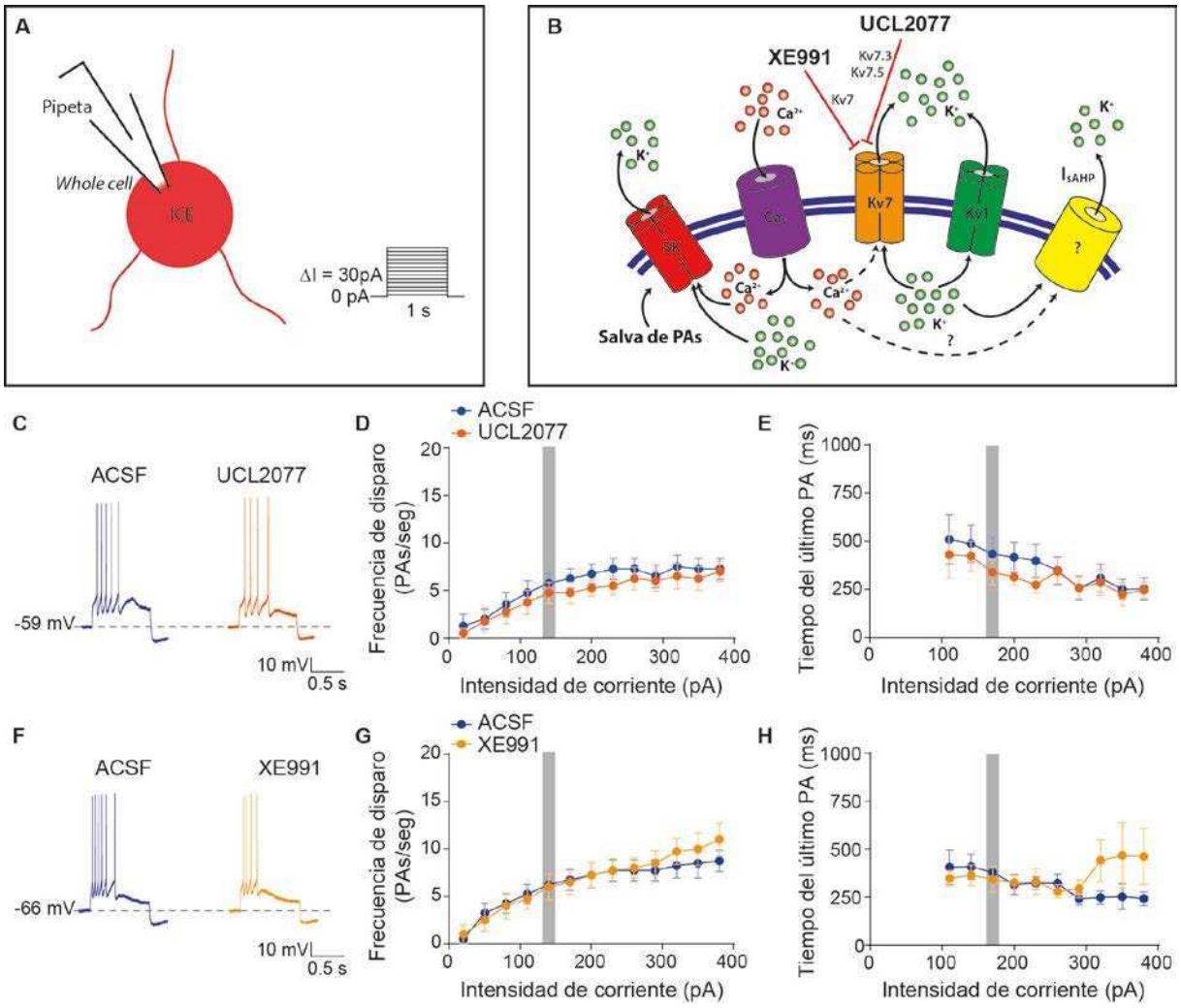

Figura r.5: Los canales Kv7 no participan en la acomodación de las ICE. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp,* y del protocolo de estimulación. **(B)** Esquema de la membrana de una ICE indicando qué canales bloquean el UCL2077 y el XE991. **(C)** Registros representativos de una ICE antes y después de la aplicación de UCL2077 (10 μM). **(D-E)** Frecuencia de disparo (D) y tiempo del último PA (E) en función de la amplitud de corriente antes y después de la aplicación del UCL2077 (ANOVA de medidas repetidas, p>0,05, n=4). **(F)** Registros representativos de una ICE antes y después de la aplicación de XE991 (10 μM). **(G-H)** Frecuencia de disparo (G) y tiempo del último PA (H) en función de la amplitud de corriente antes y después de la aplicación del XE991 (ANOVA de medidas repetidas, p>0,05, n=4). En barras grises se indica la respuesta al pulso de 140 pA que se muestra en los registros representativos. En todos los casos se muestra Media±EE.

La familia de canales Kv1 también fue relacionada con la acomodación en neuronas de la amígdala y otras estructuras (Sciamanna y Wilson, 2011; Dodson *y col*., 2002; Faber

y Sah, 2004). Las ICE expresan canales Kv1 (Song *y col*., 1998; Deng *y col*., 2005), pero su rol fisiológico ha recibido muy poca atención. Nos propusimos bloquear distintos tipos de canales Kv1 y evaluar la excitabilidad de las ICE (Figura r.6A-B). Toxinas aisladas de venenos de escorpiones y de serpientes bloquean canales Kv1 de distintos subtipos con distinta selectividad. La margatoxina (MgTx), proveniente del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* y con alta afinidad por la subunidad Kv1.3 (Garcia-Calvo *y col*., 1993), bloqueó la acomodación (Figura r.6C). Esto se observa como un aumento en la frecuencia de disparos (Figura r.6D) y en la coordenada temporal del último potencial de acción (Figura r.6E). Este resultado sugirió que la subunidad Kv1.3 participa de la corriente que media la acomodación de las ICE. Encontramos también que la MgTx no generó cambios en la excitabilidad de neuronas que no acomodaban (Figura r.6F-H). Como la MgTx es una proteína de gran tamaño (4179 Da), tarda alrededor de 40 minutos en generar su efecto máximo, ya que tiene que entrar al tejido para acceder a los canales de K^+. Para controlar que el efecto observado no sea un efecto del tiempo, hicimos un control de tiempo, en el que registramos ICE a lo largo de 40 minutos. No encontramos diferencias en la excitabilidad de estas neuronas a lo largo del tiempo (Figura r.6I-K).

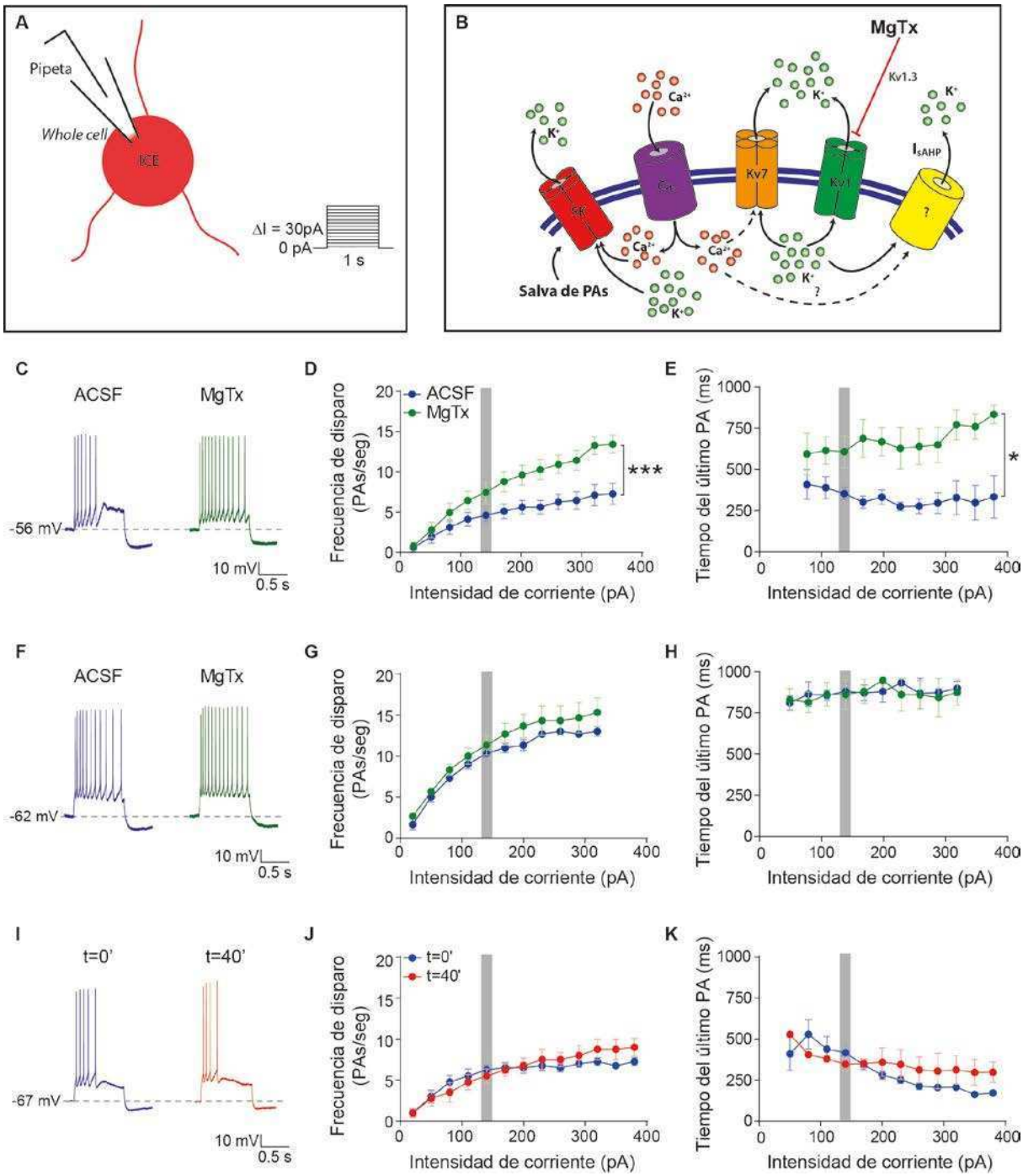

Figura r.6: El bloqueo de Kv1.3 bloquea la acomodación de las ICE. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación. **(B)** Esquema de la membrana de una ICE indicando qué canales bloquea la MgTx. **(C)** Registros representativos de una ICE que acomoda antes y después de la aplicación de MgTx (30 nM). **(D-E)** Frecuencia de disparo (D) y tiempo del último PA (E) en función de la corriente antes y después de la aplicación deMgTx (ANOVA de medidas repetidas, interacción: ***p<0,0001, *p=0,049, n=6). **(F)** Registros representativos de una ICE que no acomoda antes y después de la aplicación de MgTx (30 nM). **(G-H)** Frecuencia de disparo (G) y tiempo del último PA (H) en función de la corriente antes y después de la aplicación del MgTx (ANOVA

de medidas repetidas, NS, n=3). **(I)** Registros representativos de una ICE que acomoda a tiempo 0 y después de 40 minutos. **(J-K)** Frecuencia de disparo (J) y tiempo del último PA (K) en función de la corriente, a tiempo 0 y después de 40 minutos (ANOVA de medidas repetidas, NS, n=4). En barras grises se indica la respuesta al pulso de 140 pA que se muestra en los registros representativos. En todos los casos se muestra Media±EE.

A continuación quisimos confirmar la participación de Kv1.3, ya que MgTx muestra cierta afinidad por otras subunidades como Kv1.6. Por lo tanto, hicimos el mismo experimento pero con otra toxina selectiva para Kv1.3, la agitoxina-2 (AgTx-2, 30 nM) (García *y col.*, 1994; Cayabyab *y col.*, 2000) (Figura r.7A-B), y observamos el mismo efecto que con la MgTx, es decir, bloqueó la acomodación de las ICE (Figura r.7C-E). También vimos el mismo efecto con una toxina sintética selectiva para Kv1.3, el ADWX-1 (Li *y col.*, 2012; Han *y col.*, 2008) (Figura r.7B). Utilizamos 3 concentraciones distintas y encontramos que la dosis más baja (0,1 nM) no tiene efecto sobre la acomodación, mientras que las dos más altas (1 y 10 nM) sí (Figura r.7F-H). En otro set de experimentos pusimos un anticuerpo dirigido contra un epitope intracelular de Kv1.3 en la pipeta (10 μM), y evaluamos el efecto del bloqueo específico del canal, comparado con células en las que en la pipeta pusimos un anticuerpo control (10 μM), y encontramos que el anticuerpo contra Kv1.3 bloquea la acomodación de las ICE (Figura r.7I-K). Por último, realizamos experimentos en ratones KO de la subunidad Kv1.3 (KO Kv1.3) y encontramos el mismo efecto que con las toxinas que bloquean el canal, es decir, las ICE de los ratones KO Kv1.3 presentaron un mayor número de potenciales de acción (Figura r.7L-M) y una coordenada temporal (Figura r.7N) más tardía en comparación con las ICE de ratones de la misma colonia que sí expresaban Kv1.3. Realicé estos experimentos en el laboratorio del Dr. Kuei Tseng, en la Universidad Rosalind Franklin, en Chicago, Illinois, junto a un estudiante postdoc de ese laboratorio (Edén Flores Barrera). Estos resultados indican que los canales Kv1.3 son importantes y necesarios para la acomodación de las ICE.

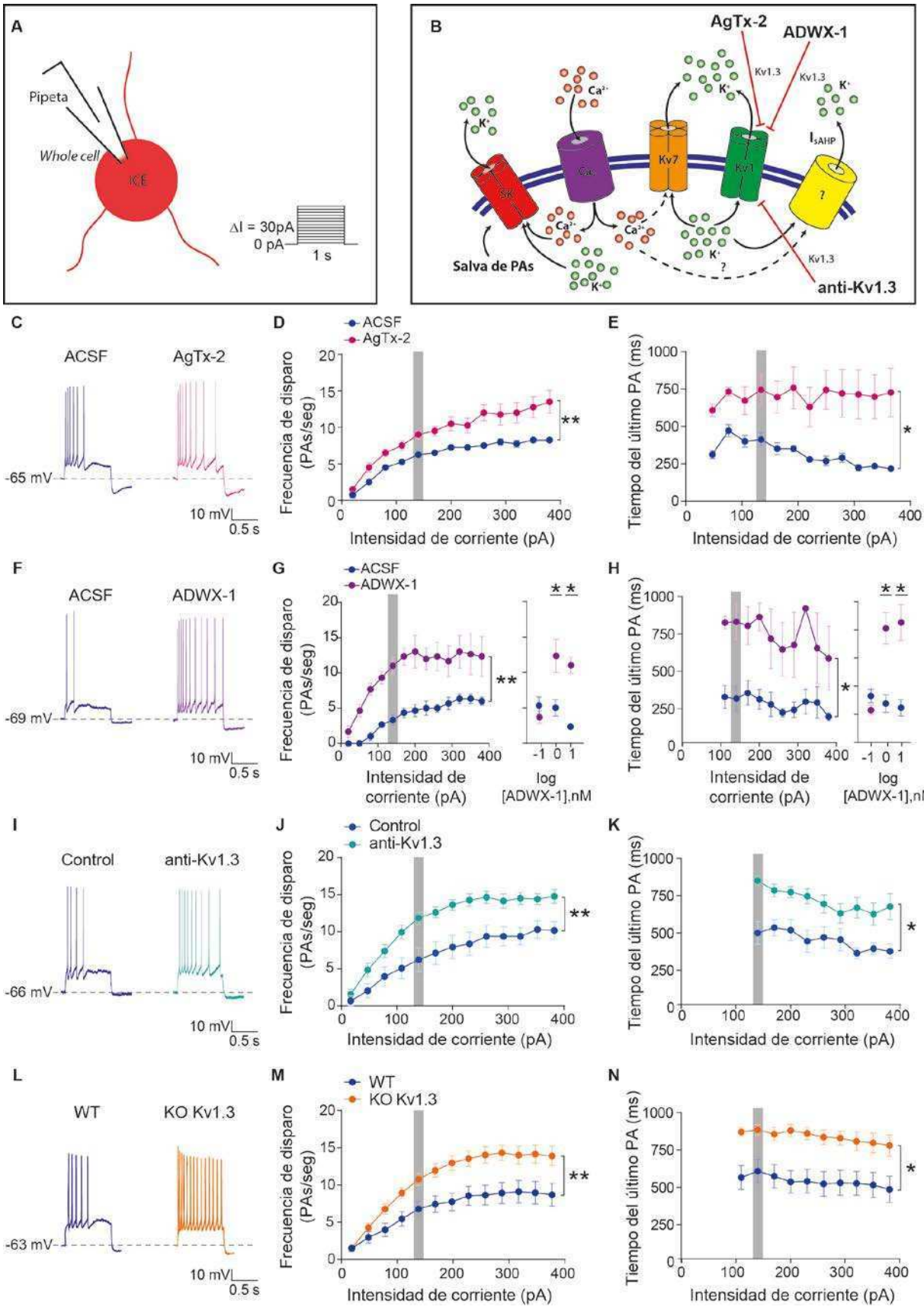
A
Pipeta
Whole cell
ΔI = 30pA
0 pA
1 s
B
AgTx-2
ADWX-1
Kv1.3
Kv1.3
Salva de PAs
anti-Kv1.3
C
ACSF
AgTx-2
-65 mV
10 mV
0.5 s
D
ACSF
AgTx-2
Frecuencia de disparo (PAs/seg)
Intensidad de corriente (pA)
E
Tiempo del último PA (ms)
Intensidad de corriente (pA)
F
ACSF
ADWX-1
-69 mV
10 mV
0.5 s
G
ACSF
ADWX-1
Frecuencia de disparo (PAs/seg)
Intensidad de corriente (pA)
log [ADWX-1],nM
H
Tiempo del último PA (ms)
Intensidad de corriente (pA)
log [ADWX-1],nM
I
Control
anti-Kv1.3
-66 mV
10 mV
0.5 s
J
Control
anti-Kv1.3
Frecuencia de disparo (PAs/seg)
Intensidad de corriente (pA)
K
Tiempo del último PA (ms)
Intensidad de corriente (pA)
L
WT
KO Kv1.3
-63 mV
10 mV
0.5 s
M
WT
KO Kv1.3
Frecuencia de disparo (PAs/seg)
Intensidad de corriente (pA)
N
Tiempo del último PA (ms)
Intensidad de corriente (pA)

Figura r.7: Kv1.3 es necesario para la acomodación de las ICE. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación. **(B)** Esquema la membrana de una ICE indicando qué canales bloquean la AgTx-2, el ADWX-1 y el anticuerpo anti-Kv1.3. **(C)** Registros representativos de una ICE antes y después de la aplicación de AgTx-2 (30 nM). **(D-E)** Frecuencia de disparo (D) y tiempo del último PA (E), en función de la corriente, antes y después de la aplicación de AgTx-2 (ANOVA de medidas repetidas, interacción: **p<0,0001, *p=0,0256, n=4). **(F)** Registros representativos de una ICE antes y después de la aplicación de ADWX-1 (10 nM). **(G-H)** Izquierda:Frecuencia de disparo (G) y tiempo del último PA (H), en función de la corriente, antes y después de la aplicación del ADWX-1(10 nM) (ANOVA de medidas repetidas, interacción: **p<0,0001, tratamiento: *p=0,0088, n=4). Derecha: Frecuencia de disparo (G) y tiempo del último PA (H) antes y después de la aplicación de ADWX-1 (0,1, 1 y 10 nM) para el pulso de 140 pA (ANOVA de medidas repetidas, *p<0,05, n=4 en cada grupo). **(I)** Registros representativos de una ICEregistrada con un anticuerpo dirigido contra un dominio intracelular de Kv1.3 (10μg/mL, Alomone) o un anticuerpo control (10μg/mL, *goat* anti-*guinea pig*biotinilado) en la pipeta. **(J-K)** Frecuencia de disparo (J) y tiempo del último PA (K) en función de la corriente para ICE registradas con anticuerpo anti-Kv1.3 o anticuerpo control en la pipeta (ANOVA de medidas repetidas, interacción: **p=0,0002, *p=0,025, n=9 en cada grupo). **(L)** Registros representativos de una ICE de un ratón WT y una de un ratón KO Kv1.3. **(M-N)** Frecuencia de disparo (M) y tiempo del último PA (N) en función de la corriente para ICE de ratones WT y KO Kv1.3 (ANOVA de medidas repetidas, interacción: **p<0,0001, *p=0,013, n=23 en cada grupo). En barras grises se indica la respuesta al pulso de 140 pA que se muestra en los registros. En todos los casos se muestra Media±EE.

Como los canales Kv1 pueden ser homo o heterotetrámeros, quisimos ver si otras subunidades Kv1 regulan la excitabilidad de las ICE. En primer lugar utilizamos α-dendrotoxina (α-DTX), que bloquea las subunidades Kv1.1, 1.2 y 1.6 (Harvey, 2001) (Figura r.8A-B). Encontramos que la α-DTX (100 nM) disminuye la acomodación de las ICE, aumentando tanto la frecuencia de disparo (Figura r.8CD) como la coordenada temporal del último potencial de acción (Figura r.8E). En cambio, la tityustoxina (TsTx), que muestra selectividad por la subunidad Kv1.2 (Werkman *y col.*, 1993) (Figura r.8B), no indujo cambios de excitabilidad (Figura r.8F-H). Por lo tanto, las subunidades Kv1.1 y Kv1.6 también podrían contribuir a la acomodación de las ICE.

