



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol de las interneuronas estriatales que expresan somatostatina en los déficits motores inducidos por la degeneración nigroestriatal

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

Lic. Agostina Mónica Stahl

Director de tesis: Dr. Mario Gustavo Murer

Directora Adjunta: Dra. Lorena Rela

Consejera de estudios: Dra. Haydée Viola

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO Houssay), Facultad de Medicina, UBA-CONICET.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2025

Agradecimientos

Por supuesto que debo empezar agradeciéndole a mis directores, que son una parte esencial de todo este trabajo. Estoy convencida de que son una dupla perfecta de dirección, se complementan muy bien. A lo largo de este camino me sentí siempre muy acompañada, contenida y muy bien instruida bajo su guía. Siempre están disponibles para mis consultas, para ayudarme y también abiertos a discutir sobre el diseño experimental, los resultados, y a escuchar nuevas ideas. Estoy muy contenta de haber hecho el doctorado con Gus y Lore, porque, además de mentes críticas y excelentes científicos, resultan ser seres humanos muy buenos y comprensibles. Los quiero y les estoy muy agradecida por mentorearme en este trayecto importantísimo de mi carrera.

Seguidamente me gustaría agradecerles a Rodri y Ceci, con quienes conformamos un grupo de trabajo súper colaborativo y amigable, y quienes también me han enseñado mucho, siempre disponibles con paciencia y buena onda, realmente han sido ejemplos a seguir para mí.

Superar las vicisitudes del día a día en el laboratorio haciendo ciencia en Argentina no podría lograrse sin un grupo de compañeras incondicional. Gracias a Cami, Jesu, Flor V. y Coti por toda la contención mutua, la compañía, la ayuda, las bromas y la alegría diaria. Se han convertido en mis amigas, capaces incluso de arriesgar su vida para hacerme el aguante cuando aprendía a manejar. ¡Las quiero un montón!

Quiero agradecer a mi compañera en el trayecto completo, desde que defendimos la tesis de licenciatura hasta ahora que estuvimos escribiendo la tesis doctoral codo a codo. Gracias por estos días de coworking, que con tu compañía fueron los más productivos en los meses que más me costaba. Gracias por esta linda amistad, ¡y mucha suerte en esta siguiente etapa! Te voy a extrañar Flor S.

Gracias a Juan que siempre está disponible para ayudar en problemas técnicos, siempre entusiasmado de ver cómo nos está yendo con los experimentos y darnos una mano y consejos. Y a todos los integrantes del GNS, tanto investigadores, técnicos y becarios, porque forman un ambiente de trabajo muy ameno y colaborativo, del que da gusto ser parte. A veces la coyuntura político-económica es muy complicada en el país, pero espero que ese espíritu de colaboración sea siempre más fuerte, para seguir adelante con estos proyectos tan relevantes y de gran calidad científica producto de la vocación que mueve a todos.

Quiero agradecer también a mi familia, que siempre ha sido un gran soporte en mi vida. Especialmente a mis papás, que se encargaron de que tenga oportunidades y que pueda elegir mi camino, dándome su apoyo y aliento a seguir lo que más me gustaba.

Le agradezco a Pablo, mi compañero en la vida, por el apoyo diario, por escucharme y acompañarme en cada alegría, cada frustración y cada día por más largo que haya sido.

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 Tecnológica.

Rol de las interneuronas estriatales que expresan somatostatina en los déficits motores inducidos por la degeneración nigroestriatal.

RESUMEN

Los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson (EP) se manifiestan luego de la degeneración dopaminérgica nigroestriatal, y se asocian a un desbalance entre las vías de proyección estriatales, clásicamente conocidas como directa e indirecta. En las etapas avanzadas de la enfermedad, sólo la L-DOPA como estrategia de reemplazo de dopamina, permite un desempeño adecuado en las actividades diarias. Sin embargo, la efectividad de la L-DOPA disminuye con el paso de los años y el avance de la degeneración, y surgen movimientos anormales involuntarios conocidos como discinesias inducidas por L-DOPA (LID). Las vías de proyección estriatales, involucradas en la selección de programas motores, son moduladas por diversas interneuronas estriatales. Aunque se ha realizado un trabajo intensivo para estudiar la contribución de las interneuronas colinérgicas a los síntomas motores de la EP y las LID, la contribución de otros tipos de interneuronas es poco comprendida. En este trabajo nos propusimos investigar si las interneuronas estriatales que co-expresan somatostatina, neuropéptido Y, óxido nítrico sintasa y GABA (iSOM) contribuyen a los déficits motores asociados a la denervación dopaminérgica y al desarrollo de LID. Mediante registros electrofisiológicos de *Patch Clamp ex vivo*, estudiamos la actividad espontánea de las iSOM en ratones control, parkinsonianos y discinéticos. Encontramos una tendencia a una disminución en la frecuencia de disparo de las iSOM de ratones parkinsonianos, y un efecto excitatorio del SKF81297, agonista selectivo de receptores D1/D5, en todos los grupos experimentales. Junto con resultados previos que demostraron una inducción de c-Fos en las iSOM de ratones discinéticos luego de un tratamiento crónico con L-DOPA, nuestros datos sugieren un aumento de actividad de las iSOM durante la expresión de las LID. Por esto, evaluamos si la inhibición selectiva de las iSOM mediante una estrategia quimiogénica podría tener un efecto terapéutico sobre las LID. Encontramos que luego del establecimiento de las LID con una dosis de 6 mg/kg de L-DOPA, la inhibición de las iSOM aumenta la severidad de las LID. Por otro lado, la inhibición desde el inicio del tratamiento con L-DOPA no previno las LID ni tuvo efecto en su severidad. Si bien no vimos efectos en los déficits motores causados por la lesión, encontramos que la inhibición de las iSOM en ratones control afecta el aprendizaje motor medido mediante el rotarod con aceleración. En suma, los resultados de esta tesis indican que, si bien las iSOM contribuyen al aprendizaje motor y muestran cambios de actividad durante la estimulación dopaminérgica y luego de una lesión nigroestriatal, no modulan mayormente la expresión de las discinesias inducidas por L-DOPA, aunque resta establecer si tienen efectos mediados por mecanismos independientes del disparo de

potenciales de acción o producidos durante los intervalos sin medicación no afectados por las intervenciones que utilizamos en esta tesis.

Palabras Clave: Enfermedad de Parkinson; L-DOPA; Discinesias; Interneuronas estriatales; Somatostatina.

Role of somatostatin-expressing striatal interneurons in motor deficits induced by nigrostriatal degeneration.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) motor symptoms arise after striatal dopaminergic denervation and are linked to an imbalance between direct and indirect striatal projection pathways. In advanced stages of the disease, only L-DOPA as a dopamine replacement strategy provides adequate performance in daily activities. However, the effectiveness of L-DOPA decreases with advancing age and disease progression, and abnormal involuntary movements known as L-DOPA-induced dyskinesias (LID) emerge. Striatal projection pathways, involved in motor program selection, are modulated by various striatal interneurons. Although intensive work has been done to study the contribution of cholinergic interneurons to the motor symptoms of PD and LID, the contribution of other types of interneurons is poorly understood. In this work we investigate whether striatal interneurons co-expressing somatostatin, neuropeptide Y, nitric oxide synthase and GABA (iSOM) contribute to motor deficits associated with dopaminergic denervation and the development of LID. Using *ex vivo* patch-clamp recordings, we examined iSOM spontaneous activity in control, parkinsonian and dyskinetic mice. There was a non-significant trend toward decreased firing frequency in parkinsonian mice and an excitatory effect of the D1/D5 selective agonist SKF81297 in all experimental groups. Together with previous results demonstrating an induction of c-Fos in iSOM of dyskinetic mice after chronic L-DOPA treatment, our data suggest an increase in iSOM activity during LID expression. Therefore, we evaluated whether selective inhibition of iSOM using chemogenetics could alleviate motor symptoms of PD and LID. We found that after the establishment of LID with a dose of 6 mg/kg L-DOPA, iSOM inhibition increases the severity of LID. On the other hand, inhibition from the onset of L-DOPA treatment did not prevent LID, nor did it affect its severity. While we saw no effect on motor deficits caused by the lesion, we found that iSOM inhibition in control mice impairs motor learning in the accelerating rotarod. Overall, these findings suggest that, while iSOM contribute to motor learning and exhibit changes in activity during dopaminergic stimulation and after dopamine depletion, they do not appear to significantly modulate LID. However, it remains to be established whether they exert effects via mechanisms that are independent of action potential firing or during off medication periods that were not affected by the interventions we used in this thesis.

Key words: Parkinson's disease; L-DOPA; Dyskinesia; striatal interneurons; Somatostatin.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	9
I.1. Enfermedad de Parkinson	10
I.1.1. Descripción general de la enfermedad	10
I.1.2. Tratamiento.....	11
I.1.2.1. Discinesias inducidas por L-DOPA (LID)	13
I.2. Ganglios Basales	15
I.2.1. Circuito general	15
I.2.2. Función de los ganglios de la base y regulación por dopamina	18
I.2.3. Alteraciones circuitales que siguen a la degeneración dopaminérgica y al tratamiento con L-DOPA.....	20
I.2.4. Actividad oscilatoria en la enfermedad de Parkinson y en LID	22
I.3. Interneuronas estriatales.....	24
I.3.1. Interneuronas colinérgicas	24
I.3.1.1. Generalidades.....	24
I.3.1.2. iChAT en parkinsonismo y LID	27
I.3.2. Interneuronas somatostatinérgicas	29
I.3.2.1. Características morfológicas y electrofisiológicas	30
I.3.2.2. iSOM en el circuito estriatal.....	34
I.3.2.3. iSOM en la conducta.....	35
I.3.2.4. iSOM en parkinsonismo y LID	37
I.4. Abordaje experimental.....	39
I.4.1. Modelos animales de la enfermedad de Parkinson y discinesias inducidas por L-DOPA	39
I.4.2. DREADDs	40
OBJETIVOS E HIPOTESIS	42
Objetivos e hipótesis:	43
MATERIALES Y MÉTODOS	44
M.1. Animales	45
M.2. Cirugías estereotáxicas	45
M.2.1. Lesión dopaminérgica	46

M.2.2. Administración de vectores virales	47
M.3. Evaluación conductual y farmacología	48
M.3.1. Evaluación de los signos motores de la enfermedad de Parkinson.....	48
M.3.1.1. Administración de CNO	50
M.3.2. Inducción de discinesias	50
M.3.2.1. Administración de L-DOPA	50
M.3.2.2. Puntuación de discinesias.....	51
M.4. Inmunohistoquímica.....	51
M.4.1. Obtención y procesamiento del tejido	51
M.4.2. Análisis del grado de denervación dopaminérgica	52
M.4.2.1. Marcación de TH.....	52
M.4.2.2. Adquisición y análisis de las imágenes	52
M.4.3. Análisis del grado de transfección del vector viral	53
M.4.3.1. Marcación de Som y Cherry	53
M.4.3.2. Adquisición y análisis de las imágenes	54
M.5. Electrofisiología	56
M.5.1. Obtención de tejido ex vivo para registros electrofisiológicos.....	56
M.5.2. Registros electrofisiológicos.....	56
M.5.3. Manipulaciones farmacológicas	58
M.5.4. Análisis de registros electrofisiológicos.....	58
RESULTADOS.....	59
R.1. Actividad electrofisiológica de las iSOM.	60
R.1.1. Actividad intrínseca de las iSOM.....	60
R.1.2. Actividad electrofisiológica de las iSOM luego de la lesión dopaminérgica	64
R.1.2.1 Validación conductual del modelo de EP y LID.	64
R.1.2.2 Actividad electrofisiológica de las iSOM en ratones parkinsonianos y discinéticos.	67
R.1.2.3 Modulación farmacológica de la actividad electrofisiológica de las iSOM en ratones parkinsonianos y discinéticos.	71
R.2. Modulación de las iSOM sobre los déficits motores de parkinsonismo y LID.	78
R.2.1. Validación histológica y electrofisiológica del DREADD utilizado.	78

R.2.2. Efecto de la inhibición de iSOM sobre los déficits motores del parkinsonismo.	81
R.2.3. Efecto de la inhibición de iSOM sobre la expresión de LID.....	85
R.2.4. Efecto de la inhibición de iSOM sobre el desarrollo de LID.	88
R.2.5. Efectos asociados al tratamiento crónico con L-DOPA.....	93
DISCUSIÓN.....	96
D.1. Nuevos aspectos clínicos observados en el hemiparkinsonismo experimental inducido por 6-OHDA.....	97
D.2. Aprendizaje motor en el rotarod acelerante.....	98
D.3. Expresión de Som durante el desarrollo	99
D.4. Actividad intrínseca de las iSOM.	99
D.5. Cambios en la actividad electrofisiológica de iSOM en parkinsonismo y el estado off L-DOPA.	100
D.6. Cambios en la actividad electrofisiológica de iSOM durante la estimulación aguda de receptores D1/D5.....	101
D.7. Efectos de la inhibición quimiogénica de las iSOM sobre las LID.	102
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXO.....	132
A.1. Caracterización histológica de los animales Som-Cre;Tomato.	132
A.2. Análisis extendido de los efectos de la inhibición de las iSOM sobre los déficits motores de la EP.	133
A.3. Experimento piloto sobre los efectos de la activación quimiogénica de las iSOM sobre los déficit motores de la EP y las LID.	135

INTRODUCCIÓN

I.1. Enfermedad de Parkinson

I.1.1. Descripción general de la enfermedad

La primera descripción de los síntomas que se asocian actualmente con la enfermedad de Parkinson (EP) fue publicada por James Parkinson en su trabajo *Essay on the Shaking Palsy* ("Ensayo sobre la parálisis agitante"), basándose en sus observaciones clínicas de 6 pacientes. La EP es una patología que, de acuerdo con datos publicados por la *Parkinson's Disease Foundation*, más de 10 millones de personas padecen alrededor de todo el mundo, lo que la ubica como la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, siendo la enfermedad de Alzheimer la primera. Se trata de una enfermedad caracterizada por debilitamiento motor que actualmente es incurable; los tratamientos disponibles son sintomáticos. La edad avanzada es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad (Pringsheim et al., 2014; Twelves et al., 2003), que representa un grave problema de salud pública por el deterioro que produce en la calidad de vida de los pacientes y por su impacto socioeconómico creciente a medida que mejora la expectativa de vida de la población. De hecho, se espera que el número de diagnósticos de EP crezca en más de un 50% para 2030 (Dorsey et al., 2007). La edad promedio de diagnóstico es cerca de los 60 años (Blauwendraat et al., 2019) y la evolución fluctúa entre 10 y 25 años.

El examen anatómo-patológico macroscópico del cerebro de pacientes con EP revela una atrofia frontal leve con pérdida de neuromelanina, pigmento normalmente presente en el mesencéfalo. En el examen microscópico se observa una **degeneración de las neuronas dopaminérgicas** de la **sustantia nigra pars compacta (SNc)**, y presencia de **cuerpos de Lewy** en las neuronas remanentes de la SNc, en núcleos del tronco encefálico y en regiones corticales límbicas, temporales y frontales, así como en algunas regiones periféricas (Kalia & Lang, 2015). Los cuerpos de Lewy son inclusiones citoplasmáticas eosinófilas formadas principalmente por agregados de α -sinucleína y otras proteínas como la ubiquitina y proteínas de neurofilamento, y constituyen el rasgo anatomopatológico característico de la enfermedad. Dado que no se han identificado marcadores que permitan el diagnóstico temprano de la EP y que la sintomatología motora se evidencia con avanzada neurodegeneración, **al momento del diagnóstico** de la enfermedad se aprecia una **degeneración de entre el 50 y 70% de las neuronas de la SNc** (George et al., 2009).

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 & Wszolek, 2007) que resultan en estrés oxidativo (Gao et al., 2008; Puspita et al., 2017), disfunción del proteosoma (Demartini et al., 2014; Triplett et al., 2015), y mitocondrial (Bose & Beal, 2016; Ganguly et al., 2017). A pesar de los progresos realizados, **la etiología de la gran mayoría de los casos de EP permanece**

desconocida, y no se dispone de tratamientos que permitan detener el proceso degenerativo (Lees et al., 2009).

Dado que las características patológicas de la EP sólo pueden terminar de confirmarse de forma *post mortem*, el deterioro en la función motora es clásicamente usado para el diagnóstico clínico. Las principales características son la **bradicinesia** (dificultad para iniciar la conducta motora y lentitud de los movimientos, pudiendo incluso llegar a acinesia), la **rigidez** (incremento del tono muscular), el **temblor de reposo** de 4 a 6 Hz, y la **inestabilidad postural** no causada por una patología visual, vestibular, cerebelosa o disfunción propioceptiva, inicialmente asimétrica, que progresa hasta convertirse en bilateral con el paso del tiempo (Goetz, 2024). Otros signos motores incluyen los cambios en la postura y la marcha festinante (con pasos cortos y apresurados, con el tronco inclinado hacia adelante), dificultades en el habla y la deglución, microfagia y disminución de las expresiones faciales (Jankovic, 2008). Una buena respuesta a la medicación dopaminérgica es confirmatoria del diagnóstico. Las manifestaciones no motoras incluyen disfunción del olfato, alteraciones cognitivas, síntomas psiquiátricos, alteraciones del sueño, disfunción autonómica, dolor y fatiga (Kalia & Lang, 2015). Los síntomas no motores son comunes en etapas tempranas de la EP, se presentan antes del inicio de los síntomas motores clásicos y pueden depender de alteraciones en otras estructuras incluyendo la degeneración de grupos de neuronas colinérgicas del tronco encefálico y del núcleo basal de Meynert.

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

I.1.2. Tratamiento

Actualmente no existe ningún tratamiento que logre evitar o postergar la neurodegeneración en la SNc, y tampoco se vislumbran estrategias viables para el restablecimiento funcional de las neuronas perdidas al momento del diagnóstico; por lo

tanto, las terapias farmacológicas actuales apuntan a **paliar los síntomas** de la enfermedad y mejorar así la calidad de vida de los pacientes.

Los **primeros tratamientos** para la EP se basaban en **inhibir la transmisión colinérgica**, y a mediados del siglo XX se introdujeron fármacos sintéticos anticolinérgicos (McDonald et al., 2018), principalmente antagonistas de receptores muscarínicos. Si bien la importancia de los ganglios de la base y el estriado en la fisiopatogenia de la EP se abordará en la siguiente sección, cabe aclarar en este punto, que esta terapia anticolinérgica se basaba en la idea de que el balance entre dopamina (DA) y acetilcolina (ACh) se encuentra alterado en el núcleo de entrada principal de los ganglios de la base, resultando en un estriado "hipercolinérgico" (Barbeau, 1962). Su uso disminuyó por su menor eficacia relativa comparada con la terapia dopaminérgica, y a falta de experimentos que demostrasen los cambios en la liberación de acetilcolina o en la actividad de las interneuronas colinérgicas estriatales en ese momento. Además, los anticolinérgicos tienen **efectos secundarios cognitivos y autonómicos** que aun limitan su utilidad clínica (Katzenschlager et al., 2003). Sin embargo, a veces se utilizan como terapia conjunta con L-DOPA para aliviar algunos síntomas como el temblor (Duvoisin, 1967; Katzenschlager et al., 2003; Lester et al., 2010).

La principal terapéutica utilizada para tratar la EP se basa en recomponer la actividad neuronal en los núcleos privados de inervación dopaminérgica mediante la administración de fármacos que reestablezcan la estimulación de los receptores dopaminérgicos, como la **levodopa** (L-3,4 dihidroxifenilalanina o **L-DOPA**) y los agonistas de receptores dopaminérgicos de tipo 2 (D2R). La L-DOPA es un precursor de la DA, así como también de todas las catecolaminas (**Figura I. 1**). Al ser administrada a los pacientes, las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas remanentes la captan y pueden aumentar la liberación de DA en el cuerpo estriado, uno de sus blancos principales (ver apartado I.2). La L-DOPA se **coadministra con un inhibidor de la DOPA decarboxilasa**, como la carbidopa o benserazida, que no atraviesa la barrera hematoencefálica, para evitar su conversión sistémica a DA. Esta combinación de fármacos es la terapéutica más efectiva sobre la sintomatología motora, y su introducción en el tratamiento de la enfermedad incrementó enormemente la expectativa de vida de los pacientes (Group, 2004).

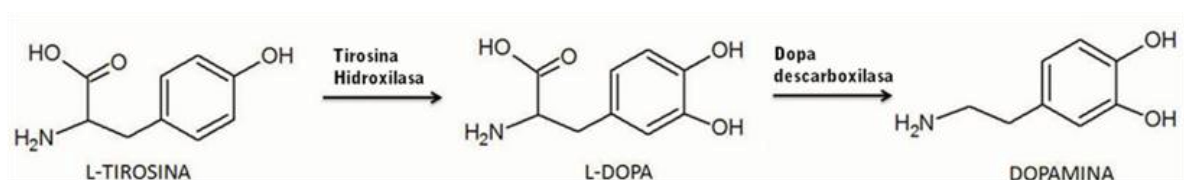


Figura I. 1: Síntesis de dopamina a partir del aminoácido tirosina. La primera reacción es catalizada por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), obteniendo como producto 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) que es transformada a dopamina por acción de la enzima

dopa decarboxilasa. Mediante la acción de otras enzimas, la dopamina puede derivar en noradrenalina y adrenalina.

Tras el inicio del tratamiento se produce un **importante beneficio clínico** durante 5-7 años. Luego, más del 50% de los pacientes exhibe complicaciones en forma de **fluctuaciones motoras y movimientos anormales involuntarios** llamadas discinesias (Francardo & Cenci, 2014). Las **discinesias inducidas por L-DOPA (LID** por sus siglas en inglés *L-DOPA-induced dyskinesias*) pueden adoptar la forma de corea, balismo, distonia, atetosis, estereotipias o mioclonías. Los tratamientos con la administración de agonistas directos de los receptores de la familia D2 para DA 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 et al., 2016), pero en última instancia **casi todos los pacientes deben recibir L-DOPA**.

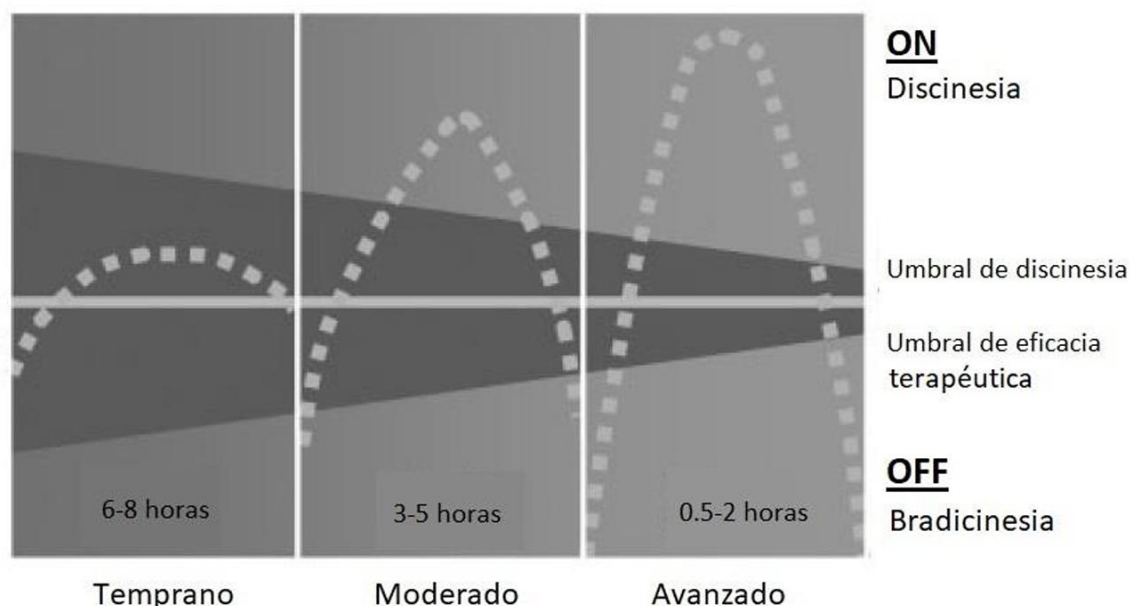
Cuando la medicación ya no resulta efectiva también se utilizan estrategias de neurocirugía que buscan corregir la actividad neuronal anormal que resulta de la denervación dopaminérgica (Benabid et al., 2009). Tal es el caso de la estimulación eléctrica en el núcleo subtalámico (NST, ver apartado I.2), que comúnmente se denomina “estimulación cerebral profunda” (DBS, por sus siglas en inglés).

I.1.2.1. Discinesias inducidas por L-DOPA (LID)

Las LID frecuentemente consisten en movimientos coreicos que involucran el tronco, las extremidades y la región orofacial, en los momentos en los que la concentración plasmática y el efecto de la L-DOPA son máximos (discinesias de **pico de dosis**), mientras que algunos pacientes desarrollan estos movimientos involuntarios en las fases iniciales o finales del beneficio clínico de cada administración (discinesias bifásicas). Además, un 30% de los pacientes sufren adicionalmente de calambres distónicos cuando el efecto de la L-DOPA está disminuyendo (discinesias o distonía de **períodos off**) (Nutt, 1990).

Se han estudiado diversos factores que contribuyen a limitar la eficacia terapéutica de la L-DOPA en etapas avanzadas de la EP. Una de ellas es la degeneración de neuronas en otras regiones del sistema nervioso que da origen a síntomas (especialmente no motores) que no responden a la L-DOPA (Kalia & Lang, 2015). Por otro lado, en etapas tempranas de la enfermedad, las terminaciones dopaminérgicas remanentes funcionan como reservorios de dopamina, sintetizada a partir de L-DOPA, que persiste más que la disponibilidad de L-DOPA en plasma. Estos **reservorios de dopamina disminuyen a medida que avanza la degeneración nigroestriatal**, por lo que, en etapas avanzadas de neurodegeneración, los niveles estriatales de dopamina fluctúan a la par con las concentraciones de L-DOPA en plasma. En consecuencia, la **estimulación de los receptores para dopamina en el estriado se vuelve “pulsátil”** y los pacientes transitan **estados on y off** (Connolly & Lang, 2014) (Figura I. 2). Esta limitación en el uso prolongado de la L-DOPA en estadios avanzados de la enfermedad hace necesario el

desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan disminuir la aparición de los efectos colaterales de su uso.



Progresión de la Enfermedad de Parkinson

Figura I. 2: Fluctuaciones motoras y discinesias en función del avance de la enfermedad. Se esquematiza el curso del efecto de la L-DOPA (línea punteada) desde su administración según la progresión de la EP. En etapas tempranas, la L-DOPA presenta un gran beneficio sintomático sin complicaciones motoras. A medida que progresa la enfermedad se acorta la duración del efecto terapéutico de la L-DOPA, aparecen discinesias inducidas por L-DOPA y los pacientes transitan estados *on* y *off*. Adaptado de [Jankovic, 2005](#), con autorización de John Wiley and Sons (licencia 6060281257364).

La aparición de estas complicaciones motoras se asocia principalmente al grado de degeneración dopaminérgica, al tiempo de tratamiento con L-DOPA y a la dosis de L-DOPA administrada. No hay evidencia clara de que exista además una predisposición genética al desarrollo de complicaciones relacionadas con la L-DOPA, aunque factores genéticos podrían contribuir a explicar la heterogeneidad de la respuesta a la L-DOPA en los pacientes ([Jankovic, 2005](#)). Las fluctuaciones motoras se caracterizan principalmente por el efecto de **wearing-off** o deterioro de fin de dosis, que consiste en el deterioro y la recurrencia de los síntomas parkinsonianos producto del acortamiento de la duración del efecto terapéutico de la L-DOPA. Además, muchos pacientes comienzan a experimentar síntomas no motores en el periodo *off*, que pueden ser sensoriales, como dolor o parestesia, o del estado de ánimo, como depresión, ansiedad o pánico ([Jankovic, 2005](#)).

Existen también casos en los que las LID se presentan esporádicamente durante los períodos sintomáticos *off* L-DOPA, cuando los niveles plasmáticos de L-DOPA son mínimos ([Fabbrini et al., 2007](#)). Los mecanismos que causan discinesias durante el

estado *off* de medicación se desconocen, si bien podrían relacionarse con los eventos de **cinesia paradójica**, cuando pacientes con EP son repentinamente capaces de realizar tareas que les era imposible realizar, generalmente en respuesta a estímulos externos estresantes y que estarían asociados a un **efecto de la L-DOPA de larga duración** (Duysens & Nonnekes, 2021; Glickstein & Stein, 1991). Este efecto de larga duración es muy importante en la clínica ya que permite a los pacientes un beneficio terapéutico, por fuera de la ventana de tiempo que la L-DOPA está en plasma, que se prolonga por días. Comienza a manifestarse luego de semanas de tratamiento crónico, y puede durar hasta semanas luego del cese del tratamiento, acortándose en los pacientes más afectados por la enfermedad. El mecanismo es aún desconocido, y dado que no existen reportes de este fenómeno en los modelos animales de EP, los mecanismos involucrados son poco comprendidos (Anderson & Nutt, 2011).

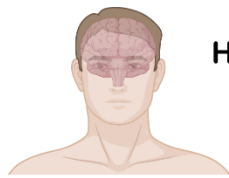
Para comprender mejor los cambios en el circuito neuronal afectado en la EP y las LID es necesario introducir el circuito de los ganglios de la base.

I.2. Ganglios Basales

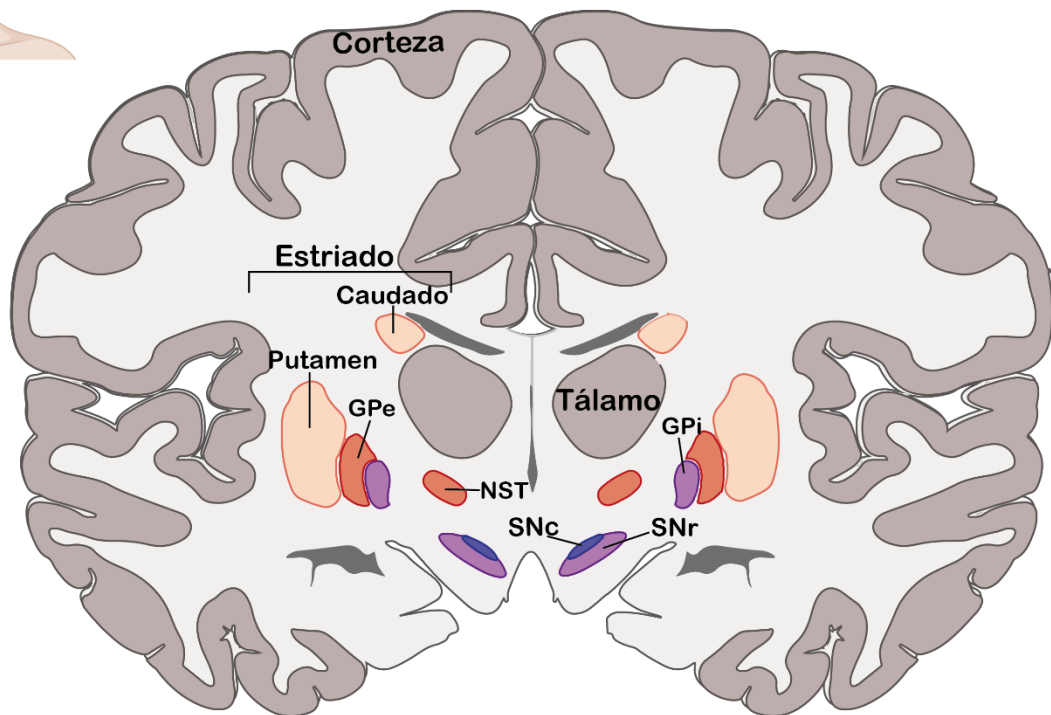
I.2.1. Circuito general

Los ganglios basales (GB) son estructuras subcorticales del sistema nervioso central interconectadas entre sí, formando un circuito cuya principal función es la selección, iniciación e integración de movimientos voluntarios, pero que está involucrado también en aprendizaje motor, funciones ejecutivas y emociones. Procesan la información proveniente de la corteza cerebral y la retroalimentan mediante un circuito que involucra al tálamo, y contribuyen con la coordinación del movimiento, entre otras funciones.

El principal núcleo de entrada de los GB está constituido por el estriado dorsal (que en primates se encuentra dividido en caudado y putamen) y el núcleo accumbens, o estriado ventral. Los núcleos intermedios incluyen al globo pálido (globo pálido externo -GPe- en primates) y al núcleo subtalámico (NST), mientras que los núcleos de salida están conformados por el núcleo entopeduncular (globo pálido interno -GPi- en primates) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr) (**Figura I. 3**). Los núcleos ventrales del tálamo son el principal blanco de los núcleos de salida, y a su vez proyectan a la corteza frontal. Entonces, los GB forman un bucle de procesamiento corteza – GB – tálamo – corteza. Además, la sustancia nigra pars compacta (SNc) y el área tegmental ventral (ATV) cumplen un rol clave en la regulación de los GB liberando dopamina (DA) en el estriado, tanto en su región dorsal como en el núcleo accumbens. Disfunciones en el sistema dopaminérgico se asocian a desórdenes del movimiento como la enfermedad de Parkinson, distonías y coreas.