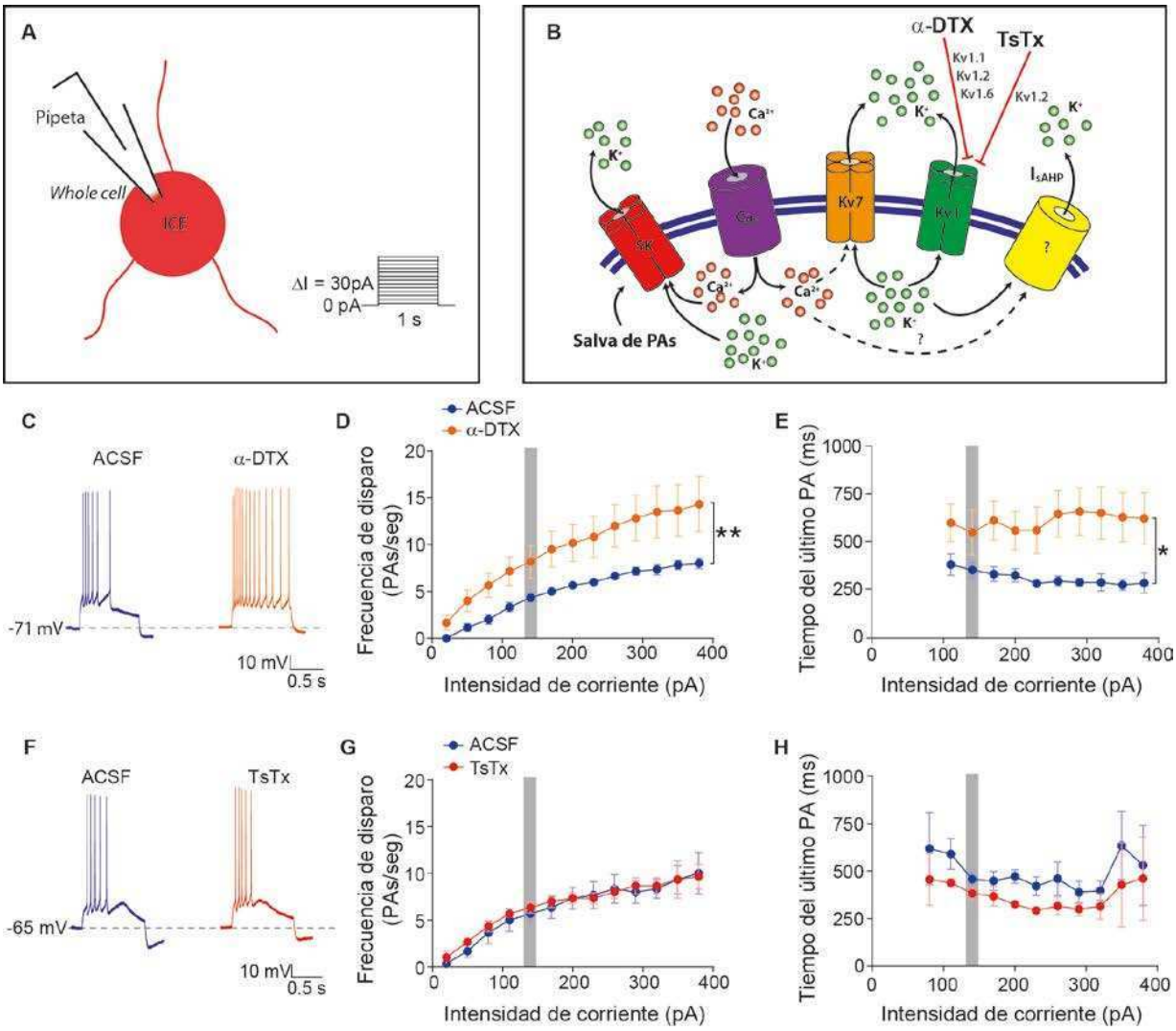

Figura r.8: El bloqueo de Kv1.1 y/o 1.6 bloquea la acomodación de las ICE. (A) Esquema del registro de una ICE en configuracion *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación. **(B)** Esquema de la membrana de una ICE indicando qué canales bloquean la α-DTX y la TsTx. **(C)** Registros representativos de una ICE que acomoda antes y después de la aplicación de α-DTX (100 nM). **(D-E)** Frecuencia de disparo (D) y tiempo del último PA (E), en función de la corriente, antes y después de la aplicación de α-DTX (ANOVA de medidas repetidas, interacción: **p=0,006, *p=0,03, n=6). **(F)** Registros representativos de una ICE que no acomoda antes y después de la aplicación de TsTx (100 nM). **(G-H)** Frecuencia de disparo (G) y tiempo del último PA (H), en función de la corriente, antes y después de la aplicación del TsTx (ANOVA de medidas repetidas, NS, p>0,05, n=3). En barras grises se indica la respuesta al pulso de 140 pA que se muestra en los registros. En todos los casos se muestra Media±EE.

Encontramos que tanto los efectos de la MgTx como los de la α-DTX fueron altamente selectivos, ya que no modificaron otras propiedades electrofisiológicas de las ICE, como el potencial de reposo, el umbral del primer potencial de acción, su amplitud y duración, la amplitud del sag o de la sAHP, la resistencia de entrada ni la reobase (Tablas r.3 y r.4). Tampoco encontramos cambios en estas propiedades en los ratones KO Kv1.3 (Tabla r.5). Por lo tanto, podemos concluir que los canales Kv1 cumplen un rol importante en la excitabilidad de la membrana de las ICE.

Tabla r.3: Comparación entre ICE antes y después de MgTx

Propiedad	ACSF	MgTx	p valor	Significancia
Potencial de reposo (mV)	-60,6 ± 1,9	-60,5 ± 3,5	0,968	NS
Resistencia de entrada (MΩ)	293,7 ± 41,0	331,0 ± 41,6	0,391	NS
Amplitud del sag (mV)	3,8 ± 0,8	4,4 ± 1,2	0,398	NS
Amplitud de sAHP (mV)	-11,1 ± 1,4	-12,1 ± 1,6	0,274	NS
Rheobase (pA)	55 ± 9,2	45 ± 9,2	0,363	NS
Umbral (mV)	-42,2 ± 1,2	-42,0 ± 2,8	0,967	NS
Ancho del 1º PA (ms)	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,03	0,529	NS
Amplitud del 1º PA (mV)	69,4 ± 5,3	68,6 ± 6,2	0,921	NS

Tabla r.4: Comparación entre ICE antes y después de α-DTX

Propiedad	ACSF	α-DTX	p valor	Significancia
Potencial de reposo (mV)	-61,3 ± 3,7	-61,2 ± 6,1	0,983	NS
Resistencia de entrada (MΩ)	228,3 ± 47,0	262,0 ± 56,7	0,618	NS
Amplitud del sag (mV)	3,6 ± 1,3	2,8 ± 0,7	0,558	NS
Amplitud de sAHP (mV)	-9,5 ± 2,6	-8,3 ± 2,0	0,451	NS
Rheobase (pA)	65 ± 10,3	50 ± 15,5	0,542	NS
Umbral (mV)	-39,4 ± 3,0	-38,3 ± 6,5	0,799	NS
Ancho del 1º PA (ms)	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,491	NS
Amplitud del 1º PA (mV)	67,3 ± 5,9	63,4 ± 10,4	0,611	NS

Tabla r.5: Comparación entre ICE de ratones WT y KO Kv1.3

Propiedad	WT	KO Kv1.3	p valor	Significancia
Potencial de reposo (mV)	-54,3 ± 2,2	-58,1 ± 1,2	0,130	NS
Resistencia de entrada (MΩ)	358,1 ± 50,6	310,0 ± 23,9	0,370	NS
Amplitud del sag (mV)	2,5 ± 0,3	3,1 ± 0,5	0,310	NS
Amplitud de sAHP (mV)	-4,7 ± 0,7	-6,8 ± 0,9	0,096	NS
Rheobase (pA)	51,4 ± 8,7	40,0 ± 5,6	0,263	NS
Umbral (mV)	-43,2 ± 0,8	-41,5 ± 0,6	0,088	NS
Ancho del 1º PA (ms)	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,1	0,115	NS
Amplitud del 1º PA (mV)	65,6 ± 3,7	71,6 ± 2,2	0,157	NS

R.2.3. Las ICE expresan una corriente sensible a MgTx

Los canales Kv1 son tetrámeros por los que pasa una corriente rectificadora tardía (*delayed rectifier*). Puede estar formada por 4 subunidades iguales (homotetrámero) o distintas (heterotetrámero), y las propiedades de la corriente dependen de las subunidades que conformen el canal (Lee *y col*., 1996; Grissmer *y col*., 1994). Para caracterizar la corriente sensible a MgTx registramos ICE en modo *voltage clamp*, en configuración *whole cell*. Medimos la amplitud de la corriente evocada al final de un pulso cuadrado de 1 segundo de duración, para distintos voltajes (*inset* en Figura r.9A), en presencia de TTX (50 μM) para prevenir las corrientes de acción. Encontramos que la MgTx reduce la amplitud de la corriente saliente evocada por pulsos despolarizantes (Figura r.9A). La corriente sensible a MgTx tuvo una amplitud de 1,36±0,53 nA si la medimos al final del pulso de 20 mV, lo que representa el 41,7% de la corriente total (Figura r.9B). La corriente sensible no presenta signos de inactivación, ya que no encontramos diferencias en la amplitud de la corriente si la medimos al principio (1,36±0,53 nA) y al final del pulso (1,36±0,53 nA) de 20 mV (test de t pareado, $p>0,05$). Para aislar la corriente sensible a MgTx y determinar de forma más precisa su dependencia de voltaje, realizamos registros en *whole cell voltage clamp*, pero estudiamos la corriente evocada con un protocolo de rampa, desde -100 a 40 mV (*inset* Figura r.9C), en presencia TTX y del bloqueante de la corriente I_h ZD7288 (30 μM)

(Jiang y North, 1991; Kawaguchi, 1993). La corriente evocada al final de la rampa en estas condiciones fue de 10,5±0,8 nA. El 58% de esta corriente fue bloqueada por Cd^{2+} (50μM), que bloquea de manera no selectiva las corrientes de Ca^{2+}, y de esta manera también bloquea las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+}. Luego agregamos MgTx (30 nM), que bloqueó un 27% adicional de la corriente total (Figura r.9C). Calculamos la conductancia sensible a MgTx a partir de la corriente sensible (Figura r.9D), y a esta curva, para cada célula por separado, le hicimos un ajuste a la ecuación de Boltzman (ver materiales y métodos). A partir de este ajuste calculamos un un potencial al 50% de activación (V_{50}) de -9,6±7,3 mV. También encontramos que hay una relación lineal entre el tiempo del último PA de una ICE y la magnitud de la corriente sensible a MgTx medida en la misma célula (Figura r.9E).

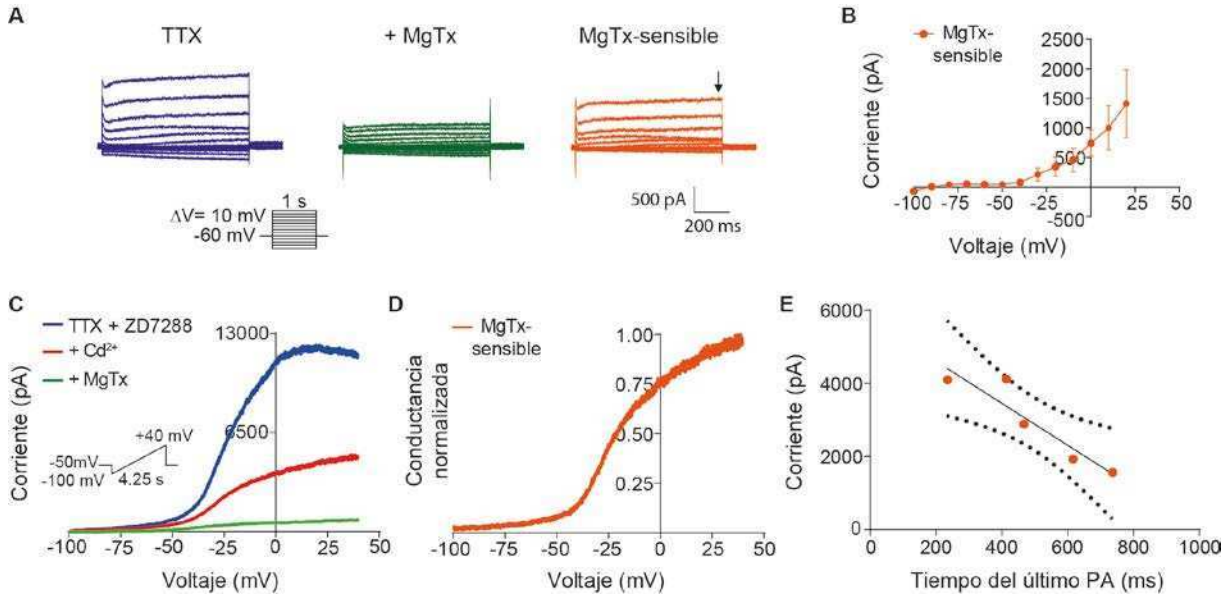

Figura r.9: Caracterización de la corriente sensible a MgTx. (A) Registros representativos de las corrientes registradas en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp* en presencia de TTX (1 μM), después del agregado de MgTx (30 nM) y de la corriente sensible a MgTx. *Inset*: protocolo de *voltage clamp.* **(B)** Curva I-V de la corriente sensible a MgTx medida al tiempo indicado por la flecha en el registro mostrado en A. Se muestra Media±EE. **(C)** Registros representativos de las corrientes registradas en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp* con un protocolo de rampa en presencia de TTX (1 μM) y ZD7288 (30 μM), después del agregado de Cd^{2+} (200 μM) y después de agregar MgTx (30 nM). *Inset*: protocolo de *voltageclamp.* **(D)** Registro representativo de la conductancia sensible a MgTx normalizada, calculada a partir de la corriente sensible a MgTx. (**E)** Corriente sensible a MgTx medida a los 40 mV de la rampa en función del tiempo del último PA para cada ICE (Correlación de Pearson, p=0,022, R^2=0,864; n=5).

Estos resultados nos muestran que, además de corrientes Ca_v y K_{Ca}, las ICE presentan una corriente sensible a MgTx de gran amplitud que se activa únicamente por voltaje, que correlaciona con la magnitud de la acomodación, lo que propone a los canales que contienen la subunidad de Kv1.3 como jugadores esenciales en la excitabilidad de las ICE. El V_{50} reportado para canales homotetrámeros de Kv1.3 es de entre -26 mV (Grissmer *y col.*, 1994) y -22 mV (Doczi *y col.*, 2008), determinado utilizando sistemas heterólogos de expresión. La diferencia en el V_{50} determinado por nosotros puede deberse a que el canal estáformado por distintas subunidades, incluyendo Kv1.3, y/o a condiciones particulares existentes en células nativas que le confieren propiedades distintas a la corriente reportada.

R.2.4. Las ICE expresan la subunidad Kv1.3

Estudios previos demostraron que las ICE expresan el ARNm de Kv1.1 y Kv1.2 (Song *y col*., 1998). Sin embargo, otras subunidades, como Kv1.3 y Kv1.6, no habían sido investigadas. Como primera aproximación hicimos dos estudios de inmunofluorescencia con anticuerpos que se unen ya sea a un epítope intracelular (Neuromab, Figura r.10A) o extracelular de la subunidad Kv1.3 (Alomone Labs, Figura r.10B). Observamos, con ambos anticuerpos, que las ICE expresan la subunidad Kv1.3.

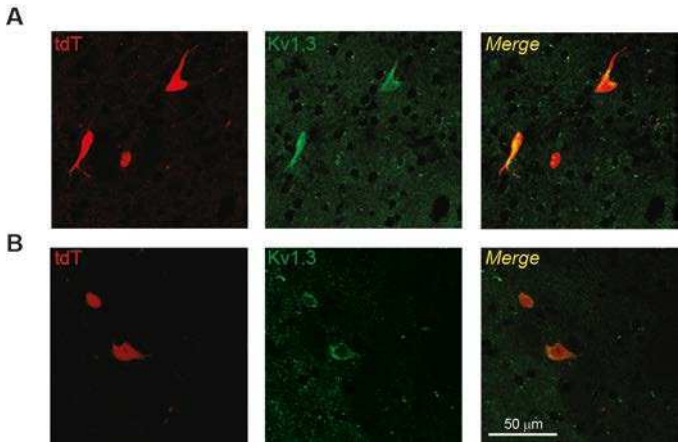

Figura r.10: Las ICE expresan la subunidad Kv1.3. (A-B) Inmunofluorescencia para el canal Kv1.3 (verde) en estriado de un ratón ChAT-Cre;tdT (tdT en rojo) usando un anticuerpo anti-Kv1.3 hecho en rata contra un epítope intracelular (A, Neuromab) y un anticuerpo anti-Kv1.3 hecho en conejo acoplado a FITC contra un epítope extracelular (B, AlomoneLabs). Ambos anticuerpos mostraron colocalización con tdT (*Merge*).

Para confirmar este resultado y estudiar la expresión de otras subunidades potencialmente implicadas en base a las herramientas farmacológicas que usamos (MgTx y α-DTX), analizamos la presencia del ARNm de distintas subunidades Kv1 en las ICE. Para ello sintetizamos ADNc a partir de ARN extraído de muestras obtenidas por captura láser de ICE (células estriatales positivas para tdTomato, tdT+) y de tejido circundante (tejido estriatal sin somas positivos para tdTomato, tdT-) (ver Figura m.4 de Materiales y Métodos). Luego realizamos PCR para evaluar la expresión de Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.6. Para validar la selectividad de las muestras capturadas, confirmamos que las muestras tdT+ expresen ARN de ChAT, y que las muestras tdT- expresen marcadores de neuronas GABAérgicas (como GAD67). Como esperábamos, las células tdT+ expresaron ARN de ChAT, mientras que las tdT- no. Sin embargo, detectamos ARN de GAD67 tanto en células tdT- como tdT+ (Figura r.11). Creemos que este resultado se debe a que el estriado está mayoritariamente compuesto por células que expresan GAD67 (neuronas de proyección e interneuronas GABAérgicas), por lo que al extraer las células tdT+ puede haberse contaminado con una pequeña muestra de tejido que las rodea, lo que nos da este resultado positivo. Es interesante notar que únicamente las muestras enriquecidas en ICE expresan la subunidad Kv1.3 (Figura r.11), lo que resulta consistente con un trabajo previo en el que no se había encontrado la expresión de esta subunidad en neuronas GABAérgicas de proyección del estriado (Shen *y col*., 2004). También observamos que las muestras enriquecidas en ICE expresan Kv1.1 pero no Kv1.2 ni Kv1.6 (Figura r.11). En un estudio previo realizado con PCR de células únicas se había encontrado que la subunidad Kv1.2 se expresa en el 25%de las ICE (Song *y col*, 1998), por lo que es probable que nosotros no la hayamos encontrado porque el ARN se encuentra en cantidades inferiores a la sensibilidad de nuestro método. Sin embargo, nuestros resultados son consistentes con la contribución principal de las subunidades Kv1.3 y Kv1.1 en los efectos de la MgTx y la α-DTX, y con la falta de efecto de la TsTx. Estos resultados también contribuyen a la idea de que el canal por el que pasa la corriente sensible a MgTx puede estar formado tanto por la subunidad Kv1.3 como por la Kv1.1.

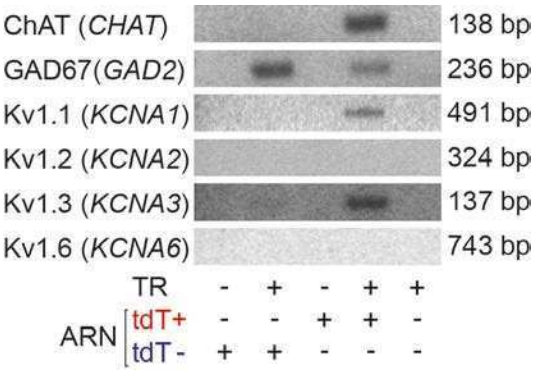

Figura r.11: Las ICE expresan ARN de las subunidades Kv1.3 y Kv1.1. Resultado representativo de RT-PCR que evaluó la expresión de ChAT, GAD67, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 y Kv1.6 (resultados similares se obtuvieron en 3 muestras de animales independientes).

R.2.5. La corriente sensible a MgTx contribuye a la IsAHP

En un trabajo previo Sanchez y colaboradores (2011) mostraron que la corriente de K^+ que causa hiperexcitabilidad de las ICE de ratones parkinsonianos puede ser evocada por un protocolo específico para estudiar la IsAHP. Generalmente la IsAHP se mide como la corriente de cola inducida por un pulso de voltaje despolarizante largo, que parte de un potencial de mantenimiento (*holding*) similar al potencial del reposo de la célula de estudio. En las ICE este protocolo evoca una corriente con una componente temprana sensible a Ba^{2+} y una componente tardía insensible a Ba^{2+} (ver Figura i.12F de la introducción). La componente insensible a Ba^{2+}, que es la K_{Ca} que clásicamente se la asoció a canales de Ca^{2+} sensibles a dihydropiridinas (Goldberg y Wilson, 2005; Goldberg *y col*., 2009), parecería no estar relacionada con la acomodación de las ICE, ya que ésta persiste luego de la aplicación de dihydropiridinas (Sanchez *y col*., 2011). Como la relación entre la corriente que nosotros describimos y la encontrada previamente por Sanchez y colaboradores (2011) resultaba poco clara, nos preguntamos si la MgTx bloqueaba la IsAHP de las ICE. Por lo tanto registramos a las ICE en *whole cell voltage clamp* utilizando el protocolo para medir IsAHP en presencia de TTX (50 μM) y luego agregamos la MgTx (30 nM). Encontramos que la MgTx redujo la IsAHP en un 41% en el pico (Figura r.12A-C). Finalmente, nos preguntamos si la corriente sensible a MgTx se encuentra activa cuando el potencial de membrana se mantiene a -50 mV, como lo hacía la componente sensible a Ba^{2+} de la IsAHP medida en ratas (Sanchez *y col*., 2011). La corriente sensible a MgTx en el potencial de *holding*

fue de 105±32 pA, lo que representa el 13% de la corriente sensible medida al final de un pulso de 1 segundo de duración de 0 mV.

Para confirmar este resultado, hicimos, nuevamente en colaboración con los Dres. Eden Flores Barrera y Kuei Tseng en la Universidad Rosalind Franklin, el mismo protocolo para evaluar la IsAHP en ratones KO Kv1.3 y la comparamos con la medida en los ratones control. Encontramos que los ratones KO para el Kv1.3 tienen la IsAHP disminuida en comparación con los controles (Figura r.12D-E).

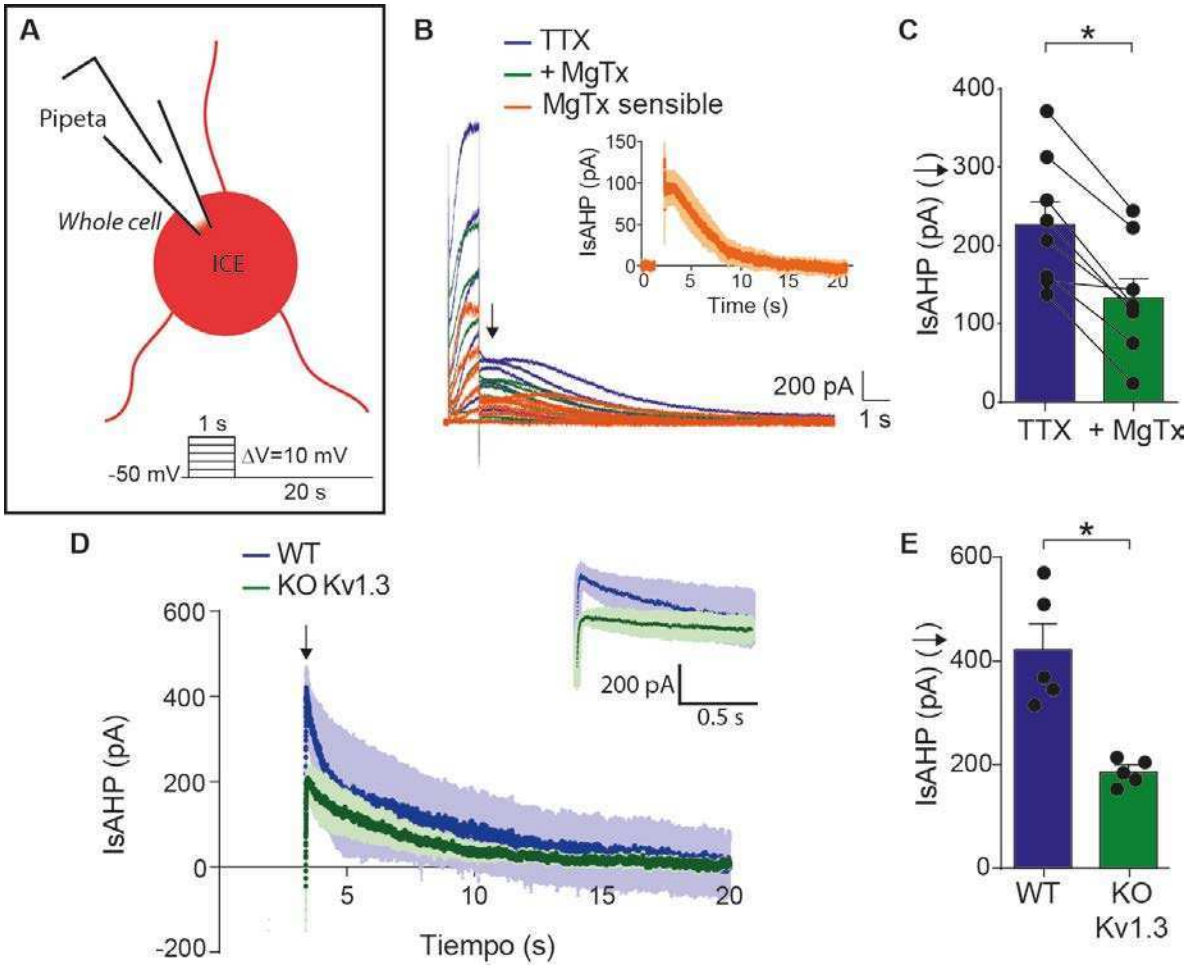

Figura r.12: Kv1.3 contribuye a la IsAHP de las ICE. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp*, y del protocolo de estimulación para evaluar la IsAHP.