Humano - corte coronal



Ratón - corte sagital

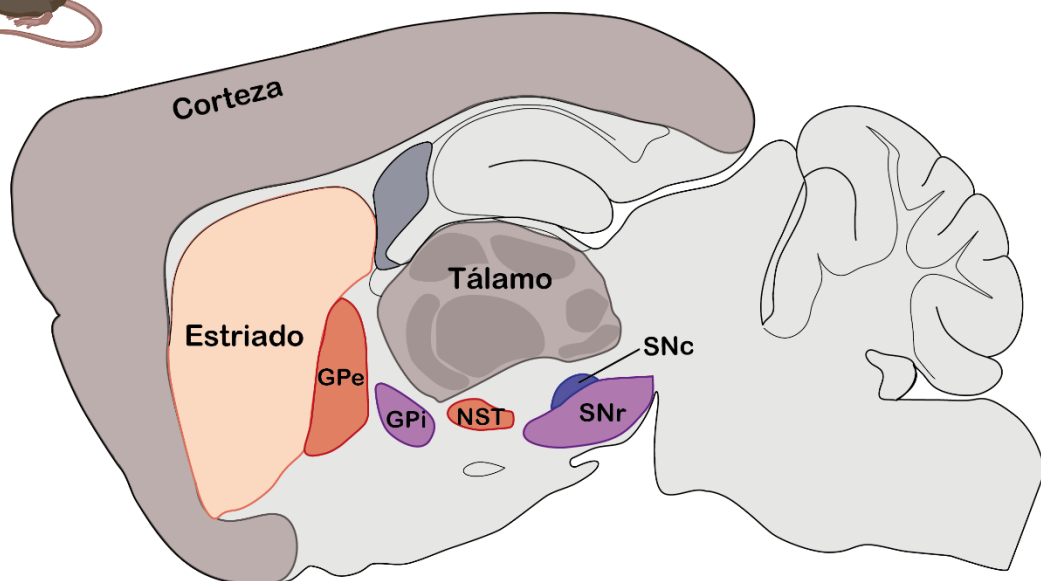


Figura I. 3: Ganglios de la base y núcleos relacionados en el humano y en roedores. El esquema superior muestra una representación de un corte coronal del cerebro humano, mientras que el esquema inferior muestra una representación de un corte sagital del cerebro de ratón. En ambos esquemas se representan los GB y núcleos relacionados: Estriado; GPi, globo pálido interno; GPe, globo pálido externo, SNc, sustantia nigra *pars compacta*; SNr, sustantia nigra *pars reticulata*; NST, núcleo subtalámico.

El estriado recibe proyecciones glutamatérgicas desde prácticamente toda la corteza cerebral y desde núcleos intralaminares y específicos del tálamo, además de recibir inputs desde el tallo encefálico, principalmente de células dopaminérgicas. A grandes rasgos, regiones corticales asociadas a motivación y recompensa, como la corteza orbitofrontal y la corteza cingulada anterior, proyectan principalmente a la parte ventral y medial del estriado, la corteza prefrontal dorsal proyecta hacia el estriado medial y las regiones corticales motoras al estriado dorso-lateral. No obstante esta organización topográfica general, las proyecciones de las diferentes regiones funcionales de la corteza no se encuentran completamente separadas (Calzavara et al., 2007; Haber et al., 2006). A través de una espiral de entradas y salidas entre las neuronas del estriado y las dopaminérgicas del cerebro medio, la información puede fluir desde los circuitos límbicos a los circuitos motores, proporcionando un mecanismo mediante el cual la motivación y la cognición pueden influir en los procesos motores de toma de decisiones y las respuestas apropiadas a las señales ambientales. Así, se reconoce a los GB como mediadores de toda la gama de conductas que conducen al desarrollo y ejecución de los planes de acción, incluidas las emociones, la motivación y la cognición que los impulsan (Haber, 2014; Haber et al., 2000).

El estriado carece de neuronas glutamatérgicas. La mayoría de sus células son GABAérgicas, incluyendo el tipo principal de neuronas de proyección estriatales llamadas neuronas espinosas medianas (NEM), que conforman alrededor del 95% de las neuronas estriatales (Tepper et al., 2010). Las NEM se caracterizan por su alta densidad de espinas y pueden ser divididas en dos subtipos según sus proyecciones axonales y sus patrones de expresión génica (Gerfen et al., 1990; Smith et al., 1998). El procesamiento de información cortical en los GB ocurre a través de dos rutas: las vías directa e indirecta (Albin et al., 1989). La **vía directa** se origina en las NEM estriatonigrales (**dNEM**) que proyectan de manera monosináptica a los núcleos de salida (GPi y SNr) y expresan principalmente el receptor de dopamina D1 (**D1R**). Los núcleos de salida envían proyecciones GABAérgicas hacia el tálamo, que, a su vez, envía proyecciones glutamatérgicas a la corteza. El efecto neto de la activación de esta vía es la **desinhibición de las neuronas excitatorias tálamo-corticales (Figura I. 4-A)**. En el circuito motor clásico, la activación de esta vía **promueve el movimiento**. La **vía indirecta** se origina con las NEM estriatopallidales (**iNEM**) que expresan principalmente el receptor de dopamina D2 y proyectan por una vía multisináptica, que involucra al GPe y el NST, a los núcleos de salida (GPi y SNr) (**Figura I. 4-A**). El efecto de la activación de esta vía es la **inhibición de las neuronas tálamo-corticales**, y en el circuito motor esto supone la **inhibición del movimiento**. La visión clásica propone entonces que la DA excita a las dNEM e inhibe a las iNEM mediante la activación de los receptores D1 y D2 respectivamente (Gerfen et al., 1990).

El conexionado esquematizado en la **Figura I. 4-A** muestra un modelo canónico simplificado del circuito de los GB, pero es más complejo: por ejemplo, existen

proyecciones directas de la corteza al NST (formando la vía hiperdirecta) (Nambu et al., 2002), proyecciones directas del GPe a los núcleos de salida (Bolam et al., 1993) y al estriado (Bevan et al., 1998; Mallet et al., 2016), proyecciones de las dNEM al GPe (Okamoto et al., 2020) y proyecciones de otras áreas subcorticales al estriado (Dautan et al., 2014), entre otras. Si bien el modelo clásico ha sido ampliado, incorporando numerosos circuitos paralelos que involucran a los GB en otras funciones y los conectan con los territorios cognitivos y asociativos (Lanciego et al., 2012), el modelo canónico ha sido, y sigue siendo, una simplificación que explica una diversidad de fenómenos y tiene poder predictivo.

I.2.2. Función de los ganglios de la base y regulación por dopamina

La DA es un neurotransmisor presente en el estriado que modula la respuesta de las NEM a las aferencias glutamatérgicas cortico- y tálamo-estriatales. En el estriado dorsal, la DA proviene de las neuronas dopaminérgicas cuyos somas se encuentran en la SNc, y que proyectan sus terminales axonales al estriado mediante el haz de fibras nigroestriatal llamado también haz medial del cerebro anterior o MFB (del inglés: *medial forebrain bundle*). Colaterales de este haz inervan el GPI, el GPe, el STN y la SNr. La muerte de estas células, y la consecuente pérdida de la modulación dopaminérgica de la transmisión glutamatérgica y colinérgica estriatal, es una característica fundamental de la enfermedad de Parkinson.

Función motora de los GB

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

Adquisición de habilidades motoras y hábitos

Los GB, especialmente el estriado, tienen un rol importante en la optimización del comportamiento mediante el refinamiento de la selección de acciones y en la configuración de hábitos y habilidades, modulando los repertorios motores disponibles. Los **hábitos** son comportamientos relativamente estables y con bajo control consciente que se desencadenan por determinados eventos (normalmente estímulos externos) que ocurren en contextos específicos. Las **habilidades motoras** son patrones de movimientos aprendidos que generan nuevas capacidades para la acción dirigida a un objetivo. Con la suficiente práctica ambos conducen a una **automaticidad** y a una resiliencia frente a acciones competitivas ([Graybiel & Grafton, 2015](#)). Los circuitos de los GB participan en la optimización del comportamiento en condiciones en las que las conductas específicas reciben **retroalimentación en forma de refuerzos**, lo que permite la selección de secuencias motoras efectivas.

La recurrencia de acciones que obtuvieron consecuencias positivas está representada por patrones de actividad neuronal en regiones corticales, como en corteza motora primaria, y su reforzamiento depende de mecanismos de plasticidad que involucran a los circuitos córtico-estriales. De hecho, la desconexión córtico-estriatal mediante la ablación selectiva de la subunidad NR1 del receptor glutamatérgico tipo NMDA (subunidad esencial para la función del receptor) en las NEM impide este tipo de aprendizaje ([Koralek et al., 2012](#)). Estos circuitos codifican las contingencias acción-consecuencia y proveen retroalimentación a la corteza, necesaria para la recurrencia de las conductas apropiadas ([Athalye et al., 2020](#); [Yin et al., 2005, 2006, 2009](#)). Un ejemplo de aprendizaje motor se pone en evidencia con el ensayo del rotarod acelerante, en el que los ratones deben adquirir la habilidad de mantenerse en un rodillo que gira, adaptándose a los cambios de velocidad. En este caso se han estudiado los cambios plásticos que se generan tanto en la corteza como en el estriado en la primera etapa del aprendizaje, que ocurre durante el primer día, así como en la etapa tardía de aprendizaje, que sucede los días siguientes de entrenamiento ([Costa et al., 2004](#)).

En el contexto de aprendizajes instrumentales, la DA liberada en el estriado cumple un rol fundamental. De hecho, el bloqueo de la transmisión dopaminérgica en etapas tempranas de un aprendizaje instrumental en animales de laboratorio impide la adquisición de las conductas reforzadas. Además, la administración de bloqueantes dopaminérgicos una vez adquirida la conducta reforzada, debilita la acción, aunque los animales logren obtener la recompensa ([Spyraki et al., 1982](#); [Wise et al., 1981](#)). Así, la dopamina estaría involucrada tanto en la motivación por la obtención de una recompensa durante una tarea recompensada, como en la consolidación de una memoria que asocia una acción con la recompensa obtenida ([Wise, 2004](#)).

La DA regula la plasticidad de las sinapsis córticoestriales ([Pisani et al., 2003](#); [Reynolds et al., 2022](#); [Shen et al., 2008](#)), mecanismo que podría sustentar la adquisición

de conductas dirigidas a alcanzar metas. Por otro lado, la DA podría participar en la selección de la conducta mejor adaptada al contexto actual mediante sus efectos agudos sobre la neurotransmisión 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 un contexto dado.

I.2.3. Alteraciones circuitales que siguen a la degeneración dopaminérgica y al tratamiento con L-DOPA.

El blanco principal de las neuronas dopaminérgicas de la SNc es el estriado, y la denervación de esta estructura repercute en el funcionamiento de las vías directa e indirecta de los ganglios de la base. En la EP, además de la pérdida dopaminérgica, existe un exceso de ACh estriatal; se postula que este desbalance conduce a una señalización anómala en la que la vía directa carece de estimulación suficiente, mientras que la vía indirecta es patológicamente hiperactiva (**Figura I. 4-B**); esto resulta en una mayor inhibición de las proyecciones tálamo-corticales y conduce a un deterioro motor parkinsoniano, y a la aparición de los rasgos hipocinéticos de la enfermedad ([Aosaki et al., 2010](#); [Salin et al., 2009](#)).

La pérdida de DA resulta además en un marcado aumento de la respuesta de las NEM de ambas vías a las drogas dopaminérgicas, incluida la L-DOPA. Según el modelo clásico del circuito de los GB, ante una hipersensibilización de los receptores dopaminérgicos, la L-DOPA produce un desbalance de las dos vías a favor de la vía directa, opuesto al observado en la EP (**Figura I. 4-C**). Es decir, dado que el efecto fisiológico de la DA es facilitador de la vía directa e inhibidor de la vía indirecta, al encontrarse ambas vías sensibilizadas por la falta de DA endógena, la L-DOPA induce una hiperactivación de la vía directa respecto de la vía indirecta. Normalmente la vía directa activa y la vía indirecta inhibe la descarga tálamo-cortical y consecuentemente el movimiento, y resulta esperable que la L-DOPA produzca un estado de facilitación del movimiento en comparación con el estado parkinsoniano y esto se traduzca en un beneficio terapéutico. Sin embargo, con el tratamiento prolongado y la denervación dopaminérgica avanzada, se producen movimientos **discinéticos** (involuntarios y descoordinados), anormales, y pueden aparecer y coexistir con una hipocinesia en el paciente.

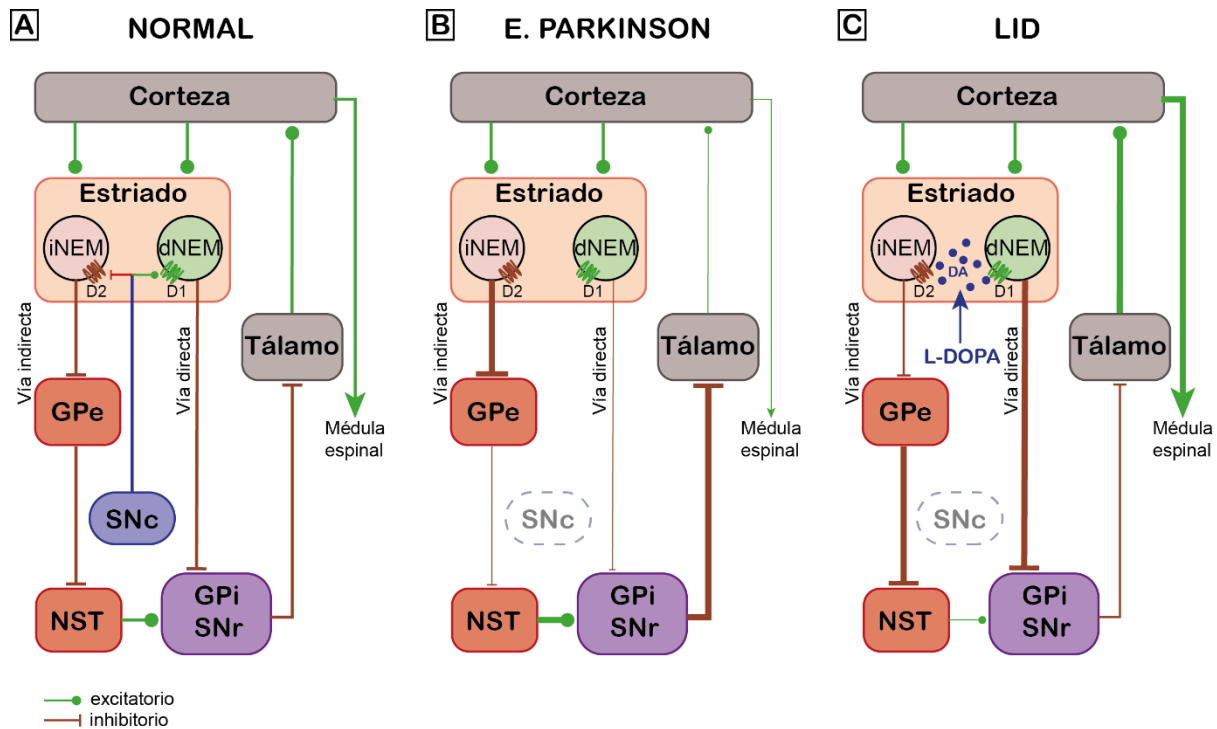


Figura I. 4: Circuito de los ganglios de la base en condiciones normales, en la enfermedad de Parkinson y en las LID. En B y C las conexiones más gruesas y finas representan un aumento o disminución, respectivamente, de la actividad de esas conexiones. En la EP, un desbalance a favor de la vía indirecta resulta en una mayor inhibición de las neuronas tálamo-corticales excitatorias, mientras que, en las LID, el desbalance a favor de la vía directa resulta en una desinhibición de las neuronas tálamo-corticales. NEM: neuronas espinosas medianas; SNc: sustancia nigra *pars compacta*; GPe: globo pálido externo; NST: Núcleo subtalámico; GPi: Globo pálido interno; SNr: sustancia nigra *pars reticulata*.

La interacción entre denervación estriatal y terapia con L-DOPA produce alteraciones moleculares, funcionales y estructurales de largo término en el estriado, asociadas a la sensibilización de la señalización del D1R, que contribuyen a limitar la eficacia de la terapéutica y promover la aparición de LID (Cenci & Konradi, 2010; Murer & Moratalla, 2011; Surmeier et al., 2010). Mientras que el uso crónico de agonistas de los D2R se asocia a un riesgo muy bajo de padecer discinesias, los agonistas selectivos de los D1R poseen un alto poder discinetogénico (Holloway et al., 2004; Rascol et al., 2006; Taravini et al., 2016). A su vez, durante el tratamiento con L-DOPA, los antagonistas de D1R son más efectivos para inhibir las LID que los antagonistas D2R. Más aún, los ratones *knock-out* para el D1R no desarrollan LID, mientras que los *knock-out* para el D2R desarrollan LID en igual medida que los ratones controles (Darmopil et al., 2009). Todo esto llevó a postular el rol crucial de la activación del D1R en la inducción y desarrollo de las LID (Murer & Moratalla, 2011). Diversos cambios en las cascadas de señalización del receptor D1R han sido asociados a las LID (Alcacer et al., 2012; Gerfen et al., 2002; Pavón et al., 2006; Santini et al., 2009; Sanz-Blasco et al., 2018), pero si bien estos descubrimientos son muy esclarecedores para entender los mecanismos subyacentes, no han constituido buenos blancos terapéuticos, ya que su intervención suele afectar

también el efecto beneficioso de la activación del D1R, por lo que, si bien conducen a una reducción de las LID, también reducen el efecto antiparkinsoniano de la L-DOPA.

Por esto, apuntar a otros blancos fuera de la cascada de señalización del D1R y a otros tipos celulares como las interneuronas, que modulan localmente a las NEM, permitiría el desarrollo de terapias que reduzcan la sintomatología discínética sin afectar el beneficio terapéutico de la L-DOPA.

I.2.4. Actividad oscilatoria en la enfermedad de Parkinson y en LID

Un rasgo importante de la fisiopatología de la EP y las LID es la aparición de alteraciones en los ritmos de actividad neuronal que tienen lugar en el circuito motor ([Chung et al., 2018](#); [Eusebio & Brown, 2009](#); [J. S. George et al., 2013](#); [Jenkinson & Brown, 2011](#)). Los síntomas que reflejan la reducción del movimiento, como la bradicinesia y la rigidez, correlacionan con un **aumento patológico en la actividad del potencial de campo** (LFP por sus siglas en inglés: *local field potential*) **en la banda de frecuencias beta (15-30 Hz)**, que se observa tanto en los GB como en la corteza motora de pacientes y modelos animales de la EP ([Brown, 2007](#); [Kühn et al., 2006, 2008](#); [Little et al., 2012](#); [Sharott et al., 2005](#)).

El LFP es el producto de contribuciones eléctricas de diversos procesos, no solo neuronales, sino que tanto la vasculatura como la glía contribuyen a dicho potencial. No obstante, de manera general, se puede conceptualizar al LFP como resultado de la actividad subumbral promedio de un grupo neuronal. Las fluctuaciones del potencial de membrana influyen sobre la probabilidad de disparo de las neuronas, y condicionan la sincronía de disparo de la población neuronal; estas fluctuaciones pueden tener origen en actividad local del circuito o en actividad evocada por aferencias distales ([Buzsáki, 2006](#)). Cuando las fluctuaciones del potencial de membrana se dan de manera sincrónica en una población neuronal se genera un patrón oscilatorio en el LFP, y su actividad oscilatoria se suele dividir según su rango frecuencial en bandas: delta (1-4 Hz), theta (4-8 Hz), alpha (8-12 Hz), beta (ya mencionada, 15-30 Hz) y gamma (50-200 Hz) ([Buzsáki & Draguhn, 2004](#)). Esta sincronía permitiría las condiciones para que se den fenómenos de plasticidad neuronal.

Los cambios en los ritmos de actividad neuronal observados en la EP se traducen, además de en alteraciones de la actividad oscilatoria beta, en una elevada coherencia entre los GB y la corteza motora M1 ([Hirschmann et al., 2013](#); [Wang et al., 2018](#)). En los últimos años, con la reinterpretación de las alteraciones de las oscilaciones beta, se ha detectado que, además de los cambios de amplitud, parámetros como la duración y/o la frecuencia de aparición de estos eventos oscilatorios, resultan buenos indicadores de la severidad de la sintomatología motora. Estos hallazgos provienen de estudios realizados en el NST ([Deffains et al., 2018](#); [Lofredi et al., 2019](#); [Tinkhauser et al., 2017](#)),

el GPI (Piña-Fuentes et al., 2017; Wang et al., 2018), el estriado (Bello et al., 2017) y más recientemente en la corteza motora primaria (Yu et al., 2021).

La relevancia de la actividad en la banda beta recae en que su supresión ha sido relacionada con la probabilidad de aparición del movimiento voluntario (Jenkinson & Brown, 2011; Wyart et al., 2012). Más concretamente, se presume que la supresión acotada de la actividad beta liberaría al estriado para recibir y procesar inputs corticales (Bertschinger & Natschläger, 2004; Ponzi & Wickens, 2013), y contribuiría con la selección de la acción apropiada (Courtemanche et al., 2003).

Se debate aun cómo se integra la emergencia de oscilaciones beta en los modelos canónicos, que analizan la disfunción motora según cambios tónicos o fásicos de actividad en las vías directa, indirecta e hiperdirecta. Algunos estudios enfatizan el rol del NST y la vía hiperdirecta en la generación de la actividad beta en el parkinsonismo (Ballion et al., 2008; Leblois et al., 2006; Moran et al., 2011). Pero también se ha demostrado que, en ratones en los que la ablación selectiva de D2R induce un síndrome parkinsoniano, se observa un aumento en la duración de episodios de actividad beta en el estriado (Bello et al., 2017). Este trabajo revaloriza el rol de la vía indirecta en la generación de los signos clínicos de la enfermedad de Parkinson y apoya la hipótesis de que cambios en la actividad de la vía indirecta median la aparición de actividad beta exagerada en el parkinsonismo.

Por otro lado, se encontró que el tono colinérgico estriatal estaría aumentando selectivamente las oscilaciones beta tanto en el estriado como en la corteza M1, además de aumentar la coordinación entre ambas estructuras en el rango beta de frecuencias (Pittman-Polletta et al., 2018a). A su vez, otro trabajo parece indicar que las oscilaciones beta generadas luego de una inhibición aguda dopaminérgica, que asemejaría a la degeneración nigroestriatal, serían el resultado de un bucle entre iNEM e interneuronas colinérgicas estriatales, dirigido por las interneuronas estriatales somatostatinérgicas (Qian et al., 2022). Estos resultados posicionan a las iNEM, las interneuronas colinérgicas y a las somatostatinérgicas del estriado como importantes mediadoras de las oscilaciones beta aumentadas y de los síntomas parkinsonianos asociados.

Las terapias destinadas a controlar los síntomas motores de la EP, como la administración de **L-DOPA o la estimulación cerebral profunda, reducen el exceso de la actividad oscilatoria beta** (Jenkinson & Brown, 2011; Kühn et al., 2008; Lemaire et al., 2012; Tsang et al., 2012). Aunque se desconoce cuáles son los mecanismos por los cuales se produce esta reducción, se reportó que dicha atenuación en la actividad beta correlaciona con una mejoría en la función motora (Cao et al., 2020; T. West et al., 2016). Durante la administración de L-DOPA **emerge una actividad exacerbada dentro del rango gamma que se asocia a la aparición de las LID** (Delaville et al., 2015; Dupre et al., 2016; Güttler et al., 2021; Ozturk et al., 2020). No existen hipótesis claras sobre cómo

se conecta la aparición de estas oscilaciones con los cambios de actividad en las vías directa e indirecta que ocurrirían en las LID.

I.3. Interneuronas estriatales

Si bien el estriado está formado mayoritariamente por las neuronas de proyección (NEM) ya mencionadas, presenta distintos tipos de interneuronas dispersas por todo el núcleo, que ejercen importantes roles en la modulación local de las NEM y conforman entre un 5 y 10% de la población neuronal estriatal, mayor en primates respecto de roedores. Se distinguen dos grandes poblaciones de interneuronas estriatales: las colinérgicas (es decir que liberan acetilcolina, ACh) y las GABAérgicas (que liberan GABA). Estas últimas a su vez pueden clasificarse en subpoblaciones bien diferenciadas por su actividad electrofisiológica y por su expresión génica (Tepper et al., 2010, 2018).

En el contexto de la EP, las **interneuronas colinérgicas** han sido **ampliamente estudiadas**, dado que conforman la **principal fuente de ACh en el estriado**, y el estado hipercolinérgico estriatal tras la degeneración dopaminérgica fue una de las primeras observaciones que inspiró las terapias antiparkinsonianas pioneras. Por esta razón incluimos en la tesis un breve resumen de los avances obtenidos en relación con las interneuronas colinérgicas. Por otro lado, en nuestro laboratorio ampliamos la investigación hacia un tipo particular de **interneuronas GABAérgicas que coexpresan somatostatina (iSOM)** y son el **foco de este trabajo**.

I.3.1. Interneuronas colinérgicas

I.3.1.1. Generalidades

En comparación con otras regiones del cerebro, el estriado contiene niveles excepcionalmente altos de ACh y de sus receptores, tanto muscarínicos como nicotínicos, que median sus efectos pre- y postsinápticos (Contant et al., 1996; Graybiel, 1990; Macintosh, 1941; Mesulam et al., 1992). Dado que tanto las NEM y las interneuronas, como las terminales glutamatérgicas y dopaminérgicas, expresan distintos tipos de receptores colinérgicos, la ACh tiene la capacidad de modular diferencialmente a las NEM de ambas vías, no solo directamente, sino también indirectamente a través del microcircuito intraestriatal. La principal fuente de ACh estriatal proviene de las interneuronas colinérgicas estriatales. Aunque existen aferencias colinérgicas de otros núcleos como el pedúnculo pontino y laterodorsal tegmental del tronco cerebral, su importancia funcional no está clara (Dautan et al., 2014). Las interneuronas colinérgicas pueden ser identificadas por la expresión de colina acetiltransferasa (ChAT, del inglés *choline acetyltransferase*), enzima limitante para la síntesis de ACh (Kawaguchi et al., 1995), y por eso las denominaremos **iChAT**. Desde una perspectiva morfológica, las iChAT son neuronas de gran tamaño con somas de alrededor de 25 µm de diámetro en ratones (Pisani et al., 2003) y entre 2 y 4 dendritas primarias (**Figura I. 5-A**), que se dividen y extienden abarcando una gran área del estriado

(Chang & Kitai, 1982; DiFiglia & Carey, 1986; Kawaguchi, 1992, 1993). La señalización colinérgica se produce mediante transmisión sináptica y transmisión volumétrica (Descarries et al., 1997; Koós & Tepper, 2002).

Las iChAT se han clasificado como **neuronas tónicamente activas (TAN)**, ya que disparan espontáneamente potenciales de acción con un patrón tónico de 2 a 10 Hz. En registros *ex vivo* se las puede identificar por sus características electrofisiológicas, además de por su gran tamaño (Bennett & Wilson, 1999; Kawaguchi et al., 1995; Sanchez et al., 2011): en respuesta a un pulso sostenido de corriente despolarizante presentan adaptación de frecuencia de disparo a menudo seguida por una interrupción de los disparos. Este fenómeno se conoce como acomodación. Al finalizar despolarizaciones sostenidas, las iChAT presentan una pronunciada hiperpolarización (*slow after hyperpolarization*, sAHP) que dura entre varios cientos de milisegundos y algunos segundos. En respuesta a un pulso de corriente hiperpolarizante, las iChAT exhiben una respuesta en “sag”: al comienzo del pulso, la membrana se hiperpolariza hasta determinado valor y luego se despolariza lentamente hasta estabilizarse. Cuando termina el pulso hiperpolarizante, aparece una despolarización de “rebote” frecuentemente acompañada por uno o varios potenciales de acción (**Figura I. 5-B**).

Las iChAT expresan receptores para dopamina de tipo D2 y D5 (Berlanga et al., 2005; Rivera et al., 2002). Mientras que la activación de los receptores D2 disminuye la actividad tónica de las iChAT (Maurice et al., 2004), la administración sistémica de agonistas y antagonistas D2 reduce e incrementa respectivamente la liberación de ACh en el estriado normal (DeBoer & Abercrombie, 1996). Por otro lado, la activación de receptores D1/D5 aumenta la excitabilidad de las iChAT (Aosaki et al., 1998) y la administración de agonistas de tipo D1/D5 promueve la liberación de ACh en el estriado (DeBoer & Abercrombie, 1996). Si bien se acepta en general que los receptores D2 ejercen mayor influencia que los D5 en la fisiología normal de las iChAT, dado por su mayor afinidad a la dopamina, la señalización mediada por receptores D5 podría tener mayor influencia en algunas condiciones en las que la modulación por dopamina se encuentra alterada (Castello et al., 2020; Ding et al., 2011).

Junto a las neuronas dopaminérgicas, las iChAT son jugadores clave en el control de la función estriatal durante el aprendizaje instrumental (Schulz & Reynolds, 2013). Registros realizados en monos despiertos demostraron que las TANs no responden al movimiento *per se* (Crutcher & 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” (Apicella, 2002; Kimura et al., 1984) (**Figura I. 5-C**). 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 et al., 1994), lo que la clasifica como el correlato neuronal de un

condicionamiento clásico. Actualmente se sabe que esta pausa ocurre como respuesta a estímulos ambientales salientes relacionados con recompensas tanto aversivas como apetitivas, en paradigmas de condicionamiento clásico y operante (Apicella, 2002; Morris et al., 2004; Ravel et al., 1999). Los mecanismos subyacentes a este fenómeno de pausa aún se encuentran en estudio, pero implicarían la activación de aferencias talámicas y dopaminérgicas sobre las iChAT (Tubert et al., 2025; Tubert & Murer, 2020).

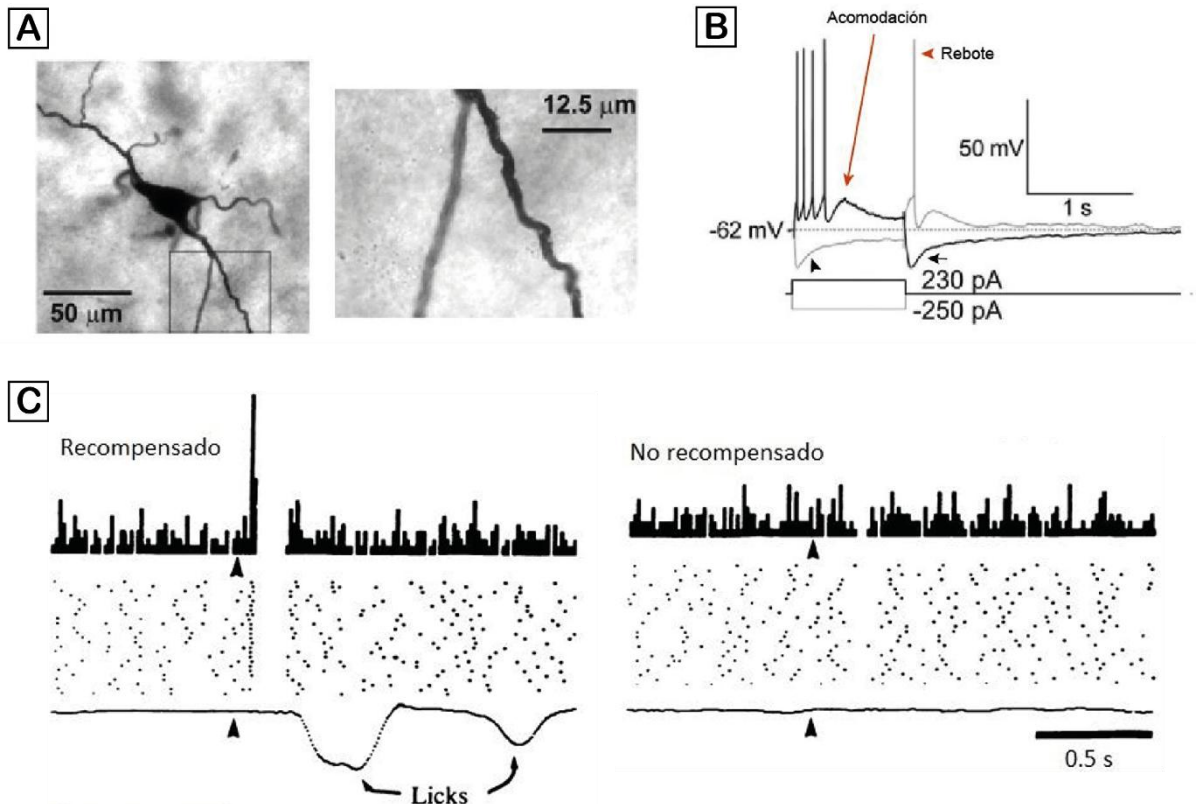


Figura I. 5: Características de las iChAT. **A-** Microfotografía de una iChAT de rata adulta marcada con neurobiotina. Se observa la ausencia de espinas en la imagen aumentada. **B-** Registro representativo de una iChAT en respuesta a un pulso despolarizante de 230 pA y uno hiperpolarizante de -250 pA, en modo *current clamp* y configuración *whole-cell*. El pulso despolarizante genera una adaptación de frecuencia de disparo seguida de acomodación (flecha roja), y al finalizar la despolarización se observa la sAHP (flecha negra). El pulso hiperpolarizante genera la aparición de la respuesta “sag” (cabeza de flecha negra), y al finalizar la hiperpolarización se ve un potencial de acción de rebote, marcado con la cabeza de flecha roja. (Adaptado de Sanchez et al., 2011- licencia abierta-). **C-** Respuesta de una TAN registrada *in vivo* en estriado de mono ante presentaciones de un estímulo (cabeza de flecha) asociado a una recompensa (recompensado) o en una tarea en la que el estímulo no está asociado a la llegada de recompensa (no recompensado). Los registros se realizaron en monos entrenados para asociar un sonido con una recompensa (jugo) y otro sonido con la ausencia de recompensa. Cada punto representa el disparo de una misma TAN en función del tiempo para diferentes ensayos y se muestran los histogramas periéstímulo para cada caso. Se observa como la TAN responde al estímulo asociado a la recompensa con una respuesta de excitación-pausa-excitación. Adaptado de Kimura et al., 1984.

I.3.1.2. iChAT en parkinsonismo y LID

Durante las últimas décadas, rigurosos estudios en modelos animales demostraron que **la hiperactividad de las iChAT contribuye al estado hipercolinérgico estriatal** que se asocia con los síntomas motores de la EP (Fino et al., 2007; Maurice et al., 2015; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016; Ztaou et al., 2016). Una hipótesis influyente propuso que el aumento del tono colinérgico sería mediado por la disminución en la activación del receptor para dopamina D2 en las iChAT (DeBoer et al., 1993; DeBoer & Abercrombie, 1996; Maurice et al., 2004). De hecho, la inhibición optogenética o quimiogenética de las iChAT alivia los síntomas motores en animales parkinsonianos (Maurice et al., 2015; Tanimura et al., 2019). Aunque podría presuponerse que un aumento de la frecuencia media de disparo de las iChAT es responsable del aumento del tono colinérgico estriatal, los estudios realizados *in vivo* sugieren un panorama más complejo. Mediante registros *in vivo* en **monos parkinsonianos se encontró que las TAN estriatales pierden su característica respuesta de pausa a estímulos salientes** (Aosaki et al., 1994; Matsumoto et al., 2001). Además, las TAN aumentan su sincronización en animales parkinsonianos, pero **no muestran un incremento de su tasa de disparo tónico** (Deffains et al., 2016; Raz et al., 1996, 2001), mientras que la sobreactivación de receptores muscarínicos estriatales ha sido relacionada con el aumento de las oscilaciones beta que correlaciona con los síntomas motores de la EP (Kondabolu et al., 2016; Pittman-Polletta et al., 2018b). Por otra parte, estudios realizados *ex vivo* no encontraron cambios en la actividad de disparo espontánea en las iChAT de roedores parkinsonianos nunca expuestos a la L-DOPA (Maurice et al., 2015; Sanchez et al., 2011).

El cambio más robusto observado en las iChAT **luego de la degeneración dopaminérgica** es el **aumento de su excitabilidad intrínseca** (Figura I. 6-A). En trabajos del laboratorio (Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016) se demostró que las iChAT de ratones parkinsonianos se encuentran hiperexcitables. Esta hiperexcitabilidad se evidencia como un aumento del número de potenciales de acción disparados en respuesta a pulsos de corriente despolarizante y se atribuye a la disminución de una corriente de potasio mediada por canales dependientes de voltaje de rectificación tardía (*delayed rectifier*) que contienen a la subunidad Kv1.3 (Tubert et al., 2016). La disminución de esta corriente no afecta la frecuencia de disparo tónica de las iChAT, pero aumenta la respuesta a despolarizaciones y reduce la hiperpolarización que sigue a la activación de aferencias talámicas (Tubert et al., 2016). Además, luego de la degeneración dopaminérgica las iChAT pierden un mecanismo de regulación mediado por autorreceptores inhibitorios M4 (Ding et al., 2006; Yan & Surmeier, 1996). En conjunto, estos cambios podrían contribuir al estado hipercolinérgico estriatal en la EP.

En estudios *ex vivo* en ratones **parkinsonianos tratados crónicamente con L-DOPA**, se **exacerba la hiperexcitabilidad** de las iChAT y se **promueve un patrón de disparo oscilatorio con *burst* y pausas** (Figura I. 6-B). Esto se debe a una reducción de las

corrientes Kv1.3/Kv1.1 y un aumento en la actividad de canales de potasio de tipo *inward rectifier* (Kir) (Paz et al., 2021, 2022). Además, una reducción en corrientes SK podrían contribuir a esta hiperexcitabilidad (Choi et al., 2020).

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

En trabajos recientes del laboratorio se demostró que la hiperexcitabilidad de las iChAT sería consecuencia de un aumento de la actividad independiente de ligando de los receptores D5, que puede ser revertido con un agonista inverso de estos receptores, como la clozapina, que también reestablece la pausa producida en respuesta a la estimulación talámica (Paz et al., 2022; Tubert et al., 2025). Estos trabajos posicionan al receptor D5 de las iChAT como un posible blanco terapéutico para tratar las LID.

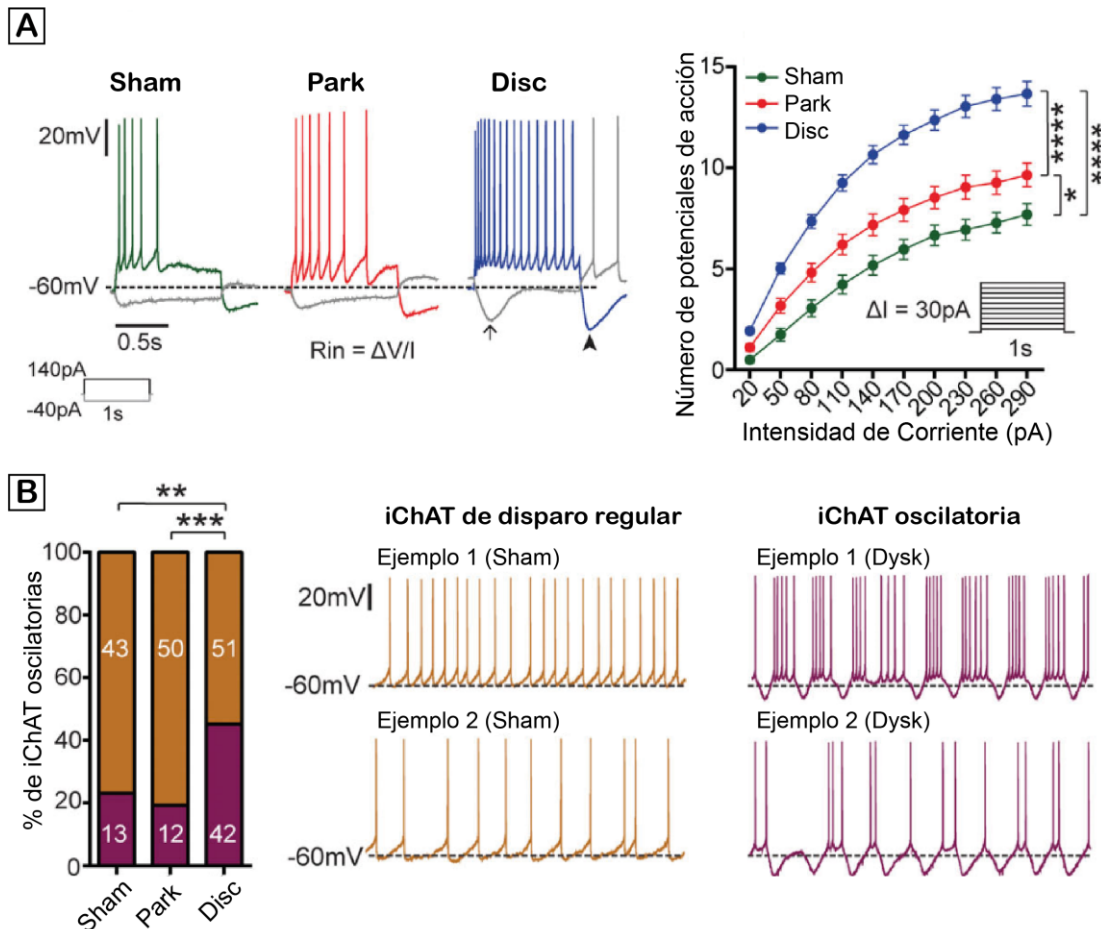


Figura I. 6: Alteraciones en las iChAT luego de la degeneración dopaminérgica y del tratamiento crónico con L-DOPA. **A-** Ejemplos representativos de las respuestas de iChAT a inyecciones de corriente en ratones con lesión simulada (sham), parkinsonianos (Park), y discinéticos (Dysk). La flecha y cabeza de flecha indican el incremento del sag y la amplitud de la sAHP, respectivamente, en un registro representativo de iChAT de un animal discinético (izquierda). Potenciales de acción vs corriente inyectada [MR ANOVA de dos vías, interacción significativa, post hoc (290 pA): * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$] (derecha). **B-** Proporción de iChAT oscilatorias [test de Fisher ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$] (izquierda). Ejemplos de la actividad espontánea de patrón regular y oscilatorio de iChAT (derecha). Adaptado de Paz et al., 2021 con autorización de John Wiley and Sons (licencia 6060280884542).

I.3.2. Interneuronas somatostatinérgicas

Muchos de los trabajos realizados en primates parkinsonianos que estudiaban a las células tónicamente activas (TAN) se han interpretado asumiendo que dichas neuronas corresponden a iChAT, pero hoy se sabe que hay otras interneuronas con actividad espontánea en el estriado, tales como las iSOM, que además presentan somas de relativo gran tamaño como las iChAT. Además, en un trabajo se ha descrito que existe un bucle de control mutuo entre ambos tipos de interneuronas, que involucra receptores muscarínicos y nicotínicos en las iSOM y también en sus aferencias GABAérgicas, lo que en suma genera una excitación en las iSOM luego de la liberación de ACh; y por otro lado, la liberación de óxido nítrico (ON) como consecuencia de la estimulación en las iSOM

generaría una excitación de las iChAT (Elghaba et al., 2016; **Figura I. 7**). Este control mutuo de ambos tipos de interneuronas podría relacionar sus funciones de forma estrecha, generando oscilaciones sincronizadas de su actividad. Hemos descrito que las iChAT presentan mayor proporción de células oscilatorias en los animales discinéticos (**Figura I. 6-B**), pero no sabemos si las iSOM son reclutadas por este fenómeno. En general, la literatura sobre la contribución de las iSOM en los síntomas de Parkinson y LID es escasa.

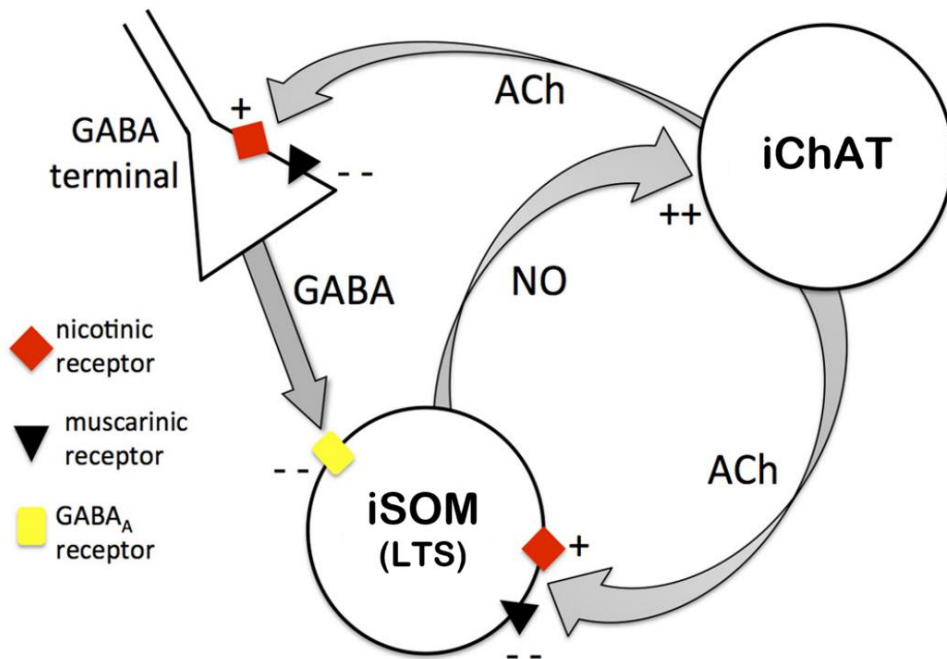


Figura I. 7: Control mutuo entre interneuronas colinérgicas (iChAT) y somatostatinérgicas (iSOM). Diagrama que sintetiza las interacciones entre iChAT e iSOM. Las iChAT modulan a las iSOM a través de ACh de forma directa e indirecta. Directamente, activan a las iSOM mediante receptores nicotínicos o las inhiben por receptores muscarínicos. Indirectamente, la ACh disminuye la liberación de GABA desde aferencias de las iSOM, mediante receptores muscarínicos (este efecto es dominante sobre la estimulación por nicotínicos). El efecto neto resulta en una excitación de las iSOM, las cuales liberan óxido nítrico que despolariza las iChAT, generándose así un bucle de estimulación mutuo entre ambos tipos de interneuronas. Adaptado de Elghaba et al., 2016 (licencia abierta).

I.3.2.1. Características morfológicas y electrofisiológicas

Descriptas como neuronas de tamaño mediano, soma redondeado, poligonal o fusiforme de diámetros entre 9 y 25 μm , las interneuronas somatostatinérgicas (iSOM) son las segundas más grandes del estriado, siendo las colinérgicas las más grandes (Tepper et al., 2010). Son interneuronas GABAérgicas que co-expresan somatostatina (Som), neuropeptido Y (NPY) y óxido nítrico sintasa (NOS), lo que les da la capacidad de liberar óxido nítrico como neurotransmisor. Presentan una arborización dendrítica relativamente simple con una extensión de hasta 600 μm desde el soma (Kawaguchi, 1993).

En un trabajo se vio, mediante secuenciación de ARN de células únicas de estriado de ratones, que, si bien hay células NPY+ que no expresan somatostatina, y son conocidas como neurogliformes y tiene propiedades electrofisiológicas distintas, no habría células Som+ que no presenten NPY (Muñoz-Manchado et al., 2018). En otro trabajo se estudió la colocalización de marcadores por inmunofluorescencia en tejido de ratas y se vio un 73% de solapamiento entre los tres marcadores (Som, NPY y NOS; Figueredo-Cardenas et al., 1996).

Las iSOM presentan actividad intrínseca, lo que implica que probablemente han sido, junto con las colinérgicas, parte de las llamadas interneuronas tónicamente activas (TAN) muy estudiadas mediante registros extracelulares realizados en primates no humanos. Son conocidas como **Low threshold spiking (LTS)** por la presencia de potenciales de acción de bajo umbral. Además, presentan un potencial de reposo relativamente despolarizado (alrededor de los -55mV), resistencia de entrada alta (mayor a 500 MΩ) (Figura I. 8) y un amplio rango de frecuencia de disparo espontáneo (Beatty y colaboradores reportaron un rango de entre 0.99 a 22.83 Hz (Beatty et al., 2012)).

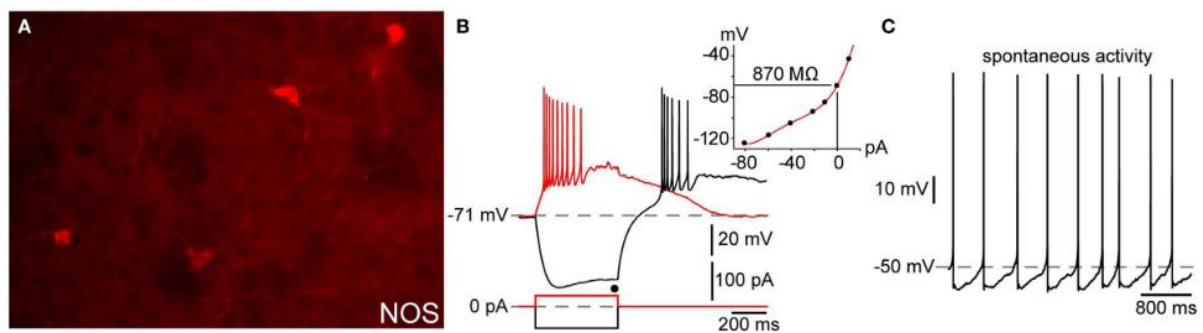


Figura I. 8: Caracterización electrofisiológica de iSOM (o LTS). **A-** Inmunofluorescencia contra NOS en estriado de ratones. **B-** Propiedades electrofisiológicas de una célula LTS en una preparación ex vivo. Actividad al cese de un pulso hiperpolarizante (trazo negro), y como respuesta a un pulso despolarizante. Inset: curva V/I. **C-** Actividad espontánea de iSOM típica. Tomado de Tepper et al., 2010 (licencia abierta).

Estas neuronas fueron también denominadas PLTS por la presencia de un **plateau** sobre el cual se montaban los potenciales de acción, en la respuesta ante la inyección de corriente despolarizante, en la respuesta de rebote luego de una hiperpolarización fuerte o en respuesta a entradas sinápticas (Figura I. 8-B). Pero se reveló que el plateau **correspondía a un artefacto de la técnica** de *whole-cell*, por la dialización del interior intracelular, y que al realizar los registros en configuración *perforated patch* con gramicidina, ya no se observaban los *plateau* (Beatty et al., 2015).

Estas células presentan **oscilaciones subumbrales en el potencial de membrana, además de un fenómeno de resonancia**, que refiere a la propiedad de amplificar inputs de una determinada frecuencia, que se refleja tanto en la amplitud de las respuestas subumbrales de la membrana como en la probabilidad de ocurrencia de los potenciales

de acción (Song et al., 2016). En ambos casos la resonancia se encuentra en el rango de frecuencias beta (10-30 Hz) (Beatty et al., 2015) y depende de canales de calcio dependientes de voltaje: el bloqueo de Cav1 reduce la amplitud de las oscilaciones, mientras que el bloqueo de Cav2.2, la frecuencia, además de bloquear la resonancia en ambos casos. Además, ambos tipos de canal activan canales de cloro activables por calcio (CaCC, ANO2), que mediarían la fase de hiperpolarización en la oscilación; su bloqueo abole tanto las oscilaciones como la resonancia (Song et al., 2016).

Se ha descrito a las LTS como interneuronas de **actividad intrínseca**, presentando tres diferentes patrones de actividad: **regular, irregular y en burst**, además de un cuarto **estado despolarizado con oscilaciones**; la misma célula puede pasar espontáneamente de un estado a otro (Beatty et al., 2012; Song et al., 2016) (**Figura I. 9**). El estado de despolarizado con oscilaciones se manifiesta en *cell attached* como una célula silente (**Figura I. 9-B**), coincide con un bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje, y puede ser revertido por una hiperpolarización prolongada, pero no breve, generando un cambio en el patrón de actividad de la célula que puede permanecer por un largo período, recuperando las características de neuronas LTS (**Figura I. 9- D y E**) (Song et al., 2016).

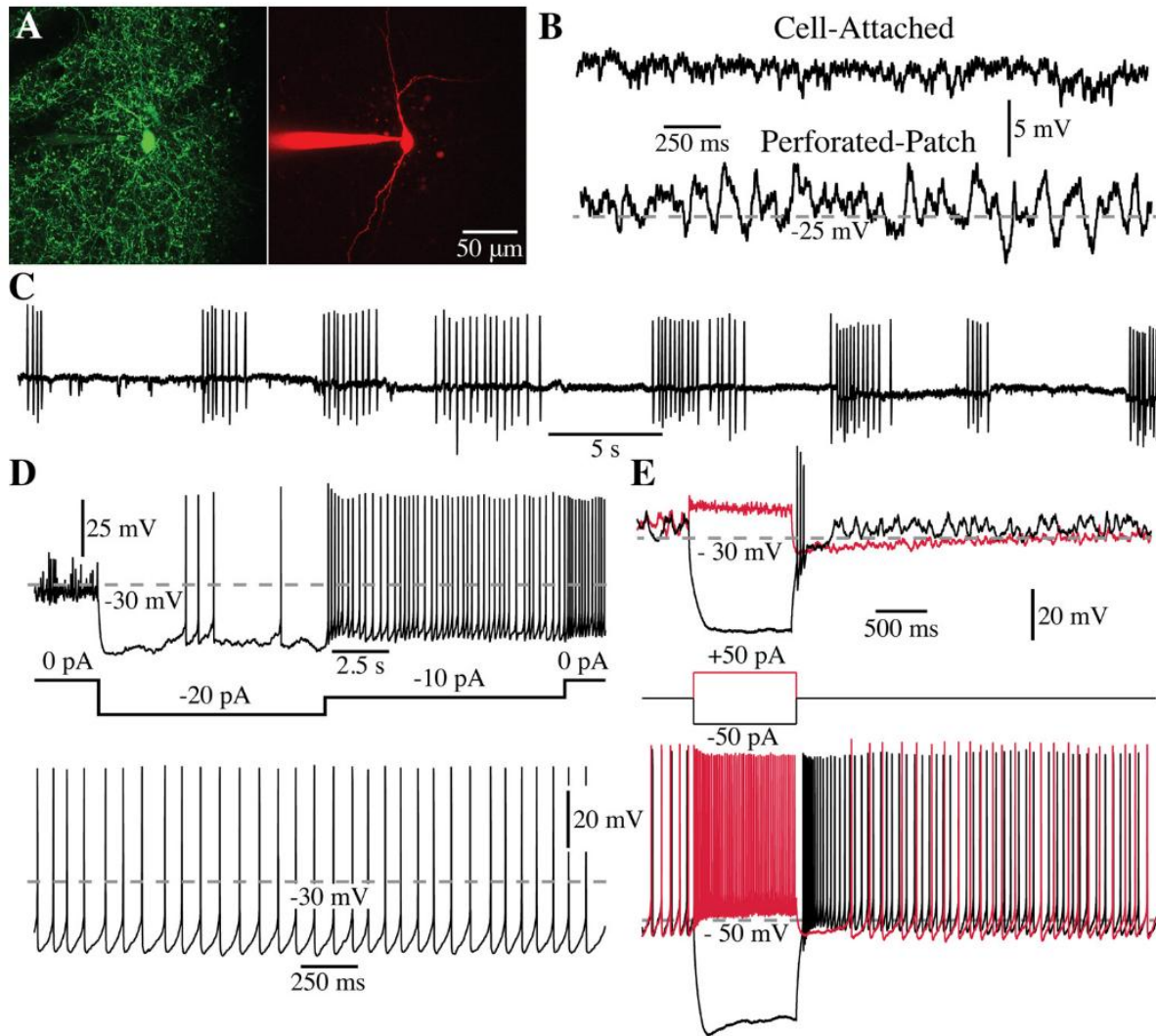


Figura I. 9: LTS estriatales transicionan espontáneamente a un estado despolarizado y oscilante. **A-** Ejemplo de una interneurona LTS en una rodaja sagital, identificada por la fluorescencia NPY-GFP (izquierda), y la misma neurona luego del llenado con Alexa Fluor 594 luego del acceso en whole-cell (derecha). **B-** Ejemplo de una LTS silente en cell-attached (arriba) y la misma neurona luego de acceder por perforated patch con gramicidina; se observa un potencial de membrana despolarizado y oscilante (abajo). **C-** Las neuronas pueden transicionar entre periodos de silencio y de potenciales de acción en registros en *cell-attached*. **D-** Neuronas en el estado despolarizado y oscilante pueden ser inducidas a disparar luego de una hiperpolarización prolongada, seguida de una reducción escalonada de la hiperpolarización (arriba). Luego pueden mantener el disparo sostenido por un periodo largo de tiempo; el registro corresponde a 10 minutos luego del protocolo aplicado (abajo). **E-** Breves despolarizaciones o hiperpolarizaciones no son suficientes para inducir la transición al disparo sostenido de potenciales de acción (arriba). Luego de la transición al estado de disparo sostenido, las neuronas muestran las propiedades estereotípicas que las caracterizan como LTS (abajo). Figura reproducida de [Song et al., 2016](#), con autorización de *The American Physiological Society* (licencia 6060240256059).

I.3.2.2. iSOM en el circuito estriatal

Si bien las iSOM liberan una diversidad de neurotransmisores, se ha visto que presentan una **concentración de GABA y GAD** (Glutamato decarboxilasa, enzima clave en la síntesis de GABA) **relativamente baja**, por lo que su efecto modulador del circuito estriatal podría depender más de los otros neurotransmisores que de una inhibición por GABA (Gittis et al., 2010).

Estas interneuronas, a diferencia de las conocidas como *fast spiking* o parvalbumina+, presentan contactos sinápticos dispersos y distales en las dendritas de las NEM, lo que sugiere que no juegan un rol en la inhibición de tipo *feedforward*, sino que la liberación de Som, ON y NPY modularía el circuito estriatal con patrones espaciales y temporales distintos a los de la transmisión sináptica rápida (Gittis et al., 2010).

Hay evidencias tanto anatómicas como de registros electrofisiológicos que demuestran la activación de iSOM por aferencias corticales (Assous & Tepper, 2019). Respecto a las aferencias talámicas en estriado, parece que no contactan de forma directa las iSOM sino que las respuestas observadas luego de una estimulación en tálamo se dan de forma disináptica con las interneuronas estriatales TH+ (iTH) como intermediarias, generando una pausa en la actividad de las iSOM seguida de un incremento en la actividad como rebote (Assous et al., 2017; Assous & Tepper, 2019).

En otro trabajo también se vio que parte de la inhibición talámica proviene de la activación de receptores muscarínicos M4 de acetilcolina luego de la activación de las iChAT (Melendez - Zaidi et al., 2019). Además de esta señal fásica, las iChAT pueden excitar tónicamente las iSOM mediante el receptor M1. Hay conexiones recíprocas entre iChAT e iSOM y se ha visto que una despolarización sincronizada de las iSOM puede causar una fuerte excitación en las iChAT que sería mediada por ON, ya sea por una vía dependiente o no de la enzima guanilato ciclasa (GC- **Figura I. 10-B**) (Centonze et al., 2001; Elghaba et al., 2016; Rafalovich et al., 2015).

Las iSOM presentan receptores para dopamina D5, que pertenecen a la familia D1, y se ha visto que reciben numerosos contactos sinápticos en sus dendritas proximales provenientes de neuronas dopaminérgicas de la SNc; sin embargo, los efectos de este receptor sobre las iSOM no habían sido estudiados (Tepper et al., 2010). También se ha visto que la administración de somatostatina en el estriado facilita la liberación de dopamina mediante receptores de somatostatina SST-R2 (Hathway et al., 2004).

Además, se han descripto aferencias GABAérgicas del GPe (Melendez - Zaidi et al., 2019; Tepper et al., 2010) y serotoninérgicas que resultan inhibitorias por la activación del receptor 5HT2C (Blomeley & Bracci, 2005; Cains et al., 2012) (**Figura I. 10-A**).

Las iSOM tienen un rol importante en la plasticidad estriatal; se ha demostrado que su activación produce depresión de largo término (o LTD por sus siglas en inglés) en las

sinapsis glutamatergicas de las NEM, vía ON (Rafalovich et al., 2015; Zhai et al., 2024) (Figura I. 10-B).

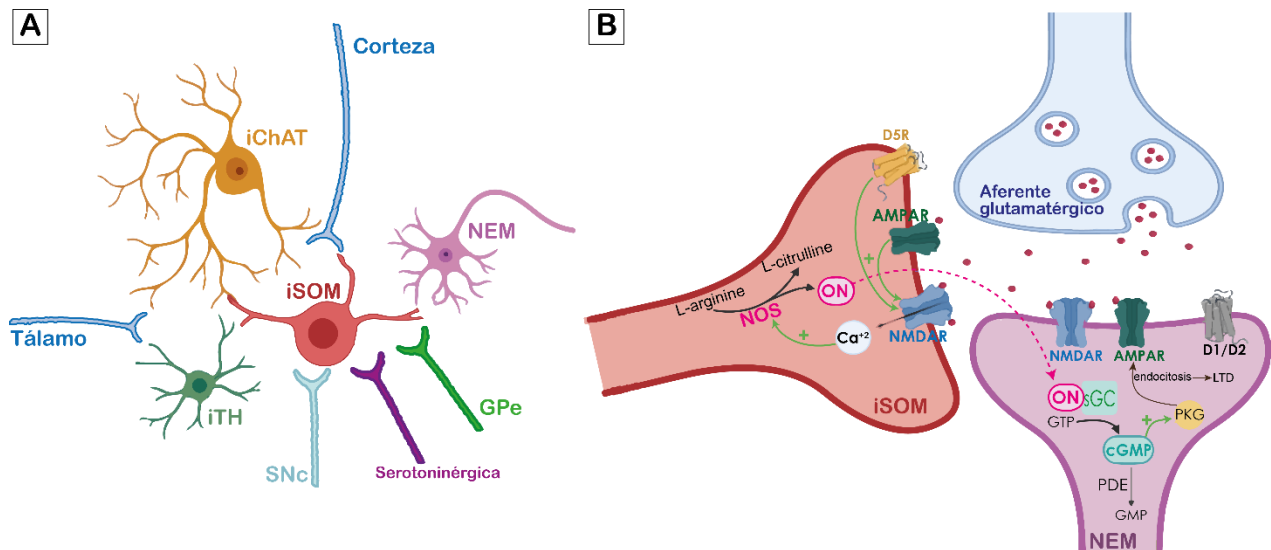


Figura I. 10: Conectividad de las iSOM en el estriado. A- Esquema de las principales aferencias y eferencias de las iSOM. **B-** Esquema del mecanismo de acción del ON sobre las sinapsis glutamatergicas en las NEM, que sería responsable de LTD. NOS: enzima óxido nítrico sintasa; PDE: enzima fosfodiesterasa; sGC guanilato ciclasa soluble; PKG proteína quinasa G.

I.3.2.3. iSOM en la conducta

Las iSOM no parecen estar involucradas en la actividad locomotora basal. No se han detectado cambios en los transientes intracelulares de calcio en las iSOM durante caminatas, actividad vertical ni en las transiciones de una actividad exploratoria a otra (Holly et al., 2019). Por otro lado, luego de la ablación selectiva de estas interneuronas mediante toxina diftérica, no se reportaron diferencias en la locomoción en un ensayo de *open field* o arena abierta, en el aprendizaje motor en un *rotarod*, en conductas repetitivas autodirigidas como el acicalamiento o *grooming*, y tampoco se vieron diferencias en conductas de tipo ansiogénicas en el *elevated plus Maze* (Gazan et al., 2019). Sin embargo, exposición sistémica e intraestriatal a inhibidores de NOS y de guanilato ciclasa, han mostrado una depresión en la locomoción basal e incluso la inducción de catalepsia (West & Tseng, 2011).

Por otro lado, la administración de somatostatina y agonistas de los receptores de somatostatina SST-R2/5 y R4 en el estriado dorsal genera mayor actividad locomotora en ratas, un efecto que se puede evitar con una previa administración de antagonistas de AMPA o NMDA (Santis et al., 2009). Se ha visto que una infusión unilateral de somatostatina en el estriado de ratones genera rotaciones ipsilaterales, asociado a un incremento en la dopamina por activación de los receptores SST-R2 (Hathway et al., 2004).

En un trabajo donde modulan a las iSOM mediante optogenética, no encontraron efectos en conductas basales, pero sí vieron que la estimulación de las iSOM del núcleo

accumbens potencia efectos de hiperlocomoción por cocaína mientras que su inhibición disminuye el efecto. Además, registraron que luego de repetidas administraciones de cocaína disminuye la excitabilidad intrínseca de estas interneuronas (Ribeiro et al., 2018). Esta última observación podría indicar que, si bien las iSOM no parecen tener un rol determinante en muchas conductas motoras normales, **podrían adquirir mayor relevancia en condiciones donde la señalización dopaminérgica está incrementada.**

Respecto a conductas de aprendizaje operantes, en un trabajo se ha visto que la inhibición de las iSOM facilita la adquisición de conductas dirigidas a metas, pero no se requiere para la modificación de tareas aprendidas previamente (Holly et al., 2019). Esto parece deberse a que las iSOM estarían regulando la liberación dopaminérgica asociada a recompensas, entonces al inhibirlas, la liberación de dopamina sería mayor y el aprendizaje se facilitaría (Holly et al., 2021).