(B) Registros representativos de la IsAHP de una ICE antes y después del agregado de MgTx (30 nM) y de la corriente sensible a MgTx, en presencia de TTX (1 μM). Inset: componente de IsAHP sensible a MgTx, promedio. **(C)** IsAHP medida en el pico de la corriente (donde indica la flecha en B) antes y después del agregado de MgTx (test de Mann-Whitney, *p=0.0002, n=8). **(D)** IsAHP promedio de ICE de ratones WT y KO Kv1.3. *Inset*: Ampliación del pico de la IsAHP. **(E)** IsAHP medida en el pico de la corriente (donde indica la flecha en D) de ICE de ratones WT y KO Kv1.3 (test de Mann-Whitney, *p=0,038, n=5-6 en cada grupo). En todos los casos se muestra Media±EE y los puntos negros corresponden a ICE individuales.

Estos resultados muestran que los protocolos utilizados para medir la IsAHP reclutan corrientes Kv1.3 de bajo umbral que no se inactivan, que parecen estar activas a potenciales de membrana subumbrales, y que entonces podrían regular la actividad subumbral de las ICE.

R.2.6. Los canales que contienen la subunidad Kv1.3 regulan la actividad tónica y la integración sináptica de las ICE

En trabajos previos se estudió el rol de las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} en la regulación de la frecuencia de disparos de potenciales de acción espontáneos de las ICE (Goldberg y Wilson, 2005; Bennet y Wilson, 1999). Sin embargo, la relevancia de las corrientes Kv en su actividad tónica no había sido estudiada. Registramos la frecuencia de disparos espontáneos de las ICE en configuración *cell attached* (Figura r.13A) en rodajas que fueron o no expuestas a MgTx (30 nM). En ambos casos, incluimos picrotoxina y CNQX en el baño para bloquear gran parte de la neurotransmisión glutamatérgica y gabaérgica, respectivamente, y minimizar la regulación por señales externas. Encontramos que la frecuencia de disparos espontáneos de las ICE fue un 72% más alto en presencia de MgTx, en comparación con la situación control, sin MgTx (Figura r.13A-B). Por lo tanto, los canales sensibles a MgTx limitan la frecuencia de disparos espontáneos de las ICE.

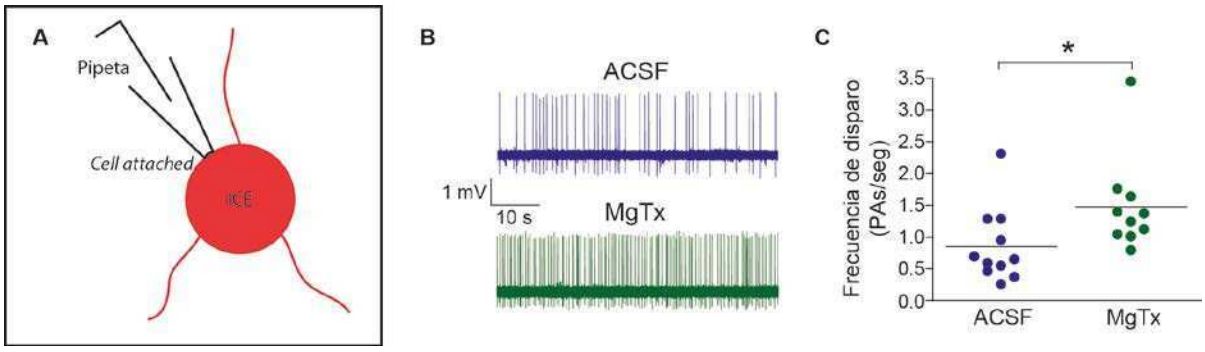

Figura r.13: Kv1.3 participa en la actividad tónica de las ICE. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *cell attached* y modo *current clamp*. **(B)** Registros representativos de la actividad espontánea una ICE en presencia (abajo) y una ICE en ausencia (arriba) de MgTx (30 nM). **(C)** Frecuencia de disparos espontáneos de ICE en presencia o ausencia de MgTx (test de Mann-Whitney, *p=0,012, n=10-11 en cada grupo).

Los inputs glutamatérgicos provenientes del tálamo generan respuestas complejas en las ICE, en relación con eventos ambientales prominentes como recompensas (Kimura *y col.*, 1984; Apicella *y col.*, 1991). Para determinar si los canales que contienen la subunidad Kv1.3 regulan la respuesta de las ICE a inputs glutamatérgicos, primero activamos las aferencias de las ICE mediante estimulación eléctrica intraestriatal con un electrodo bipolar en presencia de picrotoxina para bloquear la transmisión GABAérgica (Figura r.14A-B). Realizamos cinco pulsos de estimulación subumbral a 20 Hz y encontramos que en la situación control las ICE suman los primeros PEPS pero luego la integración temporal decrece. Sin embargo, al agregar MgTx, la integración temporal de los PEPS se mantiene a lo largo de los cinco pulsos de estimulación (Figura r.14C-D). Por otro lado, observamos que la despolarización inducida por la estimulación sináptica era seguida por una AHP (Figura r.14C), que se cree que contribuye a la respuesta de pausa de las ICE en presencia de eventos relevantes (Reynolds *y col*., 2004). Encontramos que la MgTx no redujo estadísticamente la AHP (Figura r.14E), pero sí observamos una tendencia a la reducción, pero sí aumentó su latencia (Figura r.14F). Estos resultados fueron replicados bloqueando la subunidad Kv1.3 con ADWX-1 en vez de MgTx (Figura r.14G-H), pero en este caso la AHP sí fue reducida (Figura r.14I-J). Para confirmar que la respuesta se debía a activación

sináptica y no a una despolarización directa de las ICE por la estimulación agregamos CNQX en el baño y confirmamos que la respuesta fuera bloqueada (Figura r.14C-E).

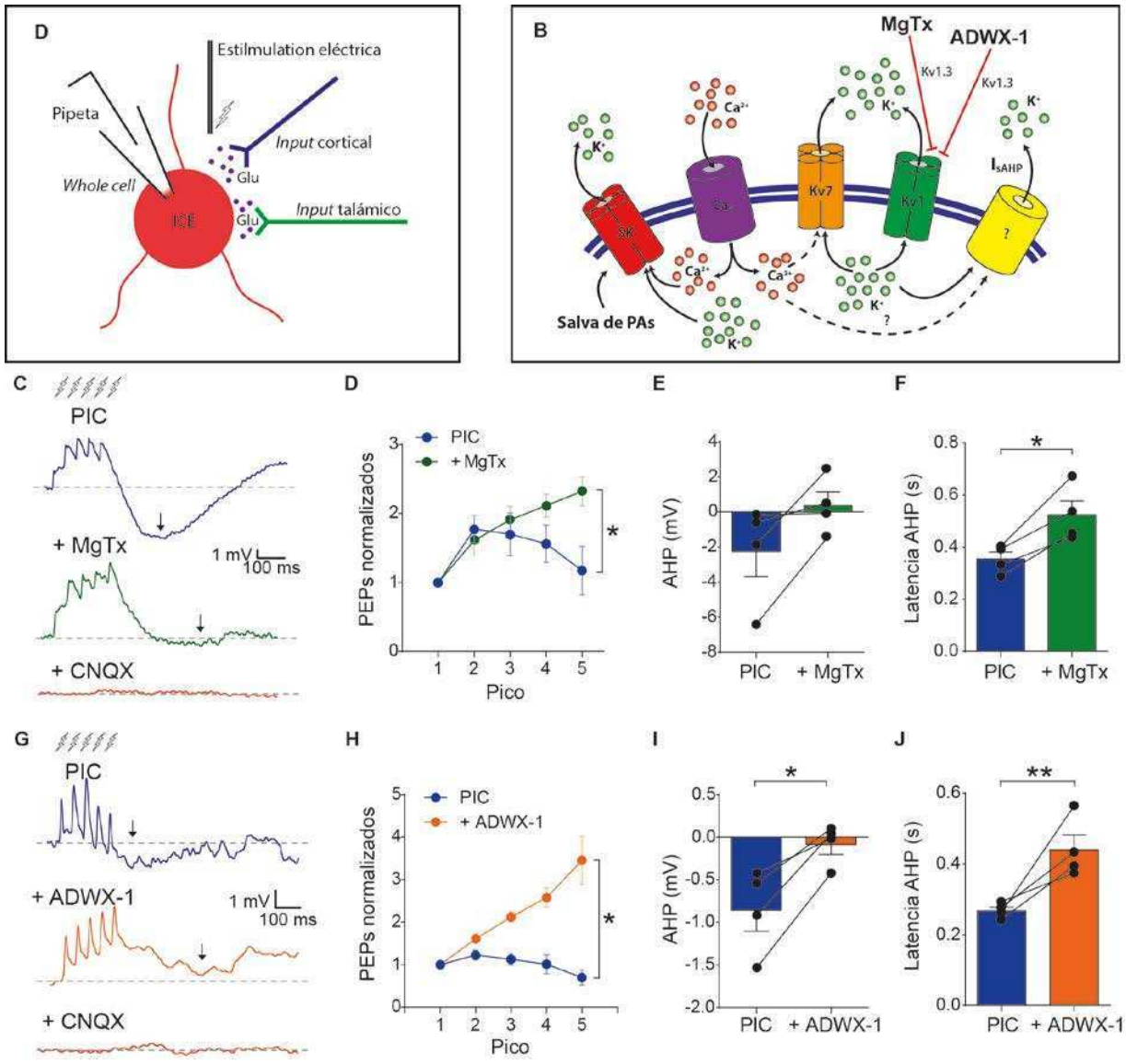

Figura r.14: Kv1.3 participa de la integración sináptica glutamatérgica de las ICE. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación eléctrica con un electrodo bipolar intraestriatal. **(B)** Esquema de la membrana de una ICE indicando qué canales bloquean la MgTx y el ADWX-1. **(C)** Registros representativos de la respuesta de una ICE antes y después de la aplicación de MgTx (30nM) frente a la estimulación eléctrica intraestriatal, en presencia de Picrotoxina (PIC, 100 μM). El agregado de CNQX (50 μM) bloqueó la respuesta a la estimulación. **(D)** Amplitud de los PEPS normalizados al 1º PEPS, evocados por la estimulación eléctrica intraestriatal,

antes y después del agregado de MgTx (ANOVA de medidas repetidas, interacción: *p=0,0004, n=4). **(E-F)** Amplitud (E) y latencia (F) de la AHP medida a su máxima amplitud en donde indican las flechas en C antes y después de la aplicación de MgTx (tests de t pareados, E: p=0,16; F: *p=0,03; n=4). **(G)** Registros representativos de la respuesta de una ICE antes y después de la aplicación de ADWX-1 (10 nM) frente a la estimulación eléctrica intraestriatal, en presencia de picrotoxina (PIC, 100 μM). El agregado de CNQX (50 μM) bloqueó la respuesta a la estimulación. **(H)** Amplitud de los PEPS normalizados al 1º PEPS, evocados por la estimulación eléctrica intraestriatal, antes y después del agregado de ADWX-1 (ANOVA de medidas repetidas, interacción: *p=0,0021, n=4). **(I-J)** Amplitud (I) y latencia (J) de la AHP medida en donde indican las flechas en F antes y después de la aplicación de ADWX-1 (tests de t pareados, I: *p=0,03; J: **p=0,008; n=4). En todos los casos se muestra Media±EE.

Dado que la respuesta fisiológica de las ICE a recompensas sería desencadenada por inputs talámicos, estudiamos el rol específico de estos inputs transfectando neuronas talámicas con channelrhodopsin-2 (ChR2) acoplada a YFP (Figura r.15A-B). Luego de esperar un mes para que el canal se exprese, realizamos rodajas coronales a la altura del estriado y registramos ICE en modo *whole cell current clamp* en presencia de picrotoxina. Primero realizamos una estimulación de 3 segundos de duración a 20 Hz y observamos que las ICE respondían a la estimulación lumínica disparando potenciales de acción, que se bloquean con el agregado de CNQX (Figura r.15C). Luego estimulamos con un tren de luz azul de cinco pulsos (10 ms) a 20 Hz, que indujo una respuesta sináptica similar a la observada con estimulación eléctrica intraestriatal. En la situación control la estimulación generó cinco PEPS con escasa integración temporal a lo largo de la respuesta excitatoria. Al agregar MgTx, la integración temporal aumentó considerablemente (Figura r.15D-E). En este caso la MgTx redujo la amplitud de la AHP (Figura r.15F) y aumentó su latencia (Figura r.15G).

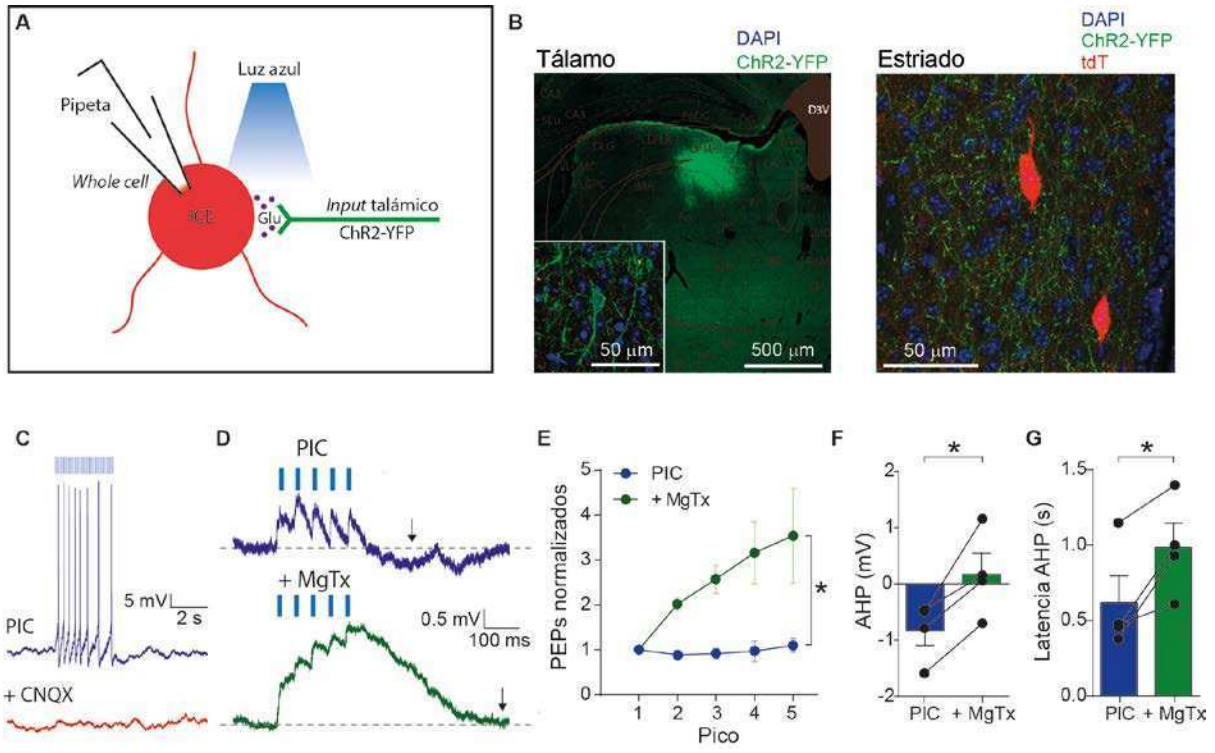

Figura r.15: Kv1.3 participa de la integración sináptica talámica de las ICE. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación optogenética con luz azul de las terminales talámicas en estriado. **(B)** Izquierda: Microfotografía del tálamo mostrando el sitio de inyección del vector viral para expresar ChR2-YFP. *Inset*: Detalle de una neurona talámica transfectada. Derecha: Microfotografía de estriado en la que se muestran las proyecciones talámicas transfectadas con ChR2-YFP alrededor de ICE en un ratón ChAT-Cre;tdT (tdT en rojo). **(C)** Registros representativos de la respuesta de una ICE frente a la estimulación optogenética (3 segundos de estimulación, tren a 20 Hz, cada pulso dura 10 ms), en presencia de picrotoxina (PIC, 100 µM). La aplicación de CNQX (50 µM) bloquea la respuesta de la ICE frente a la estimulación. **(D)** Registros representativos de la respuesta de una ICE antes y después de la aplicación de MgTx (30 nM) frente a la estimulación optogenética de las terminales talámicas (5 pulsos de 10 ms a 20 Hz), en presencia de picrotoxina (PIC, 100 µM). **(E)** Amplitud de los PEPS normalizados al 1º PEPS, evocados por la estimulación optogenética de las terminales talámicas, antes y después del agregado de MgTx (ANOVA de medidas repetidas, interacción: *p<0,0001, n=4). **(F-G)** Amplitud (F) y latencia (G) de la AHP medida en donde indican las flechas en D antes y después de la aplicación de MgTx (tests de t pareados, F: *p=0,03; G: *p=0,04; n=4).En todos los casos se muestra Media±EE.

Luego quisimos confirmar que el efecto observado por la activación sináptica se debía a un efecto de membrana. Para ello, realizamos registros en *whole cell current clamp*, y realizamos una inyección de la corriente registrada en una ICE que había sido estimulada sinápticamente (CEPS-sintéticas) (Figura r.16A). Observamos el mismo

efecto que antes: la MgTx aumentó la integración de los PEPS "sintéticos" generados (Figura r.16B-C), redujo la latencia de la AHP (Figura r.16D) y aumentó su latencia (Figura r.16E).

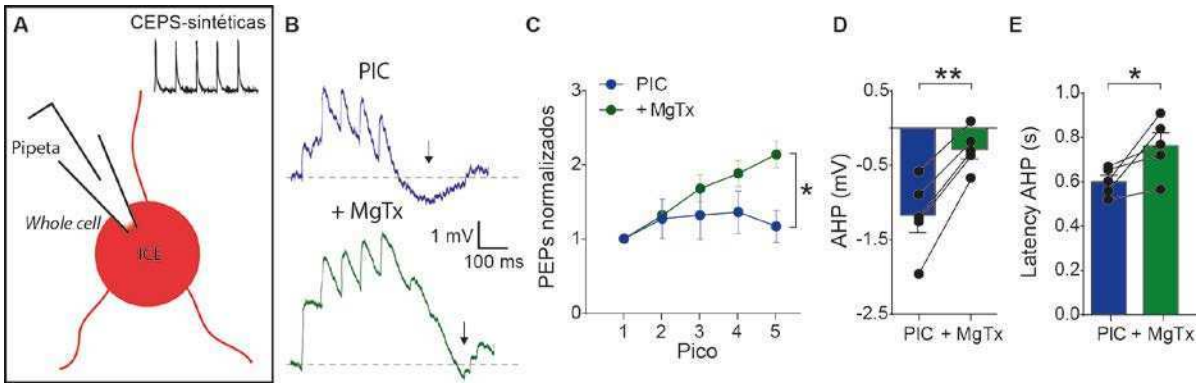

Figura r.16: El efecto de Kv1.3 en la integración sináptica se debe a cambios en las propiedades de integración de las ICE. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación. **(B)** Registros representativos de la respuesta de una ICE antes y después de la aplicación de MgTx (30 nM) frente a la inyección de las CEPSs-sintéticas, en presencia de picrotoxina (PIC, 100 μM). **(C)** Amplitud de los PEPS normalizados al 1º PEPS, evocados por la inyección de las CEPS-sintéticas, antes y después del agregado de MgTx (ANOVA de medidas repetidas, interacción: *p=0,0003, n=4). **(D-E)** Amplitud (D) y latencia (E) de la AHP medida en donde indican las flechas en B antes y después de la aplicación de MgTx (tests de t pareados, D: **p=0,009; E: *p=0,04; n=4). En todos los casos se muestra Media±EE.

Por lo tanto, los canales que contienen la subunidad Kv1.3 podrían modular las señales mediante las cuales las ICE informan sobre la presencia de eventos ambientales prominentes, como recompensas, al circuito estriatal.

Tomados en conjunto estos resultados revelan un rol inesperado de los canales Kv en la fisiología de las ICE. Los canales que contienen la subunidad Kv1.3 son jugadores claves en la excitabilidad de las ICE, regulan su frecuencia de disparos espontáneos y limitan la integración temporal de las señales excitatorias.

Capítulo 3

Contribución de la subunidad Kv1.3 en la excitabilidad de las ICE de ratones parkinsonianos

R.3.1. Las ICE de ratones parkinsonianos son más excitables

Se ha demostrado en un trabajo previo que las ICE de ratas modelo de la enfermedad de Parkinson son más excitables que las de ratas control. En ese trabajo la degeneración de las neuronas nigroestriatales se obtenía mediante la toxina 6-OHDA, que destruye selectivamente a las neuronas catecolaminérgicas. El aumento en la excitabilidad se evidenció como una falta de acomodación en comparación con las ICE de ratas sham (Sanchez *y col.*, 2011; Figura i.11A-B de la introducción). Para determinar si la degeneración nigroestriatal induce un déficit en la acomodación en ratones, similar al observado en ratas, estudiamos la excitabilidad de las ICE de ratones ChAT-Cre;tdT lesionados con 6-OHDA y ratones control (sham). En colaboración con la Dra. Irene Taravini, que realizó la mayoría de las lesiones, inyectamos la toxina (o su vehículo) en el haz medial del cerebro anterior (*medial forebrain bundle,* MFB) de un hemisferio (Figura m.1 del Materiales y Métodos). Cuatro semanas después realizamos tres ensayos conductuales para evaluar el déficit motor que presentaban. Primero realizamos un ensayo de arena abierta (*open field*) en el cual evaluamos la cantidad de rotaciones ipsilaterales al lado de la lesión, en función de las rotaciones totales, y observamos que los ratones parkinsonianos rotan más veces hacia el lado ipsilateral que los controles (Figura r.17A). En segundo lugar realizamos el ensayo "del cilindro", en el cual se examina el uso de las extremidades anteriores durante la exploración vertical de la pared de un cilindro de acrílico transparente de 10 cm de diámetro. Verificamos que los ratones parkinsonianos utilizan menos su pata contralateral respecto del control (Figura r.17B). Por último realizamos un ensayo de *rotarod* acelerado, en el que evaluamos la

latencia a caerse del rodillo durante cinco ensayos seguidos, separados por cinco minutos, y verificamos que los ratones lesionados tardaron menos en caerse que los controles (Figura r.17C), implicando que tienen menor coordinación motora. Para confirmar el grado de lesión de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta*, luego de realizar los experimentos de electrofisiología evaluamos en esta estructura la inmunorreactividad contra tirosina hidroxilasa (TH), una enzima clave en la síntesis de catecolaminas, y verificamos una drástica reducción de neuronas TH+ en los ratones parkinsonianos (Figura r.17D). Estos resultados confirman la efectividad de la lesión dopaminérgica en el grupo experimental.

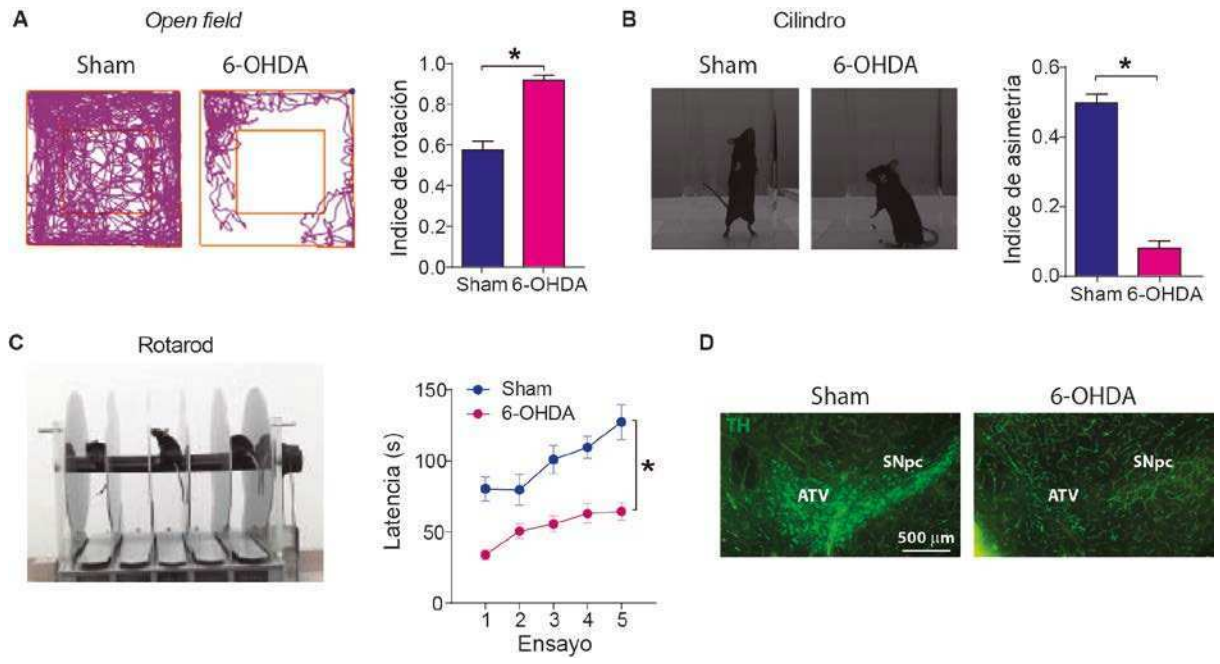

Figura r.17: Comportamiento de ratones con lesión dopaminérgica nigroestriatal y su confirmación histológica. (A) Izquierda: Trayectoria representativa en el *open field* de un ratón sham y uno lesionado (6-OHDA). Derecha: índice de rotación para los ratones sham y 6-OHDA (test de t no pareado, *p<0,0001, n=18 sham y n=35 6-OHDA). **(B)** Izquierda: Fotos de un ratón del grupo sham y uno del grupo 6-OHDA realizando el test del cilindro. Derecha: índice de asimetría de patas delanteras para los ratones sham y 6-OHDA (test de t no pareado, *p<0,0001, n=18 sham y n=35 6-OHDA). **(C)**

Izquierda: Foto de ratones realizando el test del rotarod. Derecha: Latencia de caída del rotarod de los ratones del grupo sham y 6-OHDA (ANOVA de medidas repetidas, interacción: *p=0,008, n=18 sham y n=35 6-OHDA). **(D)** Inmunofluorescencia para TH en la sustancia *nigra pars compacta* y el área tegmental ventral (ATV) en ratones de los gruposham y 6-OHDA.

Para estudiar la excitabilidad de las ICE de ratones parkinsonianos observamos su respuesta a la inyección de pulsos de corriente despolarizante. Encontramos que las ICE de ratones lesionados tienen una menor reobase, disparan más potenciales de acción y disparan su último potencial de acción más tarde que las ICE de los controles (Figura r.18A-C). Tanto para los ratones parkinsonianos como para los controles el patrón de acomodación de cada célula no cambió a lo largo de distintos pulsos despolarizantes (Figura r.18D).

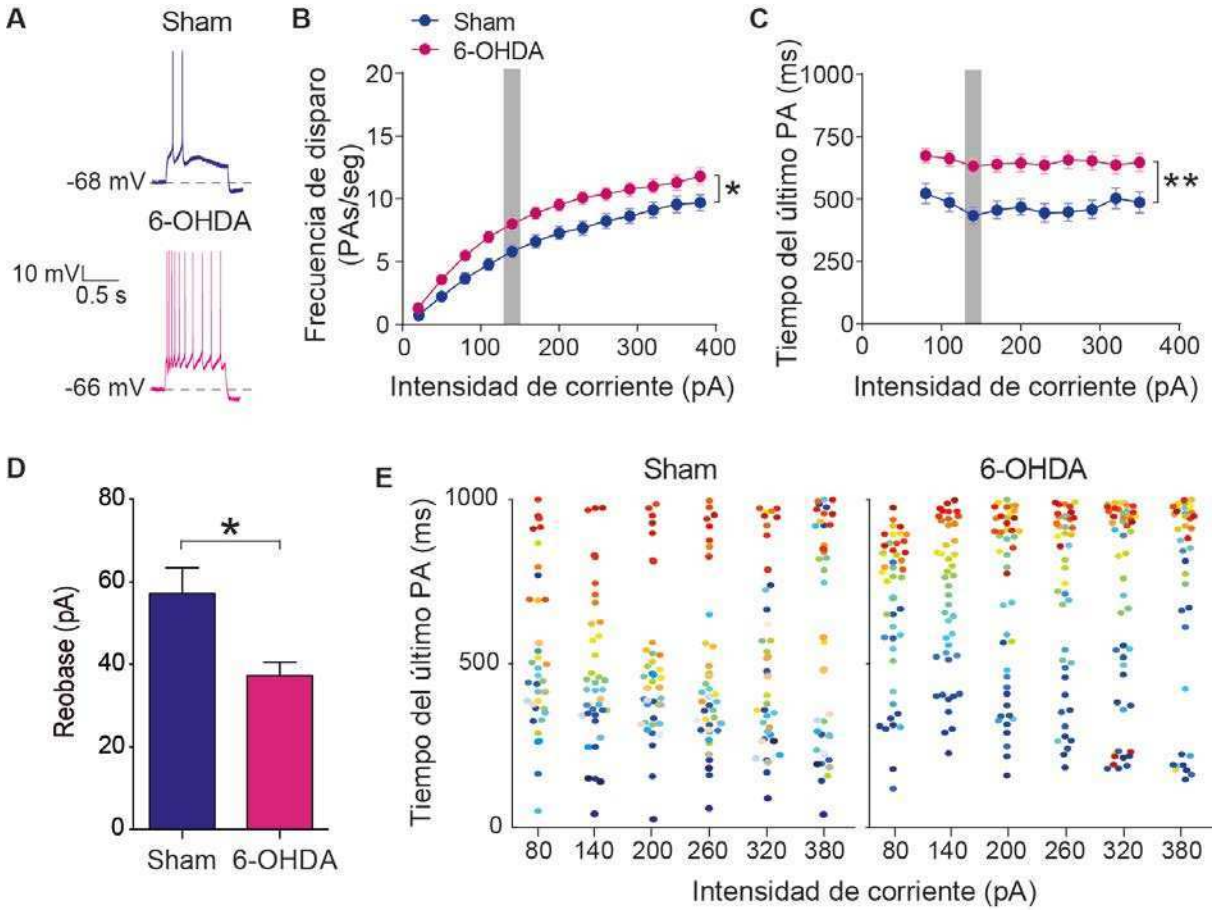

Figura r.18: las ICE de los ratones parkinsonianos son más excitables. (A) Registros representativos de una ICE que acomoda (arriba) de un ratón del grupo sham y una que no acomoda (abajo) de un ratón

del grupo 6-OHDA en respuesta a un pulso despolarizante (140 pA).**(B-C)** Frecuencia de disparo (B) y tiempo del último PA (C) en función de la intensidad de corriente para ICE de ratones del grupo sham y 6-OHDA (ANOVA de medidas repetidas, interacción: *p=0.005, grupo: **p=0,0001, n=46 sham y n=71 6-OHDA). En barras grises se indica la respuesta al pulso de 140 pA que se muestra en los registros en A. **(D)** Reobase de ICE de ratones del grupo sham y 6-OHDA (test de t no pareado; *p=0,003, n=46 sham y n=71 6-OHDA). **(E)** Tiempo del último PA para todas las ICE registradas en ratones delos grupos sham (izquierda) y 6-OHDA (derecha) en función de la intensidad de corriente. El código de color está asignado según el tiempo del último PA para el pulso de 140 pA. En todos los casos se muestra Media±EE.

El cambio en la coordenada temporal del último potencial de acción y un análisis exploratorio de los registros sugirieron que el aumento de excitabilidad se debía a una falla en la acomodación de las ICE. Para determinar sin sesgo cuántas ICE acomodaban o no acomodaban en cada grupo experimental realizamos el mismo tipo de análisis de *clusters* multivariado que antes cuando comparamos las ICE de ratones juveniles y adultos. Utilizamos como variables la frecuencia de disparo y tiempo del último PA para el pulso de 140 pA. Nuevamente encontramos dos *clusters* (Figura r.19A): uno con alta frecuencia y elevado tiempo del último potencial de acción (*Cluster* 1, "no acomodadoras") y el otro con baja frecuencia y bajo tiempo del último potencial de acción (*Cluster* 2, "acomodadoras") (Figura r.19B). En este caso también encontramos que la proporción de células no acomodadoras y acomodadoras difiere entre los dos grupos (Figura r.19D): los animales parkinsonianos presentan una mayor proporción de células no acomodadoras que los controles. El 43% de 71 neuronas de ratones lesionados fueron clasificadas como “no acomodadoras”, en comparación con el 17% de 46 neuronas de ratones control. Cabe destacar que dentro de cada *cluster* no hubo diferencias entre ratones control y lesionados en las dos variables analizadas. Es decir, las diferencias de excitabilidad reportadas en la Figura r.18 para la totalidad de las ICE estudiadas reflejan más diferencias en la proporción de ICE acomodadoras y no acomodadoras entre los grupos que una variación de excitabilidad que afecta a todas las ICE independientemente de su fenotipo de excitabilidad. Además, observamos que la reobase fue mayor en el *cluster* de las ICE que no acomodan, pero no difirió entre grupos dentro de cada *cluster* (Figura r.19C), indicando nuevamente que

el cambio de reobase observado al promediar todas las ICE (Figura r.18) es resultado de un aumento en la proporción de ICE no acomodadoras en los ratones lesionados.

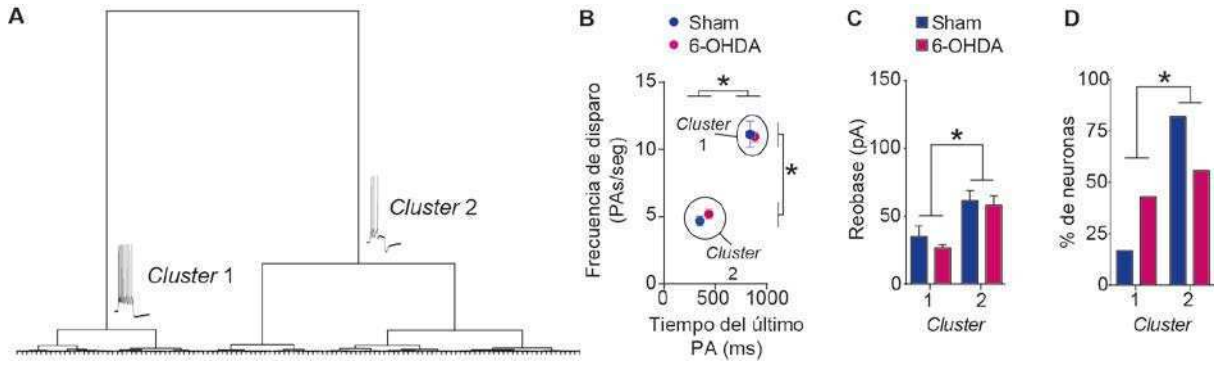

Figura r.19: La proporción de ICE que no acomodan aumenta en ratones parkinsonianos. (A) Análisis de *clusters* multivariado no supervisado obtenido utilizando la frecuencia de PAs y el tiempo del último PA como variables clasificatorias. **(B)** Frecuencia de PAs en función del tiempo del último PA para ratones del grupo sham y 6-OHDA para los *clusters* 1 y 2 obtenidos a partir del análisis de *clusters* en A, para el pulso de 140 pA (ANOVA de 2 factores, efecto del *cluster*: *p<0,0001; interacción y grupo fueron NS). **(C)** Reobase de ratones del grupo sham y 6-OHDA para los *clusters* 1 y 2. (ANOVA de 2 factores, efecto de *cluster*: *p=0,0008; interacción y grupo NS). **(D)** Porcentaje de neuronas de ratones delos grupos sham y 6-OHDA para cada *cluster* (test exacto de Fisher, *p=0,002). En todos los casos se muestra Media±EE.

Por otro lado, encontramos que las ICE de ratones sham y 6-OHDA no diferían en otras propiedades como el potencial de reposo, resistencia de entrada, amplitud del sag y de sAHP, el umbral, el ancho y la amplitud del primer potencial de acción (Tabla r.6).

Tabla r.6: Comparación entre ICE de ratones sham y 6-OHDA

Propiedad	Sham	6-OHDA	p valor	Significancia
Potencial de reposo (mV)	-66,1 ± 1,0	-64,5 ± 1,2	0,303	NS
Resistencia de entrada (MΩ)	230,5 ± 38,0	308,7 ± 54,7	0,247	NS
Amplitud del sag (mV)	3,2 ± 0,6	4,3 ± 1,3	0,398	NS
Amplitud de sAHP (mV)	-9,1 ± 1,3	-10,0 ± 1,6	0,672	NS
Rheobase (pA)	67,5 ± 13,6	26,0 ± 4,0	**0,014**	**S**
Umbral (mV)	-45,0 ± 1,5	-42,4 ± 1,2	0,231	NS
Ancho del 1º PA (ms)	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,06	0,724	NS
Amplitud del 1º PA (mV)	63,5 ± 4,7	67,0 ± 4,6	0,613	NS

Estos datos confirman y extienden los resultados previamente reportados en ratas, sugiriendo que las ICE de animales con lesión nigroestriatal crónica expresan un fenotipo de excitabilidad que se encuentra más representado en ratones juveniles que en adultos (Sanchez *y col.* 2011).

R.3.2. La excitabilidad de las ICE no cambia con el bloqueo agudo de receptores de dopamina

Con los resultados recién mencionados nos preguntamos si el cambio en la excitabilidad se debía a la lesión crónica de las neuronas dopaminérgicas o si podía reproducirse bloqueando de manera aguda los receptores para dopamina. Para contestar esta pregunta realizamos experimentos en ratones control y registramos las ICE en *whole cell current clamp,* antes y después de la aplicación de los bloqueantes de receptores para dopamina SCH23390 (bloquea receptores de tipo D1) y sulpiride (bloquea receptores de tipo D2). No encontramos cambios en la excitabilidad de las ICE al agregarles estos bloqueantes (Figura r.20), por lo que concluimos que los cambios observados en las ICE de los ratones parkinsonianos requieren la depleción dopaminérgica crónica.

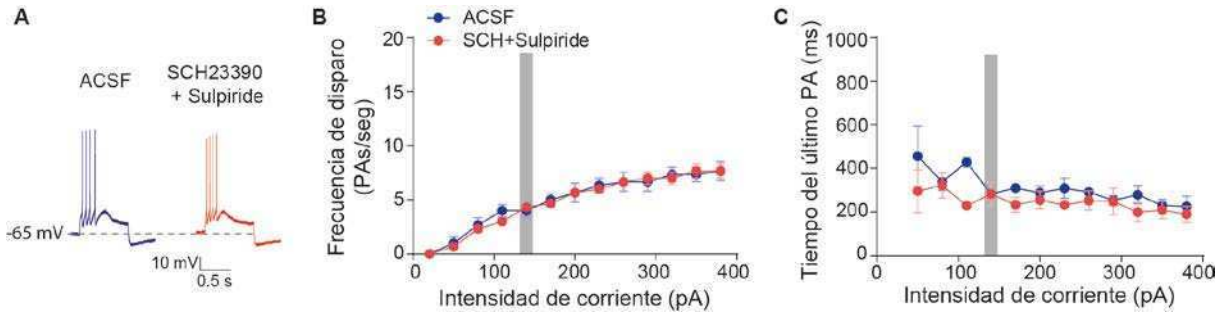

Figura r.20: El bloqueo agudo de los receptores para DA no bloquea la acomodación de las ICE. (A) Registros representativos de una ICE que no acomoda antes y después de la aplicación de SCH23390 (1 μM) y sulpiride (10 μM). **(B-C)** Frecuencia de disparo (B) y tiempo del último PA (C) en función de la corriente antes y después de la aplicación de SCH23390 y sulpiride (ANOVA de medidas

repetidas, p>0,05, n=4). En barras grises se indica la respuesta al pulso de 140 pA que se muestra en los registros. En todos los casos se muestra Media±EE.

R.3.3. Las ICE de ratones parkinsonianos son insensibles a MgTx

Dado que bloqueando los canales que contienen la subunidad Kv1.3 se obtiene un fenotipo de excitabilidad en las ICE de ratones controles que asemeja el que ocurre espontáneamente en los animales parkinsonianos, nos preguntamos si la hiperexcitabilidad observada en ratones lesionados podía explicarse por una disminución de la corriente de los canales Kv1.3. Si este fuera el caso, la MgTx debería tener un efecto disminuido o nulo sobre la excitabilidad de membrana de las ICE de ratones lesionados. Por ello registramos ICE de ratones parkinsonianos y sham en *whole cell current clamp* y estudiamos la respuesta a pulsos despolarizantes antes y después de la aplicación de MgTx (Figura r.21A-B). Como esperábamos, encontramos que la MgTx aumentó tanto la frecuencia de disparo como el tiempo del último potencial de acción de las ICE de ratones sham, pero no tuvo efecto sobre las ICE de ratones parkinsonianos (Figura r.21C-E).

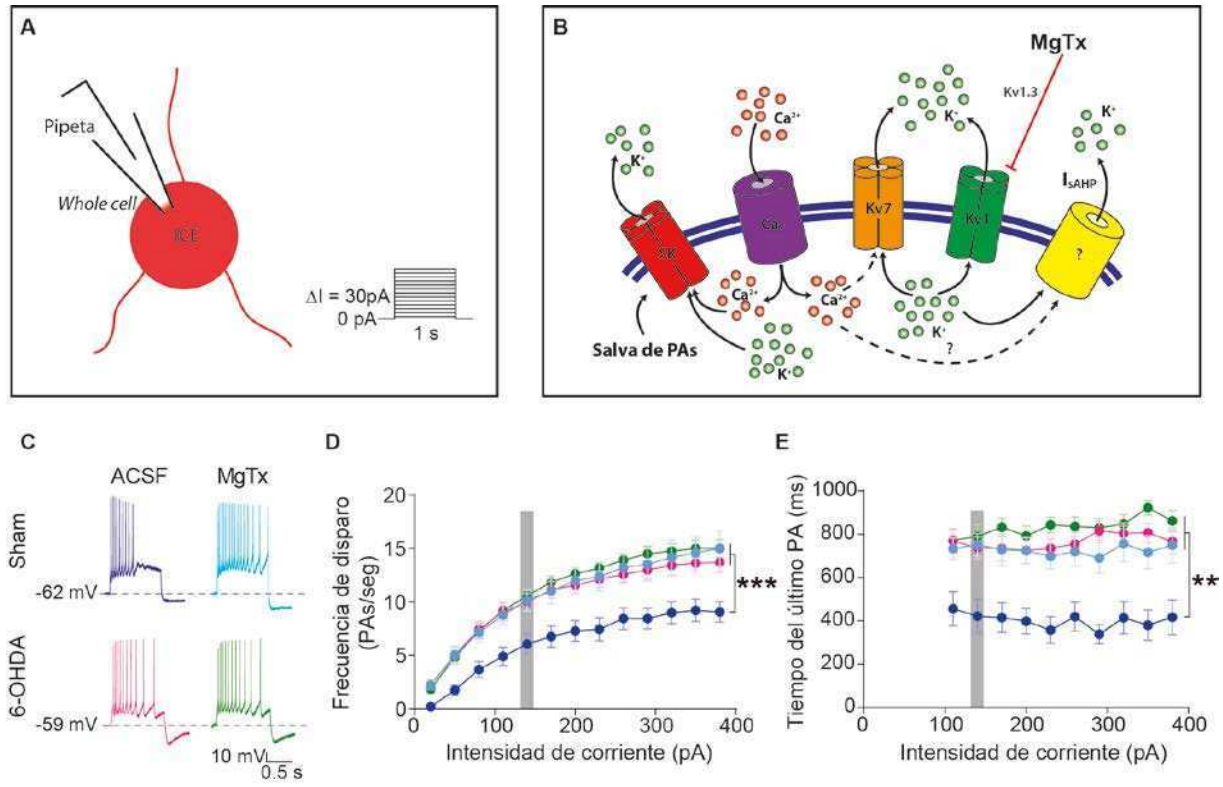

Figura r.21: El bloqueo de Kv1.3 disminuye la acomodación en ratones sham pero no tiene efecto en ratones parkinsonianos. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación. **(B)** Esquema de la membrana de una ICE indicando qué canales bloquea la MgTx. **(C)** Registros representativos de una ICE que acomoda de un ratón sham y una que no acomoda de un ratón 6-OHDA antes y después de la aplicación de MgTx (30 nM). **(D-E)** Frecuencia de disparo (D) y tiempo del último PA (E), en función de la corriente, de ICE de ratones sham y 6-OHDA antes y después de la aplicación de MgTx (ANOVA de medidas repetidas, interacción: ***p<0,0001, **p<0,0001, n=13 sham y n=13 6-OHDA). En barras grises se indica la respuesta al pulso de 140 pA que se muestra en los registros. En todos los casos se muestra Media±EE.