También se ha sugerido que las iSOM pueden estar involucradas en mecanismos de *setshifting*; esto refiere a la capacidad de cambiar conductas aprendidas cuando cambian las contingencias. Este rol es consistente con la participación de las iSOM en el circuito que vincula el núcleo parafascicular (PFn) del tálamo con la respuesta de pausa de las iChAT, y con que las iSOM forman parte de la población de neuronas históricamente conocidas como TAN, que generan una pausa luego de la activación del PFn. La activación de la corteza cingulada cuando el resultado de una acción no es el esperado, activaría las iSOM, y estas, ante una actividad sostenida, producirían ON, que podría generar LTD en sinapsis de las NEM. Entonces es posible que la producción de ON resultante de la activación de la corteza cingulada contribuya a la extinción de asociaciones aprendidas actuando sobre sinapsis glutamatérgicas estriatales, luego de recompensas fallidas (Melendez - Zaidi et al., 2019; Rafalovich et al., 2015). Ver **Figura I. 11.**

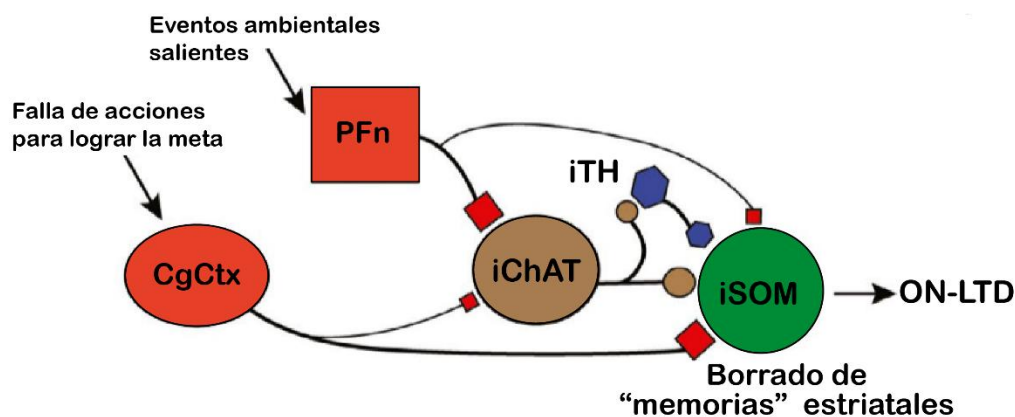


Figura I. 11: Mecanismo propuesto para explicar el modo en que las iSOM están involucradas en mecanismos de setshifting. Referencias: PFn- núcleo parafascicular del tálamo; CgCtx- corteza cingulada; iTH- interneuronas estriatales TH+; iChAT- interneuronas colinérgicas estriatales; iSOM- interneuronas estriatales LTS; ON-LTD: Depresión de largo

término inducido por óxido nítrico. Adaptado de [Melendez - Zaidi et al., 2019](#), con autorización de John Wiley and Sons (licencia 6060290945857).

I.3.2.4. iSOM en parkinsonismo y LID

En estudios post mortem, se ha visto que el gradiente de Som presente en el estriado, que desciende de dorso-lateral hacia ventro-medial, se pierde en pacientes con EP ([Eve et al., 1997](#)). Pero hay controversia acerca de si se da un aumento o disminución en la concentración de Som o su expresión, ya que se han obtenido distintos resultados según el modelo de estudio, la metodología y el tiempo de parkinsonismo ([Lu & Stoessl, 2002](#)).

Un estudio electrofisiológico reportó hiperactividad de interneuronas LTS de ratas con lesión crónica nigroestriatal, y propuso que las células cambiaban a un patrón de actividad en *burst* ([Dehorter et al., 2009](#)). Pero este trabajo presenta un tamaño muestral muy pequeño: se vio este patrón en 3 de 5 neuronas registradas. De todas formas, dado que las iSOM presentan receptores muscarínicos de tipo M4, y que la actividad sostenida de los mismos genera actividad en *burst* en estas células, se sugirió que la liberación sostenida de acetilcolina por un aumento en la excitabilidad de las iChAT podría explicar el cambio de patrón observado en ese trabajo ([Melendez - Zaidi et al., 2019](#)). Controversialmente, un trabajo reciente reportó una disminución en la actividad tónica de las iSOM en ratones modelo de la EP por inyección de 6-OHDA ([Zhai et al., 2024](#)).

Se sabe que las iSOM presentan resonancia en el rango beta ([Beatty et al., 2015](#)), lo cual implicaría que entradas en ese rango de frecuencia podrían favorecer su activación. En la EP también se observa un aumento de oscilaciones beta en distintas regiones, incluyendo el estriado, lo que podría favorecer la activación exacerbada de las iSOM en este contexto y se sugiere que las iSOM serían responsables de generar un bucle entre las iNEM y las iChAT, generador de las oscilaciones beta ([Qian et al., 2022](#)).

Con respecto a la señalización por ON, la LTD dependiente de ON en las sinapsis glutamatérgicas de las NEM desaparece en un modelo murino de EP, y resultaría de una menor liberación de ON por parte de las iSOM ([Zhai et al., 2024](#)). Por otro lado, se ha visto que drogas con efectos opuestos sobre la señalización río abajo de NO pueden tener efectos beneficiosos en el alivio de las LID ([West & Tseng, 2011](#)). Luego de la lesión nigroestriatal, la plasticidad de tipo LTD en el estriado es prácticamente nula. Si bien en condiciones normales, se puede imitar la LTD dependiente de actividad con la aplicación de inhibidores de la enzima PDE, que aumentaría el GMPc (ver **Figura I. 10-B**), esto no ocurre en animales sin innervación dopaminérgica. Pero en animales discinéticos, se ha visto que la inhibición de la enzima PDE logra reestablecer la plasticidad normal y además disminuyen las LID ([Picconi et al., 2011](#)). Controversialmente, en otros trabajos encontraron que inhibidores de la enzima NOS, que reducirían la señalización por ON y por lo tanto el GMPc, coadministrados con L-DOPA atenúan también las LID, así como otras alteraciones estriatales que han sido asociadas a la vía NO-cGMP-PKG, como la

fosforilación de DARPP-32 y de la subunidad GluA1 del receptor AMPA, también asociados a la fisiopatología de las LID ([Del Bel et al., 2015](#); [Padovan-Neto et al., 2009](#); [Solís et al., 2015](#); [Takuma et al., 2012](#)).

Por otro lado, en un estudio posterior (tesis doctoral de [Gomez et al., 2019](#)), se vio que luego de un tratamiento crónico durante dos semanas con una dosis alta de L-DOPA (12mg/kg) en ratones parkinsonianos, se induce la expresión del marcador de actividad c-Fos en una gran proporción de iSOM, mientras que esto no ocurre en otras interneuronas como iChAT o iPV (**Figura I. 12**). Estas observaciones se realizaron 1 hora después de administrar L-DOPA, lo que implica que los animales se encontraban en el estado *on* de la medicación. Anteriormente se había reportado la inducción de FosB en neuronas NOS+ del estriado en ratones parkinsonianos tratados crónicamente con L-DOPA, también 1 hora luego de la última dosis ([Pavón et al., 2006](#)).

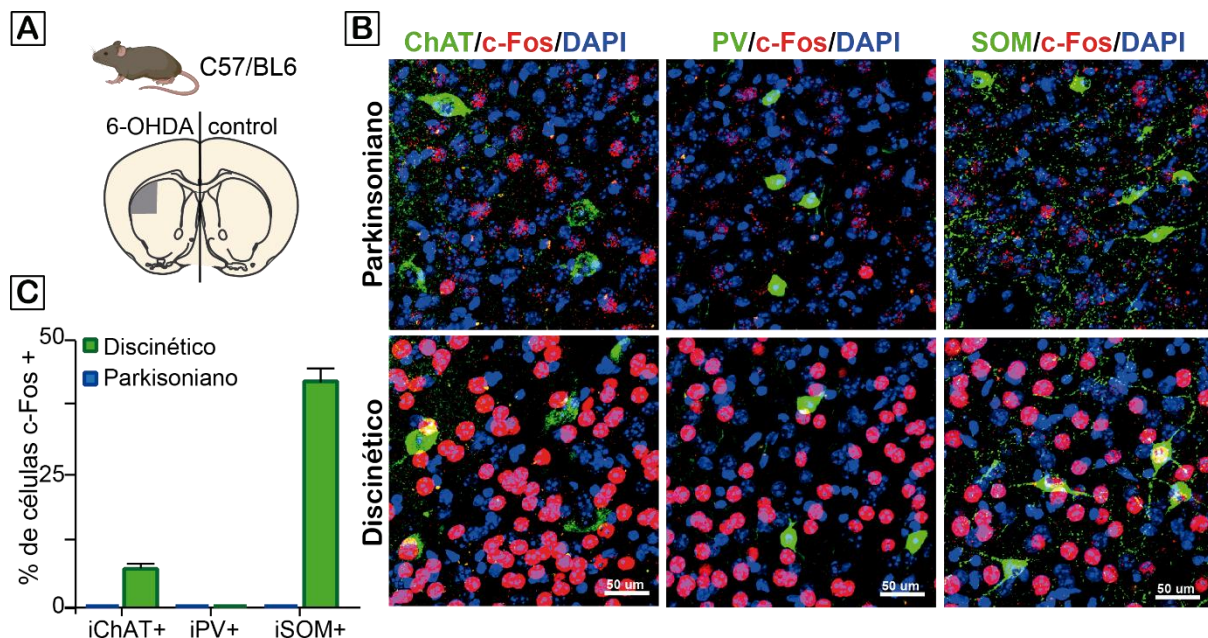


Figura I. 12: Inducción de c-Fos en iSOM de animales discinéticos. A- Esquema de la región del estriado analizada (dorso-lateral). B- Co-inmunohistoquímica de neuronas del estriado dorsolateral para marcadores de interneuronas (Chat, PV o SOM) y c-Fos, de ratones lesionados con 6-OHDA y tratados con L-DOPA (Discinéticos) o vehículo (Parkinsonianos). C- Las iSOM+ muestran activación de c-Fos en el grupo L-DOPA. N=4 ratones por grupo. Nótese además la marca de c-Fos en otras neuronas (posibles NEM) en el grupo L-DOPA (resultados de la tesis doctoral de [Gimena Gómez, 2019](#)).

Toda esta evidencia apunta a que las iSOM podrían estar involucradas en la plasticidad estriatal que ocurre tanto luego de la degeneración dopaminérgica, como luego del tratamiento de reemplazo con L-DOPA. Pero no hay trabajos en los que se evalúe si una modulación específica de estas células puede generar beneficios terapéuticos.

I.4. Abordaje experimental

I.4.1. Modelos animales de la enfermedad de Parkinson y discinesias inducidas por L-DOPA

Para estudiar la EP se hace uso de modelos animales, ya que no es una enfermedad natural en otras especies. La utilidad de un modelo animal depende de su **validez de apariencia**, es decir, de que presente síntomas similares a los de la enfermedad; de su **validez predictiva**, es decir, de que responda a la terapéutica de igual manera que lo hace el paciente; de su **validez de constructo**, es decir, de que recapitule algún aspecto clave de la fisiopatología de la enfermedad, como ser en este caso, la degeneración de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales; y de su **validez etiológica**: que presente el mismo agente etiológico que la enfermedad a modelar. Existen pocos modelos con validez etiológica para la enfermedad de Parkinson, que han sido generados introduciendo en el ratón mutaciones observadas en pacientes que sufren formas de genéticas de la enfermedad (menos del 5% de los casos). En general estos modelos no han conseguido producir una masiva degeneración de neuronas dopaminérgicas en el ratón y son poco útiles para estudiar estados avanzados de la enfermedad, aunque resultan sumamente útiles para comprender cómo esas mutaciones afectan la función y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.

Los primeros modelos en ser utilizados fueron farmacológicos, que generan una depleción aguda de dopamina. Entre los fármacos capaces de producir esta depleción se encuentran la reserpina (que afecta la captación de dopamina por las vesículas sinápticas) y la alfa-metil-paratirosina (inhibidor de la enzima limitante de la síntesis de dopamina, la tirosina hidroxilasa) ([Francardo, 2018](#)). Se encuentran en desuso ya que no inducen degeneración de las neuronas dopaminérgicas y la velocidad con que se induce la depleción de dopamina impide que se instalen mecanismos de compensación que resultan importantes para comprender el origen de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Los modelos con mayor validez de apariencia y predictiva se obtienen **induciendo la degeneración de la SNc con toxinas** para simular la degeneración que ocurre en la enfermedad de Parkinson. Estos modelos recapitulan los síntomas motores típicos y la respuesta al tratamiento con L-DOPA.

En esta tesis se utilizó un modelo que produce la degeneración de neuronas dopaminérgicas mediante la administración de la **toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA)**. La 6-OHDA es captada por los transportadores de DA (y de noradrenalina) y destruye a las neuronas mediante la formación de radicales libres. Dado que no atraviesa la barrera hematoencefálica, 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 el estriado o en la SNc. La neurodegeneración dopaminérgica obtenida es permanente y semeja la observada en la enfermedad de Parkinson. En el modelo de hemiparkinsonismo experimental, 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, aunque en ratones requiere de **cuidados post operatorios críticos para evitar la mortalidad** y asegurar la recuperación (Francardo et al., 2011). Este modelo tiene **validez de apariencia**, ya que presenta déficits motores similares a los presentados por pacientes con EP, como la hipocinesia y bradicinesia (Simola et al., 2007). Además, tiene **validez predictiva**, ya que al tratar a estos animales con L-DOPA, se 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; Cenci & Crossman, 2018).

Para evaluar los déficits motores generados por la lesión con 6-OHDA en ratones, se utilizan distintos ensayos conductuales (Meredith & Kang, 2006) entre ellos, el rotarod acelerante, el ensayo del cilindro y arena abierta (Ver **sección M.3.1. Evaluación de los signos motores de la enfermedad de Parkinson**). Los resultados obtenidos en estos ensayos correlacionan muy bien con el grado de lesión dopaminérgica (Escande et al., 2016), la cual puede ser evaluada por un análisis inmunohistoquímico de la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) (**Figura M. 3**). La TH está presente tanto en los cuerpos neuronales como en las terminales nerviosas de las neuronas dopaminérgicas susceptibles a la degeneración, de modo que el análisis se puede realizar tanto en la SNc para evaluar la cantidad de somas de neuronas dopaminérgicas remanentes, como en el cuerpo estriado, evaluando el grado de inervación dopaminérgica (Escande et al., 2016). La susceptibilidad para desarrollar discinesias depende de la severidad de la denervación dopaminérgica en la parte motora del cuerpo estriado, así como de la dosis de L-DOPA administrada y del tiempo de tratamiento (Cenci & Crossman, 2018). La forma de evaluar y clasificar las LID en roedores está bien descripta y estandarizada (Cenci & Lundblad, 2007) (ver **sección M.3.2.2. Puntuación de discinesias**).

I.4.2. DREADDs

Por sus siglas en inglés, DREADDs significa ***Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*** y refiere a una técnica quimiogenética mediante la cual se pueden manipular reversiblemente poblaciones de células de forma selectiva. Los DREADDs más utilizados se generaron a partir de receptores de membrana acoplados a proteínas G, modificados por ingeniería genética de modo de que no reconocieran más a su ligando endógeno, sino que fueran activables únicamente en presencia de un ligando exógeno, sintético (Ozawa & Arakawa, 2021; Urban & Roth, 2015).

En este trabajo, usamos un DREADD derivado del receptor **muscarínico M4 humano**, que se acopla a **proteínas Gi**, y se denomina **hM4Di**. Estos receptores activan canales

de potasio *inwardly rectifying* llamados GIRKs, que generan hiperpolarización en las neuronas y consecuentemente, disminución de su actividad, es decir, que son inhibitorios ([Armbruster et al., 2007](#)). La afinidad por la acetilcolina es muy baja en estos receptores, por lo que sólo se activarían en presencia de ligandos sintéticos como la clozapina-N-óxido (CNO), uno de los más utilizados y que también usamos en esta tesis.

Se han desarrollado también otros DREADDs a partir de receptores que se acoplan a otras proteínas G como Gs y Gq, por lo cual activan vías de señalización asociadas a estas proteínas G y suelen ser excitatorios ([Akhmedov et al., 2017](#); [Farrell et al., 2012](#); [Mahler et al., 2019](#)). También se han modificado otros receptores no colinérgicos como el *kappa-opioid-based receptor DREADD* (KORD), que es un DREADD inhibitorio no activable por CNO sino por otro ligando, lo que permite en el mismo animal su combinación con un DREADD excitatorio dependiente de CNO, y tener en el mismo sistema inhibición o excitación según el ligando utilizado ([Marchant et al., 2015](#); [Vardy et al., 2015](#)).

En comparación con el optogenético, el método quimiogenético que usamos en este trabajo resulta ventajoso, ya que permite una modulación duradera del circuito (de alrededor de 2 horas ([Guettier et al., 2009](#))), adecuada para evaluar su impacto sobre conductas que duran varios minutos, o hasta dos horas como las LID.

OBJETIVOS E

HIPOTESIS

Objetivos e hipótesis:

Nos proponemos evaluar el rol de las interneuronas somatostatinérgicas estriatales (iSOM) en la expresión de déficits motores y en el desarrollo de discinesias inducidas por L-DOPA (LID) en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson (EP).

Específicamente buscamos:

- **Identificar el impacto de la degeneración nigroestriatal y la inducción de LID sobre la actividad electrofisiológica de las iSOM.**

Las iSOM expresan receptores D5 para dopamina. Trabajos previos de nuestro grupo muestran una fuerte modulación de las iChAT por receptores D5 en condiciones normales, y cambios de actividad marcapaso intrínseca dependientes de receptores D5 en las iChAT en modelos de EP y LID. Dado que las iSOM son, al igual que las iChAT, neuronas con actividad marcapaso intrínseca, **nuestra hipótesis es que la degeneración dopaminérgica y terapia de reemplazo con L-DOPA también afectan la actividad de las iSOM.** En particular, considerando estudios previos que sugieren que las iChAT e iSOM pueden interaccionar formando un bucle de mutua excitación dependiente de actividad de receptores nicotínicos, nuestra expectativa fue encontrar que las iSOM, tal como ocurre en las iChAT, mostrarían un patrón de hiperactividad con *bursts* y pausas, en ratones modelo de LID.

- **Establecer el valor terapéutico potencial de modular selectivamente las iSOM en un modelo experimental de la EP que desarrolla LID.**

Nos guía la **hipótesis de que la inhibición de las iSOM puede disminuir la severidad de las LID e incluso prevenir su desarrollo.** Esta hipótesis se basa, por un lado, en el supuesto de que la inducción del marcador de actividad neuronal c-Fos en iSOM, previamente observada en animales discinéticos en el estado *on* de medicación, es patológica; y por otro lado, en resultados de otros laboratorios que muestran que la sensibilización inducida por exposición repetida a psicoestimulantes, que involucra a los circuitos de los ganglios de la base, es modulada por iSOM.

MATERIALES Y

MÉTODOS

M.1. Animales

Se utilizaron ratones que en todas las neuronas que expresan la proteína Somatostatina (Som) expresan también la recombinasa Cre: Som-IRES-Cre ($Sst^{tm2.1(cre)Zjh}/J$, Stock 13044) (Taniguchi et al., 2011). En estos ratones se insertó una secuencia IRES (Sitio Interno de Entrada al Ribosoma, por sus siglas en inglés) seguida de la secuencia codificante para Cre en la región 3' UTR del locus somatostatina, de forma que la expresión de Cre es controlada por el promotor endógeno de Som. Por simplicidad, llamaremos a estos ratones Som-Cre.

Para los registros electrofisiológicos, estos ratones fueron cruzados con la línea LSL-tdTomato (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)Hze}/J, stock 7914) (Madisen et al., 2010) que presentan un cassette stop flanqueado por sitios loxP (en la misma orientación), previniendo la transcripción de la proteína tdTomato dirigida por el promotor ubicuo CAG. Esta construcción permite la expresión de tdTomato de manera dependiente de Cre. Así generamos ratones Som-Cre;Tomato, que expresan la proteína reportera roja tomato en las neuronas que alguna vez expresaron Somatostatina, incluso aunque fuera transitoriamente durante el desarrollo. Los parentales llevaron las construcciones en homocigosis y los experimentos se realizaron en ratones de la descendencia, heterocigotas para Som-Cre y para Tomato.

Las líneas fueron mantenidas en el bioterio del IFIBIO. Los animales experimentales se mantuvieron en un máximo de 6 por jaula, fueron alimentados *ad libitum* y mantenidos en un ciclo de 12:12 horas de luz:oscuridad (la luz se enciende a las 7 am). Se utilizaron hembras y machos adultos (90 días de edad) al momento de la cirugía, para todos los experimentos. En los experimentos donde no se encontraron diferencias significativas entre los sexos, los datos se muestran juntos.

Se respetaron los cuidados establecidos institucionalmente (CICUAL de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) y gubernamentales (SENASA, Argentina).

M.2. Cirugías estereotáxicas

Todas las cirugías fueron realizadas con anestesia inhalatoria con isoflurano (4% en O₂ para inducción, 0,5-1% para mantenimiento) y montados en un marco estereotáxico (Kopf Instruments; Estados Unidos), alineando bregma y lambda en la misma altura. La temperatura del cuerpo fue controlada y mantenida entre 36 y 37°C con una manta térmica durante toda la cirugía. Al inicio se rasuró el cuero cabelludo sobre la calvaria, se limpió la zona con yodopovidona como antiséptico y, antes de realizar una incisión en la piel, se administró 0,1ml de lidocaína 2% subcutánea en el sitio de la cirugía como anestésico local. Al finalizar la cirugía y los dos días posteriores, se administró flunixin meglumina (2.5 mg/kg, subcutáneo) como analgésico y antiinflamatorio. Además, durante la cirugía, los ojos fueron humectados con gel oftálmico (Acrylarm - Ácido

poliacrílico 0,2%, Laboratorios Poen, Argentina). Durante los días posteriores, se monitoreó el peso de los animales, la presencia de signos de dolor y el estado de la herida para prevenir infecciones. No se registraron infecciones postquirúrgicas en ninguno de los animales utilizados en este trabajo.

M.2.1. Lesión dopaminérgica

Para inducir la degeneración dopaminérgica nigroestriatal se inyectó la neurotoxina 6-hidroxidopamina HBr (6-OHDA, Sigma Aldrich AB) 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. 1**). La 6-OHDA fue disuelta en solución salina-ácido ascórbico 0,1%, en una concentración de 5,91 µg/µl de droga base. Se inyectaron 0,5 µl de la solución en el MFB del hemisferio izquierdo utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas: 1 mm antero-posterior, 1,1 mm lateral y 4,8 mm dorso-ventral, medidas desde la duramadre ([Paxinos & Franklin, 2004](#)). La velocidad de inyección fue de 0,5 µl/min, y se utilizó una cánula de 300 µm de diámetro unida a una jeringa Hamilton de 25µl controlada por una bomba motorizada (Bioanalytical Systems, Estados Unidos). La cánula fue mantenida en el sitio de inyección por 6 minutos luego de la inyección, y retirada lentamente cuidando que no hubiera reflujo de la toxina. Los animales control (sham) recibieron una inyección de solución salina-ácido ascórbico 0,1% en el MFB y fueron manipulados de igual manera que los que recibieron 6-OHDA. La asignación de cada ratón a cada tratamiento fue hecha al azar. Luego de la cirugía, todos los días durante alrededor de 15 días, los ratones fueron pesados, recibieron una inyección subcutánea de solución salina y fueron alimentados con una dieta rica en azúcares y grasas para que recuperen su peso. Una vez recuperados, los ratones pasaron por una serie de ensayos conductuales para evaluar los signos de parkinsonismo esperados ante la lesión de la vía nigroestriatal. El grado de lesión dopaminérgica se confirmó mediante el análisis de expresión de tirosina hidroxilasa (TH) por inmunohistoquímica en cortes fijados de cerebro a la altura del estriado.

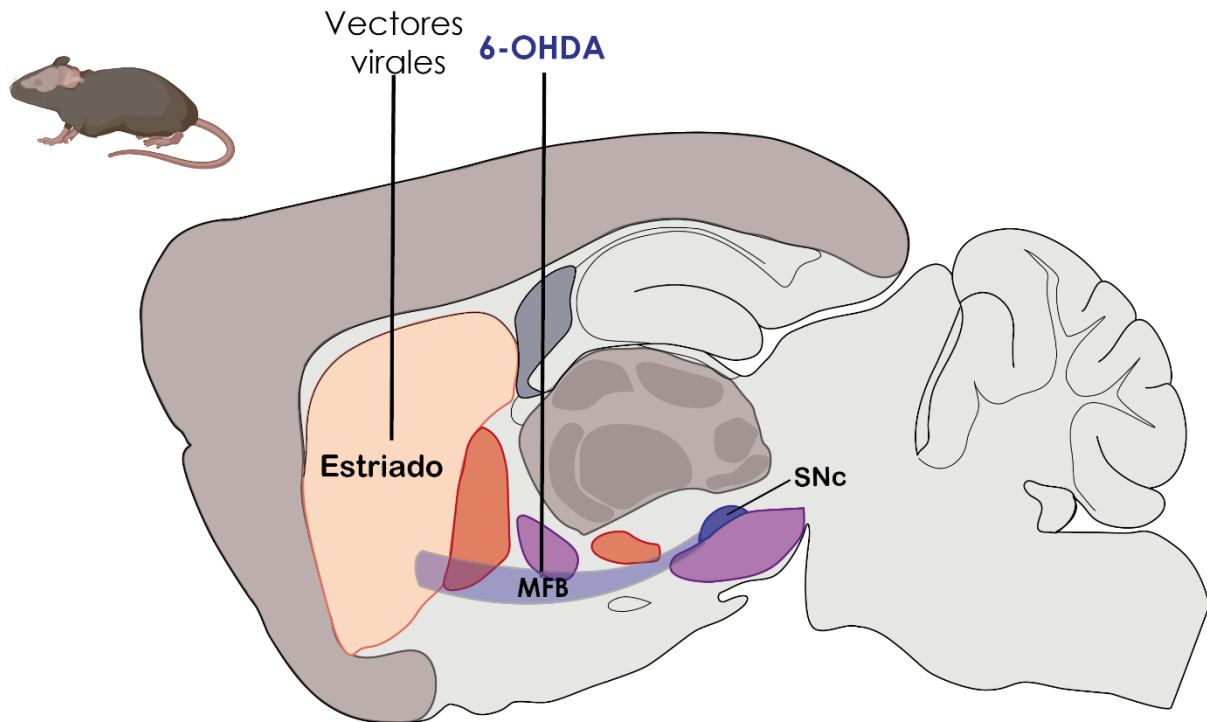


Figura M. 1: Inyecciones estereotáxicas. Esquema indicando la localización anatómica del haz medial del cerebro anterior (MFB) donde se administró la toxina 6-OHDA o su vehículo como modelo de parkinsonismo. Además, se marca el estriado, donde se administraron los vectores virales.

M.2.2. Administración de vectores virales

Los animales que recibieron este tratamiento fueron tratados en la misma cirugía en la que recibieron 6-OHDA o ácido ascórbico 0.1%. El vector se administró en el mismo hemisferio que la 6-OHDA. Se usó un vector viral adeno-asociado (AAV) de serotipo 8 que expresa, de forma dependiente de Cre, una proteína de fusión del DREADD inhibitorio hM4D con la proteína reportera mCherry (hM4D-mCherry) bajo el promotor de sinapsina humana (AAV8-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE-hGPA; Virovek Estados Unidos lote #16-626, plásmido Addgene #44362). Para algunos experimentos se utilizó como vector control un AAV de serotipo 8 que sólo expresa, también de forma dependiente de Cre, la proteína reportera bajo el mismo promotor (AAV8-hSyn-DIO-mCherry-WPRE-hGPA, Virovek Estados Unidos lote #v61605, plásmido Addgene #50459). La concentración de los vectores utilizados fue de $3,3 \times 10^{12}$ y $3,6 \times 10^{12}$ partículas virales por ml, respectivamente luego de ser diluidos en PBS estéril.

Para la administración de los vectores virales se prepararon pipetas estirando capilares de borosilicato (Kwik-Fil, World Precision Instruments, Item #1B100F-4) en un puller vertical (Narishige) y cortando las puntas con una tijera pequeña de modo que la abertura de la punta tuviera un diámetro de entre 13 y 21 μm , observado en un microscopio con una grilla colocada en el ocular, a una magnificación de 400x.

Para conseguir una infección extendida, realizamos inyecciones en 4 sitios del estriado dorso-lateral (ver **Figura M. 2**), con un volumen total de 1,25 μL . Las pipetas estaban conectadas a una jeringa de 1ml controlada manualmente de modo de inyectar con una velocidad de entre 0,25-0,5 μL por minuto. Primero se inyectó en el sitio más ventral y se dejó la pipeta durante 2 minutos antes de subir al sitio más dorsal. Luego de las inyecciones se esperó 6 minutos antes de subir la pipeta lentamente y extraerla del cerebro.

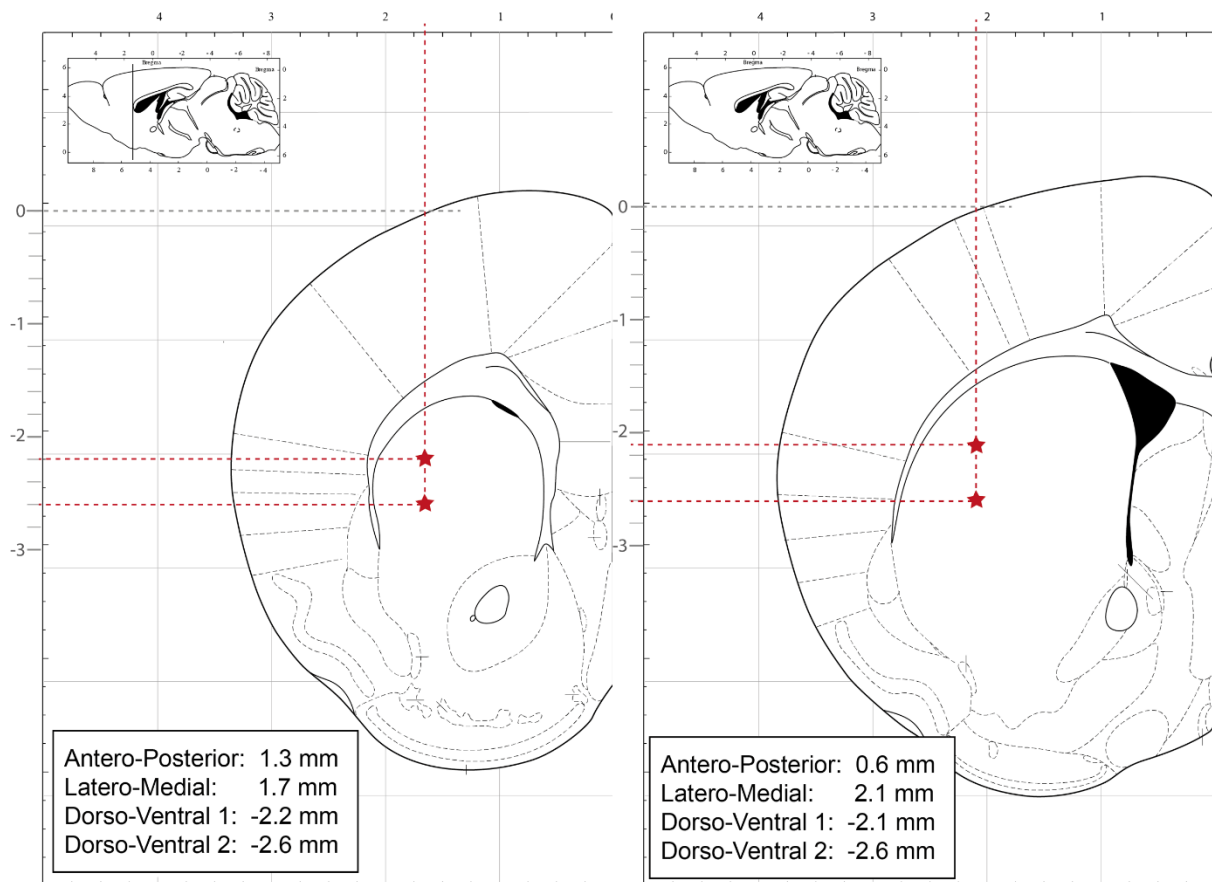


Figura M. 2: Sitios de inyección de los vectores virales en el estriado. Se muestran los sitios de inyección según las coordenadas del atlas ([Paxinos & Franklin, 2004](#)).

M.3. Evaluación conductual y farmacología

M.3.1. Evaluación de los signos motores de la enfermedad de Parkinson

Para evaluar los signos de parkinsonismo, los ratones fueron sometidos a 3 ensayos conductuales, a partir de la tercera semana luego de la cirugía, durante la fase de luz. Para evaluar la asimetría motora general producida por la lesión, se calculó un índice de rotaciones del cuerpo durante la exploración de una arena abierta (*open field*). Además, se calculó un índice de asimetría del uso de las patas delanteras durante la exploración

vertical de una cámara cilíndrica (ensayo del cilindro). Y para evaluar la coordinación motora y el balance se utilizó el ensayo de *rotarod* acelerante. Los aparatos se limpiaron con etanol 10% en agua al fin de cada ensayo.

Para la evaluación de los signos motores en los animales que serían destinados a electrofisiología, los ensayos se realizaron uno por día en días no consecutivos. En los animales destinados a experimentos de evaluación de la inhibición quimiogénica de iSOM, el ensayo de *open field* y el ensayo del cilindro fueron realizados el mismo día en ese orden, uno seguido del otro.

Para realizar los cálculos se utilizó Microsoft Excel, y para realizar los gráficos y comparaciones estadísticas, GraphPadPrism versión 8 (GraphPad Software).