También quisimos ver si la integración sináptica de las ICE de ratones parkinsonianos estaba alterada y era insensible a MgTx. Registramos ICE de ratones lesionados y controles en *whole cell current clamp* y realizamos experimentos de estimulación eléctrica intraestriatal subumbral (Figura r.22A). Encontramos que la suma temporal de los PEPS de las ICE de ratones parkinsonianos es mayor que en los sham, y que, a diferencia de lo que ocurre en estos últimos, la MgTx no tiene ningún efecto sobre su amplitud (Figura r.22B-C).

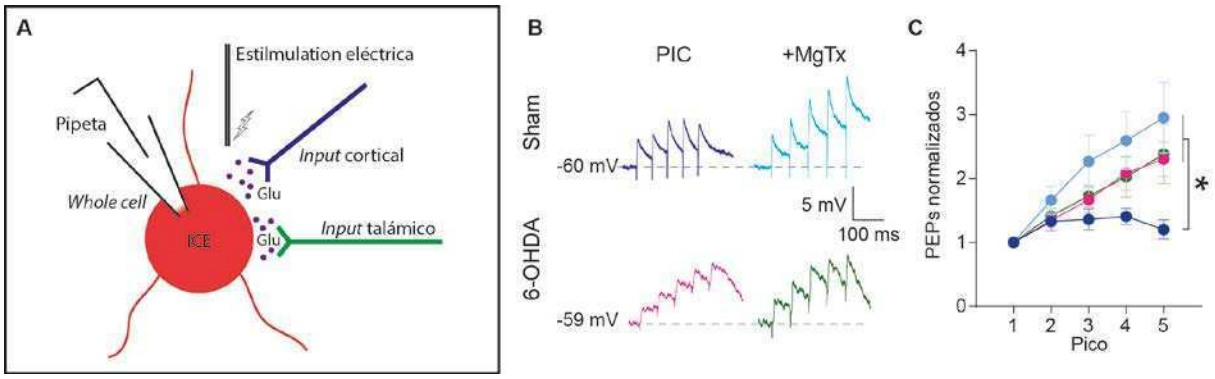

Figura r.22: La integración de entradas sinápticas glutamatérgicas por las ICE depende de Kv1.3 y está potenciada en ratones parkinsonianos. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación eléctrica con un electrodo bipolar intraestriatal. **(B)** Registros representativos de una ICE de un ratón sham y otra de un ratón 6-OHDA antes y después de la aplicación de MgTx (30 nM) frente a la estimulación eléctrica intraestriatal, en presencia de picrotoxina (PIC, 100 μM). **(D)** Amplitud de los PEPS normalizados al 1º PEPS (ANOVA de medidas repetidas, interacción: *p=0,035, n=6 sham y n=7 6-OHDA). Se muestra Media±EE.

Por último, previamente se había reportado que la frecuencia preferida de disparo de las ICE durante una rampa de corriente despolarizante era mayor en ratas parkinsonianas que en ratas control (Sanchez *y col.*, 2011). Por lo tanto inyectamos una rampa despolarizante de corriente ascendente y luego descendente para determinar cuál era la frecuencia de disparos preferida de las ICE de ambos grupos de ratones (Figura r.23A). Para medir la frecuencia preferida de disparos calculamos el intervalo entre potenciales de acción (*inter spike-interval,* ISI) para cada par de disparos, y a partir de ese valor obtuvimos la frecuencia instantánea (1/ISI). Calculamos la frecuencia instantánea cada 100 ms y determinamos mediante un ANOVA de un factor cuáles de las frecuencias instantáneas consecutivas no diferían. Promediamos todas las frecuencias que no presentaban diferencias por al menos 3 bines consecutivos y ese valor lo consideramos como la frecuencia preferida de disparos. Encontramos, como esperábamos, que la frecuencia preferida de las ICE de ratones 6-OHDA es mayor que la de los ratones sham, y que la MgTx sólo aumenta esta frecuencia en los ratones sham (Figura r.23B-C). Este experimento confirma que la

lesión dopaminérgica nigroestriatal provoca un aumento de excitabilidad de las ICE, y que el bloqueo de los canales Kv1.3 no tiene efecto sobre estas neuronas.

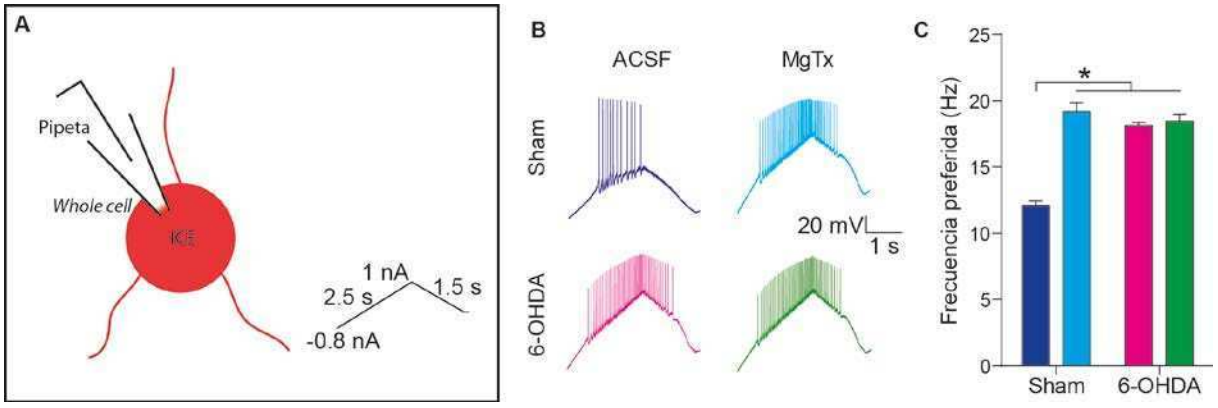

Figura r.23:Las ICE de ratones parkinsonianos tienen una frecuencia preferida de disparo más alta. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación en forma de rampa. **(B)** Registros representativos de la respuesta de una ICE de un ratón del grupo sham y una de un ratón del grupo 6-OHDA antes y después de la aplicación de MgTx (30 nM) frente a la inyección de corriente en forma de rampa. **(C)** Frecuencia preferida de disparos de PAs de ICE de ratones de los grupos sham y 6-OHDA antes y después de la aplicación de MgTx (ANOVA de 2 factores, interacción: *p=0,0003,Bonferroni post-hoc, n=7 sham y n=8 6-OHDA). Se muestra Media±EE.

R.3.4. Las ICE de ratones parkinsonianos tienen una corriente sensible a MgTx de amplitud reducida

De acuerdo con los resultados expuestos previamente podríamos esperar que la corriente sensible a MgTx en los ratones parkinsonianos fuera de menor amplitud que la de los ratones sham. Para evaluar esto realizamos registros de las ICE en *whole cell voltage clamp* en presencia de TTX, ZD7288 (bloqueante de I_h) y Cd^{2+} (bloqueante de canales Ca_v), con o sin MgTx, en ratones sham y 6-OHDA (Figura r.24A). Debido a que en las condiciones de registro mencionadas las células se mantienen en buen estado por un tiempo máximo aproximado de una hora, y a que el efecto máximo de MgTx se observó aproximadamente a los 40 min, para optimizar el uso de la droga e incrementar la probabilidad de obtener registros saludables, decidimos utilizar registros

control y en presencia de MgTx no pareados. Para ello incubamos las rodajas durante 40 minutos con o sin MgTx y luego realizamos los registros. Observamos que las ICE de los ratones lesionados tienen corrientes salientes de menor amplitud que las de los ratones sham. Como esperábamos, encontramos que las ICE de ratones sham en presencia de MgTx presentaron corrientes de menor amplitud que en ausencia de MgTx, pero de igual amplitud que las de los ratones 6-OHDA tanto en presencia como en ausencia de MgTx (Figura r.24B-C).

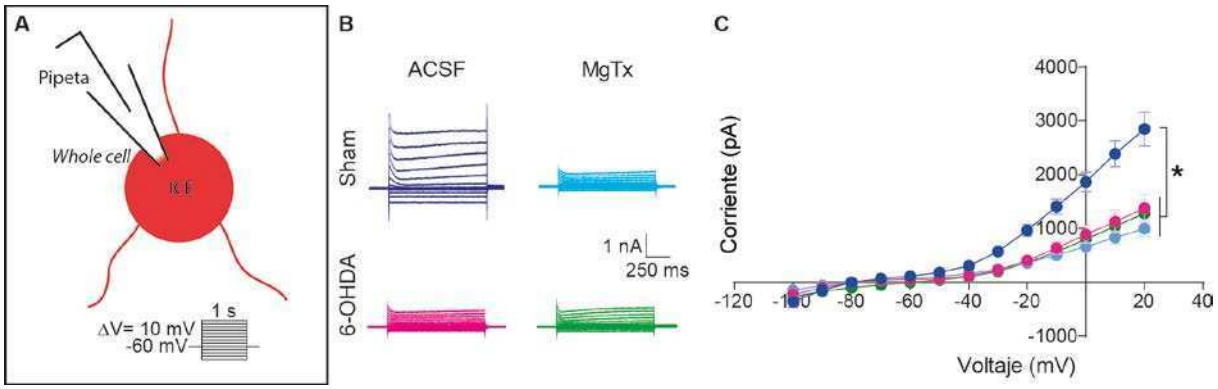

Figura r.24: Las ICE de ratones parkinsonianos no tienen corriente sensible a MgTx significativa. **(A)**Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp*, y del protocolo de estimulación. **(B)** Registros representativos de las corrientes registradas de ICE de un ratón sham y uno 6-OHDA en presencia de TTX (1 μM), ZD7288 (30 μM) y Cd^{2+} (200 μM), con o sin MgTx (30 nM).**(C)** Curva I-V de las corrientes totales de ratones sham y 6-OHDA con o sin MgTx (ANOVA de medidas repetidas, interacción: *p<0,0001). Se muestra Media±EE.

En conjunto nuestros resultados apoyan la idea de que una reducción de la corriente sensible a MgTx causa los déficits de la acomodación e integración sináptica observados en las ICE de los ratones parkinsonianos.

R.3.5. La IsAHP está disminuida en las ICE de ratones parkinsonianos

Como vimos que los canales que contienen la subunidad Kv1.3 contribuyen a la IsAHP de las ICE en condiciones control, quisimos ver si la IsAHP de ratones lesionados era de menor amplitud que la de ratones control. Realizamos experimentos de *whole cell voltage clamp* y medimos el pico de la corriente de cola luego de finalizado el pulso de 1 segundo de duración y 0 mV de amplitud (Figura r.25A-B). Encontramos que la IsAHP de ratones 6-OHDA es de menor amplitud que la de los ratones sham (Figura r.25B-C). Estos resultados están de acuerdo con los publicados previamente por Sanchez y colaboradores (2011), donde observaron que la IsAHP de las ICE de ratas parkinsonianas era de menor amplitud que la de ratas sham (Figura i.11C de la introducción). Con estos resultados podemos especular que la reducción de la IsAHP en animales parkinsonianos puede deberse, al menos en parte, a una disminución de la corriente Kv1.3, la misma que explica los déficits de acomodación e integración sináptica.

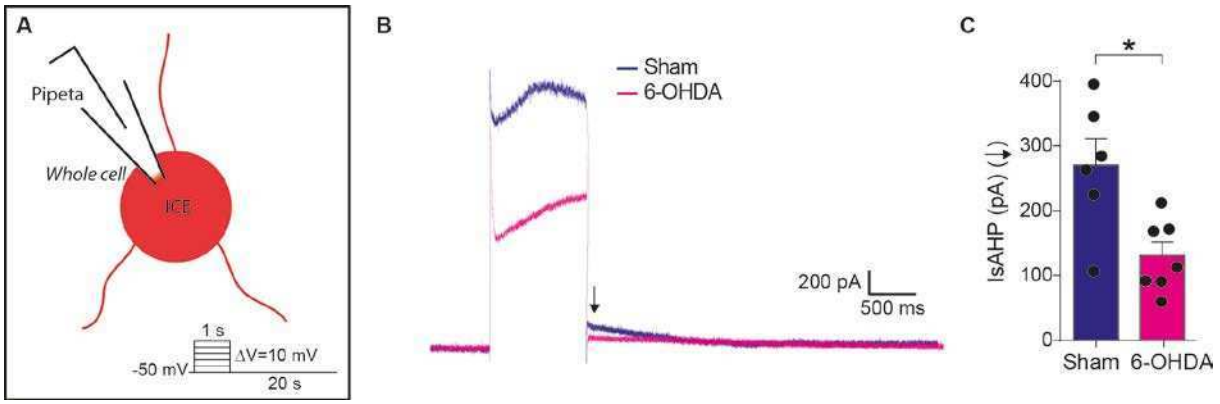

Figura r.25: Las ICE de los ratones parkinsonianos tienen una IsAHP de menor amplitud. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp*, y del protocolo de estimulación para evaluar la IsAHP. **(B)** Registros representativos de la IsAHP de una ICE de un ratón sham y una de un ratón 6-OHDA, en presencia de TTX (1 μM). **(C)** Amplitud de la IsAHP medida en el pico de la corriente (donde indica la flecha en B) en ICE de ratones sham y 6-OHDA (test de t no pareado, *p=0,0085, n=6 sham y n=7 6-OHDA). Se muestra Media±EE.

R.3.6. La expresión del canal Kv1.3 no está alterada en ratones parkinsonianos

Dado que encontramos que las ICE de ratones parkinsonianos presentan hiperexcitabilidad, son insensibles a MgTx y parecen tener un déficit en su corriente MgTx-sensible, nos preguntamos qué mecanismo les confiere este fenotipo. En primer lugar pensamos que podrían tener una disminución en la expresión del canal. Para evaluar esto hicimos una inmunomarcación en cortes de estriado de ratones ChAT-Cre;tdT y determinamos la intensidad de marca de Kv1.3 en el soma de las ICE (Figura r.26). Paara ello, las ICE fueron detectadas automáticamente luego de establecer un umbral de marca (ver Materiales y Métodos y Figura m.3). No encontramos diferencias entre ratones parkinsonianos y controles (Figura r.26A-B). Esto sugiere que los déficits en la corriente MgTx-sensible no son causados por una disminución en la expresión de los canales que expresan la subunidad Kv1.3, restando determinar si la subunidad es direccionada adecuadamente a la membrana celular.

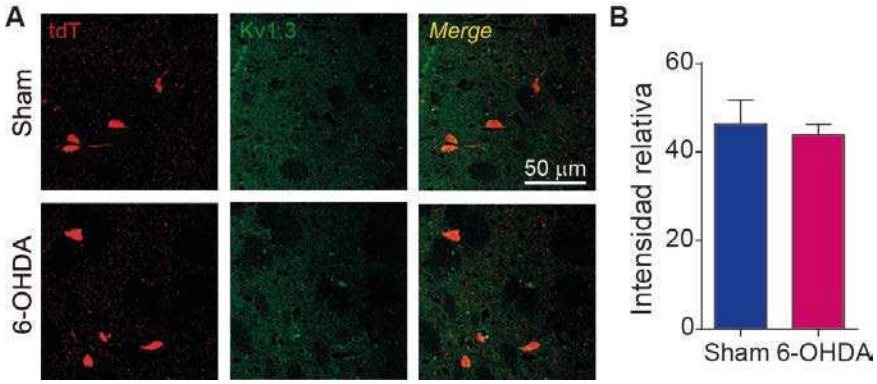

Figura r.26: Las ICE de los ratones parkinsonianos no expresan menores niveles de Kv1.3. (A) Inmunofluorescencia contra Kv1.3 en un corte de estriado de un ratón sham y uno de un ratón 6-OHDA. **(B)** Cuantificación de la intensidad de marca de Kv1.3 en ICE de ratones sham y 6-OHDA (test de t no pareado, p>0,05, NS). Se muestra Media±EE.

R.3.7. Cambios en RGS4 no afectan la excitabilidad de las ICE

Otra alternativa para explicar el fenotipo hiperexitable es que los mecanismos que regulan el canal Kv1.3 se encuentren alterados.

Ding y colaboradores (2006) demostraron que las ICE de ratones parkinsonianos lesionados también con 6-OHDA muestran una sobre-expresión de RGS4, una proteína reguladora de proteínas G (ver Introducción). Ellos propusieron que el aumento de RGS4 modificaría la capacidad autoinhibitoria del autoreceptor M_4, alterando la actividad de la ICE y la liberación de ACh. Dado que los canales Kv1 son pasibles de ser modulados por quinasas cuya actividad depende de proteínas G (Lee *y col*., 2013), nos preguntamos si los cambios que observamos en la excitabilidad de las ICE podían explicarse por la sobre-expresión de RGS4 (Figura r.27A-B). Para evaluarlo realizamos dos experimentos: por un lado, registramos ICE de ratones sham, que en su mayoría presentan un fenotipo acomodador, en las que incluimos RGS4 en la pipeta de registro. Especulábamos que, si una sobre-expresión de esta proteína fuera capaz de reducir la corriente Kv1.3, la excitabilidad de membrana de las ICE debería aumentar. Sin embargo, encontramos que la presencia de RGS4 en la solución interna de la pipeta (tanto 50 pM como 1 nM) no modificó la acomodación de las ICE de ratones sham (Figura r.27C-E). Por otro lado, registramos ICE de ratones 6-OHDA en los que incluimos CCG63802, un inhibidor de RGS4 (Lerner y Kreitzer, 2012), en la pipeta. Si la sobre-expresión de RGS4 fuera responsable de la hiperexcitabilidad inducida por la lesión, las ICE deberían recobrar un fenotipo normal bajo este tratamiento. Sin embargo, no encontramos una disminución de la hiperexcitabilidad de las ICE de ratones lesionados respecto al control (Figura r.27F-H).

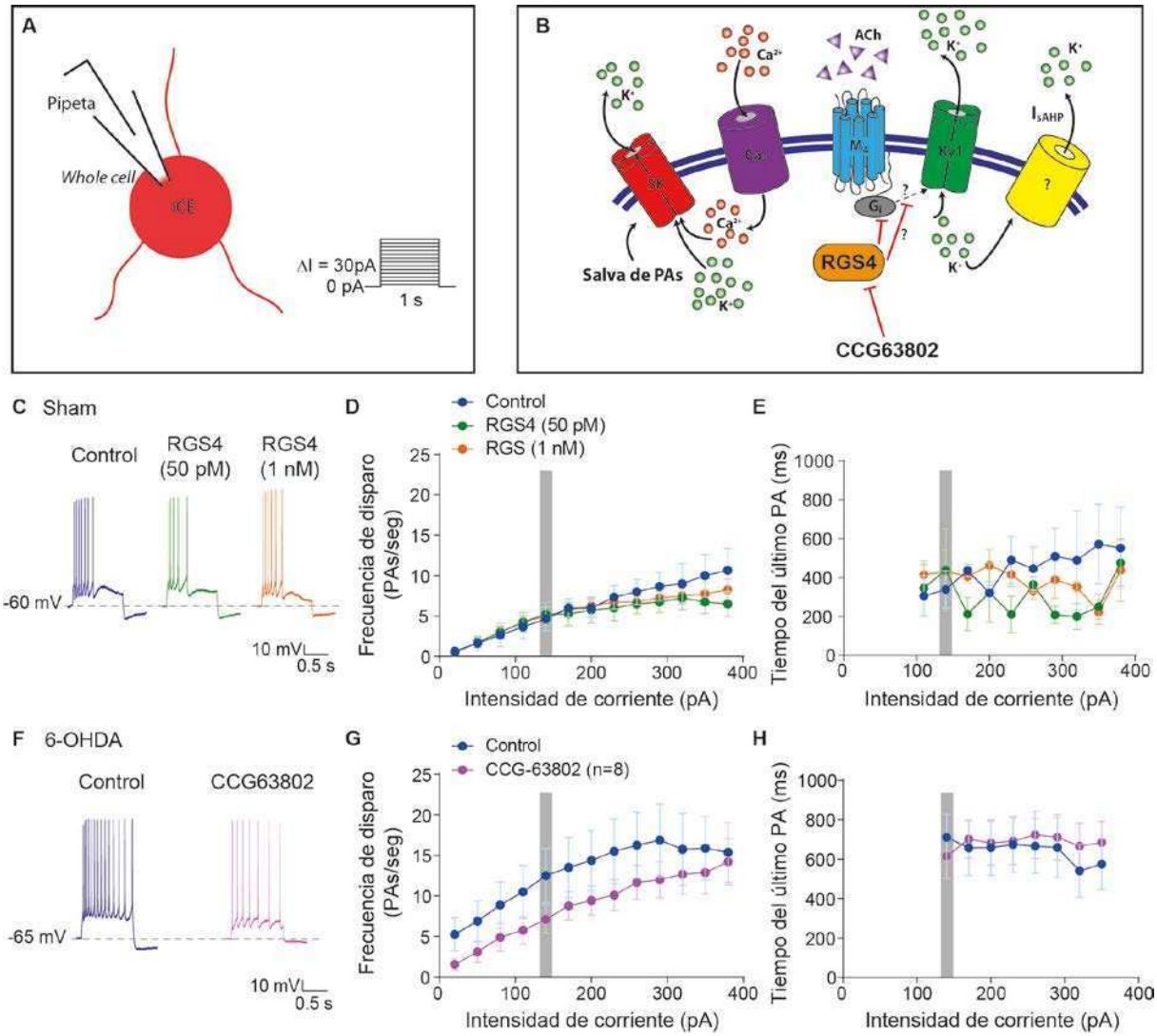

Figura r.27: Modificaciones de la disponibilidad de RGS4 en ICE no alteran su excitabilidad. (A) Esquema del registro de una ICE en configuración *whole cell* y modo *current clamp*, y del protocolo de estimulación. **(B)** Esquema de la membrana de una ICE indicando la interacción entre las proteínas G acopladas al receptor muscarínico M_4, RGS4 y la posible interacción con Kv1.3. **(C)**Registros representativos de ICE que acomodan de un ratón sham con o sin RGS4 (50 pM y 1nM) en la pipeta de registro. **(D-E)** Frecuencia de disparo (D) y tiempo del último PA (E), en función de la corriente, de ICE de ratones sham con o sin RGS4 en la pipeta (ANOVA de medidas repetidas, $p>0,05$, $n=4$ en cada grupo). **(F)** Registros representativos de ICE que no acomodan de un ratón 6-OHDA con o sin CCG63802 (100 μM) en la pipeta de registro. **(G-H)** Frecuencia de disparo (G) y tiempo del último PA (H) en función de la corriente de ICE de ratones 6-OHDA con o sin CCG63802 en la pipeta (ANOVA de medidas repetidas, $p>0,05$, $n=8$ en cada grupo). En barras grises se indica la respuesta al pulso de 140 pA que se muestra en los registros. En todos los casos se muestra Media±EE.

Estos resultados indican que los cambios observados en la acomodación de las ICE en los ratones parkinsonianos no puede explicarse por cambios, al menos agudos, en la expresión o actividad de RGS4.

Discusión

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis revelan un rol fisiológico inesperado de una corriente rectificadora tardía Kv en las ICE. Esta corriente provee una fuerte retroalimentación negativa a la despolarización, limitando la integración temporal de los *inputs* excitatorios, el disparo en salvas de potenciales de acción y la actividad tónica. Estudios farmacológicos, genéticos y de expresión molecular nos permitieron demostrar que la subunidad Kv1.3 forma parte de los canales que median esta corriente. Más aún, demostramos que la hiperexcitabilidad observada en las ICE de ratones parkinsonianos está asociada a una disminución de esta corriente. Específicamente, en condiciones normales, los disparos de potenciales de acción durante la inyección de corriente despolarizante y la suma temporal de *inputs* excitatorios son limitados por la corriente que pasa por canales que poseen la subunidad Kv1.3. Luego de la lesión dopaminérgica nigroestriatal, muchas ICE disparan contínuamente durante la inyección de corriente despolarizante y muestran una integración sináptica aumentada, lo mismo que ocurre cuando se bloquean los canales que contienen a la subunidad Kv1.3 en animales normales.

D.1. Validación del modelo ChAT-Cre;tdT

Las ICE conforman entre un 1 y 2% de las neuronas totales del estriado. Aunque pueden reconocerse porque son más grandes que el resto de las neuronas estriatales (Gerfeny Surmeier, 2011), encontrarlas insume mucho tiempo y limita el rendimiento de cada experimento. Una vez que se establece la configuración de registro *whole cell,* pueden reconocerse por sus propiedades electrofisiológicas, muy distintas a las del resto de las neuronas del estriado. Para agilizar el reconocimiento de las ICE dentro de una rodaja, utilizamos un ratón que expresa la proteína fluorescente roja tdTomato bajo el control de ChAT. Este ratón ya había sido utilizado por otros grupos (Erickson *y col*., 2014), pero no se había publicado una caracterización exhaustiva de las propiedades intrínsecas de sus ICE. Realizamos dicha caracterización ya que, en nuestra experiencia, las

caracterizaciones publicadas para determinada región cerebral o tipo celular no pueden extrapolarse sin mayor análisis a otras regiones o tipos celulares. A modo de ejemplo, establecimos que ratones diseñados para reportan la presencia del receptor D1 para dopamina marcan con presición a las NEM de la vía directa, pero no reportan ningún tipo de interneurona estriatal a pesar de que otros métodos y estudios fisiológicos indican que sí los expresan (Escande *y col*., 2016). De manera similar, una línea transgénica que reporta correctamente a las neuronas PV+ en la corteza cerebral, solo reporta a una parte de las interneuronas estriatales PV+ (observaciones no publicadas).

Observamos similares propiedades electrofisiológicas en las ICE de ratones Chat-Cre;tdT y las de ratones *wild type* con el mismo *background* genético (C57/BL6). Además confirmamos que las neuronas tdTomato+ expresan la proteína ChAT, y no expresan marcadores de otras interneuronas estriatales. En la cuantificación encontramos que el 93,6% de las neuronas tdTomato+ fueron inmunomarcadas por el anticuerpo contra ChAT. Es posible que el 6,4% restante no haya sido marcado por una menor sensibilidad de la inmunofluorescencia comparada con el reporte genético y no porque efectivamente no expresen la proteína. Por otro lado, encontramos sólo un 0,9% de células ChAT+ que no fueron tdTomato+. Esto podría deberse a que una pequeña porción de células ChAT+ no haya expresado la proteína fluorescente roja, o a que la inmunomarcación de ChAT nos dio una pequeña fracción de falsos positivos. De todas formas, cada vez que registramos una neurona tdTomato+ comprobamos que presentaba las propiedades electrofisiológicas de las ICE antes de continuar con el registro.

D.2. Excitabilidad de las ICE

Basándonos en el patrón de disparo de las ICE en respuesta a un pulso de corriente, podemos clasificar a las ICE en dos categorías, acomodadoras y no acomodadoras, y encontramos que la maduración postnatal se caracteriza por un aumento en la proporción de ICE “acomodadoras”. Estos resultados son similares a los descriptos previamente en ratas (Sanchez *y col*., 2011).

Desde hace tiempo se sabe que las ICE expresan corrientes rectificadoras tardías de K^+ (Song *y col*., 1998) que supuestamente aceleran la fase de repolarización de

sus potenciales de acción (Deng *y col*., 2005; Goldberg *y col*., 2009). Sin embargo, nosotros no hallamos efectos de esta corriente sobre los potenciales de acción, incluida su duración (Tablas r.3-r.5). Esto remarca la conocida importancia de la corriente BK en la repolarización del potencial de acción en estas células. En cambio, en esta tesis encontramos que una corriente mediada por canales con subunidades Kv1.3 es necesaria para que ocurra acomodación en las ICE. Además observamos que esta corriente contribuye a la IsAHP. La IsAHP es responsable de la acomodación en otros tipos celulares, pero clásicamente es atribuida a canales K_{Ca}.

En nuestro trabajo primero confirmamos que la acomodación no ocurre por un bloqueo de los canales de Na^+ causados por la despolarización sostenida, mediante la aplicación de un sobrepulso luego de que la ICE ya había acomodado. A continuación demostramos que los canales que contienen la subunidad Kv1.3 son necesarios para que las ICE presenten acomodación utilizando toxinas que bloquean selectivamente canales que contienen esta subunidad, un anticuerpo que reconoce la porción intracelular de Kv1.3 incluido en la solución intracelular, y por último, realizando registros en el ratón KO de Kv1.3 (Figura d.1).

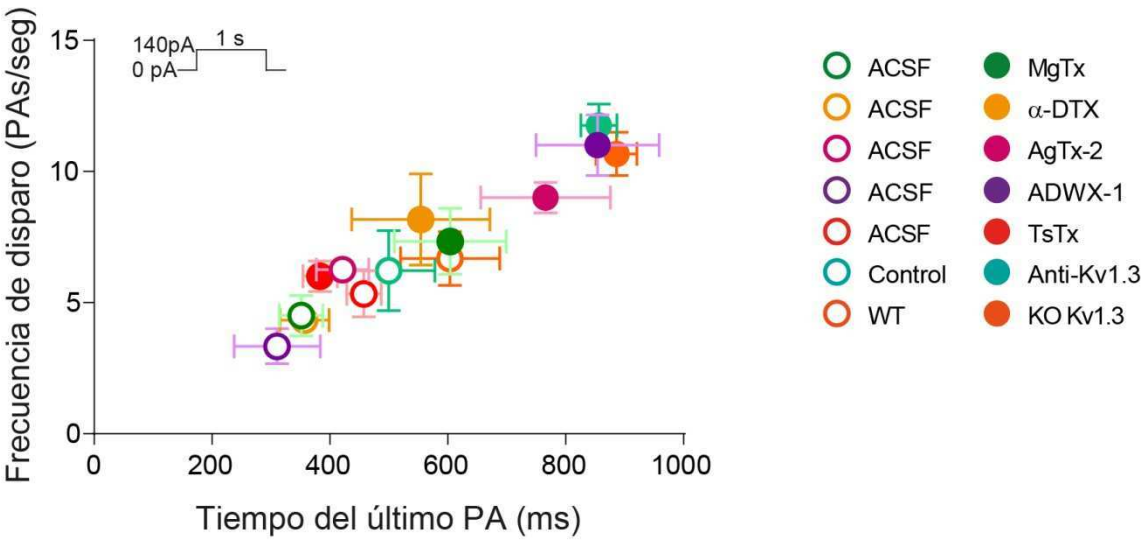

Figura d.1: Resumen de las estrategias usadas para identificar canales Kv1 en las ICE. Efecto de los distintos bloqueantes Kv1 y del KO Kv1.3 en la frecuencia de disparo y el tiempo del último PA en las ICE. *Inset*: Protocolo en el que se muestra el pulso de corriente analizado en este caso. En todos los casos se muestra Media±EE. Abreviaturas: MgTx: margatoxina; α-DTX: α-dendrotoxina; AgTx-2: agitoxina-2; TsTx: tytiustoxina; Anti-Kv1.3: anticuerpo anti-Kv1.3 en la pipeta de registro; WT: *wild type*.

Los canales Kv1 están formados por cuatro subunidades que se ensamblan formando canales homoméricos o heteroméricos, que les confieren diferentes propiedades funcionales (Yellen, 2002). Song y colaboradores (1998) demostraron mediante PCRs de células únicas que todas las ICE expresan el ARN de la subunidad Kv1.4 (que participa en corrientes de tipo I_A), y sólo alrededor del 25% expresan la subunidad Kv1.2, mientras que ninguna expresa la subunidad Kv1.5. También demostraron que los canales Kv1 pueden unirse a distintas subunidades auxiliares beta presentes en las ICE. En nuestro trabajo demostramos que las ICE también expresan las subunidades Kv1.1 y Kv1.3, y no expresan la Kv1.6. Nosotros no detectamos la presencia de Kv1.2 en las ICE, lo que podría deberse a una falta de sensibilidad de nuestro método de detección. Teniendo en cuenta este factor, la subunidad Kv1.6 también podría ser expresada en un número de ICE reducido o débilmente por las ICE en general. Dado que la subunidad Kv1.3 puede ensamblarse con cualquiera de las subunidades mencionadas (Coleman *y col*., 1999), y la unión de una molécula de MgTx puede bloquear el canal, independientemente de si es homomérico o heteromérico (Hopkins, 1998), las ICE podrían estar equipadas con una variedad de tetrámeros Kv1. Es probable que las subunidades Kv1.3 estén mayormente integradas en un canal heteromérico, debido a que la corriente no presenta la inactivación lenta reportada en canales homoméricos Kv1.3 expresados en sistemas heterólogos (Stühmer *y col*., 1989; Grissmer *y col*., 1994). El hecho de que la α-DTX también bloquee la acomodación de las ICE apoya la idea de que el canal responsable de los efectos fisiológicos observados contiene tanto a la subunidad Kv1.3 como a la Kv1.1. Al realizar los experimentos en modo *voltage clamp* confirmamos que estas células presentan una corriente sensible a MgTx, la cual correlaciona con la fuerza de la acomodación. Cuando calculamos el voltaje al 50% de la activación máxima (V_{50}) de la conductancia sensible a MgTx encontramos pequeñas diferencias con lo reportado en sistemas heterólogos de expresión (Grissmer *y col.*, 1994; Doczi *y col.*, 2008), lo que podría deberse a que el canal sea un heterotetrámero y no un homotetrámero de Kv1.3. Sin embargo, estas diferencias también podrían deberse a que estudiamos un sistema nativo, donde los canales puede interaccionar con proteínas distintas a las que se expresan en sistemas heterólogos. Además, en otros sistemas

nativos se han reportado V_{50} similares a las que observamos nosotros para canales rectificadores retardados de bajo umbral (Guan *y col*., 2006; Iwasaki *y col*., 2008).

La IsAHP ha sido relacionada con diferentes propiedades de cómputo de las neuronas, incluyendo la adaptación de frecuencia de disparo y la acomodación (Adams *y col*., 1982; Madison y Nicoll, 1984), la transformación de la señal *input* en una secuencia de potenciales de acción (Zhang y Arsenault, 2005; Thurley *y col*., 2008), y con la preferencia de código entre el tiempo de cada potencial de acción o la frecuencia de potenciales de acción (Prescott *y col*., 2006; Prescott y Sejnowski, 2008).

Aunque estudios recientes sugieren que IsAHP podría ser mediada por canales KCa3.1 (King *y col*. 2015), aquí encontramos que es bloqueada parcialmente por MgTx y además es de menor amplitud en animales KO Kv1.3. Nuestros resultados hacen un nuevo aporte sobre el rol de los canales de K^+ dependientes de voltaje en la IsAHP, en conjunto con resultados en neuronas de hipocampo, donde la IsAHP es mediada al menos parcialmente por canales Kv7 y regulada indirectamente por Ca^{2+} a través de hipocalcina (Tzingounis y Nicoll, 2008; Tzingounis *y col*., 2010; Ford *y col*., 2013). En nuestro trabajo demostramos que los Kv7 no participan de la acomodación de las ICE, pero sabemos que se expresan en estas neuronas y que aumentando su probabilidad de apertura con distintos "abridores" (*openers,* retigabina y diclofenac) disminuye su frecuencia de disparo (resultados no mostrados). Interesantemente, el bloqueo de Kv1.3 no modificó la sAHP que sigue al pulso de corriente despolarizante. Cabe remarcar que en las ICE, al igual que en otros tipos neuronales, está demostrada la participación de una corriente K_{Ca} de identidad molecular no definida, en la IsAHP. Así, nuestro trabajo está en línea con lo reportado en Sanchez y colaboradores (2011) y por otros grupos que apunta a la participación de múltiples corrientes en IsAHP (Andrade *y col*., 2012). Entonces, no resulta sorprendente que en nuestro trabajo, así como en otros trabajos recientes que identifican corrientes K_{Ca} que contribuyen a IsAHP (King *y col*., 2015), la sAHP no se afecta significativamente al bloquear la corriente estudiada. En nuestro caso creemos que, como al bloquear la subunidad Kv1.3 aumenta la descarga de potenciales de acción, se recluta de manera más eficiente el componente K_{Ca} de la IsAHP y enmascara potenciales cambios en la sAHP. En la fisiología de las ICE el rol de la corriente MgTx-sensible podría ser complementario al de la corriente K_{Ca},

similar a lo que ocurre en células del sistema inmune, donde se sabe que la conductancia Kv1.3 interactúa con la conductancia $K_{Ca}3.1$ y juntas regulan las oscilaciones del potencial de membrana que median algunas respuestas inmunes (Feske *y col*., 2015).

D.3. Influencia de Kv1.3 sobre patrones fisiológicos de actividad de las ICE

Aunque se considera que las corrientes intrínsecas de las ICE juegan un rol clave en la génesis de su actividad tónica y su respuesta de pausa ante estímulos ambientales relevantes, los estudios previos hicieron énfasis en corrientes K_{Ca} e I_h. El rol de corrientes Kv en la regulación de los patrones fisiológicos de disparo de las ICE no había sido analizado.

Como mencionamos en la introducción, la respuesta de pausa registrada *in vivo* en animales realizando tareas desaparece luego de una lesión dopaminérgica nigroestriatal (Aosaki *y col*., 1994b) y cuando se bloquea la transmisión tálamoestriatal (Matsumoto *y col*., 2001). Evidencia obtenida en rodajas muestra que mediante la estimulación de aferentes tálamoestriatales puede obtenerse una pausa que se atenúa cuando se aplican antagonistas de receptores D2 o se eliminan estos receptores de las ICE (Ding *y col*., 2010; Kharkwal *y col*., 2016). Además, se propone que la despolarización inducida por aferentes talámicos recluta la IsAHP, que tendría un rol clave en generar la pausa (Wilson y Goldberg, 2006; Reynolds *y col*., 2004), y que la pausa activaría I_h, quien contribuiría a darle fin (Deng *y col*., 2007). Aquí demostramos que la corriente mediada por Kv1.3 limita la despolarización inducida por aferentes talámicos y contribuye a generar la AHP que sigue a dicha despolarización. Es interesante destacar que en este caso la AHP dependiente de Kv1.3 sigue a una despolarización subumbral, que sería menos eficiente para reclutar las corrientes Ca_v que activan los canales K_{Ca} que median el componente canónico de IsAHP. Esta interpretación de los resultados está en línea con la idea de roles complementarios de las corrientes Kv y K_{Ca} en la provisión de *feedback* negativo durante una excitación. En resumen, los canales Kv1.3 podrían estar involucrados en la respuesta de las ICE a las aferencias talámicas que

desencadenan la respuesta de pausa en presencia de un estímulo relevante durante un aprendizaje orientado a obtener una recompensa (Figura d.2). Especulamos que la DA podría modular la actividad del canal y contribuir a esta respuesta.

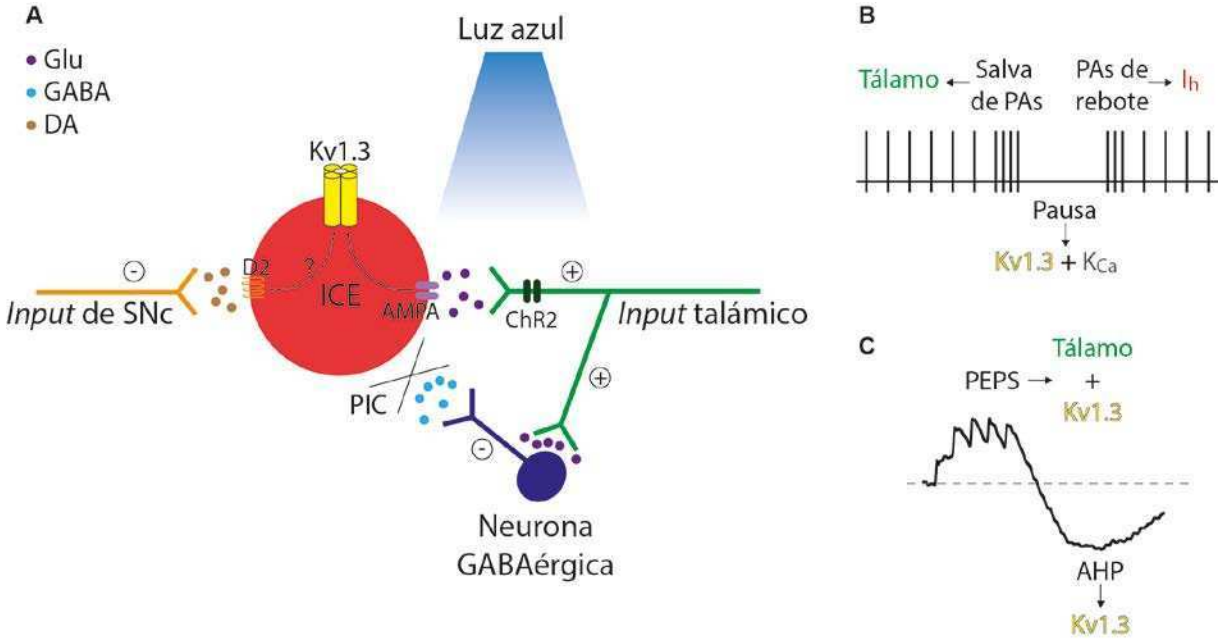

Figura d.3: Respuesta de pausa de las ICE. (A) Esquema de la pausa generada por una respuesta sináptica de la ICE frente a la estimulación talámica, dada por los canales que contienen la subunidad Kv1.3. La transmisión GABAérgica se encuentra bloqueada con picrotoxina (PIC) en el baño. **(B)** Esquema de la pausa donde se muestra quiénes participan en cada componente de la respuesta. **(C)** Especificación de los participantes de los PEPS y la AHP generados en la ICE por estimulación talámica.

Por otro lado, encontramos que los canales que contienen la subunidad Kv1.3 también participan en la regulación de la frecuencia de disparo de potenciales de acción espontáneos. Los patrones de disparo espontáneos de las ICE son generados por canales Ca_v, K_{Ca} y HCN. Por lo tanto, el rol que cumplen los canales Kv1 en su actividad espontánea fue altamente inesperado. En los experimentos de *voltage clamp* observamos que la MgTx bloquea también parte de la corriente en el potencial de *holding* habitualmente utilizado para registrar a las ICE (-50 mV), indicando que es una corriente de bajo umbral que está activa en el potencial de reposo de la célula, tal como ocurre en linfocitos, en quienes se la considera principal responsable del potencial de reposo (Feske *y col*., 2015). A pesar de ser

inesperados, nuestros resultados son compatibles con los publicados por otros grupos que ya habían observado que canales rectificadores tardíos de bajo umbral participan en la regulación de los patrones de disparo de otras neuronas del sistema nervioso central y periférico (Dodson *y col*., 2002; Faber y Sah, 2004).

En resumen, nuestros resultados de farmacología y de expresión génica indican que los canales que contienen las subunidades Kv1.1 y Kv1.3 limitan la actividad tónica y la integración de *inputs* sinápticos y contribuyen a la IsAHP, y sugieren que participan de la respuesta de pausa de las ICE.

D.4. Rol del Kv1.3 en la enfermedad de Parkinson

Sanchez y colaboradores (2011) demostraron que las ICE de ratas parkinsonianas tienen una excitabilidad aumentada, una frecuencia de disparo preferida elevada y una IsAHP disminuida. Nosotros encontramos el mismo fenotipo en las ICE de ratones parkinsonianos. Además encontramos que tienen una integración sináptica aumentada frente a la estimulación glutamatérgica. En todos los casos, estos cambios fueron similares a los inducidos por MgTx en ICE de animales control, y fueron insensibles a la MgTx en las ICE de ratones lesionados. Finalmente, observamos una disminución de la corriente MgTx-sensible en ratones parkinsonianos.

La diferencia observada en la respuesta a la excitación talámica provee una posible explicación a la atenuación de la de respuesta pausa en monos con parkinsonismo experimental (Aosaki *y col*., 1994b). Pensamos que la degeneración dopaminérgica nigroestriatal de alguna manera desregula la actividad del canal Kv1.3, lo que provoca una respuesta alterada frente a la activación talámica y su consecuente pérdida de la respuesta de pausa (o disminución de la AHP) frente a un evento prominente.

Resta aclarar los mecanismos últimos por los que la pérdida de neuronas DA lleva a una disminución de la corriente Kv1.3. La disminución de la corriente MgTx-sensible podría deberse a una reducción de la expresión de los canales que contienen la

subunidad Kv1.3, o a alteraciones de sus mecanismos regulatorios. Mediante la cuantificación de la inmunofluorescencia no encontramos diferencias en su expresión, por lo que pensamos que habría alguna perturbación de los elementos regulatorios del canal. Sin embargo resta realizar un estudio morfológico más detallado para establecer si el canal se trafica correctamente a la membrana de las ICE.

Debido a que Ding y colaboradores (2006) demostraron que las ICE sufrían cambios en la regulación de la liberación de ACh mediado por alteraciones en el funcionamiento del autoreceptor M_4 y un aumento de la proteína regulatoria RGS4, nos preguntamos si este mecanismo podría estar alterando la funcionalidad del canal. Sin embargo, cuando registramos ICE de ratones control incluyendo RGS4 en la solución intracelular, éstas no dejaron de acomodar, y tampoco comenzaron a acomodar las ICE de ratones parkinsonianos registradas con el inhibidor de RGS4 en la solución intracelular. Por lo tanto, demostramos que los cambios en la expresión de esta proteína en las ICE no influyen sobre la función de la subunidad Kv1.3.

Se sabe que las corrientes que pasan por los canales con subunidad Kv1.3 son reguladas por fosforilación de residuos serina/treonina (Kupper *y col.*, 1995) y tirosina (Fadool *y col.*, 1997), por co-expresión de la subunidad regulatoria KCNE4 (Grunnet *y col.*, 2003) y distintas subunidades auxiliares (McCormack *y col.*, 1999), por ubiquitinación (Henke *y col.*, 2004), y por interacciones con proteínas de andamiaje (Doczi *y col.*, 2011). Se requieren más estudios para determinar si alteraciones en la fosforilación del canal o cambios en sus mecanismos reguladores provocan el fenotipo hiperexcitable que observamos en ICE de ratones parkinsonianos.

En resumen, en animales parkinsonianos la localización subcelular o funcionalidad de este canal se encuentra alterada, provocando una disminución de la IsAHP, hiperexcitabilidad y una respuesta exagerada a inputs excitatorios (Figura d.3B). Estos resultados nos permiten proponer a las subunidades Kv1.3 o a sus mecanismos regulatorios como potenciales nuevos blancos para la terapia antiparkinsoniana, ya que los tratamientos anticolinérgicos resultan efectivos tanto

para disminuir la sintomatología motora como las discinesias inducidas por L-DOPA (Lim *y col*., 2014; Ding *y col*., 2011). Conocer con mayor detalle las alteraciones que ocurren en las ICE en la enfermedad de Parkinson permitiría el desarrollo de fármacos más eficientes en su tratamiento.