Open field (arena abierta): se colocó un animal por vez en una arena abierta de 40 x 40 cm y se le permitió explorarla libremente durante 15 minutos. La arena se ubicó en un cuarto sin claves visuales y con 130 lux de intensidad lumínica. 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; así se monitorean tanto sus movimientos como patrones de actividad. Dado que la lesión unilateral con 6-OHDA afecta el hemicuerpo contralateral generando hipocinesia, los animales tienden a rotar espontáneamente de forma ipsilateral a la lesión. Se calculó un índice de rotación según el número de rotaciones ipsilaterales sobre el número de rotaciones totales ocurridas durante el ensayo, como medida conductual del grado de lesión dopaminérgica. Animales con lesiones severas muestran un índice cercano a 1, mientras que animales control, un valor cercano a 0,5 ([Escande et al., 2016](#)).

En el experimento en el que se realizó el test de *open field* durante el tratamiento con L-DOPA, el ensayo se realizó el día 5 de tratamiento con L-DOPA (12mg/kg), a los 124 minutos post inyección, después del test del cilindro, y duró sólo 5 minutos.

Cilindro: Se introdujo a un ratón por vez, sin un período de habituación, en un cilindro vertical de acrílico transparente de 10 cm de diámetro y 14 cm de alto. Se evaluó la asimetría del uso de las extremidades delanteras debido a la lesión unilateral de la vía nigroestriatal, durante la actividad exploratoria espontánea. Para ello, se contabilizó el número de veces que el ratón usó la pata delantera contralateral a la lesión, la ipsilateral o ambas juntas, para apoyarse en la pared del cilindro al realizar una exploración vertical, durante 5 minutos o más tiempo si fue necesario para contabilizar al menos 3 usos de pata. Se calculó un índice de asimetría según la sumatoria del número de veces que el animal utilizó la pata delantera contralateral a la lesión (afectada) más la mitad de las veces que utilizó ambas simultáneamente, sobre el total (contralateral + ipsilateral + ambas juntas). Los animales control utilizan ambos miembros delanteros indistintamente, obteniendo un índice de 0,5 mientras que los lesionados muestran un

deterioro significativo en el uso de la extremidad anterior contralateral a la lesión (Escande et al., 2016).

En el experimento en el que se realizó el test del cilindro durante el tratamiento con L-DOPA, el ensayo se realizó el día 5 de tratamiento con L-DOPA (12mg/kg), a los 120 minutos post inyección y duró sólo 3 minutos.

Rotarod acelerante: es un rodillo giratorio impulsado por un pequeño motor que se mueve en un rango de velocidades (acelerado) incrementando su velocidad de 4 a 40 rpm en 5 minutos (UgoBasile, Italia). Se colocó a los ratones a caminar sobre el rotarod acelerante y se activó un cronómetro que se frenó, por activación de una placa, al caer el animal del rodillo, dando una lectura de la *latencia a la caída*, parámetro utilizado para cuantificar el desempeño en este ensayo. Esta prueba requiere que los animales realicen una tarea motora activa con una dificultad incremental y así puede evaluar coordinación motora, balance y evaluar indirectamente la bradicinesia. Además, cada animal fue evaluado 5 veces seguidas separadas por 5 minutos cada una, obteniéndose también un parámetro del aprendizaje motor según la evolución a medida que avanzaron los ensayos. Los animales lesionados con 6-OHDA muestran deterioro de la coordinación motora en comparación con los animales control, reflejada en una menor latencia a la caída, especialmente en el primer ensayo (Escande et al., 2016).

M.3.1.1. Administración de CNO

El CNO o Clozapina-N-Oxido (NIH MH#C929 Batch id:14073-1) fue disuelto en solución fisiológica estéril 10% Di-Metil-SulfÓxido (DMSO, Fluka #4165) hasta una concentración de 0,3mg/ml y fue administrado intraperitonealmente (10ml/kg, 3mg/kg de CNO). Se administró CNO o vehículo 30 minutos antes del inicio del ensayo de *open field* o de la prueba de *rotarod*, según el diseño detallado más adelante). En el caso de la evaluación de discinesias, se administró el CNO entre 10 y 20 minutos antes de la administración de L-DOPA.

M.3.2. Inducción de discinesias

M.3.2.1. Administración de L-DOPA

Para la inducción de discinesias en los animales destinados a los experimentos de electrofisiología, los animales lesionados con 6-OHDA fueron divididos en dos grupos al azar que recibieron, respectivamente, tratamiento con L-DOPA o vehículo. La L-DOPA (Sigma Aldrich) fue disuelta en solución salina estéril a una concentración de 1,2 mg/ml con igual concentración de benserazida (inhibidor periférico de la enzima dopa-decarboxilasa que cataliza la conversión de L-DOPA a dopamina, que no atraviesa la barrera hematoencefálica, Sigma Aldrich) para evitar su decarboxilación periférica. El tratamiento consistió en una dosis diaria de L-DOPA (o vehículo) durante 14 días consecutivos por vía intraperitoneal (10ml/kg, 12 mg/kg de L-DOPA/benserazida).

Para los experimentos de inhibición quimiogénica utilizamos dosis crecientes de 3, 6 y 12 mg/kg de L-DOPA, todas con 12mg/kg de benserazida. Los días de administración son aclarados en cada experimento.

M.3.2.2. Puntuación de discinesias

Las discinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA (LID), fueron puntuadas como **movimientos anormales involuntarios** (AIM por sus siglas en inglés, *abnormal involuntary movements*) a partir del momento de la administración y hasta los 120 minutos, cada 20 minutos. Para ello, se colocó al animal en una arena cilíndrica de 20 cm de diámetro y de paredes transparentes y se cuantificaron sus AIMS durante 1 minuto. La puntuación se realizó en el momento y se grabaron las sesiones con una videocámara lateral.

Las discinesias se categorizaron según la región corporal afectada en: axiales, de miembros y oro-linguales. La escala de puntuación que se aplica a cada región corporal consiste en unidades arbitrarias de 0 a 4 que representan ([Cenci & Lundblad, 2007](#)):

- 0** = ausencia de discinesias;
- 1** = signos ocasionales de discinesia presentes en menos de la mitad del tiempo de observación;
- 2** = frecuentes signos de discinesia, presentes durante más de la mitad del tiempo de observación;
- 3** = discinesias presentes durante toda la sesión, pero suprimidas por estímulos externos (como ruidos repentinos);
- 4** = discinesias continuas insensibles a estímulos externos.

Con este criterio, el puntaje máximo posible para cada animal es de 12 por cada evaluación de 1 minuto. Además, suele expresarse el resultado como las discinesias acumuladas a lo largo de una sesión sumando los puntajes obtenidos en las seis mediciones realizadas durante 120 minutos (puntaje máximo acumulado = 72).

Para los animales destinados a registros electrofisiológicos, la puntuación se realizó los días 1, 4, 8 y 12 de tratamiento con L-DOPA (o vehículo). En los experimentos de quimiogénica los días de puntuación están aclarados en cada esquema experimental de la sección de Resultados.

M.4. Inmunohistoquímica

M.4.1. Obtención y procesamiento del tejido

Los animales fueron anestesiados con una dosis letal de hidrato de cloral (600 mg/kg, i.p.). Una vez constatada la ausencia de reflejos, fueron perfundidos a través de la aorta con buffer fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (PBS) suplementado con heparina (2 U/ml), seguido por paraformaldehído (PFA, 4%) en PBS. Los cerebros fueron disecados, post-

fijados por 24 hs en PFA 4% y luego crioprotegidos por incubación en sacarosa 30% en PBS durante 3 días. Posteriormente fueron cortados en secciones coronales de 30 μm de espesor utilizando un micrótopo de congelación con cuchilla deslizante (Leica SM 2010R). Los cortes que contenían el cuerpo estriado fueron conservados en PBS con 0,1% azida de sodio a 4°C.

M.4.2. Análisis del grado de denervación dopaminérgica

Dado que la tirosina hidroxilasa (TH) es una enzima clave en la síntesis de dopamina (**Figura I. 1**) su presencia es un marcador de fibras dopaminérgicas en el estriado. Para evaluar el grado de denervación dopaminérgica por la administración de 6-OHDA, cuantificamos la marca TH+ en el estriado del hemisferio lesionado con respecto al hemisferio control.

M.4.2.1. Marcación de TH

A lo largo de toda la determinación se utilizó una solución de PBS 0,1 M con Tritón 0,2 % (PBS-T) como buffer de lavado y como buffer de dilución de los reactivos. Secciones coronales de tejido flotante en solución se incubaron con H_2O_2 0,3 % por 20 minutos para inhibir la peroxidasa endógena y luego de 3 lavados, se incubó en una solución de suero normal de cabra (NGS, del inglés: *normal goat serum*) al 5 % por 30 minutos para bloquear los sitios de unión inespecífica. Seguidamente, el tejido se incubó en presencia del anticuerpo primario anti-TH hecho en conejo (dilución 1:1000, Pel-Freez P40101-150) por una noche a 4°C, y posteriormente se expuso a un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en cabra y conjugado con biotina (dilución 1:500, Vector Laboratories BA-1000) por 2 hs a temperatura ambiente. La presencia del anticuerpo primario se evidenció por incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (dilución 1:125 en PBS, Vectastain Elite PK6100, Vector Laboratories); que se reveló con 3,3'-diaminobenzidina 0,5 mg/ml (DAB, Sigma), H_2O_2 0,015 % en buffer Tris 0,25 M (pH 7,4). Los cortes fueron montados sobre portaobjetos gelatinizados, se deshidrataron por pasajes sucesivos en soluciones de concentración creciente de etanol y finalmente xilol, y se cubrieron con un bálsamo sintético como medio de montaje (Alwik, Argentina).

M.4.2.2. Adquisición y análisis de las imágenes

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Zeiss AxioImager M2 con software Neurolucida de MBF Bioscience en campo claro con parámetros ajustados para una iluminación Köhler, utilizando la cámara QIMAGING QIClick. Usando un objetivo de 10x (NA 0.3, EC PLAN NEOFLUAR), se tomaron imágenes en forma de mosaico en 2D de forma que la imagen final cubriese la sección entera, con el estriado de ambos hemisferios.

El análisis de las imágenes se realizó con el software FIJI (ImageJ) y con Microsoft Excel. Se trabajó con fotos en 8bit. Se delimitó manualmente el área correspondiente a cada estriado, y se obtuvieron los histogramas de intensidad de pixels para cada una. Como

valor de background se tomó como umbral a la media de intensidad más 2 desvíos estándar de un área ovalada delimitada en la corteza dorsal (**Figura M. 3**). En cada histograma se realizó corrección de background convirtiendo en cero todas las intensidades inferiores al valor umbral y se cuantificó la cantidad de píxeles que superaron el valor de umbral (píxeles positivos). El área positiva relativa queda definida como la cantidad de píxeles positivos / píxeles totales. El grado de innervación se determinó según el área positiva del estriado lesionado / área positiva del estriado control, valores cercanos a 1 implican innervación similar en ambos hemisferios, valores cercanos a cero, una denervación completa en el hemisferio lesionado. Se promedió el valor obtenido en 3 secciones de estriado por animal. Sólo se incluyen en el análisis conductual, animales lesionados con 6-OHDA que presentan un grado de innervación (área porcentual de TH+) de hasta 20%.

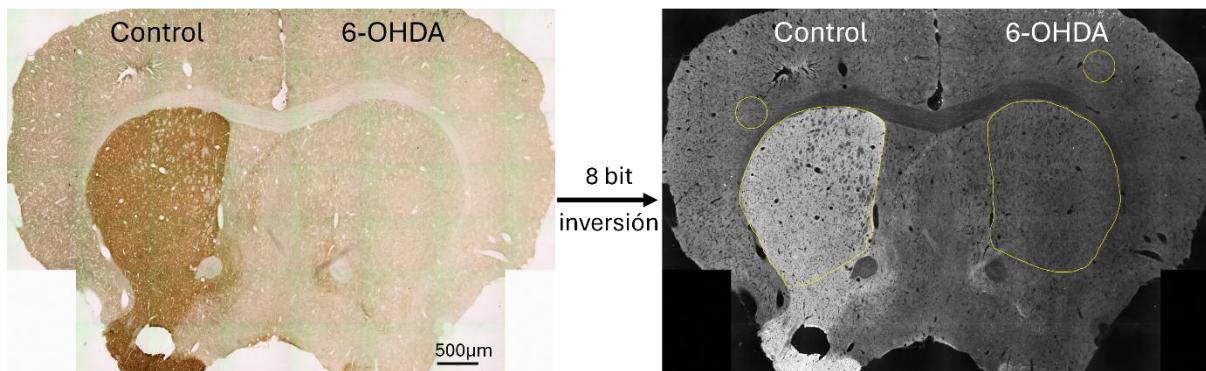


Figura M. 3: Análisis del grado de denervación dopaminérgica. Imagen representativa de una sección coronal de un animal hemiparkinsoniano inmunomarcado contra TH antes (izquierda) y después de convertirla en 8-bit e invertir (derecha). El estriado control y lesionado con 6-OHDA se encuentran delimitados, así como las regiones utilizadas como background en la corteza (zonas corticales con neuropilo homogéneo).

M.4.3. Análisis del grado de transfección del vector viral

Para evaluar la eficiencia y especificidad de los vectores virales, así como las áreas transfectadas, se realizó mediante inmunofluorescencia co-marcación para somatostatina (Som) y la proteína reportera que se expresa a partir del vector viral luego de la recombinación: Cherry.

M.4.3.1. Marcación de Som y Cherry

A lo largo de toda la determinación se utilizó una solución de PBS 0,1 M con Tritón 0,2 % (PBS-T) como buffer de lavado y como buffer de dilución de los reactivos. Secciones coronales de tejido flotante en solución se incubaron en una solución de suero normal de caballo (NHS, del inglés: *normal horse serum*) al 5 % por 1 hora para bloquear los sitios de unión inespecífica. Seguidamente, el tejido se incubó en presencia de los anticuerpos primarios anti-Som hecho en cabra (dilución 1:500, Santa Cruz SC7819 lot#B052) y anti-Cherry hecho en conejo (dilución 1:1500, Abcam 167453) por 1 hora a temperatura ambiente seguido de 3 noches a 4°C. Luego, el tejido se expuso a un

anticuerpo secundario anti-IgG de cabra hecho en burro y conjugado con biotina (dilución 1:1000, Jackson ImmunoResearch 705-066-147) por 2 hs a temperatura ambiente. Posteriormente el tejido fue incubado en una solución con streptavidina conjugada con el fluoróforo Alexa 647 (dilución 1:1000, Invitrogen S32357), para el revelado de Som, y con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado al fluoróforo Cy3 (dilución 1:1000, Jackson ImmunoResearch 111-165-144), para revelar Cherry, y DAPI (1µg/ml, Sigma D9564), para marcar los núcleos, por 2 hs a temperatura ambiente. Los cortes fueron montados sobre portaobjetos y cubiertos con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories).

M.4.3.2. Adquisición y análisis de las imágenes

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Zeiss AxioImager M2 con software Neurolucida de MBF Bioscience utilizando la cámara HAMAMATSU Orca-Flash 4.0 LT C11440. Usando un objetivo de 20x (NA 0.5, EC PLAN NEOFLUAR), se tomaron imágenes en forma de mosaico en 2D de forma que la imagen final cubriese el hemisferio inyectado entero. Se utilizaron los siguientes filtros para adquirir las imágenes:

- Rojo lejano para visualizar Som: BP 640/30 (excitación); FT 660; y BP 690/50 (emisión).
- Rojo para visualizar Cherry: BP 546/12 (excitación); FT 560; y BP 607/80 (emisión).
- Azul para visualizar DAPI: BP 390/40 (excitación); BS 420; y BP 450/40 (emisión)

Los diferentes análisis de las imágenes se realizaron con el software FIJI (ImageJ) y con Microsoft Excel.

Especificidad del vector viral

Para evaluar la especificidad del vector viral, se delimitó el estriado manualmente y se marcaron todos los somas Cherry+ en el canal rojo (**Figura M. 4-A**). Luego, en el canal rojo lejano, se cuantificó la cantidad de esas posiciones que además presentaban marca Som+ y se determinó el porcentaje de células Som+/total de Cherry+.

Eficiencia del vector viral

Para evaluar la eficiencia del vector viral, se marcaron todas las células Cherry+ del estriado, se calculó el centro de masa del conjunto y a partir de ese punto se generó un círculo que abarca la zona de transfección (**Figura M. 4-B**). En esa área se cuantificaron todos los somas Som+ y luego se determinó cuántas de esas células eran además Cherry+. Así se calculó el porcentaje de células Cherry+/ total de Som+ en el área de infección.

Grado de transfección del estriado

Para calcular el grado de transfección, se utilizaron 4 secciones del estriado, a diferentes posiciones en el eje antero-posterior (distancias a bregma: 1.1, 0.8, 0.4 y 0 mm). En cada sección se delimitó el estriado y usando el centroide del estriado como referencia, se trazó una línea vertical y una horizontal de modo que el estriado quedó

dividido en 4 regiones: dorso-lateral (DL), dorso-medial (DM), ventro-lateral (VL) y ventro-medial (VM) (**Figura M. 4-C**). En cada región se marcaron todas las células Som+, luego se cuantificó la proporción de estas células que además presentan marca Cherry+.

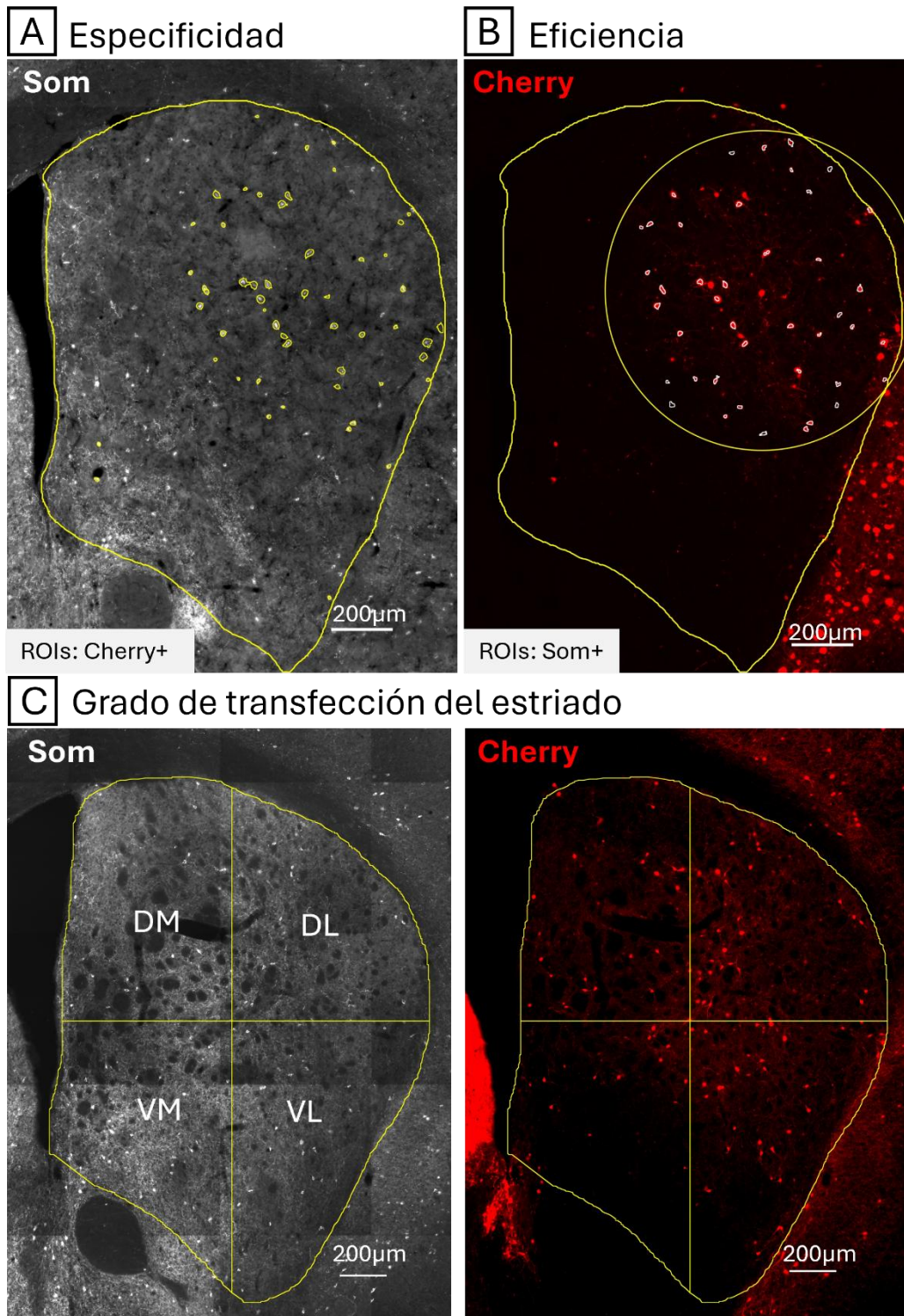


Figura M. 4: Análisis de la transfección con el vector viral. **A-** Imagen del estriado en el canal correspondiente a la marca de Som, con regiones de interés delimitadas a partir del canal rojo (Cherry+). La especificidad está dada por el porcentaje de células Cherry+ que son Som+. **B-** Misma imagen del estriado que en A, que muestra el canal correspondiente a la marca de Cherry,

con el área de transfección delimitada y las células Som+ de esa área delimitadas. La eficiencia está dada por el porcentaje de células Som+ que son Cherry+. **C-** Imagen del estriado de otro animal en el canal de Som (izquierda) y de Cherry (derecha) que indica los cuatro cuadrantes del estriado considerados para la cuantificación del grado de transfección del estriado.

M.5. Electrofisiología

M.5.1. Obtención de tejido ex vivo para registros electrofisiológicos

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

M.5.2. Registros electrofisiológicos

Para realizar los registros se transfirieron las rodajas a una cámara de registro alimentada mediante una bomba peristáltica (Ismatec, Alemania) con ACSF de niveles de magnesio y calcio normales a una tasa de 3 ml/min. Este ACSF contenía: 125mM NaCl, 2.5mM KCl, 1.3mM NaH₂PO₄·H₂O, 26mM NaHCO₃, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ y 10mM glucosa. La temperatura en la cámara fue de 34°C mantenida con un controlador de temperatura TC 344B (Warner Instruments). Antes de realizar los registros se dejó estabilizar las rodajas en la solución de registro durante 10 minutos en la cámara de registro. Se registraron células Tomato+ de la región dorsolateral del estriado, la cual corresponde a la región motora. Se identificaron las neuronas registradas con un microscopio Nikon Eclipse equipado con un objetivo de inmersión en agua 40x, con óptica DIC y para fluorescencia, y una cámara infrarroja conectada a un monitor y a la computadora. Se utilizaron pipetas de registro de capilares de borosilicato (Kwik-Fil, World Precision Instruments, Item #1B150F-4) estirados con un puller (P-97, Sutter Instruments), de resistencia entre 4 y 7 MΩ. Para los registros en *whole cell* se llenaron las pipetas con solución intracelular: 20mM KCl, 120mM K-gluconato, 1mM HEPES, 2mM Na₂ATP, 0.3mM NaGTP, 0.1mM EGTA, 10mM fosfocreatina y 2mM MgCl₂, pH 7.3 ajustado con KOH. Para los registros en *cell attached* se llenaron las pipetas con ACSF. Los registros se realizaron con un amplificador Axoparch-1D (Molecular Devices), a una frecuencia de muestreo de 20 kHz (Digidata 1322A, Molecular Devices) en una computadora equipada con pClamp 9.2 (Molecular Devices). En *cell attached*, se registró el potencial sin filtros en un canal, que se usó para detectar transiciones rápidas

que reflejaban probablemente artefactos de origen mecánico, cuya ausencia se aplicó como criterio de calidad del registro. En otro canal se registró la misma señal con filtro pasa alto de 500Hz y pasa bajo de 1kHz, a partir de la cual se detectaron los potenciales de acción.

Para los registros en *whole cell current clamp* se compensó la resistencia en serie. En todos los experimentos se agregó picrotoxina (100 μ M) y DNQX (10 μ M) al ACSF para bloquear la transmisión GABAérgica y glutamatérgica.

Los criterios de inclusión de las células al análisis de los registros en *cell attached* fueron: 1) el disparo de potenciales de acción por al menos 5 minutos; 2) una resistencia del sello que no varíe más de un 20% de su valor original a lo largo del registro; 3) un valor de potencial sin filtros que se mantenga en 0 ± 10 mV con respecto al valor inicial (**Figura M. 5**).

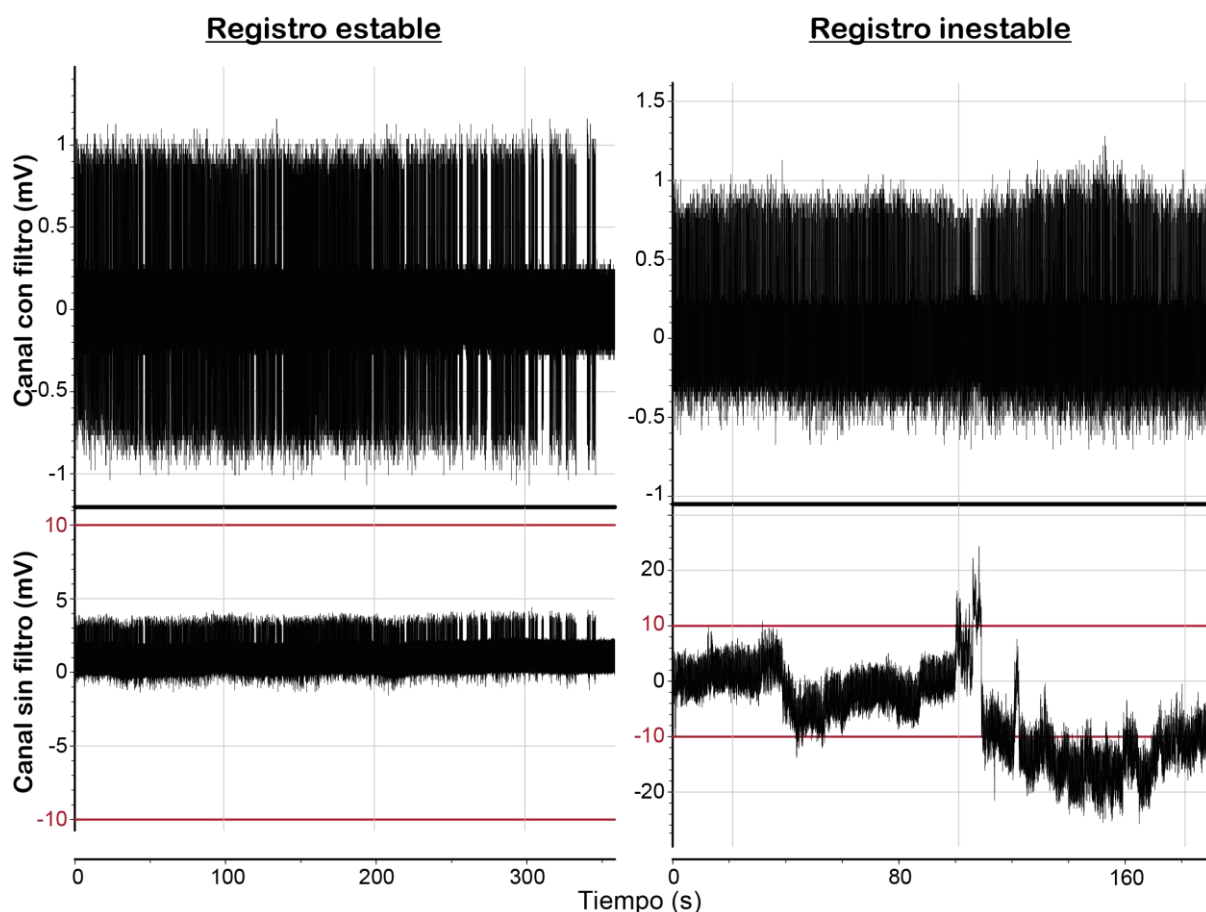


Figura M. 5: Criterio de estabilidad de los registros en *cell attached*. Según la variabilidad del registro en el canal de potencial sin filtros (abajo), se ejemplifica una célula con registro estable (izquierda) y una con registro inestable (derecha), que no fue considerada en el análisis.

M.5.3. Manipulaciones farmacológicas

Las drogas se prepararon en soluciones de stock, fueron diluidas en ACSF inmediatamente antes de su uso y aplicadas en el baño de registro a través del sistema de perfusión. Utilizamos las siguientes drogas en las siguientes concentraciones finales: DNQX (10 μ M, stock preparado en DMSO, Sigma), picrotoxina (100 μ M, stock preparado en DMSO, Sigma), SCH23390 (1 μ M, stock preparado en H₂O, Sigma), mecamilamina-HCl (10 μ M, stock preparado en H₂O, RBI #M-106) y SKF81297 (2 μ M, stock preparado en DMSO, Sigma). El agua utilizada fue de calidad para análisis de biología molecular.

M.5.4. Análisis de registros electrofisiológicos.

Utilizamos el software ClampFit (Molecular Devices) versión 10 para analizar los registros, Microsoft Excel para realizar los cálculos y GraphPadPrism versión 8 (GraphPad Software) para construir los gráficos y realizar comparaciones estadísticas. De los registros de actividad espontánea en configuración *cell attached* se analizó todo el tiempo disponible de registro estable de cada célula a partir de los 5 minutos de formado el sello (como máximo, 10 minutos de análisis). Para los registros con modulación farmacológica, se analizó el tramo de registro desde 10 minutos luego de agregar la droga al baño hasta 10 minutos después. Se cuantificaron los potenciales de acción (PAs) y la coordenada del pico de cada uno en la ventana de análisis. Se calculó:

- la frecuencia de disparo promedio como el número de PAs/tiempo en segundos;
- la media, moda y mediana de los intervalos entre PAs (ISI, *Inter Spike Interval*);
- coeficiente de variación del ISI: desvío estándar de la muestra de ISI / media de ISI;
- histogramas de la distribución de ISI, con bins de a 5ms y una escala de 0 a 400ms;
- skewness del histograma de ISI:

$$Skewness = \frac{n}{(n-1)(n-2)} \sum \left(\frac{x_i - \bar{x}}{s} \right)^3$$

Donde n es el tamaño de la muestra, x_i es cada valor de ISI, $\bar{x}$ es la media del ISI y s es el desvío estándar de la muestra.

- Kurtosis del histograma del ISI:

$$Kurtosis = \left\{ \frac{n(n+1)}{(n-1)(n-2)(n-3)} \sum \left(\frac{x_i - \bar{x}}{s} \right)^4 \right\} - \frac{3(n-1)^2}{(n-2)(n-3)}$$

Donde n es el tamaño de la muestra, x_i es cada valor de ISI, $\bar{x}$ es la media del ISI y s es el desvío estándar de la muestra.

RESULTADOS

En este trabajo buscamos comprender el rol de las interneuronas somatostatinérgicas del estriado (iSOM) en los signos motores de la enfermedad de Parkinson (EP) y las discinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA (LID). Para este fin, registramos la actividad intrínseca de las iSOM y evaluamos si ésta cambia en ratones parkinsonianos y discinéticos. Por otro lado, evaluamos si la modulación de la actividad de estas neuronas puede afectar los signos motores de la EP y las LID.

R.1. Actividad electrofisiológica de las iSOM.

Dado que las iSOM constituyen menos del 5% de las neuronas estriatales, utilizamos ratones adultos Som-Cre;Tomato, de modo de poder identificar las células de interés por la expresión de la proteína fluorescente roja.

Straub y colaboradores ([Straub et al., 2016](#)) observaron que los ratones Som-Cre, cruzados por una línea reportera, muestran una proporción de células marcadas que en el adulto no expresan Somatostatina (Som). Para verificar este fenómeno, detectamos la proteína Som mediante un ensayo de inmunofluorescencia en tejido de ratones Som-Cre;Tomato adultos. Observamos que el $61 \pm 8\%$ de las células Tomato+ en el estriado eran inmunoreactivas para Som (Som+), pero notamos también que hay una gran segregación tanto regional como por intensidad de estas células. Localizamos una zona de alta densidad de células Tomato+/Som- en la región ventro-lateral más anterior del estriado. Además, las células Som+ muestran una intensidad de marca para Tomato menor que las Som- (ver **Anexo Figura A.1**). Teniendo en cuenta estas observaciones, inferimos que las células que expresan Som en el adulto se encuentran con mayor probabilidad en la región dorsal del estriado, en rodajas ubicadas entre Bregma +1.1 y -0.3mm, según el atlas ([Paxinos & Franklin, 2004](#)), y en células con una intensidad relativamente baja de fluorescencia de Tomato, de modo que realizamos los registros en estas condiciones.

Realizamos registros *ex vivo* con la técnica de *patch clamp* en configuración *cell-attached*. Primero evaluamos la actividad intrínseca de las iSOM en ratones control, registrando los potenciales de acción en presencia o ausencia de bloqueantes sinápticos en el baño, con el fin de reducir la modulación de la actividad por inputs sinápticos y así caracterizar principalmente la actividad intrínseca. Posteriormente utilizamos ratones control, parkinsonianos y discinéticos para registrar la actividad espontánea de las iSOM en los 3 grupos.

R.1.1. Actividad intrínseca de las iSOM.