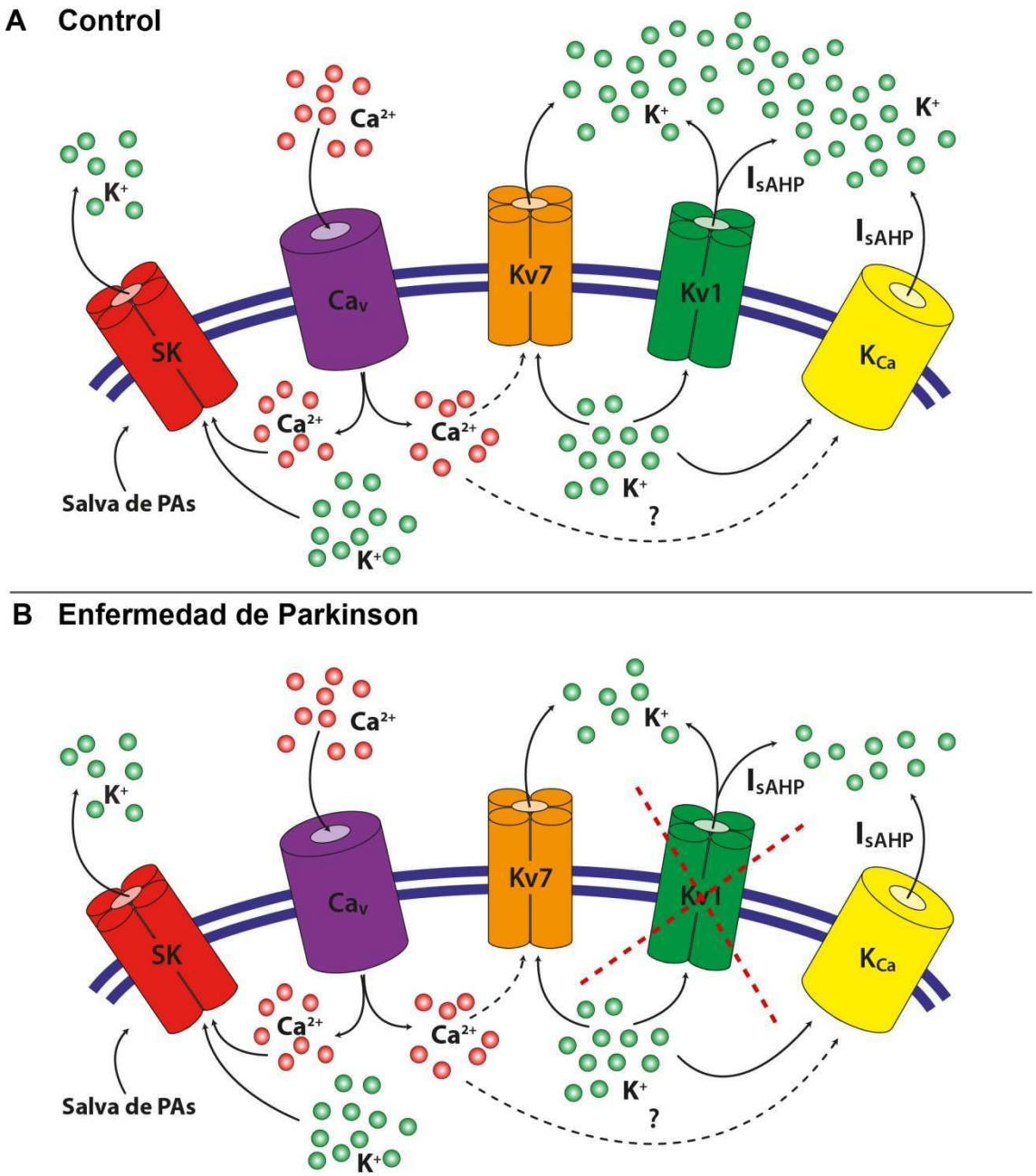

Figura d.3: Esquema de los canales que regulan la excitabilidad de las ICE. La subunidad Kv1.3 está funcional en condiciones normales **(A)** y no lo está en la enfermedad de Parkinson **(B)**.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Albin, R.L., Young, A.B. and Penney, J. B. (1989) 'The functional anatomy of basal ganglia disorders', *Trends in neurosciences*, 12(10), pp.366–75.

Andrade, R., Foehring, R. C., and Tzingounis, A. V. (2012) 'The calcium-activated slow AHP: cutting through the Gordian knot', *Frontiers in cellular neuroscience*, 6, pp. 47.

Aosaki, T., Graybiel, A. M. and Kimura, M. (1994a) 'Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys', *Science*, 265(5170), pp. 412-5.

Aosaki, T., Tsubokawa, H., Ishida, A., Watanabe, K., Graybiel, A. M. and Kimura, M. (1994b) 'Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning', *J Neurosci* 14, pp. 3969–3984.

Aosaki, T., Kimura, M. and Graybiel, A. M. (1995) 'Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum', *J Neurophysiol* 73, pp. 1234–1252.

Aosaki, T., Kiuchi, K., Kawaguchi, Y. (1998) 'Dopamine D1-like receptor activation excites rat striatal large aspiny neurons in vitro', *J Neurosci* 18, pp. 5180–5190.

Apicella, P., Scarnati, E. and Schultz, W. (1991) 'Tonically discharging neurons of monkey striatum respond to preparatory and rewarding stimuli'. *Exp Brain Res*, 84(3), pp. 672-5.

Apicella, P., Legallet, E. and Trouche, E. (1997) 'Responses of tonically discharging neurons in the monkey striatum to primary rewards delivered during different behavioral states'. *Exp Brain Res*, 116, pp. 456-466.

Apicella, P. (2002) 'Tonically active neurons in the primate striatum and their role in the processing of information about motivationally relevant events'. *Eur J Neurosci*, 16, pp. 2017-2026.

Atherton, J. F. and Bevan, M. D. (2005) 'Ionic mechanisms underlying autonomous action potential generation in the somata and dendrites of GABAergic subtantia nigra pars reticulata neurons in vitro', *J Neurosci*, 25(36), pp 8272-81.

Balleine, B. W., Liljeholm, M. and Ostlund, S. B. (2009) 'The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning', *Behavioural Brain Research*, 199(1), pp. 43–52.

Barbeau, A (1962) 'The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis', *Can Med Assoc J*, 87, pp. 802-7.

Benabid, A. L., Chabardes, S. and Mitrofanis, J., (2009) 'Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease', *Lancet Neurol*, 8(1), pp. 67–81.

Bennett, B. D., Wilson, C. J. (1998) 'Synaptic regulation of action potential timing in neostriatal cholinergic interneurons', *J Neurosci* 18, pp. 8539–8549.

Bennett, B. D., Callaway, J. C. and Wilson, C. J. (2000) 'Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons', *J Neurosci*, 20(22), pp. 8493-503.

Bennett, B. D. and Wilson, C. J. (1999) 'Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro', *J Neurosci*, 19(13), pp. 5586-96.

Bergman, H., Wichmann, T. and DeLong, M. R. (1990) 'Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus', *Science (New York, N.Y.)*, 249(4975), pp. 1436-1438.

Bergman, H., Feingold, A., Nini, A., Raz, A., Slovin, H., Abeles, M., and Vaadia, E. (1998) 'Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates', *Trends in neurosciences*, 21(1), pp. 32-38.

Bergstrom, B. P., Sanberg, S. G., Andersson, M., Mithyantha, J., Carroll, F. I. and Garris, P. A. (2011) 'Functional reorganization of the presynaptic dopaminergic terminal in parkinsonism', *Neuroscience*, 193, pp. 310-322.

Bevan, M. D., Booth, P. a, Eaton, S. and Bolam, J. P. (1998) 'Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(22), 9438–52.

Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., …and Gross, C. E. (2001) 'Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), 6853–6861.

Blomeley C, Bracci E (2005) 'Excitatory effects of serotonin on rat striatal cholinergic interneurones', *J Physiol*, 569(3), pp. 715–721.

Bolam, J. P., Wainer, B. H. and Smith, A. D. (1984) 'Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum.A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy', *Neuroscience*, 12 pp. 711–718.

Bolam, J. P., Smith, Y., Ingham, C. A., Von Krosigk, M. and Smith, A. D. (1993) 'Convergence of synaptic terminals from the striatum and the globus pallidus onto single neurones in the substantia nigra and the entopeduncular nucleus', *Progress in brain research*, 99, pp. 73-88.

Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A. C. and Bevan, M. D. (2000) 'Synaptic organisation of the basal ganglia', *Journal of anatomy*, 196(4), pp. 527-542.

Bonsi, P., Cuomo, D., Ding, J., Sciamanna, G., Ulrich, S., Tscherter, A., Bernardi, G., Surmeier, D. J. and Pisani, A. (2007) 'Endogenous serotonin excites striatal cholinergic interneurons via the activation of 5-HT 2C, 5-HT6, and 5-HT7 serotonin receptors: implications for extrapyramidal side effects of serotonin reuptake inhibitors', *Neuropsychopharmacology,* 32 pp. 1840–1854.

Bonsi, P., Martella, G., Cuomo, D., Platania, P., Sciamanna, G., Bernardi, G., Wess, J. and Pisani, A. (2008) 'Loss of muscarinic autoreceptor function impairs long-term depression but not long-term potentiation in the striatum', *J Neurosci*, 28 pp. 6258–6263.

Boraud, T., Bezard, E., Bioulac, B. and Gross, C. E. (2002) 'From single extracellular unit recording in experimental and human Parkinsonism to the development of a functional concept of the role played by the basal ganglia in motor control', *Prog.Neurobiol*, 66(4), pp. 265–283.

Braz, B. Y., Galiñanes, G. L., Taravini, I. R., Belforte, J. E. and Murer, M. G. (2015) 'Altered Corticostriatal Connectivity and Exploration/Explotation Imbalance Emerge as Intermediate Phenotypes for a Neonatal Dopamine Dysfunction', *Neuropsychopharmacology*, 40(11), pp. 2576-87.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A. and Bernardi, G. (1998b) 'Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses', *Eur J Neurosci*, 10 pp. 3020–3023.

Calabresi, P., Centonze, D., Pisani, A., Sancesario, G., North, R. A. and Bernardi, G. (1998c) 'Muscarinic IPSPs in rat striatal cholinergic interneurones', *J Physiol*, 510 pp. 421–427.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A. and Bernardi, G. (2000) 'Acetylcholine-mediated modulation of striatal function', *Trends Neurosci*, 23 pp. 120–126.

Carlsson, A., Lindqvist, M. and Magnusson, T. O. R. (1957) '3, 4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists'.

Cayabyab, F. S., Khanna, R., Jones, O. T. and Schlichter, L. C. (2000) 'Suppression of the rat microglia Kv1. 3 current by src-family tyrosine kinases and oxygen/glucose deprivation', *EuropeanJournal of Neuroscience*, 12(6), pp. 1949-1960.

Cenci, M. A. (2002) 'Transcription factors involved in the pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease', *Amino acids*,23(1-3), pp. 105-109.

Chang, H. T. andKitai, S. T. (1982) 'Largeneostriatal neurons in rat: an electron microscopic study of gold-toned Golgi-stained cells', *Brain Res Bull*, 8 pp. 631–643.

Chuhma, N., Mingote, S., Moore, H. and Rayport, S. (2014) 'Dopamine neurons control striatal cholinergic neurons via regionally heterogeneous dopamine and glutamate signaling', *Neuron*, 81(4), pp. 901-912.

Ciesielska, A., Mittermeyer, G., Hadaczek, P., Kells, A. P., Forsayeth, J. and Bankiewicz, K. S. (2011) 'Anterograde axonal transport of AAV2-GDNF in rat basal ganglia', *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(5), pp. 922–927.

Coetzee, W. A., Amarillo, Y. I. M. Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T. O. M., ... and Saganich, M. (1999) 'Molecular diversity of K+ channels', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868(1), pp. 233-255.

Coleman, S. K., Newcombe, J., Pryje, J. and Dolly, J. O. (1999) 'Subunit composition of Kv1 channels in human CNS', *J Neurochem*, 73(2), pp. 849-58.

Contant, C., Umbriaco, D., Garcia, S., Watkins, K. C. and Descarries, L. (1996) 'Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervation in adult rat neostriatum', *Neuroscience*, 71 pp. 937–947.

Cooper, E. C., Harrington, E., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (2001) 'M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neural network oscillations and synchronization in mouse brain', *J Neurosci*, 21(24), pp. 9529-40.

Cragg, S. (2006) 'Meaningful silences: how dopamine listens to the ACh pause', *Trends Neurosci*, 29(3), pp. 125-31.

DeBoer, P., Heeringa, M. J. and Abercrombie, E. D. (1996) 'Spontaneous release of acetylcholine in striatum is preferentially regulated by inhibitory dopamine D2 receptors', *Eur J Pharmacol*, 317(2-3), pp. 257-62.

Deffains, M. and Bergman, H. (2015) 'Striatal cholinergic interneurons and cortico-striatal synaptic plasticity in health and disease', *MovDisord*, 30(8), pp.1014-25.

Demartini, D. R., Schilling, L. P., da Costa, J. C. and Carlini, C. R. (2014) 'Alzheimer's and Parkinson'sdiseases: anenvironmentalproteomicpoint of view', *Journal of proteomics*, 104, pp. 24-36.

Deng, P., Pang, Z. P., Zhang, Y. and Xu, Z. C (2005) 'Increase of delayed rectifier potassium currents in large aspiny neurons in the neostriatum following transient forebrain ischemia', *Neuroscience*, 131(1), pp. 135-46.

Deng, P., Zhang, Y. and Xu, Z, C. (2007) 'Involvement of I(h) in dopamine modulation of tonic firing in striatal cholinergic interneurons', *J Neurosci*, 27(12), pp. 3148-56.

DiFiglia, M., Carey, J. (1986) 'Large neurons in the primate neostriatum examined with the combined Golgi-electron microscopic method', *J Comp Neurol*, 244, pp. 36–52.

DiFiglia, M. (1987) 'Synaptic organization of cholinergic neurons in the monkey neostriatum',*J Comp Neurol*, 255, pp. 245–258.

Ding, J., Guzman, J. N., Tkatch, T., Chen, S., Goldberg, J. A., Ebert, P. J., Levitt, P., Wilson, C. J., Hamm, H. E. and Surmeier, D .J. (2006) 'RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following sopamine depletion', *Nat Neurosci*, 9(6), pp. 832-42.

Ding, J. B., Guzman, J. N., Peterson, J. D., Goldberg, J. A., and Surmeier, D. J. (2010) 'Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons', *Neuron*, 67(2), pp. 294-307.

Ding, Y., Won, L., Britt, J. P., Lim, S. A., McGehee, D. S. and Kang, U. J. (2011) 'Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2), pp. 840-5.

Doczi, M. A., Morielli, A. D. and Damon, D. H. (2008) 'Kv1. 3 channels in postganglionic sympathetic neurons: expression, function, and modulation', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(3), pp. R733-R740.

Doczi, M. A., Damon, D. H. and Morielli, A. D. (2011) 'A C-terminal PDZ binding domain modulates the function and localization of Kv1.3 channels', *Exp Cell Res*, 317(16), pp. 2333-41.

Dodson, P. D., Barker, M. C. and Forsythe, I. D. (2002) 'Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing', *J Neurosci*, 22(16), pp. 6953-61.

Dreyer, J. K. (2014)'Three Mechanisms by which Striatal Denervation Causes Breakdown of Dopamine Signaling', *Journal of Neuroscience*, 34(37), pp. 12444–12456.

Duvoisin, R. C. (1967) 'Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism', *Archives of Neurology*, 17(2), pp. 124-136.

Erickson, C. S., Lee, S. J., Barlow-Anacker, A. J., Druckenbrod, N. R., Epstein, M. L. and Gosain, A. (2014) 'Appearance of cholinergic myenteric neurons during enteric nervous system development: comparison of different ChAT fluorescent mouse reporterlines', *Neurogastroenterology & Motility*, 26(6), pp. 874-884.

Escande, M. V., Taravini, I. R., Zold, C. L., Belforte, J. E. and Murer, M. G. (2016) 'Loss of Homeostasis in the Direct Pathway in a Mouse Model of Asymptomatic Parkinson's Disease. *J Neurosci*, 36(21), pp. 5686-98.

Everitt, B.J. and Robbins, T. W.(2005) 'Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion', *Nature neuroscience*, 8(11), pp.1481–9.

Exley, R., Cragg, S. J. (2008) 'Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission', *Br J Pharmacol*, 153(Suppl. 1), pp. S283–S297.

Faber, E. S. and Sah, P. (2004) 'Opioids inhibit lateral amygdala pyramidal neurons by enhancing a dendritic potassium current', *J Neurosci*, 24(12), pp. 3031-9.

Fadool, D. A., Holmes, T. C., Berman, K., Dagan, D. and Levitan, I. B. (1997) 'Tyrosine phosphorylation modulates current amplitude and kinetics of a neuronal voltage-gated potassium channel', *J Neurophysiol*, 78(3), pp. 7563-73.

Feske, S., Wulff, H. and Skolnik, E. Y. (2015) 'Ion channels in innate and adaptive immunity', *Annu Rev Immunol*, 33, pp. 291-353.

Fiorillo, C. D., Tobler, P. N., Schultz, W. (2003) 'Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons', *Science*, 299 pp. 1898–1902.

Ford, K. J., Arroyo, D. A., Kay, J. N., Lloyd, E. E., Bryan, R. M., Sanes, J. R. and Feller, M. B. (2013) 'A role for TREK1 in generating the slow afterhyperpolarization in developing starbusrstamacrine cells', *J Neurophysiol*, 109(9), pp. 2250-9.

Garcia-Calvo, M., Leonard, R. J., Novick, J., Stevens, S. P., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G. J. and Garcia, M. L. (1993) 'Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of Centuridesmargaritatus venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels', *J BiolChem*, 268(25), pp. 18866-74.

Gao, H. M., Kotzbauer, P. T., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. Y. (2008) 'Neuroinflammation and oxidation/nitration of α-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration', *The Journal of neuroscience*, 28(30), pp. 7687-7698.

Gao, H. M., Zhang, F., Zhou, H., Kam, W., Wilson, B. and Hong, J. S. (2011) 'Neuroinflammation and α-synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease', *Environmental Health Perspectives*, 119(6), pp. 807–814.

Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J. and Sibley, D. R. (1990) 'D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons',*Science (New York, N.Y.)*, 250(4986), pp. 1429–1432.

Gerfen, C. R. and Surmeier, D. J. (2011) 'Modulation of striatal projection systems by dopamine', *Annu Rev Neurosci*, 34, pp. 441-66.

Goldberg, J. a, Boraud, T., Maraton, S., Haber, S. N., Vaadia, E. and Bergman, H. (2002) 'Enhanced synchrony among primary motor cortex neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of Parkinson's disease', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(11), pp. 4639–4653.

Goldberg, J. A. and Wilson, C. J. (2005) 'Control of spontanoeus firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons', *J Neurosci*, 25(44), pp. 10230-8.

Goldberg, J. A., Teagarden, M. A., Foehring, R. C. and Wilson, C. J. (2009) 'Nonequilibrium calcium dynamic regulate the autonomous firing pattern of rat striatal cholinergic interneurons', *J Neurosci*, 29(26), pp. 8396-407.

Goldberg, J. A. and Wilson, C. (2010) 'The Cholinergic Interneurons of the Striatum; Intrinsic Properties Underlie Multiple Discharge Patterns', *Handbook of basal ganglia structure and function* (Vol. 24). Academic Press.

Goudreau, J. L., Pérez, A., Aminoff, M. J., Boyd, J. T., Burau, K. D., Christine, C. W., ... and NET-PD Investigators. (2016) 'Choice of dopaminergic therapy among early, mild Parkinson disease subjects in North America', *Journal of the Neurological Sciences*, *366*, pp. 74-81.

Graybiel, A. M., Aosaki, T., Flaherty, A. W. and Kimura, M. (1994) 'The basal ganglia and adaptive motor control',*Science* 265 pp. 1826–1831.

Graybiel, A. M.(2008) 'Habits, rituals, and the evaluative brain', *Annual review of neuroscience*, 31, pp.359–387.

Grissmer, S., Nguyen, A. N., Aiyar, J., Hanson, D. C., Mather, R. J., Gutman, G. A., Karmilowicz, M. J., Auperin, D. D. and Chandy, K. G. (1994) 'Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K+ channels, typer Kv1.1, 1.2, 1.2, 1.5 and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines', *MolPharmacol*, 45(6), pp. 1227-34.

Grunnet, M., Rasmussen, H. B., Hay-Schmidt, A., Rosenstierne, M., Klaerke, D. A., Olesen, S. P. and Jespersen, T. (2003) 'KCNE4 is an inhibitory subunit to Kv1.1 and Kv1.3 potassium channels', *Biophys J*, 85(3), pp. 1525-37.

Guan, D., Lee, J. C., Tkatch, T., Surmeier, D. J., Armstrong, W. E. and Foehring, E. C. (2006) 'Expression and biphysical properties of Kv1 channels in suprangular neocortical pyramidal neurones', *J Physiol*, 571(Pt 2), pp. 371-89.

Han, S., Yi, H., Yin, S. J., Chen, Z. Y., Liu, H., Cao, Z. J., ... and Li, W. X. (2008) 'Structural basis of a potent peptide inhibitor designed for Kv1. 3 channel, a therapeutic target of autoimmune disease', *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), pp. 19058-19065.

Harvey, A. L. (2001) 'Twenty years of dendrotoxins', *Toxicon*, 39(1), pp. 15-26.

Hattori, S., Murakami, F. and Song, W. J. (2003) 'Quantitative relationship between Kv4.2 mRNA and A-type K+ current in rat striatal cholinergic interneuron's during development',*J Neurophysiol*, 90, pp. 175–183.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. and MacKinnon, R. (1994) 'Mutations in the K+ channelsignaturesequence', *Biophysical Journal*, 66(4), pp. 1061.

Henke, G., Maier, G., Wallisch, S., Boehmer, C. and Lang, F. (2004) 'Regulation of the voltage gated K+ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1', *J Cell Physiol*, 199(2), pp. 194-9.

Hille, B. (2001) 'Ion channels of excitable membranes', (Vol. 507). *Sunderland*, MA: Sinauer.

Hodgkin, A. L. and Katz, B. (1949) 'The effect of sodium ions on the ekectrical activity if the giant axon ofthe squid', *J Physiol (Lond)*, 108, pp. 37-77

Hopkins, W. F. (1998) 'Toxin and subunit specificity of blocking affinity of three peptide toxins for heteromultimeric, voltage-gated potassium channels expressed in Xenopus oocytes', *J Pharmacol Exp Ther*, 285(3), pp. 1051-60.

Hwang, O. (2013) 'Role of oxidative stress in Parkinson's disease',*Experimental Neurobiology*, 22(1), pp. 11–7.

Iwasaki, S., Chihara, Y., Komuta, Y., Ito, K and Sahara, Y. (2008) 'Low-voltage-activated potassium channels underlie the regulation of intrinsic firing properties of rat vestibular ganglion cells', *J Neurophysiol*, 100(4), pp. 5192-204.