Una de las características de las iSOM es que presentan actividad espontánea (ver Introducción). Mediante registros *ex vivo* en la configuración *cell-attached* (**Figura R. 1-A**) observamos que, mayoritariamente, disparan de manera regular con un patrón tónico sostenido, y en algunos casos con tendencia a mostrar vaivenes en la frecuencia de

disparo y pausas de duración variable (**Figura R. 1-B**). Este patrón de disparo se refleja en una asimetría en la distribución de frecuencia de los intervalos entre espigas (ISI por sus siglas en inglés: *Inter Spike Interval*), que muestran una cola extendida hacia ISIs largos (**Figura R. 1-B**). Por ello, para realizar un análisis inicial de su actividad, utilizamos tanto la frecuencia media de disparo (PA/s) como la moda de la distribución de ISIs, siendo esta última representativa de la frecuencia de disparo dominante. Para discernir si, en nuestras condiciones experimentales, la actividad espontánea es generada de manera intrínseca por las células o inducida por actividad sináptica aferente, agregamos al baño diferentes bloqueantes sinápticos y comparamos la actividad con y sin ellos. Considerando que la mayoría de las aferencias del estriado son glutamatérgicas (de corteza y tálamo) y que la mayoría de las células estriatales son GABAérgicas, evaluamos los efectos del agregado al baño de DNQX y picrotoxina, que funcionan como antagonistas de receptores ionotrópicos glutamatérgicos de tipo AMPA/kainato y GABAérgicos, respectivamente (**Figura R. 1-A**). No encontramos diferencias significativas en la frecuencia de disparo de PA, ni en la moda del ISI (**Figura R. 1-C y D**).

Otros neurotransmisores importantes en el estriado son la ACh y la DA. Las iSOM presentan receptores de ACh nicotínicos (nAChR) y muscarínicos, siendo los primeros excitatorios (**Figura I. 7**). Para evaluar su participación en la actividad espontánea de las iSOM, agregamos al baño mecamilamina, que bloquea selectivamente los nAChR, y podría revelar un posible efecto excitatorio endógeno de la ACh sobre la actividad de las iSOM. Para poner en evidencia posibles efectos endógenos de la DA sobre la actividad de las iSOM, que expresan receptores D5, que en otras interneuronas estriatales tienen un efecto excitatorio, agregamos al baño SCH23390, un antagonista selectivo de receptores dopaminérgicos de tipo D1/D5. Ni el agregado de mecamilamina, ni el de SCH23390, en presencia de picrotoxina y DNQX, afectó la frecuencia media de disparo (**Figura R. 1-C**) ni el ISI dominante en estas células (**Figura R. 1-D**).

La actividad registrada parece entonces no estar influida por un tono sináptico, sin embargo, dado que en las condiciones de registro puede haber disponibilidad de glutamato y GABA, **decidimos mantener la presencia de picrotoxina y DNQX en el baño todos los registros**, de modo de independizarnos de posibles efectos vía los receptores mencionados, como se hace comúnmente en el campo.

Entre las células tónicas, pudimos observar luego de unos minutos de registro, que algunas dejaban de disparar transitoriamente luego de un aumento en la frecuencia y una disminución en la amplitud de los potenciales de acción (**Figura R. 1-E**). Descartamos que esto se debiera a problemas técnicos, ya que la resistencia del sello permanecía dentro del criterio de variación permitido y el registro se veía estable en el canal sin filtros pasa-alto. En otros animales realizamos algunos registros en configuración *whole-cell* para explorar estos fenómenos junto con el registro del potencial de membrana. Pudimos detectar eventos en los que la célula registrada se

despolarizaba espontáneamente, aumentaba su frecuencia de disparo a la vez que disminuía la amplitud de los potenciales de acción y posteriormente se bloqueaba la actividad (**Figura R. 1-F arriba**). Estas células podían recuperar su actividad espontánea luego de una hiperpolarización inducida por inyección de corriente negativa. Este fenómeno es consistente con el que observamos en *cell-attached*. Denominamos a estas células y a las que en *cell attached* se silenciaban luego de un aumento de frecuencia y disminución en la amplitud de los PAs, como **tónicas con pausas por despolarización** (presumiblemente “depolarization block”).

Por otro lado, registramos también en *whole-cell* células que espontáneamente presentan ciclos de despolarización e hiperpolarización, pudiendo dejar de disparar durante la hiperpolarización (**Figura R. 1-F abajo**). Por esto, inferimos que las células que en *cell-attached* se silenciaron súbitamente, sin verse afectada la amplitud de los PAs previo a la supresión de la actividad, se hiperpolarizaron espontáneamente y por esto dejaron de disparar. En algunas pocas células los silencios por hiperpolarización fueron dominantes, presentándose, una actividad en “salvas” (burst).

En los registros en configuración *whole-cell*, aplicando estímulos de corriente despolarizante entre 5 y 70 pA, pudimos observar que la misma célula puede alternar entre patrones de actividad muy diferentes, y que estos dependen del potencial de membrana en el que se encuentran (**Figura R. 1-G**). Estos datos, sumado a trabajos en los que registraron estas células y reportaron oscilaciones del potencial de membrana (Beatty et al., 2012; Song et al., 2016), sugieren que cada iSOM puede alternar entre los patrones de actividad observados. Dado que estos patrones de actividad pueden ser sensibles a la dialización del contenido intracelular en configuración *whole-cell* (Song et al., 2016), **decidimos utilizar la configuración *cell-attached* para los registros de la actividad espontánea de las iSOM en los distintos grupos experimentales** (sham, parkinsoniano y discinético), y así minimizar factores puedan modificar el patrón de actividad de las células de forma artefactual.

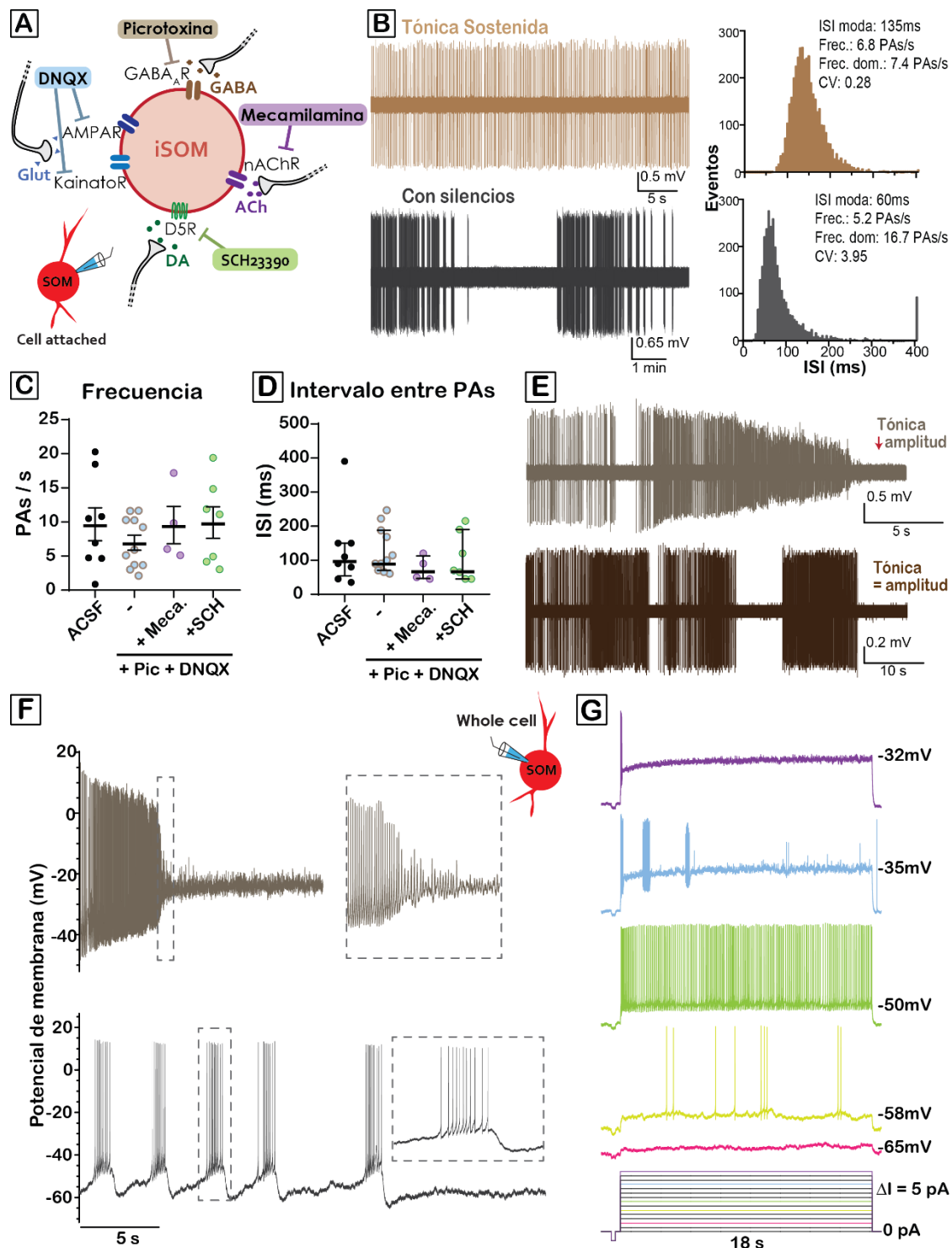


Figura R. 1: Actividad intrínseca de las iSOM. **A**- Esquema mostrando los receptores bloqueados con las drogas utilizadas en el baño, y la configuración de registro. **B**- Ejemplos representativos de los dos tipos de patrón de disparo observados en *cell-attached*: tónico sostenido (arriba) o con silencios (abajo). Histogramas del intervalo entre potenciales de acción (ISI) correspondientes a 10 minutos de registro de cada célula ejemplificada, y parámetros medidos: moda del ISI, frecuencia de disparo, frecuencia dominante (inversa de la moda del ISI) y coeficiente de variación (CV) del ISI. **C**- Frecuencia media de potenciales de acción (PAs/s) registrada durante 10 minutos, para cada tratamiento (ANOVA de 1 vía ns p=0.6928). **D**- Moda

del ISI de cada célula registrada durante 10 minutos en la condición indicada (Kruskal Wallis ns $p=0.5681$). **E-** Ejemplos representativos de los dos fenómenos de silenciamiento de las células tónicas: con disminución en la amplitud de los PAs (arriba) o sin cambio en la amplitud (abajo). **F-** Ejemplos de células registradas en configuración *whole-cell* en los que se puede observar la despolarización y bloqueo de actividad (arriba) y la actividad en salvas, que espontáneamente se detiene (abajo). **G-** Ejemplo de una neurona registrada en *whole-cell current clamp*, en el que se pueden observar distintos patrones de actividad según el potencial en el que se encuentra la célula, que varía según el valor de corriente inyectada. Pic = picrotoxina (100 μ M); DNQX (10 μ M); SCH23390 (10 μ M); Mecamilamina (10 μ M); ACSF (Artificial Cerebro-Spinal Fluid) corresponde a la solución extracelular. ACSF n=8; N=3; +Pic+DNQX n= 13, N=9; +mecamilamina n=4, N=4; +SCH n= 7, N= 5; (n: células, N: ratones).

R.1.2. Actividad electrofisiológica de las iSOM luego de la lesión dopaminérgica.

R.1.2.1 Validación conductual del modelo de EP y LID.

Para evaluar los posibles cambios en la actividad intrínseca de las iSOM en el modelo de EP y LID, generamos ratones Som-Cre;Tomato de los 3 grupos experimentales de interés: sham (controles con lesión simulada), parkinsonianos y discinéticos. Como se describe en Materiales y Métodos, el modelo de parkinsonismo que utilizamos consiste en la inyección unilateral de la toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el fascículo prosencefálico medial. Como consecuencia de la inyección, las neuronas dopaminérgicas de la *Sustancia Nigra pars compacta* de ese hemisferio degeneran y se pueden observar los signos motores de la enfermedad afectando el hemicuerpo contralateral. Los animales sham reciben vehículo en lugar de toxina. Posterior a la cirugía, los animales reciben cuidados especiales durante 3 semanas hasta que recuperan peso, y luego son sometidos a ensayos conductuales para evaluar el grado de lesión dopaminérgica (**Figura R. 2-A**).

Los ratones que recibieron 6-OHDA muestran déficits en la coordinación y balance, revelados como una menor latencia a la caída en el rotarod acelerante (**Figura R. 2-B**). Por otra parte, y debido a que la lesión es unilateral, presentan una asimetría en las rotaciones del cuerpo hacia el lado ipsilateral a la lesión (**Figura R. 2-C izquierda**). Además, los animales lesionados presentan menor actividad motora en general (**Figura R. 2-C medio**) evidenciada como menores distancias recorridas durante la exploración de una arena abierta (**Figura R. 2-C derecha**). En el test del cilindro también se puede evaluar la asimetría en el uso de las patas delanteras al explorar las paredes de un cilindro verticalmente, con un uso prácticamente nulo de la pata contralateral a la lesión, representativo del signo cardinal de la enfermedad: la hipocinesia (**Figura R. 2-D izquierda**). En este test también se observa la menor movilidad de los animales ya que exploran con sus patas delanteras una menor cantidad de veces que los controles (**Figura R. 2-D derecha**).

Luego de los análisis conductuales, comenzó el tratamiento crónico con L-DOPA (**Figura R. 2-A**). Para esto, los animales que recibieron 6-OHDA fueron divididos de forma aleatoria en 2 grupos: uno recibió L-DOPA 12mg/kg (junto con benserazida 12mg/kg) diariamente durante 2 semanas y el otro recibió vehículo (benserazida 12mg/kg). Para evaluar la expresión de discinesias inducidas por L-DOPA, evaluamos los **movimientos anormales involuntarios (AIMs** por sus siglas en ingles *Abnormal Involuntary Movements*) utilizando una escala de puntuación ya publicada que considera movimientos anormales orofaciales, de miembros y axiales (ver Materiales y Métodos). Con la dosis utilizada, los animales que recibieron L-DOPA desarrollan discinesias desde el primer día (**Figura R. 2-E izquierda**) y son considerados el **grupo discinético**, mientras que los animales tratados con vehículo nunca presentan estos movimientos anormales (**Figura R. 2-E derecha**), y son considerados el **grupo parkinsoniano**. Los animales presentan LID por al menos 2 horas a partir de la administración de L-DOPA. Este período es considerado el estado **on** del tratamiento, mientras que el resto del día los animales presentan fenotipo parkinsoniano, y ese período es considerado el estado **off**.

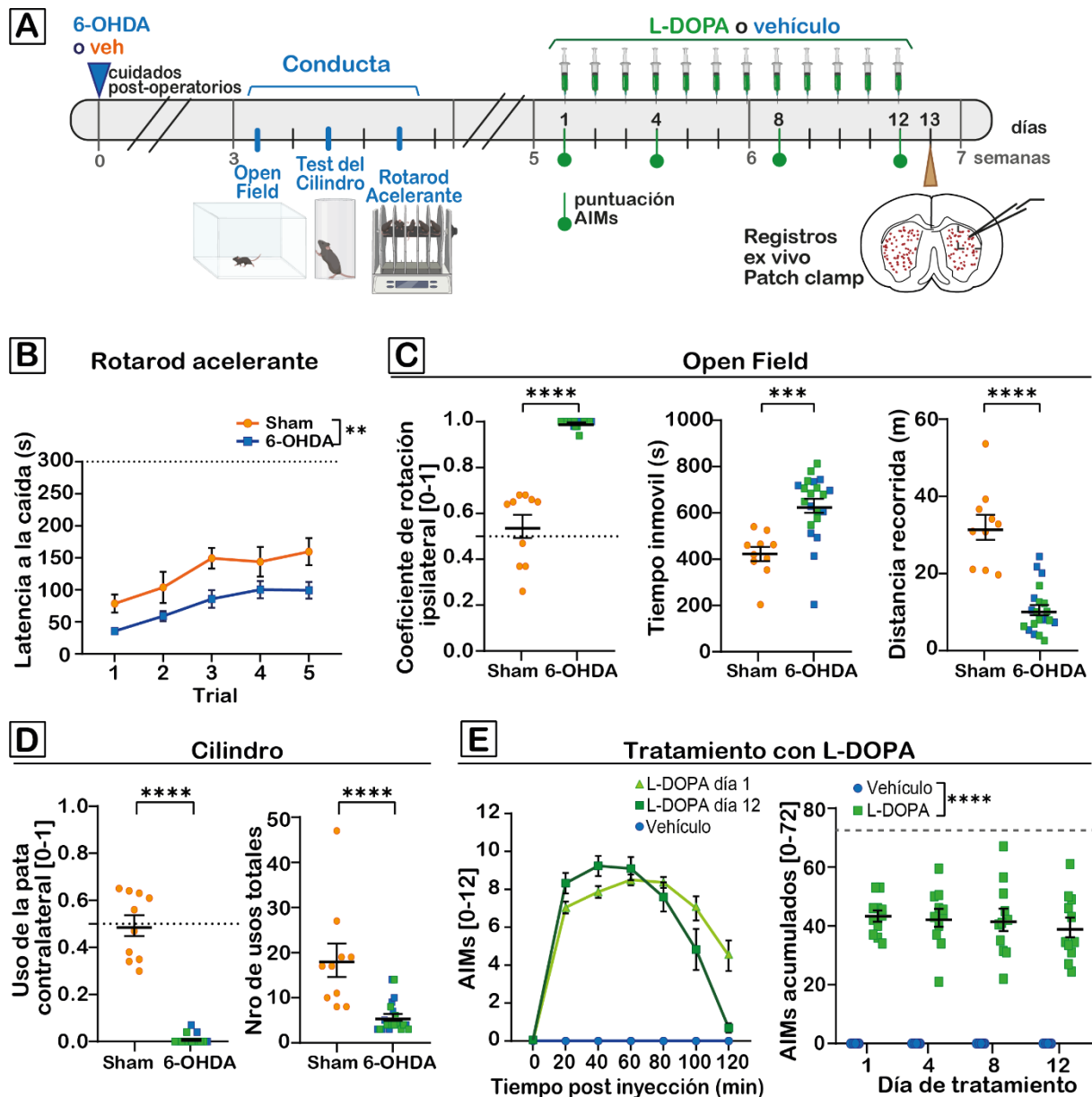


Figura R. 2: Validación del modelo de EP y LID. **A-** Esquema del diseño experimental. **B-** Latencia a la caída en el rotarod acelerante (ANOVA de 2 vías con MR interacción ns, Lesión $p=0.008$, tiempo $p<0.0001$). **C-** Parámetros obtenidos en el test de arena abierta (*open field*) durante 15 minutos de exploración: coeficiente de rotación ipsilateral (test de t no pareado $p<0.0001$), tiempo de inmovilidad (test de t no pareado $p=0.0002$) y distancia recorrida (test de t no pareado $p<0.0001$). **D-** Índice de asimetría en el uso de la pata delantera contralateral a la lesión durante la exploración vertical de las paredes de un cilindro (izquierda, test de t no pareado $p<0.0001$), y número de usos totales realizados (derecha, test de t no pareado $p<0.0001$). **E-** Movimientos anormales involuntarios (AIMs) cuantificados durante el primer y doceavo día de tratamiento con L-DOPA o vehículo (izquierda, ANOVA de 2 vías con MR interacción $p<0.0001$), y los acumulados en cada sesión de 120 min cuantificada (derecha, ANOVA de 2 vías con MR interacción ns, día de tratamiento ns, L-DOPA $p<0.0001$). En todos los casos se muestra media $\pm$ SEM. Sham $n=10$; 6-OHDA/Vehículo $n=10$; 6-OHDA/L-DOPA $n=11$ ratones.

R.1.2.2 Actividad electrofisiológica de las iSOM en ratones parkinsonianos y discinéticos.

El día siguiente al último tratamiento con L-DOPA o vehículo, es decir en el estado *off* de medicación, los animales fueron procesados para obtener rodajas de cerebro para realizar registros electrofisiológicos de iSOM en configuración *cell-attached*. Los ratones sham no fueron tratados crónicamente, pero fueron registrados en los mismos tiempos post cirugía. Los registros fueron realizados siempre en presencia de picrotoxina y DNQX en el baño para minimizar la modulación extrínseca de la actividad (**Figura R. 3-A**). Considerando todos los intentos de registro realizados, encontramos neuronas iSOM silentes, es decir que no presentaron actividad espontánea, en una proporción similar en los 3 grupos experimentales (**Figura R. 3-B**, 28% en sham, 28% en parkinsonianos y 34% en discinéticos). Resulta difícil establecer el significado de estos registros que podrían representar células inviables o iSOM que estaban silentes cuando acercamos el electrodo. Las restantes células registradas presentaron actividad espontánea, en su mayoría tónica y regular; una baja proporción presentó silencios dominantes, a las que denominamos “burst” (ver los trazos de ejemplo en la **Figura R. 1 -F abajo**). De entre las células que disparan tónicamente, la mayoría permaneció todo el registro disparando de forma sostenida (64% en sham, 80% en parkinsonianos y 68% en discinéticos), mientras que una proporción se silenció luego de un aumento de frecuencia y disminución en la amplitud de los PAs, lo que consideramos una despolarización y bloqueo (ver los trazos de ejemplo en la **Figura R. 1 -E y F arriba**; 32% en sham, 14% en parkinsonianos y 29% en discinéticos), y la pequeña proporción restante mostró silencios “por hiperpolarización” (**Figura R. 3-C**).

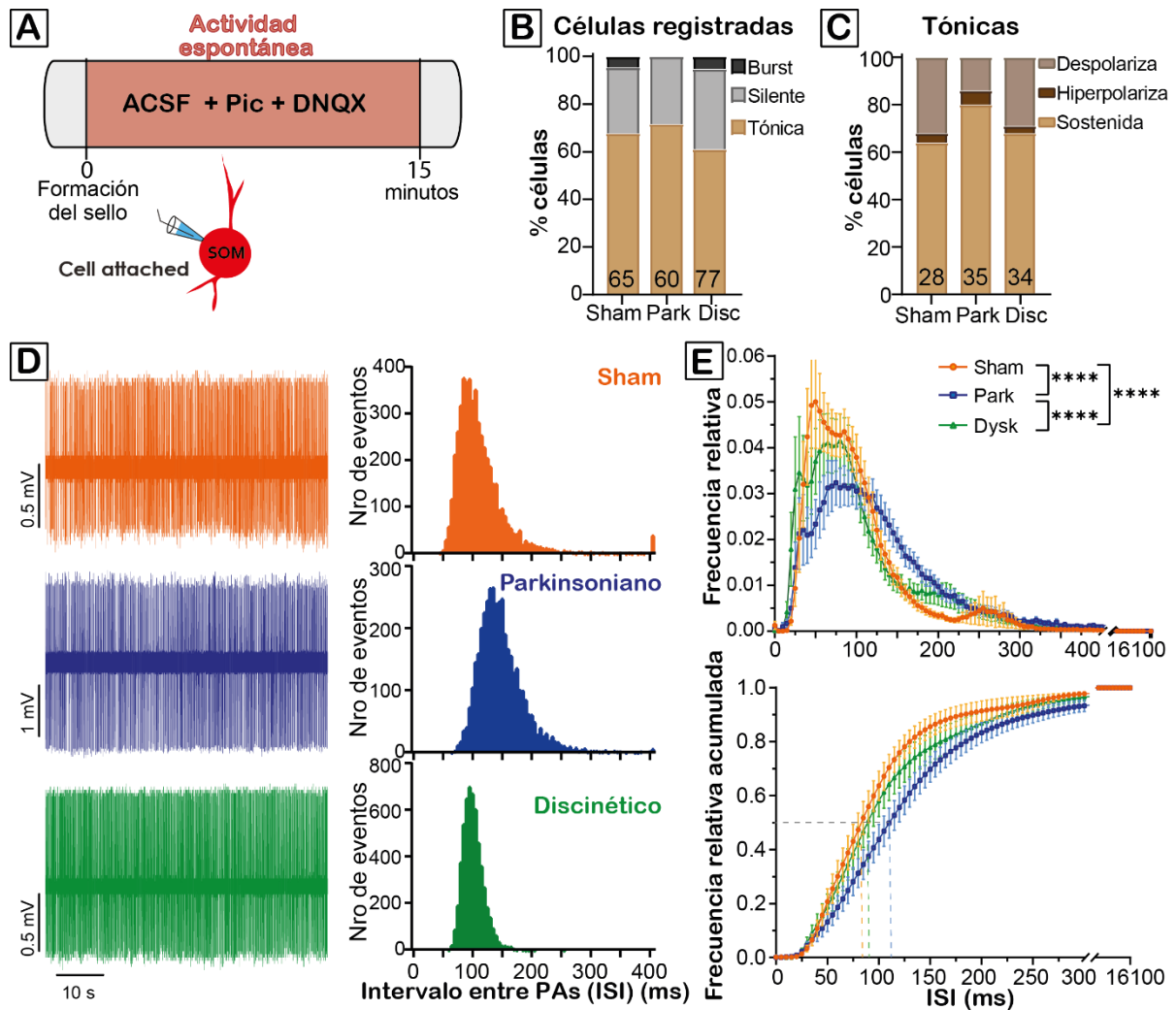


Figura R. 3: Patrones de actividad espontánea de las iSOM. **A-** Esquema del tiempo de registro en configuración *cell-attached*; se muestra el análisis de la actividad espontánea en presencia de picrotoxina (100 μ M) y DNQX (10 μ M). **B-** Proporción de las células registradas en configuración *cell-attached*, que presentan una actividad tónica, en salvas de potenciales de acción, o que no presentan actividad espontánea (silentes). Sobre las barras se aclara la cantidad de células totales por grupo. **C-** Proporción de células que mantuvieron actividad tónica durante el tiempo registrado (“sostenida”) o que dejaron de disparar potenciales de acción luego de una despolarización o una hiperpolarización. Sobre las barras se aclara la cantidad de células totales por grupo (test χ^2 ns). **D-** Registros representativos de neuronas tónicas para cada grupo experimental, y su histograma del intervalo entre potenciales de acción (ISI) correspondiente al tiempo total de registro de actividad espontánea. **E-** Histograma de frecuencia relativa (arriba) y acumulada (abajo) de los ISI para cada grupo experimental. La escala de abscisas se encuentra discontinua para una mejor visualización. Las líneas punteadas marcan la mediana de cada curva. Se observa media $\pm$ SEM en ambos histogramas. Todos estos registros se realizaron en presencia de picrotoxina (100 μ M) y DNQX (10 μ M) en el baño. Sham n = 27, N = 10; Parkinsonianos n = 36, N = 10; Discinéticos n = 36, N = 11 (n: células, N: ratones).

Para el análisis de la actividad espontánea en animales sham, parkinsonianos y discinéticos off medicación, utilizamos células que al iniciarse el registro mostraban actividad tónica. Las células fueron registradas durante 15 minutos en presencia de

microtoxina y DNQX. Analizamos los últimos 10 minutos de modo de asegurarnos que no incluimos posibles efectos artefactuales de la formación del sello en la actividad de las células. Los casos en los que las células dejaron de disparar por despolarización o hiperpolarización fueron incluidos en la cuantificación siempre y cuando el tiempo de actividad superase los 5 minutos en la ventana de análisis. Si bien en los tres grupos experimentales observamos patrones de actividad tónica regular (**Figura R. 3-D**), al analizar los valores de intervalo entre potenciales de acción (ISI), reflejados en el histograma de frecuencia relativa y acumulada (**Figura R. 3-E**), observamos diferencias entre los grupos (Kruskal-Wallis $p < 0.0001$, comparaciones post hoc de Dunn $p < 0.0001$), con un corrimiento claro del grupo parkinsoniano hacia ISIs más largos. Una actividad cercana a la normal parece reestablecerse luego del tratamiento crónico con L-DOPA.

Para caracterizar más ampliamente la actividad de las iSOM, analizamos distintos parámetros de la actividad de las células (**Figura R. 4-B a E**). No encontramos diferencias en el coeficiente de variación de los ISI de cada célula entre los grupos (**Figura R. 4-B izquierda**) lo que podría relacionarse a patrones de actividad similares. Hay una tendencia a menores frecuencias medias de disparo en el grupo parkinsoniano (**Figura R. 4-B derecha**). Tal como se explicó previamente, la frecuencia media de disparo, integrada en períodos largos de tiempos, puede ser insensible a la variabilidad de los ISI observada en estas células. Sin embargo, dicha variabilidad puede reflejarse en la distribución de los ISI. De hecho, la mediana de los ISI fue 28% mayor en el grupo parkinsoniano con respecto al sham (**Figura R. 4-C izquierda**). La moda del ISI, que representa la frecuencia de disparo predominante en las células, no mostró diferencias significativas (**Figura R. 4-C derecha**). Estos resultados son compatibles con cambios que afectan la distribución de ISI con poco impacto en las frecuencia media y dominante de disparo.

Para caracterizar la presencia de silencios prolongados durante los registros, cuantificamos el porcentaje de ISI mayores a 400ms para cada célula, obteniendo valores muy bajos que no difieren entre los tres grupos (**Figura R. 4-D izquierda**). Tampoco hay diferencias significativas en los valores máximos alcanzados por esos ISI de larga duración (**Figura R. 4-D derecha**), si bien los casos de valores mayores se encuentran en los grupos parkinsoniano y discinético. Para caracterizar la forma de las distribuciones de ISI de cada grupo, y considerando que los eventos mayores de 400ms son escasos y no difieren entre los grupos, decidimos analizar dos parámetros de la morfología del histograma construido con valores de ISI de hasta 400ms: skewness y kurtosis. Skewness indica el grado de simetría; valores positivos indican una asimetría positiva, que es lo que se observa en todos los grupos experimentales. Se puede notar un corrimiento no significativo hacia histogramas más simétricos en el grupo parkinsoniano (con valores de entre 0 y 1, población ausente en el grupo sham), pero que lo diferencia del grupo discinético, que presenta una mayor asimetría en general (**Figura R. 4-E izquierda**) y mayor variabilidad. El parámetro kurtosis indica qué tan disperso es

el histograma, valores bajos indican distribuciones con gran variabilidad, mientras que valores altos indican distribuciones más precisas. Observamos una pequeña tendencia hacia histogramas de mayor variabilidad en el grupo parkinsoniano respecto al sham, que parece revertirse y hasta sobrecompensarse en el grupo discinético, que presenta un valor de kurtosis del doble que el grupo parkinsoniano (**Figura R. 4-E derecha**).

En suma, parece haber un corrimiento hacia valores de ISI un poco más largos y una mayor variabilidad de los ISI en el grupo parkinsoniano, lo cual se observa como un desplazamiento de las distribuciones hacia la derecha, produciendo distribuciones más amplias, pero sin un cambio de patrón marcado. En el contexto de nuestras hipótesis, resulta relevante que el análisis detallado del patrón de disparo no reveló una actividad de tipo "burst/pausas" similar a la que observamos en las iChAT en ratones discinéticos (Paz et al., 2021), y previsible en base a trabajos previos que postulan una interacción excitatoria mutua entre iSOM e iChAT que podrían generar oscilaciones anormales en condiciones de depleción de dopamina (Elghaba et al., 2016; Qian et al., 2022).