Jiang, Z. G. and North, R. A. (1991) 'Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro', *J Physiol*, 443, pp. 533-53.

Jones, I. W., Bolam, J. P. andWonnacott, S. (2001) 'Presynaptic localization of the nicotinic acetylcholine receptor 廔2 subunit immunoreactivity in rat nigrostriatal dopaminergic neurons', *J Comp Neurol*, 439, pp. 235–247.

Katzenschlager, R., Sampaio, C., Costa, J., & Lees, A. (2003) 'Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson s disease', *The Cochrane Library*.

Kawaguchi, Y. (1992) 'Largeaspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro: physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents',*J Neurophysiol*, 67, pp. 1669–1682.

Kawaguchi, Y. (1993) 'Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat striatum', *J Neurosci*, 13(11), pp. 4908-23.

Kemp, J. M., Powell, T. P. (1971) 'The synaptic organization of the caudate nucleus', *PhilosTrans R Soc Lond B Biol Sci*, 262, pp. 403–412.

Kharkwal, G., Brami-Cherrier, K., Lizardi-Ortiz, J. E., Nelson, A. B., Ramos, M., Del Barrio, D., ... and Borrelli, E. (2016) 'Parkinsonism Driven by Antipsychotics Originates from Dopaminergic Control of Striatal Cholinergic Interneurons', *Neuron*, 91(1), pp. 67-78.

Kimura, M., Rajkowski, J. and Evarts, E. (1984) 'Tonically discharging putamen neurones exhibit set-dependent responses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(15), pp. 4998-5001.

King, B., Rizwan, A. P., Asmara, H., Heath, N. C., Engbers, J. D., Dykstra, S., ... and Turner, R. W. (2015) 'IKCa channels are a critical determinant of the slow AHP in CA1 pyramidal neurons', *Cell reports*, 11(2), pp. 175-182.

Kölliker, A. (1896) 'Handbuch der Gewebelehre des Menchen', *Bd. II. Leipzig: Kengelman*.
Koós, T. andTepper, J. M. (2002) 'Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum', *J Neurosci*, 22, pp. 529–535.

Kopell, B. H., Rezai, A. R., Chang, J. W., and Vitek, J. L. (2006) 'Anatomy and physiology of the basal ganglia: implications for deep brain stimulation for Parkinson's disease', *Movement disorders*, 21(S14), pp. S238-S246.

Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., and Kreitzer, A. C. (2010) 'Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry', *Nature*, 466(7306), pp. 622-626.

Kupper, J., Bowlby, M. R., Marom, S. and Levitan, I. B. (1995) 'Intracellular and extracellular amino acids that influence C-type inactivation and its modulation in a voltage-dependent potassium channel', *Pflugers Arch*, 430(1), pp. 1-11.

Kuznetsova, A. Y., Huertas, M. A., Kuznetsov, A. S., Paladini, C. A., and Canavier, C. C. (2010) 'Regulation of firing frequency in a computational model of a midbrain dopaminergic neuron', *Journal of computational neuroscience*, *28*(3), pp. 389-403.

Lapper, S. R. and Bolam, J. P. (1992) 'Input from the fontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat', *Neuroscience*, 51, pp. 533–545.

Lee, T. E., Philipson, L. H. and Nelson, D. J. (1996) 'N-type inactivation in the mammalian Shaker K+ channel Kv1.4', *J Membr Biol*, 151(3), pp. 225-35.

Lee, J. H., Choi, S. H., Lee, B. H., Hwang, S. H., Kim, H. J., Rhee, J., ... and Nah, S. Y. (2013) 'Activation of lysophosphatidic acid receptor by gintonin inhibits Kv1.2 channel activity: involvement of tyrosine kinase and receptor protein tyrosine phosphatase α', *Neuroscience letters*, 548, pp. 143-148.

Lees, A. J. (2009) 'Parkinson's disease', *Lancet*, 373(9680), pp. 2055–66.

Lerner, T. N. and Kreitzer, A. C. (2012) 'RGS4 is required for dopaminergic control of striatal LTD and susceptibility to parkinsonian motor deficits', *Neuron*,73(2), pp. 347-359.

Lester, D. B., Miller, A. D. and Blaha, C. D. (2010) 'Muscarinic receptor blockade in the ventral tegmental area attenuates cocaine enhancement of laterodorsaltegmentum stimulation-evoked accumbens dopamine efflux in the mouse', *Synapse*, 64(3), pp. 216-223.

Li, Z., Liu, W. H., Han, S., Peng, B. W., Yin, J., Wu, Y. L., ... and Li, W. X. (2012) 'Selective inhibition of CCR7− effector memory T cell activation by a novel peptide targeting Kv1. 3 channel in a rat experimental autoimmune encephalomyelitis model', *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), pp. 29479-29494.

Lim, S.A., Kang, U.J. and McGehee, D. S. (2014) 'Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects', *Front Synaptic. Neurosci*. 6, pp.22.

Ljungberg, T., Apicella, P. and Schultz, W.(1992) 'Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions', *Journal of neurophysiology*, 67(1), pp.145–63.

Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S. and Zeng, H. (2010) 'A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain', *Nat Neurosci*, 13(1), pp. 133-40.

Madison, D. V. and Nicoll, R. A. (1984) 'Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro', *The Journal of Physiology*, 354, pp. 319.

Magill, P. J., Bolam, J. P., and Bevan, M. D. (2001) 'Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network', *Neuroscience*, 106, pp. 313–330.

Markram, H., Roth, A. andHelmchen, E. (1998) 'Competitive calcium binding: implications for dendritic calcium signaling',*J ComputNeurosci*, 5, pp. 331–348.

Matsumoto, N., Minamimoto, T., Graybiel, A. M. and Kimura, M. (2001) 'Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events',*J Neurophysiol*, 85, pp. 960–976.

Maurice, N., Liberge, M., Jaouen, F., Ztaou, S., Hanini, M., Camon, J., Deisseroth, K., Amalric, M., Kerkerian-Le Goff, L. and Beurrier, C. (2015) 'Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal ganglia Function in Experimental Parkinsonsm', *Cell Rep*, 13(4) pp. 657-66.

Maurice, N., Mercer, J., Chan, C. S., Hernandez-Lopez, S., Held, J., Tkatch, T. and Surmeier, D. J. (2004) 'D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na+ channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons', *J Neurosci*, 24(46), pp. 10289-301.

Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C., and Gonon, F. (2006) 'Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats' *The Journal of neuroscience*, 26(14), pp. 3875-3884.

McCormack, T., McCormack, K., Nadal, M. S., Vieira, E., Ozaita, A. and Rudy B. (1999) 'The effects of Shaker beta-subunits on the human lymphocyte K+ channel Kv1.3', *J BiolChem*, 274(29), pp. 20123-6.

Mendelson, J. (1966) 'The role of hunger in the T-maze learning for food by rats',*J Comp Physiol Psychol*, 62, pp. 341–349.

Mesulam, M. M., Mash, D., Hersh, L., Bothwell, M. andGeula, C. (1992) 'Cholinergic innervation of the human striatum, globuspallidus, subthalamic nucleus, substantianigra, and red nucleus', *J CompNeurol*, 323, pp. 252–268.

Morris, G., Arkadir, D., Nevet, A., Vaadia, E. and Bergman, H. (2004) 'Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons', *Neuron*, 43, pp. 133–143.

Nambu, A., Tokuno, H. and Takada, M.(2002) 'Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway', *Neuroscience research*, 43(2), pp.111–7.

Negus, S. S., and Miller, L. L. (2014) 'Intracranial self-stimulation to evaluate abuse potential of drugs', *Pharmacological reviews*, 66(3), pp. 869-917.

Nelson, A. B., Hammack, N., Yang, C. F., Shah, N. M., Seal, R. O and Kreitzer, A. C. (2014) 'Striatal cholinergic interneurnos Drive GABA release from dopamine terminals', *Neuron*, 82(1), pp. 63-70.

Ni, Z. G., Bouali-Benazzouz, R., Gao, D. M., Benabid, A. L., and Benazzouz, A. (2001) 'Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal activity after 6-OHDA-induced dopamine depletion in rats', *Brain Research*, 899(1-2), pp. 142–147.

Oswald, M. J., Oorschot, D. E., Schulz, J. M., Lipski, J. and Reynolds, J. N. (2009) 'Ih current generates the afterhyperpolarisation following activation of subthreshold cortical synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons', *TheJournal of physiology*, 587(24), pp. 5879-5897.

Pakhotin, P. and Bracci, E. (2007) 'Cholinergic interneurons control the excitatory input to the striatum', *J Neurosci*, 27, pp. 391–400.

Parkinson, T. and Group, S. (2004) 'Levodopa and theprogression of Parkinson's disease' *N Engl J Med*, 2004(351), pp. 2498-2508.

Paxinos, G. and Franklin, K. B. J. (2001) 'The mouse brain atlas', *Academic Press*, Second edition.

Pepperl, D. J., Shah-Basu, S., VanLeeuwen, D., Granneman, J. G. and MacKenzie, R. G. (1998) 'Regulation of RGS mRNAs by cAMP in PC12 cells', *Biochemical and biophysical research communications*, 243(1), pp. 52-55.

Perez-Rosello, T., Figueroa, A., Salgado, H., Vilchis, C., Tecuapetla, F., Guzman, J. N., Galarraga, E. and Bargas, J. (2005) 'Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 $Ca2+$ channels', *J Neurophysiol*, 93, pp. 2507–2519.

Pessiglione, M. (2005) 'Thalamic Neuronal Activity in Dopamine-Depleted Primates: Evidence for a Loss of Functional Segregation within Basal Ganglia Circuits', *Journal of Neuroscience*, 25(6), pp. 1523–1531.

Peters, H. C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J. F. and Isbrandt, D. (2005) 'Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior', *Nat neurosci*, 8(1), pp. 51-60.

Phelps, P. E., Houser, C. R., Vaughn, J. E. (1985) 'Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses', *J CompNeurol*, 238, pp. 286–307.

Pisani, A., Bonsi, P., Catania, M. V., Giuffrida, R., Morari, M., Marti, M., Centonze, D., Bernardi, G., Kingston, A. E. and Calabresi, P. (2002) 'Metabotropic glutamate 2 receptors modulate synaptic inputs and calcium signals in striatal cholinergic interneurons', *J Neurosci*, 22, pp. 6176–6185.

Pisani, A., Bonsi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Bernardi, G. and Calabresi, P. (2003) 'Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: Focus on metabotropic glutamate receptors', *Neuropharmacology*, 45, pp. 45–56.

Pisani, A., Bernardi, G., Ding, J. and Surmeier, D. J. (2007) 'Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders', *Trends neurosci*, 30(10), pp. 545-53.

Prescott, S. A., Ratte, S., De Koninck, Y. andSejnowski, T. J. (2006) 'Nonlinear interaction between shunting and adaptation controls a switch between integration and coincidence detection in pyramidal neurons', *J Neurosci*, 26, pp. 9084 –9097.

Prescott, S. A. and Sejnowski, T. J. (2008) 'Spike-ratecoding andspike-time coding are affected oppositely by different adaptation mechanisms', *J Neurosci*, 28, pp. 13649 –13661.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A., McNamara, J. O., and Williams, S. M. (2001) 'Neuroscience', 3rd edition. Sunderland. *MA: Sinauer Associates*.

Ravel, S., Legallet, E. and Apicella, P. (1999) 'Tonically active neurons in the monkey striatum do not preferentially respond to appetitive stimuli', *Experimental brain research*, 128(4), pp. 531-534.

Raz, A., Feingold, A., Zelanskaya, V., Vaadia, E. and Bergman, H. (1996) 'Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates', *J Neurophysiol*, 76, pp. 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', *J Neurosci*, 21(3), RC128.

Reynolds, J. N., Hyland, B. I. andWickens, J. R. (2004) 'Modulation of an afterhyperpolarization by the substantia nigra induces pauses in thetonicfiring of striatal cholinergic interneurons', *J Neurosci*, 24, pp. 9870–9877.

Rice, M. E. andCragg, S. J. (2004) 'Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum', *Nat Neurosci*, 7, pp. 583–584.

Ross, O. A., Braithwaite, A. T., Skipper, L. M., Kachergus, J., Hulihan, M. M., Middleton, F. A., ... and Adler, C. H. (2008) 'Genomicinvestigation of α-synucleinmultiplication and parkinsonism', *Annals of neurology*, 63(6), pp. 743-750.

Rossi, J., Balthasar, N., Olson, D., Scott, M., Berglund, E., Lee, C. E., ... and Elmquist, J. K. (2011) 'Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis', *Cell metabolism*, 13(2), pp. 195-204.

Rossi, S. P., Matzkin, M. E., Terradas, C., Ponzio, R., Puigdomenech, E., Levalle, O., ... and Frungieri, M. B. (2012) 'New insights into melatonin/CRH signaling in hamster Leydig cells', *General and comparative endocrinology*, 178(1), pp. 153-163.

Sanchez, G., Rodriguez, M. J., Pomata, P., Rela, L. and Murer, M. G. (2011) 'Reduction of an afterhyperpolatization current increases excitability in striatal cholinergic interneurons in rat parkinsonism', *J Neurosci*, 31(17), pp. 6553-64.

Santos, J. R., Cunha, J. A., Dierschnabel, A. L., Campêlo, C. L., Leão, A. H., Silva, A. F., ... and Ribeiro, A. M. (2013) 'Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine', *Behavioural brain research*, 253, pp. 68-77.

Saunders, A. and Sabatini, B. L. (2015) 'Cre Activated and Inactivated Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Neuronal Anatomical Tracing or Activity Manipulation', *Current Protocols in Neuroscience*, pp. 1-24.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis', *Nat methods*, 9(7), pp. 671-675.

Schultz, W. (2002) 'Getting formal with dopamine and reward', *Neuron*, 36(2), pp. 241-263.
Schulz, J. M., & Reynolds, J. N. (2013) 'Pause and rebound: sensory control of cholinergic signaling in the striatum', *Trends in neurosciences*, 36(1), 41-50.

Schirinzi, T., Madeo, G., Martella, G., Maltese, M., Picconi, B., Calabresi, P. and Pisani, A. (2016) 'Early synaptic dysfunction in Parkinson's disease: Insights from animal models', *Movement Disorders*, 31(6), pp. 802-813.

Sciamanna, G. and Wilson, C. J. (2011) 'The ionic mechanism of gamma resonance in rat striatal fast-spiking neurons', *J Neurophysiol*, 106(6), pp. 2936-49.

Shen, W., Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Held, J. E. and Surmeier, D. J. (2004) 'Kv1.2 containing K+ channels regulate subthreshold excitability of striatal medium spiny neurons', *J Neurophysiol*, 91(3), pp. 1337-49.

Sidibe, M., and Smith, Y. (1999) 'Thalamic inputs to striatal interneurons in monkeys: synaptic organization and co-localization of calcium binding proteins', *Neuroscience*, 89(4), pp. 1189-1208.

Simola, N., Morelli, M. and Carta, A. R. (2007) 'The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease', *Neurotoxicity research*, 11(3-4), pp. 151-167.

Smith, Y., Bevan, M. D., Shink, E. and Bolam, J. P. (1998) 'Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia', *Neuroscience*, 86(2), pp. 353–387.

Song, W. J., Tkatch, T., Baranauskas, G., Ichinohe, N., Kitai, S. T and Surmeier, D. J. (1998) 'Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits', *J Neurosci*, 18(9), pp. 3124-37.

Spyraki, C., Fibiger, H. C. and Phillips, A. G. (1982) 'Attenuation by haloperidol of place preference conditioning using food reinforcement', *Psychopharmacology*, 77, pp. 379–382.

Spyraki, C., Fibiger, H. C. and Phillips, A. G. (1983) 'Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system', *Psychopharmacology*, 79, pp. 278–283.

Spyraki, C., Nomikos, G. G. and Varonos, D. D. (1987) 'Intravenous cocaine-induced place preference: attenuation by haloperidol', *Behav Brain Res*, 26, pp. 57–62.

Steinbusch, H. W. (1981) 'Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals', *Neuroscience*, 6, pp. 557–618.

Straub, C., Tritsch, N. X., Hagan, N. A., Gu, C. and Sabatini, B. L. (2014) 'Multiphasic modulation of cholinergic interneurons by nigrostriatal afferents', *The Journal of Neuroscience*, 34(25), pp. 8557-8569.

Stühmer, W., Ruppersberg, J. P., Schröter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M.,Giese, K. P., Perschke, A., Baumann, A. and Pongs, O. (1989) 'Molecular basisof functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain', *EMBO J*, 8(11), pp.3235-44.

Sullivan, M. A., Chen, H. andMorikawa, H. (2008) 'Recurrent inhibitory network among striatal cholinergic interneurons', *J Neurosci*, 28, pp. 8682–8690.

Suzuki, T., Miura, M., Nishimura, K. Y. and Aosaki, T. (2001) 'Dopamine-dependent synaptic plasticity in the striatal cholinergic interneurons', *TheJournal of neuroscience*, 21(17), pp. 6492-6501.

Takeshita, Y., Harata, N. and Akaike, N. (1996) 'Suppression of K+ conductance by metabotropic glutamate receptor in acutely dissociated large cholinergic neurons in rat caudate putamen', *J Neurophysiol*, 76, pp. 1545–1558.

Tepper, J. M., and Bolam, J. P. (2004) 'Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons', *Current opinion in neurobiology*, 14(6), pp. 685-692.

Thomas, T. M., Smith, Y., Levey, A. I. and Hersch, S. M. (2000) 'Cortical inputs to m2-immunoreactive striatal interneurons in rat and monkey', *Synapse*, 37, pp. 252–261.

Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N. J., Jennings, K. A., Deisseroth, K. and Cragg, S. J. (2012) 'Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons', *Neuron*, 75(1), pp. 58-64.

Thurley, K., Senn, W. and Lüscher, H. R. (2008) 'Dopamine increases the gain of the input-output response of rat prefrontal pyramidal neurons', *Journal of neurophysiology*, 99(6), pp. 2985-2997.

Triplett, J. C., Zhang, Z., Sultana, R., Cai, J., Klein, J. B., Büeler, H., and Butterfield, D. A. (2015) 'Quantitative expression proteomics and phosphoproteomics profile of brain from PINK1 knockout mice: insights into mechanisms of familial Parkinson's disease', *Journal of Neurochemistry*, *133*(5), pp. 750–65.

Tseng, K. Y., Kasanetz, F., Kargieman, L., Riquelme, L. A., and Murer, M. G. (2001a) 'Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions', *J. Neurosci,* 21, pp. 6430–6439.

Tseng, K. Y., Kasanetz, F., Kargieman, L., Pazo, J. H., Murer, M. G., and Riquelme, L. A. (2001b) 'Subthalamic nucleus lesions reduce low frequency oscillatory firing of substantia nigra pars reticulata neurons in a rat model of Parkinson's disease', *Brain Res,* 904, pp. 93–103.

Tzingounis, A. V. and Nicoll, R. A. (2008) 'Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents', *ProcNatlAcadSci U S A*, 105(50), pp. 19974-9.

Tzingounis, A. V., Heidenreich, M., Kharkovets, T., Spitzmaul, G., Jensen, H. S., Nicoll, R. A. and Jentsch, T. J. (2010) 'The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22), pp. 10232-10237.

Van der Werf, Y. D., Witter, M. P. and Groenewegen, H. J. (2002) 'The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness', *Brain Research Reviews*, 39(2), pp. 107-140.

Wang, Z., Kai, L., Day, M., Ronesi, J., Yin, H., Ding, J., Tkatch, T., Lovinger, D. and Surmeier, D. (2006) 'Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons', *Neuron*, 50(3), pp. 443-52.

Wei, W., Li, L., Yu, G., Ding, S., Li, C. and Zhou, F. M. (2013) 'Supersensitive presynaptic dopamine D2 receptor inhibition of the striatopallidal projection in nigrostriatal dopamine-deficient mice', *Journal of neurophysiology*, 110(9), pp. 2203-2216.

Werkman, T. R., Gustafson, T. A., Rogowski, R. S., Blaustein, M. P. and Rogawski, M. A. (1993) 'Tityustoxin-K alpha, a structurally novel and highly potent K+ channel peptide toxin, interacts with the alpha-dendrotoxinbinding site on the cloned Kv1.2 K+ channel', *Molecular pharmacology*, 44(2), pp. 430-436.

Wickens, J. R., Tripp, G. and Gerhardt, G. A. (2007) 'Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): from gene to therapy', *Journal of neuroscience methods*, 166(2), pp. 293.

Wider, C. and Wszolek, Z. K. (2007) 'Clinical genetics of Parkinson's disease and related disorders', *Parkinsonism Relat Disord*, 13(Suppl 3), pp. S229–32.

Wieland, S., Du, D., Oswald, M. J., Parlato, R., Köhr, G. and Kelsch, W. (2014) 'Phasic dopaminergic activity exerts fast control of cholinergic interneuron firing via sequential NMDA, D2, and D1 receptor activation', *The Journal of Neuroscience*, 34(35), pp. 11549-11559.

Wilson, C. J., Chang, H. T. and Kitai, S. T. (1990) 'Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum', *J Neurosci*, 10, pp. 508–519.

Wilson, C. J. (2004) 'Basal Ganglia. In: The Synaptic Organization of the Brain', *5th edn (Shepherd GM ed)*, pp. 361–413. New York: Oxford UniversityPress.

Wilson, C. J. and Goldberg, J. A. (2006) 'Origin of the slow afterhyperpolarization and slow rhythmic bursting in striatal cholinergic interneurons', *J Neurophysiol*, 95(1), pp. 196-204.

Wise, R. A. (2004) 'Dopamine, learning and motivation' *Nature reviews neuroscience*, 5(6), pp. 483-494.

Wise, R. A. and Schwartz, H. V. (1981) 'Pimozide attenuates acquisition of lever pressing for food in rats', *Pharmacol Biochem Behav*, 15, pp. 655–656.

Yan, Z., Song, W. J. andSurmeier, D. 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, pp. 1003–1015.

Yellen, G. (2002) 'The voltage-gated potassium channels and their relatives', *Nature*, 419(6902), pp. 35-42.

Yin, H.H. and Knowlton, B. J.(2006) 'The role of the basal ganglia in habit formation', *Nature reviews. Neuroscience*, 7(6), pp.464–476.

Yue, C. and Yaari, Y. (2004) 'KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons', *J Neurosci*, 24(19), pp. 4614-24.

Zhang, H. andSulzer, D. (2004) 'Frequency-dependent modulation of dopamine release by nicotine', *Nat Neurosci*, 7, pp. 581–582.

Zhang, Z. W. and Arsenault, D. (2005) 'Gain modulation by serotonin in pyramidal neurones of the rat prefrontal cortex', *TheJournal of physiology*,*566*(2), 379-394.

Zhao, Z., Zhang, K., Liu, X., Yan, H., Ma, X., Zhang, S., ... and Wei, X. (2016) 'Involvement of HCN channel in muscarinic inhibitory action on tonic firing of dorsolateral striatal cholinergic interneurons', *Frontiers in cellular neuroscience*,10.

Zhou, F. M., Wilson, C. J. andDani, J. A. (2002) 'Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum', *Journal of neurobiology*, 53(4), 590-605.

Zhu, J., and Chu, C. T. (2010) 'Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease', *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(S2), pp. 325-334.