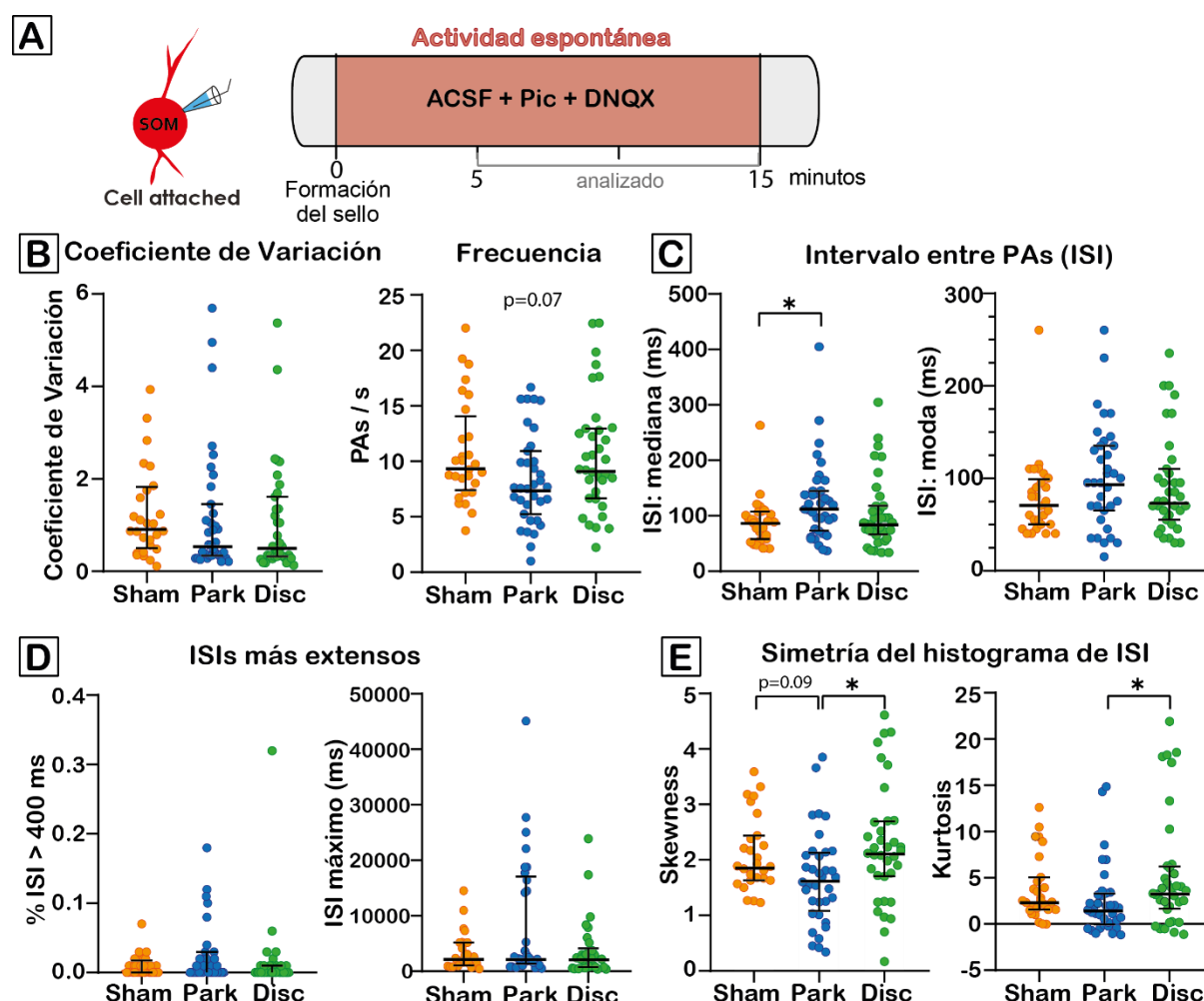


Figura R. 4: Parámetros de la actividad espontánea tónica de las iSOM. **A-** Esquema del tiempo de registro en configuración cell-attached; se muestra el análisis de la actividad espontánea en presencia de picrotoxina (100 μ M) y DNQX (10 μ M). **B-** Coeficiente de variación del ISI para los tres grupos experimentales (izquierda, Kruskal-Wallis ns) y frecuencia de

potenciales de acción (derecha, Kruskal-Wallis $p=0.0701$). **C-** Mediana (izquierda, Kruskal-Wallis $p=0.049$, comparaciones post hoc de Dunn $*p=0.0445$) y moda (derecha, Kruskal-Wallis ns) de los ISI para los tres grupos experimentales. **D-** Porcentaje de ISIs mayores a 400ms (izquierda, Kruskal-Wallis ns) y valores de ISI máximos de cada célula (derecha, Kruskal-Wallis ns). **E-** Morfología de los histogramas de ISI contruidos con los valores hasta 400ms, según la simetría medida como skewness (izquierda, Kruskal-Wallis $p=0.0126$, comparaciones post hoc de Dunn $*p=0.0154$) y la dispersión medida como kurtosis (derecha, Kruskal-Wallis $p=0.0168$, comparaciones post hoc de Dunn $*p=0.0182$). Se presentan mediana $\pm$ rango intercuartil en todos los gráficos. Sham $n=27$, $N=10$; Parkinsonianos $n=36$, $N=10$; Discinéticos $n=36$, $N=11$ (n : células, N : ratones).

R.1.2.3 Modulación farmacológica de la actividad electrofisiológica de las iSOM en ratones parkinsonianos y discinéticos.

Para evaluar si la lesión dopaminérgica y/o el tratamiento crónico con L-DOPA generan una sensibilidad diferencial a la dopamina en las iSOM, decidimos agregar al baño un agonista específico de receptores D1/D5 conocido como **SKF81297** (o SKF) (**Figura R. 5-A**). El agregado de este agonista permite simular el estado *on* de medicación con L-DOPA en el circuito (recordamos que los registros se realizaron un día después de la última dosis de L-DOPA, es decir en el estado *off*). Comparando la actividad de las células antes y después del agregado de SKF, se observa que los histogramas de ISI se corren hacia la izquierda, es decir que se reduce la duración de los ISIs, en los tres grupos experimentales (**Figura R. 5-B y C**). Como se observa en el histograma acumulado, la amplitud del corrimiento es mayor en el grupo parkinsoniano, pasando de una mediana del ISI de 120 ms a una de 90 ms. La ausencia de interacción significativa y efecto significativo del grupo experimental en el ANOVA de dos vías, sumada a un efecto significativo del SKF, lleva a concluir que el SKF produjo un aumento significativo de la frecuencia de disparo en los tres grupos experimentales (**Figura R. 5-D**). Resultados similares se observaron en otras variables: una disminución en la mediana del ISI (**Figura R. 5-E**) y cambios en skewness (**Figura R. 5-F izquierda**) y kurtosis (**Figura R. 5-F derecha**) de los histogramas de ISI hacia valores mayores en ambos parámetros.

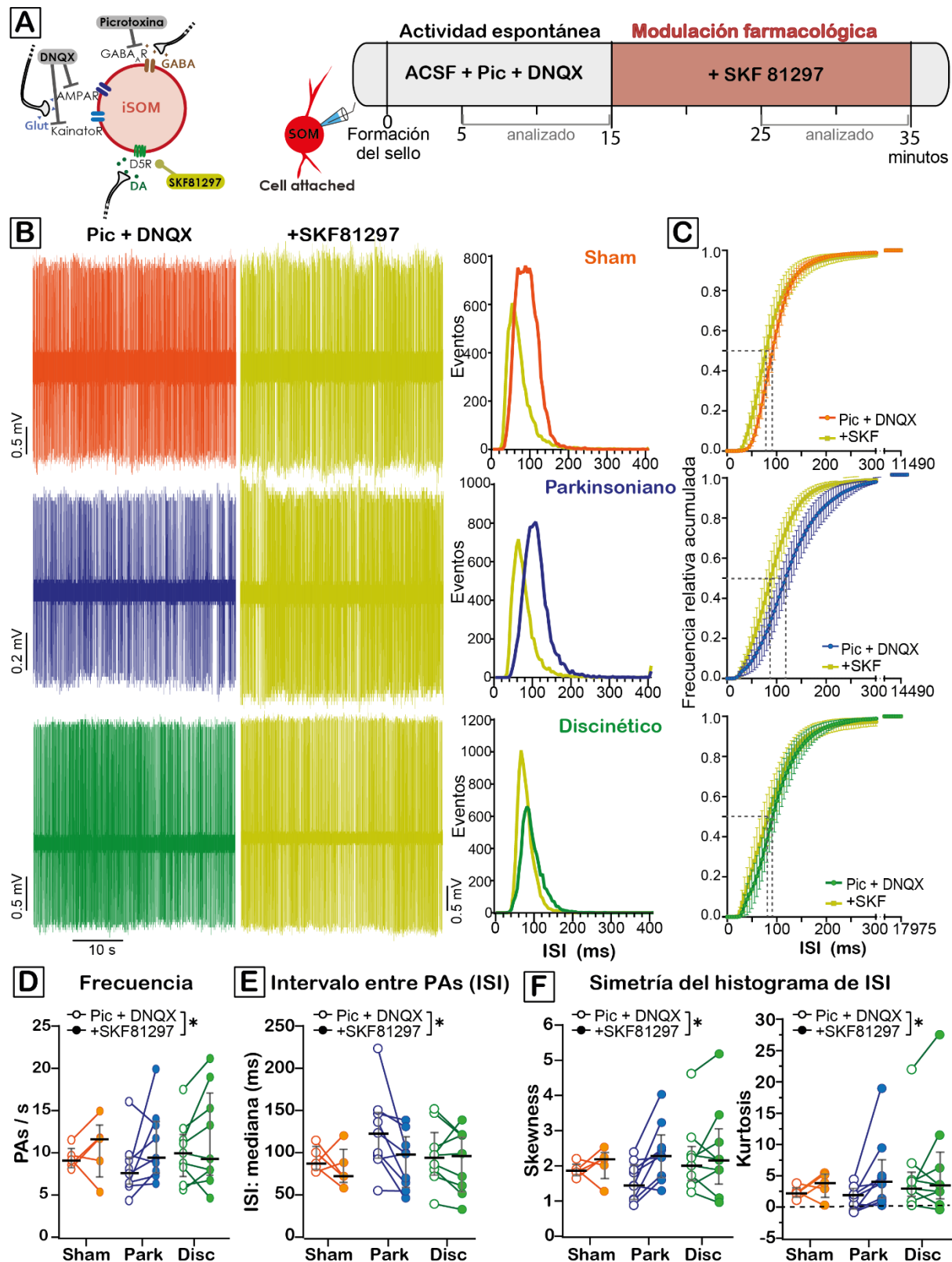


Figura R. 5: Estimulación farmacológica de receptores D1/D5 en iSOM. **A-** Curso temporal del experimento en configuración *cell-attached*, y esquema mostrando los receptores modulados y las drogas utilizadas. **B-** Registro representativo de una célula tónica de cada grupo experimental, y su histograma del intervalo entre potenciales de acción (ISI) correspondiente al registro de actividad sólo en presencia de picrotoxina (100µM) y DNQX (10µM), en comparación al

histograma obtenido luego de la adición de SKF81297 (2 μ M). **C-** Histograma de frecuencia relativa acumulada de los ISI para cada grupo experimental. La escala de abscisas se encuentra discontinua para una mejor visualización. Con línea punteada se marca la mediana de cada curva. Se observa media $\pm$ SEM en estos histogramas. **D-F**, Frecuencia de potenciales de acción por segundo (**D**, ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, efecto de grupo ns, efecto del SKF * $p=0.0389$); Mediana de los ISI (**E**, ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, efecto de grupo ns, efecto del SKF * $p=0.0201$) y morfología de los histogramas de ISI construidos con los valores hasta 400ms, según la simetría medida como skewness (**F-izquierda**, ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, efecto de grupo ns, efecto del SKF * $p=0.0186$) y la dispersión medida como kurtosis (**F-derecha**, ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, efecto de grupo ns, efecto del SKF * $p=0.0222$) para los tres grupos experimentales, comparando antes y después de agregar al baño el agonista dopaminérgico SKF81297. Se presentan mediana $\pm$ rango intercuartil. Sham $n=5$, $N=5$; Parkinsonianos $n=9$, $N=7$; Discinéticos $n=9$, $N=7$ (n : células, N : ratones).

Dado que se identifica un estado hipercolinérgico estriatal luego de la depleción dopaminérgica, como se describió en la introducción, buscamos evaluar si una modulación farmacológica de receptores colinérgicos podría influir diferencialmente en el patrón de actividad de las iSOM según el grupo experimental. Sabemos que las iChAT pueden actuar directamente sobre las iSOM vía receptores nicotínicos con un efecto neto excitatorio (Elghaba et al., 2016). Además, la excitación de las iSOM también estimula las iChAT mediante la liberación de óxido nítrico, lo que podría generar excitación recurrente entre ambos tipos neuronales (Elghaba et al., 2016). Por esta razón, para evaluar si la actividad de las iSOM en parkinsonianos y discinéticos está siendo estimulada por ACh, evaluamos el efecto de la **mecamilamina**, un antagonista de receptores nicotínicos.

Al observar los histogramas de ISI acumulados (**Figura R. 6-C**), encontramos gran dispersión en los datos, probablemente debido al tamaño pequeño de la muestra. En especial en el grupo discinético detectamos en el análisis que la frecuencia de disparo inicial de las células era un 50% menor a la mediana poblacional observada en la muestra total de células en las que evaluamos la actividad espontánea (4.3 PAs/s **Figura R. 6-D** en comparación a 9.2 PAs/s en **Figura R. 4-D**) y por eso los histogramas se encuentran corridos hacia la derecha. Luego del agregado de mecamilamina, no observamos cambios en los patrones de actividad de las células evaluados mediante la frecuencia de disparo, mediana del ISI o simetría del histograma de ISI, para la muestra analizada (**Figura R. 6-D, E y F**). Estos resultados indican que, en nuestras condiciones de registro, no se verifica un efecto de la ACh endógena vía receptores nicotínicos en ninguno de los grupos experimentales.

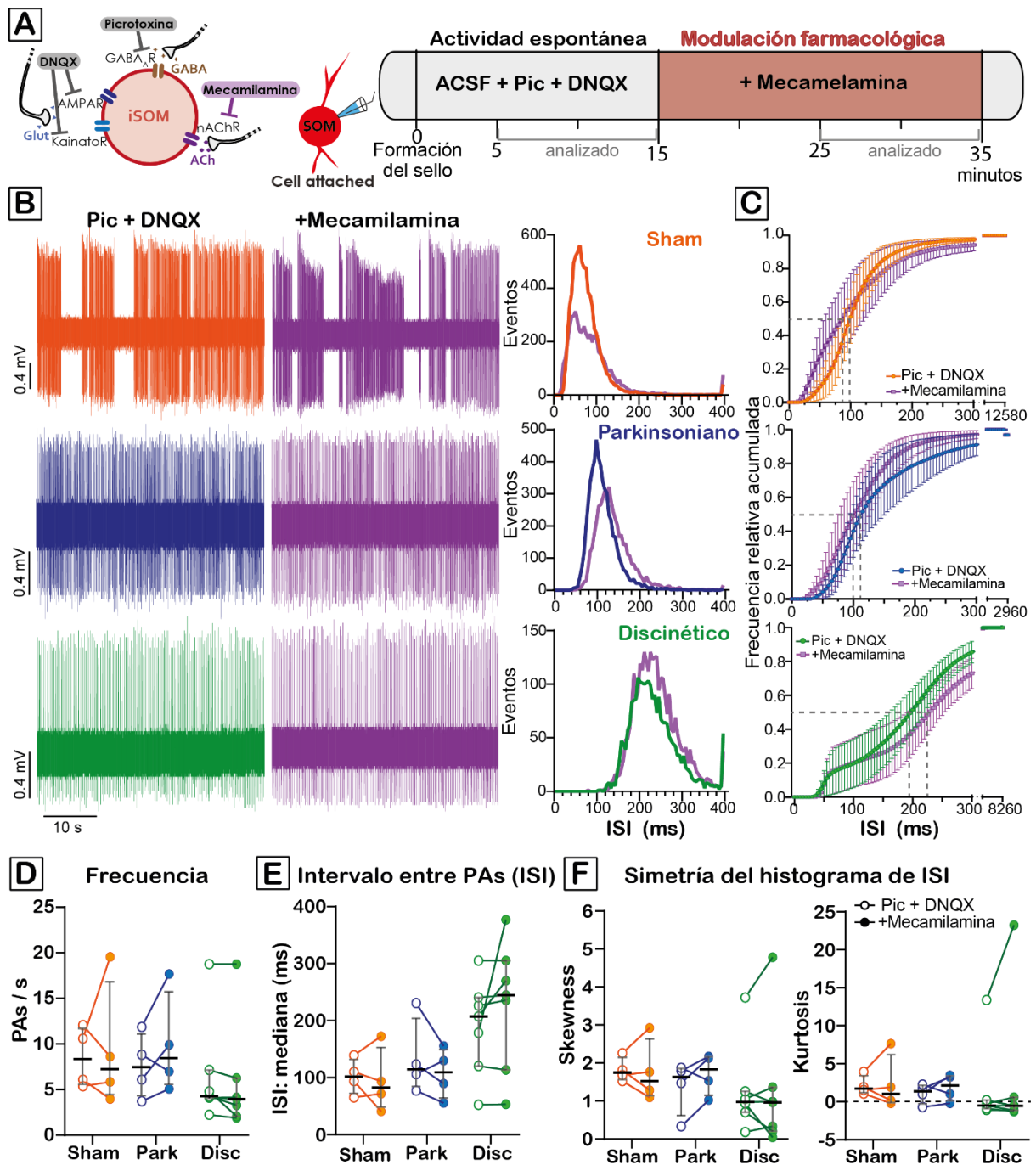


Figura R. 6: Bloqueo farmacológico de receptores nicotínicos en iSOM. **A-** Curso temporal del experimento en configuración *cell-attached*, y esquema mostrando los receptores modulados y las drogas utilizadas. **B-** Registro representativo de una célula tónica de cada grupo experimental, y su histograma del intervalo entre potenciales de acción (ISI) correspondiente al registro de actividad sólo en presencia de picrotoxina (100µM) y DNQX (10µM), en comparación al histograma obtenido luego de la adición de mecamilamina (10 µM). **C-** Histograma de frecuencia relativa acumulada de los ISI para cada grupo experimental. La escala de abscisas se encuentra discontinua para una mejor visualización. Con línea punteada se marca la mediana de cada curva. Se observa media ± SEM en estos histogramas. **D-F** Frecuencia de potenciales de acción (**D**); Mediana de los ISI (**E**) y morfología de los histogramas de ISI construidos con los valores hasta 400ms, según la simetría medida como skewness (**F-izquierda**) y la dispersión medida

como kurtosis (**F-derecha**) para los tres grupos experimentales, comparando antes y después de agregar mecamilamina al baño (ANOVA de 2 vías con MR, ns en todos los casos). Se presentan mediana $\pm$ rango intercuartil. Sham n= 4, N= 4; Parkinsonianos n= 4, N=4; Discinéticos n= 7, N= 7 (n: células, N: ratones).

Para descartar que los cambios en la actividad de las células se debieran meramente al paso del tiempo, registramos algunas células durante un tiempo comparable al de las células tratadas, pero sin el agregado de drogas adicionales a picrotoxina y DNQX (**Figura R. 7-A**). Al observar los histogramas de ISI de cada célula y poblacionales vemos que las curvas correspondientes al inicio y final del tiempo de registro se superponen (**Figura R. 7-B y C**). También resultan indistinguibles la frecuencia, mediana del ISI y simetría de los histogramas de ISI de las células (**Figura R. 7-D, E y F**).

Este experimento control permite concluir que los efectos observados luego del agregado del SKF son específicos del tratamiento y no resultan de inestabilidad de la actividad en el transcurso del tiempo.

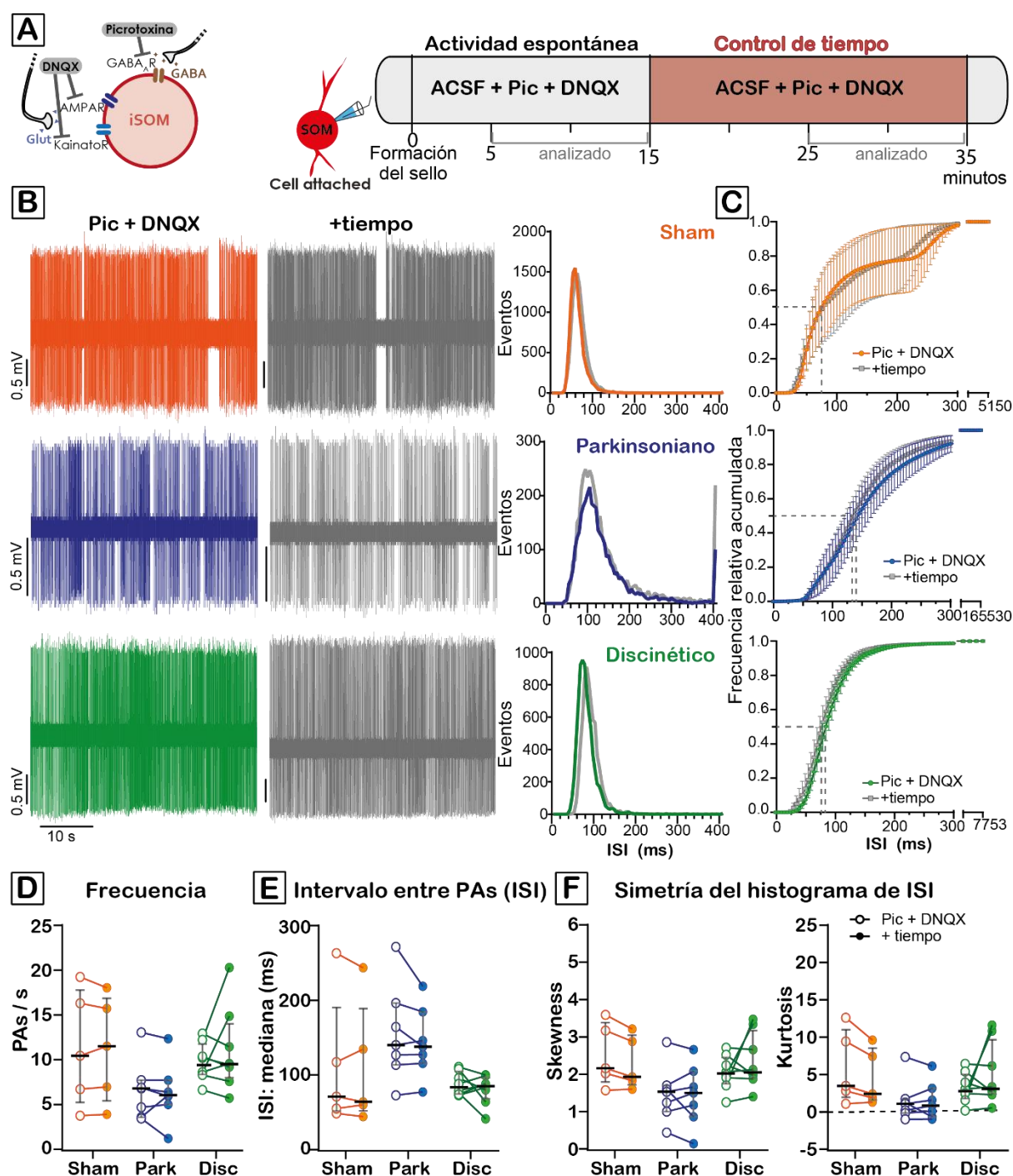


Figura R. 7: Control de tiempo para los experimentos de modulación farmacológica. **A-** Curso temporal del experimento en configuración *cell-attached*, y esquema mostrando los receptores modulados y las drogas utilizadas. **B-** Registro representativo de una célula tónica de cada grupo experimental, y su histograma del intervalo entre potenciales de acción (ISI) correspondiente al registro de actividad sólo en presencia de picrotoxina (100 μ M) y DNQX (10 μ M), en tiempos de registros comparables con los usados para los tratamientos farmacológicos. **C-** Histograma de frecuencia relativa acumulada de los ISI para cada grupo experimental. La escala de abscisas se encuentra discontinua para una mejor visualización. Con línea punteada se marca la mediana de cada curva. Se observa media $\pm$ SEM en estos histogramas. **D-F** Frecuencia de potenciales de acción (**D**); Mediana de los ISI (**E**) y morfología de los histogramas de ISI construidos con los valores hasta 400ms, según la simetría medida como

skewness (**F-izquierda**) y la dispersión medida como kurtosis (**F-derecha**) para los tres grupos experimentales, comparando antes y después del tiempo establecido (ANOVA de 2 vías con MR, ns en todos los casos). Se presentan mediana $\pm$ rango intercuartil. Sham n= 5, N= 5; Parkinsonianos n= 7, N=7; Discinéticos n= 8, N= 8 (n: células, N: ratones).

R.2. Modulación de las iSOM sobre los déficits motores de parkinsonismo y LID.

En los antecedentes presentados, mencionamos una inducción del marcador de actividad celular c-Fos en las iSOM del estriado de animales discinéticos tratados crónicamente con L-DOPA, una hora luego de la última administración, es decir en el estado *on* de medicación (**Figura I. 12**). Por otro lado, en los registros electrofisiológicos realizados en el estado *off* de los ratones discinéticos, encontramos que el agonismo de receptores D5 aumenta la frecuencia de disparo de las iSOM (**Figura R. 5-D**). Estos resultados en conjunto sugieren que en presencia de señalización dopaminérgica producto de la administración de L-DOPA en animales parkinsonianos, las iSOM presentarían una actividad eléctrica aumentada, que podría contribuir al desarrollo y/o expresión de las discinesias inducidas por L-DOPA (LID).

Para evaluar esto, utilizamos una estrategia quimiogenética para inhibir a las iSOM. El abordaje quimiogenético resulta adecuado, ya que puede generar modulación de la actividad durante una ventana de tiempo amplia, que permite evaluar efectos conductuales relativamente duraderos como las discinesias, que se desarrollan en una ventana de 2 hs desde la administración de la L-DOPA. Utilizamos un DREADD derivado del receptor muscarínico 4 humano (hM4D), y modificado por ingeniería genética de modo que no reconoce a su ligando endógeno (acetilcolina) sino a uno exógeno (Clozapina N-óxido; CNO). Es un receptor metabotrópico asociado a proteínas G inhibitorias (Gi) que al activarse desencadena una respuesta inhibitoria de la actividad de la célula.

R.2.1. Validación histológica y electrofisiológica del DREADD utilizado.

Para estos experimentos inyectamos, en el estriado de ratones Som-Cre, un vector viral que permite la expresión del hM4D de forma dependiente de Cre. Las inyecciones se hicieron en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA de modo de poder modular las iSOM del mismo hemisferio afectado por la lesión dopaminérgica. Buscamos modular mayoritariamente las neuronas del estriado dorso-lateral, ya que es una región predominantemente asociada a las conductas motoras estudiadas.

El transgen expresado por el vector viral consiste en una proteína de fusión del DREADD mencionado con la proteína fluorescente roja mCherry, que funciona como reportera. Un subgrupo de animales fue tratado con un vector control que permite la expresión de mCherry de forma Cre dependiente (es decir, sin el DREADD).

Para evaluar la especificidad y eficiencia de los vectores virales, realizamos tinciones mediante co-inmunofluorescencia para detectar Somatostatina (Som) y mCherry

(Figura R. 8-A). Primero detectamos todas las células mCherry positivas (Cherry+) y cuantificamos la proporción que colocaliza con Som. Observamos una especificidad del $84\% \pm 7\%$ para el vector que incluye el hM4D y de $87\% \pm 4\%$ para el vector control (media $\pm$ sd; Figura R. 8-B). En paralelo, en las mismas imágenes marcamos el área infectada por la marca de mCherry en el estriado, y en esa región identificamos la proporción de células Som+ que presentaban marca Cherry+. Con esta metodología observamos una eficiencia de infección del $89\% \pm 10\%$ para el vector que incluye el hM4D y de $87\% \pm 10\%$ para el control (Figura R. 8-C). Si bien las inyecciones del vector viral se realizaron con coordenadas estriatales, en muchos animales se pudieron observar células de la corteza piriforme con la marca Cherry (Figura R. 8-A). Aunque no podemos determinar la causa, posiblemente existan conexiones entre la corteza piriforme y el estriado, que justifiquen la presencia de la marca allí. De todas formas, la corteza piriforme se trata de una región ampliamente descrita como clave en el procesamiento de la información olfativa (Blazing & Franks, 2020), y no hemos encontrado literatura que asocie esta estructura con funciones motoras ni movimientos anormales como las discinesias.

Para evaluar el efecto inhibitorio del ligando CNO sobre las células transfectadas utilizamos ratones que expresaban el receptor hM4D para realizar registros de *patch clamp ex vivo*. Las células fueron identificadas por la fluorescencia de Cherry en el estriado y fueron registradas en configuración *cell-attached* en presencia de picrotoxina y DNQX, antes y después del agregado de CNO en el baño. Como control, registramos algunas células por el mismo tiempo sin agregar el ligando. A partir de los 5 minutos desde el agregado del CNO en el baño se pudo observar una tendencia a la disminución en la frecuencia de disparo (Figura R. 8-E) con un efecto significativo a los 30 minutos respecto de la actividad de base (Figura R. 8-F).

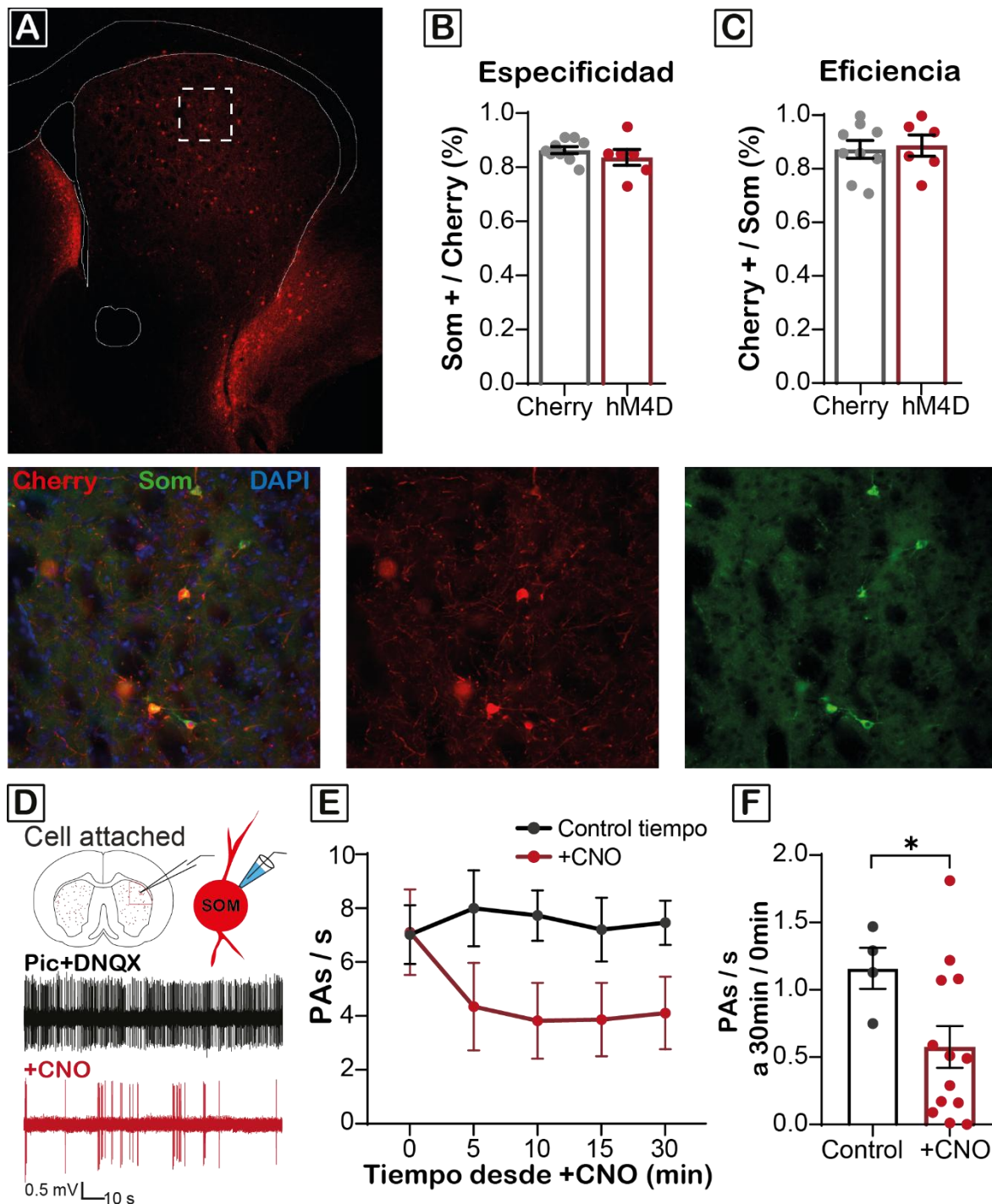


Figura R. 8: Validación histológica y electrofisiológica del DREADD inhibitorio. **A-** Imagen representativa de la transfección con el vector viral en un corte coronal de estriado del hemisferio inyectado. En el panel inferior se detalla el sector delimitado en mayor magnificación, observando los canales de Cherry (medio) y Som (derecha) de forma separada. **B-** Cuantificación de la especificidad del vector, medida como la proporción de las células Cherry+ que son también Som+. **C-** Cuantificación de la eficiencia del vector, medida como la proporción de células Som+ en la región transfectada, que además son Cherry+. Vector Cherry, N=5; vector hM4D-Cherry, N=3 ratones (2 cortes de cada uno). **D-** Esquema mostrando la región del estriado donde se registraron células Cherry+ mediante *Patch clamp* en configuración *cell-attached*. El panel inferior muestra trazos representativos de actividad de una de las células registradas

antes (trazo negro) y después del agregado de CNO en el baño (trazo rojo). **E-** Frecuencia de disparo expresada como potenciales de acción (PAs) por segundo, registrada antes (tiempo cero) y a diferentes tiempos después del agregado de CNO en el baño. **F-** Cuantificación de la frecuencia de disparo 30 minutos después del agregado de CNO, relativa a la frecuencia basal (Mann Whitney test $*p=0.0445$). Control de tiempo $n=4$; $N=3$; CNO $n=10$; $N=7$; (n: células, N: ratones). En todos los casos se muestra media $\pm$ SEM.

R.2.2. Efecto de la inhibición de iSOM sobre los déficits motores del parkinsonismo.

Para evaluar si la inhibición selectiva de las iSOM produce beneficios terapéuticos sobre los déficits motores del modelo de EP que utilizamos, en la misma cirugía, los animales Som-Cre recibieron 6-OHDA o vehículo en el MFB unilateralmente para generar el modelo de parkinsonismo; además, todos los ratones recibieron en el estriado ipsilateral el vector que permite la expresión del hM4D de forma dependiente de Cre. Pasado el periodo de recuperación postquirúrgica, los animales fueron evaluados en los mismos ensayos conductuales mencionados anteriormente: *open field*, test del cilindro y rotarod acelerante. En este caso utilizamos un diseño de cuadrado latino, en el que cada animal es testado una vez luego de la administración de CNO, de modo de inhibir las iSOM, y otra vez luego de la administración de su vehículo, de modo de tener el valor de la conducta en situación experimental y control para cada animal. La mitad de los animales recibió el CNO en la primera repetición del ensayo (indicado en color rosa en el esquema de la **Figura R. 9-A**), mientras que la otra mitad recibió vehículo, (indicado en violeta).

Al finalizar el experimento los animales fueron procesados para analizar de forma histológica el grado de denervación dopaminérgica del estriado y la extensión de la región con células transfectadas. El grado de denervación dopaminérgica fue cuantificado mediante inmunohistoquímica contra TH, que marca las fibras dopaminérgicas de la SNc que inervan el estriado. Determinamos el área del estriado con marca positiva para TH (TH+) en el hemisferio ipsilateral a la lesión y la relativizamos al área positiva del lado control. En los ratones sham, se observó un área TH+ similar en ambos hemisferios por lo que esta relativización resulta cercana al 100%. En el caso de los ratones lesionados con 6-OHDA, el área TH+ del hemisferio ipsilateral es muy baja. Sólo los animales lesionados con 6-OHDA que presentaron una denervación del 80% o más (es decir un área TH+ de hasta el 20% con respecto al lado control) han sido incluidos en el análisis (**Figura R. 9-B**).

Para conocer la proporción de células transfectadas y potencialmente modulables en estos ratones, realizamos tinciones de co-inmunofluorescencia para detectar Som y mCherry, y cuantificamos la proporción de iSOM transfectadas en el estriado. El grado

de transfección se mantuvo por encima del 50% en cada sección del estriado a lo largo del eje antero-posterior, y observando específicamente la región dorso-lateral, este porcentaje aumenta, sobre todo en la región más anterior analizada (**Figura R. 9-C**)

De modo comparable a los resultados mostrados en la sección **R.1.2.1**, los déficits asociados a la lesión dopaminérgica unilateral se manifestaron como asimetría en las rotaciones del cuerpo a favor del lado ipsilateral a la lesión, y en el escaso uso de la pata contralateral durante la exploración vertical. Estos déficits no se vieron afectados por el tratamiento con CNO (**Figura R. 9-D izquierda; Figura R. 9-E**). Otros parámetros locomotores asociados a la lesión, como la menor distancia recorrida en el *open field*, tampoco fueron afectados por el tratamiento con CNO (**Figura R. 9-D derecha**).

La falta de efectos del tratamiento con CNO en los parámetros locomotores y de asimetría, podría deberse a una dosis de CNO insuficiente, sin embargo, la dosis usada (3mg/kg) ha sido efectiva en experimentos diferentes realizados por otros miembros del laboratorio, en condiciones similares y con ratones tratados con el mismo vector viral ([Keifman et al., 2022](#)). De todas maneras, en otra cohorte de ratones lesionados con 6-OHDA, repetimos los ensayos conductuales con una dosis de 5mg/kg de CNO, y obtuvimos resultados comparables (ver **Anexo Figura A.2**), con lo cual podemos descartar la posibilidad de que la falta del efecto se deba a una dosis baja del ligando del DREADD.

Cabe notar que, si bien las dos repeticiones de cada ensayo conductual estuvieron separadas por una semana, se pudieron observar efectos de habituación en el *open field*, como una menor distancia recorrida y un mayor tiempo inmóvil en la segunda repetición, independientemente del grupo experimental y del tratamiento administrado (**Anexo Figura A.2-B**). Para evaluar si este fenómeno estaba enmascarando posibles efectos del CNO, repetimos los análisis tomando los datos de la primera repetición de los ensayos solamente, comparando el grupo que recibió CNO con el que recibió vehículo. En este caso tampoco observamos diferencias significativas que demuestren un efecto de la inhibición de las iSOM sobre los déficits motores evaluados.

En el caso del rotarod acelerante, en el primer día de la prueba (corresponde al día 4 de la evaluación de la conducta, **Figura R. 9-A**), observamos que la inhibición de las iSOM limitó el aprendizaje en el grupo sham, mientras que en el grupo parkinsoniano no se vieron diferencias entre el grupo tratado con CNO y el grupo que recibió vehículo, probablemente debido al efecto piso dado por el hecho de que estos animales ya tienen disminuida la performance y el aprendizaje en este ensayo. Este resultado se evidencia al comparar la diferencia entre la latencia a la caída cuantificada en el último trial del día (trial 5) respecto de la del primer trial (**Figura R. 9-F derecha**). En el segundo día de la prueba, cuando se invirtieron los tratamientos con vehículo y CNO para completar el diseño de cuadrado latino (día 8 según la línea de tiempo del experimento), no se observan diferencias entre los grupos tratados. En este caso la interpretación se

dificulta por la complejidad del diseño de administración de CNO en un contexto en el que las dos repeticiones no son independientes debido al aprendizaje ocurrido en la primera exposición a la prueba. Entonces, consideramos que para esta prueba corresponde evaluar los efectos tomando en cuenta solo la primera exposición; aunque la segunda exposición a la prueba no resultó informativa, permitió que todos los animales pasen a la siguiente etapa del experimento atravesando igual número de exposiciones al CNO.

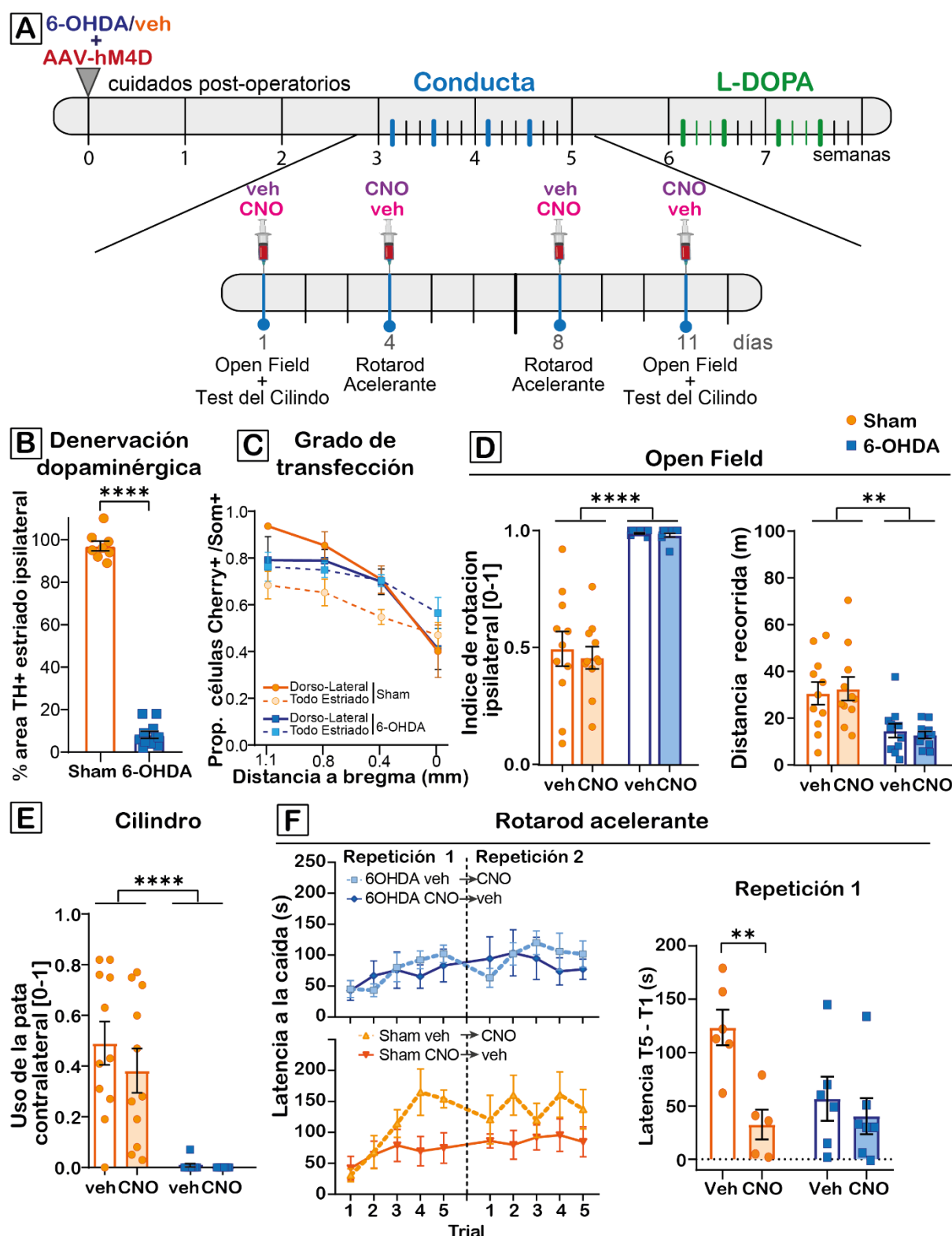


Figura R. 9: Efecto de la inhibición de las iSOM sobre los déficits motores de la EP. **A-** Esquema de la línea temporal del experimento. Todos los animales recibieron el vector que contiene el DREADD hM4D; un grupo de animales recibió 6-OHDA y otro, vehículo (grupo Sham). El diseño experimental es un cuadrado latino en el que todos los animales realizan las pruebas conductuales una vez luego de la administración del ligando CNO y otra vez luego de su vehículo. **B-** Cuantificación de la inmunomarca contra TH en el estriado; se muestra el área TH+ en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA, como porcentaje del área TH+ del lado contralateral

(Mann Whitney test $p < 0.0001$). **C-** Cuantificación de la proporción de células Som+ que expresan Cherry en todo el estriado y sólo en la región dorso-lateral, a distintas coordenadas en el eje antero-posterior. **D-** Parámetros medidos en el *open field*: índice de rotación ipsilateral a la lesión con 6-OHDA (ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, CNO ns, Lesión $p < 0.0001$) y distancia recorrida (ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, CNO ns, Lesión $**p = 0.0020$) durante los 15 minutos que dura el ensayo. **E-** Índice en el uso de la pata delantera contralateral a la lesión en la exploración vertical de las paredes del cilindro (ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, CNO ns, Lesión $p < 0.0001$). **F-** Latencia a la caída en el rotarod acelerante para el grupo 6-OHDA (izquierda arriba) y Sham (izquierda abajo); se indica el tratamiento recibido en cada repetición de la prueba. Diferencia entre la latencia en el trial 5 y el trial 1, en la primera repetición de la prueba (derecha, ANOVA de 2 vías con MR, interacción $*p = 0.0483$, comparaciones post hoc Sidak: $**p = 0.0047$). En todos los casos se muestra media $\pm$ SEM. Sham N=11; 6-OHDA N=11 ratones.

R.2.3. Efecto de la inhibición de iSOM sobre la expresión de LID.

Para evaluar si la inhibición de las iSOM tiene un efecto en la expresión de discinesias ya instaladas, los animales lesionados con 6-OHDA y que expresan el hM4D en las iSOM, comenzaron un tratamiento con L-DOPA (**Figura R. 10-A**). Para poder evaluar efectos moduladores en un rango amplio de severidad de discinesias, realizamos el tratamiento con dosis crecientes de L-DOPA, comenzando por la dosis más baja que corresponde a 3mg/kg en la primera semana, y 6mg/kg en la segunda semana. Como los animales presentan una denervación dopaminérgica casi total (**Figura R. 9-B**), se espera que con la dosis más baja utilizada la mayoría de los animales desarrolle discinesias desde el primer día de tratamiento, y que la severidad aumente con la dosis ([Keifman et al., 2019](#)). El protocolo consiste en 4 dosis semanales de L-DOPA en días consecutivos; el día 3, la mitad de los animales recibe CNO junto con la L-DOPA, mientras que en el día 4, se co-administra L-DOPA con vehículo (grupo marcado con color rosa en la **Figura R. 10**), la otra mitad recibe el tratamiento invertido (grupo marcado en color violeta en la **Figura R. 10**). Los movimientos anormales fueron puntuados en los días 3 y 4 de tratamiento. De esta manera podemos observar el efecto de la inhibición de las iSOM en la expresión de movimientos anormales involuntarios (AIMs) en cada animal.

Con la dosis de L-DOPA de 3 mg/kg no observamos diferencias significativas debidas a la inhibición de las iSOM (**Figura R. 10-B izquierda**), aunque se puede ver un efecto debido al día de tratamiento, con una mayor severidad el día 4 con respecto al día 3 (media $\pm$ SEM: 18.2 ± 4.2 vs 11.8 ± 3.3), independientemente del tratamiento con CNO (**Figura R. 10-B derecha**).

Por otro lado, con la dosis de 6 mg/kg de L-DOPA observamos un 16% de aumento en la severidad de las LID al inhibir las iSOM (**Figura R. 10-C izquierda**) mientras que no se observaron diferencias entre los días de tratamiento (**Figura R. 10-C derecha**).

Para evaluar si las iSOM están involucradas en un tipo particular de movimiento anormal, discriminamos los AIMS según si eran de miembros, axiales u orofaciales. Con la dosis más baja de L-DOPA no encontramos diferencias significativas entre los grupos con y sin CNO en ninguna de las subcategorías (**Figura R. 10-D** panel superior), mientras que para la dosis de 6mg/kg de L-DOPA, observamos que el aumento en la severidad debido a la inhibición de las iSOM se asocia a una mayor severidad de los movimientos anormales de miembros, con un aumento del 13%, y axiales, con un aumento del 18%, pero no orofaciales aunque se ve una tendencia al aumento (**Figura R. 10-D** panel inferior).

Como el experimento se realizó con animales de ambos sexos, evaluamos si había un efecto diferencial en la inhibición de las iSOM sobre la expresión de las LID, y no encontramos diferencias significativas con ninguna de las dosis de L-DOPA (**Figura R. 10-E**).

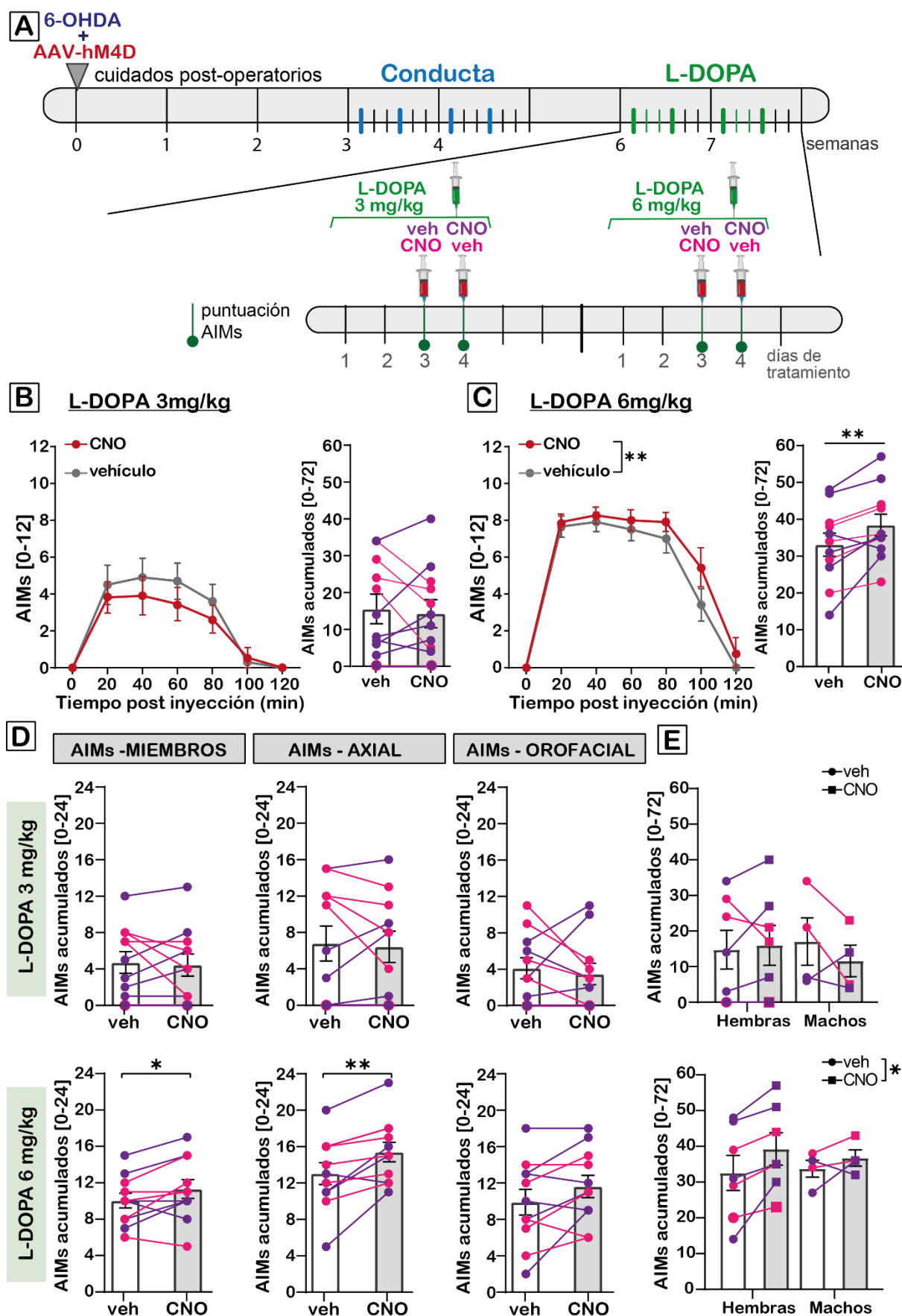


Figura R. 10: Efecto de la inhibición de las iSOM sobre las discinesias ya establecidas. A- Esquema de la línea temporal del experimento, con detalle del tratamiento con L-DOPA. Todos

los animales fueron lesionados con 6-OHDA y recibieron el vector que contiene el hM4D. El diseño experimental permite que los animales desarrollen LID durante 2 días, para posteriormente evaluar el efecto de la inhibición de las iSOM en los días 3 ó 4 de tratamiento con L-DOPA, en los que se coadministra CNO o vehículo con la L-DOPA. **B- Izquierda**, movimientos anormales involuntarios (AIMs) cuantificados durante los días 3 y 4 de tratamiento con la dosis de 3mg/kg L-DOPA, según si los animales recibieron vehículo o CNO (ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, CNO ns, tiempo $p < 0.0001$). **Derecha**, AIMs acumulados en la sesión, según el tratamiento recibido, discriminando por color los que recibieron el CNO el día 3 (puntos rosas) respecto de los que lo recibieron el día 4 (puntos violetas) (test de t pareado en función del tratamiento CNO vs Veh, ns $p = 0.6483$; test de t pareado en función del día 3 vs 4, $**p = 0.0064$). **C-** AIMs cuantificados con la dosis de 6mg de L-DOPA en función del tratamiento con CNO o vehículo (**izquierda**: ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, CNO $**p = 0.0051$, tiempo $p < 0.0001$; **derecha**: test de t pareado en función del tratamiento $**p = 0.0051$, test de t pareado en función del día ns $p = 0.5$). **D-** AIMs acumulados según la coadministración de L-DOPA con CNO o vehículo para cada categoría de movimiento anormal evaluado: de miembros (panel izquierdo), axial (panel del centro) y orofacial (panel derecho) y según las dosis de L-DOPA utilizadas (**panel superior** L-DOPA 3mg/kg, test de t pareado ns en los tres casos; **panel inferior** L-DOPA 6mg/kg, test de t pareado $*p = 0.0455$; $**p = 0.003$; ns $p = 0.0647$). **E-** AIMs acumulados según la coadministración de L-DOPA con CNO o vehículo, discriminando por sexo de los ratones para ambas dosis de L-DOPA (ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, Sexo ns, CNO ns para la dosis L-DOPA 3mg/kg y $*p = 0.0111$ para la de 6mg/kg). Se muestra media $\pm$ SEM. 6-OHDA N=11 ratones.

R.2.4. Efecto de la inhibición de iSOM sobre el desarrollo de LID.

Aunque la degeneración de las neuronas dopaminérgicas es un factor primordial en el desarrollo de las LID, la exposición repetida a L-DOPA produce una sensibilización progresiva que las incrementa. Por ello, investigamos si un co-tratamiento repetido desde el inicio con L-DOPA e inhibición por hM4D tiene un efecto mayor sobre las LID que una única dosis de inhibición por DREADD una vez que las LID se habían establecido. Tratamos otra cohorte de ratones Som-Cre con 6-OHDA para generar el modelo de parkinsonismo; la mitad recibió en el estriado el vector que permite la expresión del hM4D, mientras que la otra mitad recibió un vector control que sólo produce la expresión de la proteína reportera mCherry (**Figura R. 11-A**). Tras la recuperación postquirúrgica, realizamos las pruebas conductuales de rutina para verificar los déficits motores descritos en secciones anteriores: asimetría en las rotaciones del cuerpo, asimetría en el uso de las patas delanteras en la exploración vertical, y bajas latencias a la caída en un rotarod acelerante (**Figura R. 11-B**). Posteriormente todos los animales recibieron un co-tratamiento de L-DOPA y CNO durante 4 días; el día 5 recibieron sólo L-DOPA, de modo de evaluar si la inhibición de iSOM los primeros días había provocado cambios en el circuito local que se manifestaran como una menor severidad de LID. Los movimientos anormales fueron cuantificados los días 1, 4 y 5, y este tratamiento se

repitió durante 3 semanas con dosis crecientes de L-DOPA (**Figura R. 11-A**). Al final del experimento, los animales fueron procesados para cuantificar el grado de denervación dopaminérgica del estriado, y sólo fueron incluidos en el análisis los animales con más de un 80% de denervación (es decir menos de un 20% de área estriatal con fibras TH+). Por otro lado, cuantificamos la proporción de células Som+ del estriado dorsolateral que expresan el reportero del vector viral; para el vector hM4D-Cherry y para el vector Cherry (control) observamos valores entre el 70 y 90% de células transfectadas, en diferentes coordenadas del estriado en el eje antero-posterior (**Figura R. 11-C**).

El desarrollo de las LID fue similar en ambos grupos experimentales el día 5, para todas las dosis de L-DOPA evaluadas (**Figura R. 11-D, E y F, panel superior**). Además, las evaluaciones realizadas los días 1 y 4, bajo efecto del CNO, tampoco mostraron diferencias entre grupos (días 1 y 4) (**Figura R. 11- D, E y F, panel inferior**).

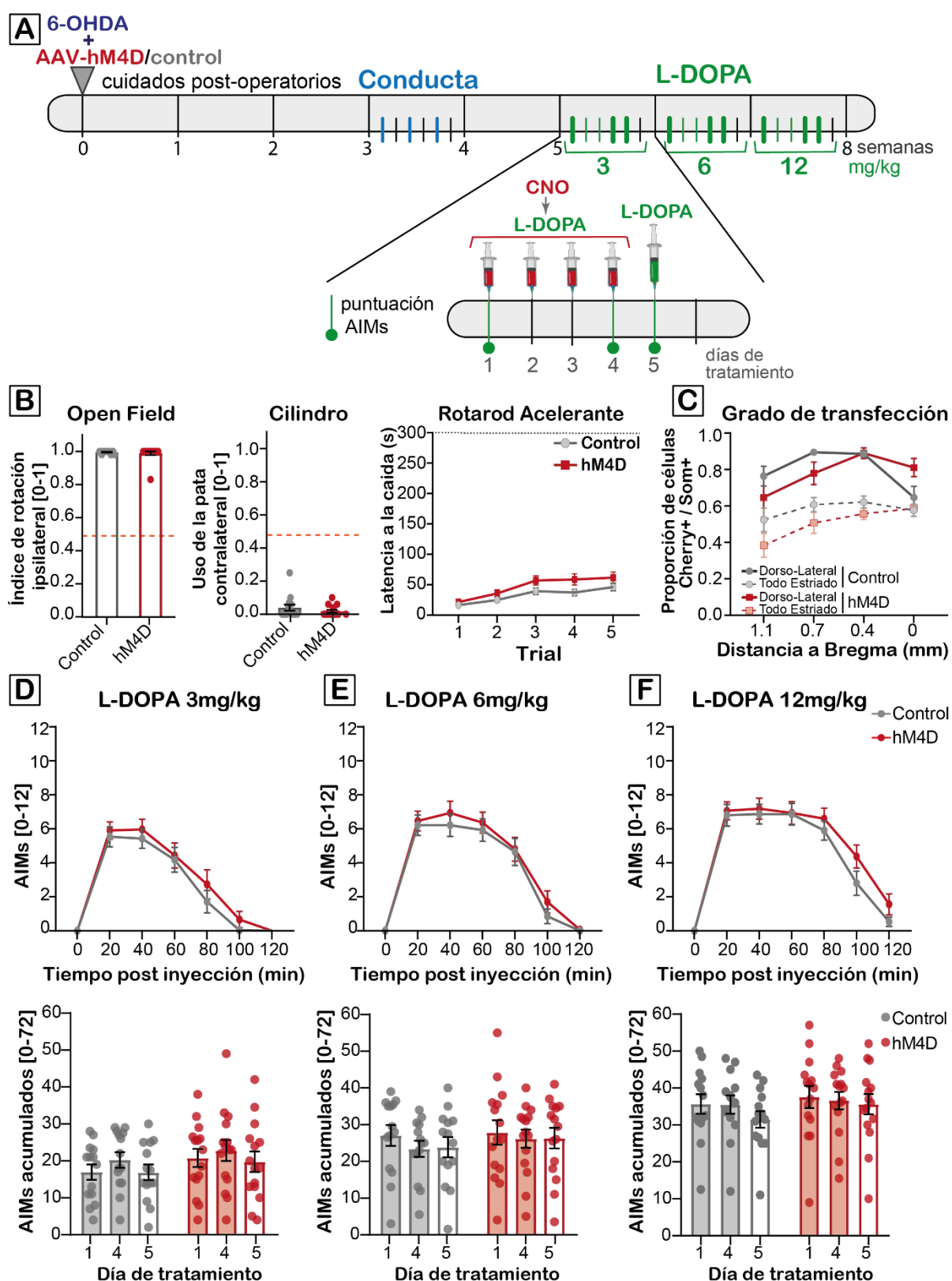


Figura R. 11: Efecto de la inhibición de las iSOM sobre el desarrollo de las discinesias. A- Esquema de la línea temporal del experimento, con detalle del tratamiento con L-DOPA. Todos los animales fueron lesionados con 6-OHDA; la mitad recibió el vector que expresa el hM4D, y la otra mitad recibió un vector control que permite la expresión solamente de la proteína reportera mCherry. Los animales recibieron CNO y L-DOPA durante 4 días; el día 5 fueron evaluados luego

de la administración de L-DOPA solamente. Este esquema se repitió con dosis crecientes de L-DOPA. **B-** Parámetros cuantificados para evaluar los déficits motores causados por la degeneración nigroestriatal en el *open field* (izquierda), test del cilindro (medio) y rotarod acelerante (derecha). La línea punteada naranja indica el valor promedio esperado para ratones control con lesión simulada. **C-** Cuantificación de la proporción de células Som+ que expresan Cherry en el estriado dorso-lateral o en el estriado completo, a distintas coordenadas en el eje antero-posterior (ANOVA de 2 vías con MR sin efecto del tipo de vector viral $p=0.7215$). **D, E y F-** Movimientos anormales involuntarios (AIMs) cuantificados durante el día 5 de tratamiento con cada dosis (**panel superior**, ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, Inhibición ns, tiempo $p<0.0001$) y AIMs acumulados en cada sesión analizada (**panel inferior**, ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, Inhibición ns, día de tratamiento $*p=0.0046$ para L-DOPA 3mg/kg; $**p=0.0451$ para L-DOPA 6mg/kg; $*p=0.0268$ para L-DOPA 12mg/kg). Los días en los que la puntuación se realizó bajo los efectos del CNO están sombreados. En todos los casos se muestra media $\pm$ SEM. Control, N=14 (6H + 8M); hM4D, N=15 (8H + 7M) ratones.

Para evaluar si con este tratamiento puede haber un efecto diferencial en el subtipo de movimiento anormal evaluado, discriminamos los AIMs en categorías: movimientos anormales de miembros, axiales y orofaciales; no observamos diferencias significativas debido a la inhibición de las iSOM (**Figura R. 12-A**).

Por otro lado, al discriminar según el sexo de los animales, observamos una diferencia entre machos y hembras con la dosis más baja de L-DOPA; las hembras presentaron una severidad de LID 47% mayor que los machos; esta diferencia no se replica con las dosis más altas; tampoco observamos efectos debidos a la inhibición (**Figura R. 12-B**). Esta diferencia no puede adjudicarse a un grado de denervación dopaminérgica diferencial entre machos y hembras, ya que no detectamos diferencias entre sexos en el porcentaje de área TH+ remanente en el estriado denervado (**Figura R. 12-C**).

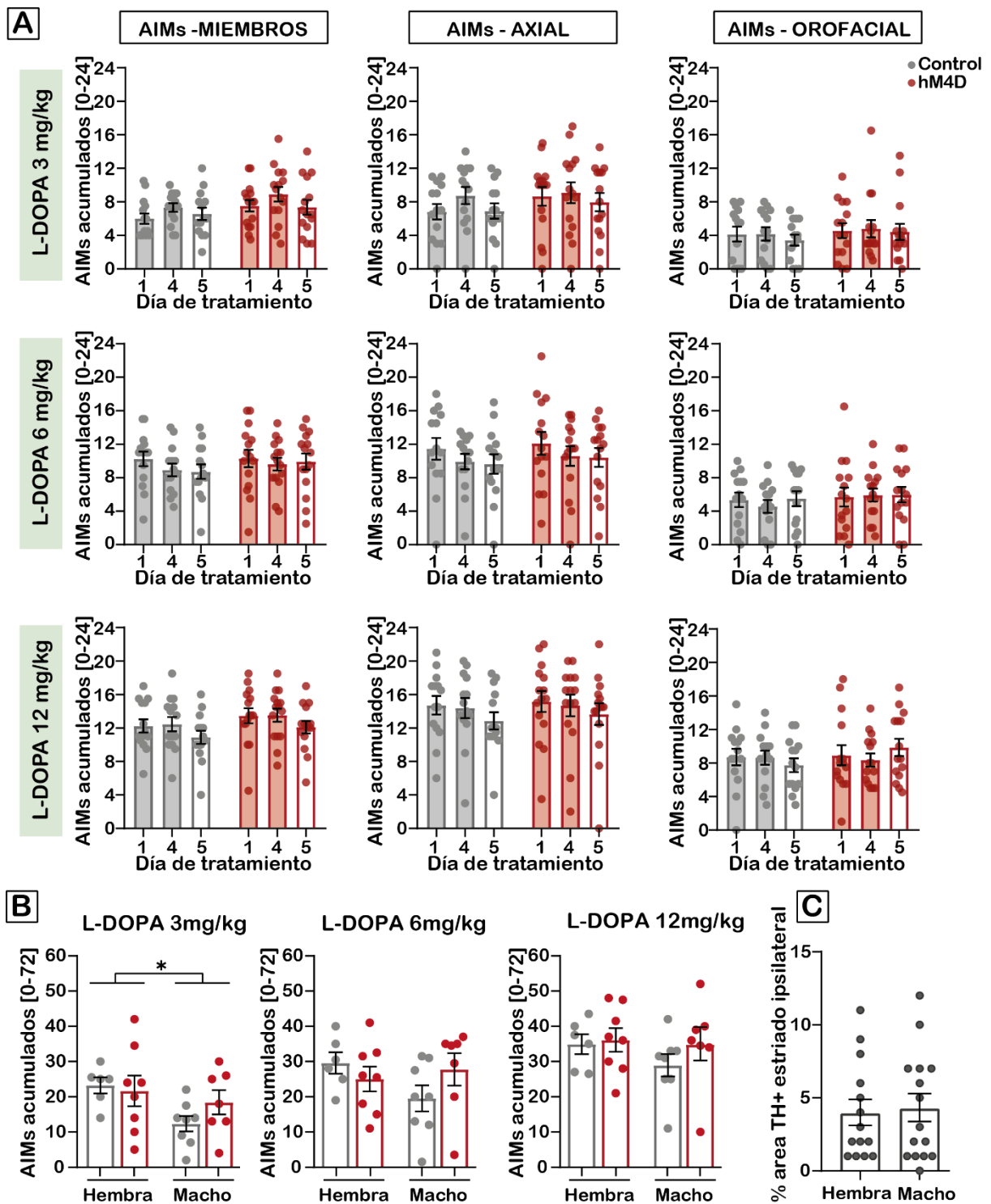


Figura R. 12: Efectos de la inhibición de las iSOM sobre el desarrollo de LID según la categoría de AIM y el sexo. A- AIMs acumulados en cada día de tratamiento según la categoría de movimiento anormal: de miembros (panel izquierdo), Axial (panel del centro) y orofacial (panel derecho) y según las dosis de L-DOPA utilizadas. Los días en los que la puntuación se realizó bajo los efectos del CNO están sombreados (ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns, Inhibición ns, efecto de día significativo para las discinesias de miembros y axiales para las 3 dosis). **B-** AIMs totales acumulados el día 5 de tratamiento, según el sexo de los animales, para las 3 dosis de L-DOPA utilizadas (ANOVA de 2 vías, interacción ns, Inhibición ns, efecto del sexo

significativo $p=0.044$ para la dosis de L-DOPA 3mg/Kg). **C-** Cuantificación de la inmunomarca contra fibras TH+ en el estriado; se muestra el porcentaje del área TH+ en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA, respecto del lado contralateral (test de t no pareado $p=0.801$). En todos los casos se muestra media $\pm$ SEM. Control, N=14 (6H + 8M); hM4D, N=15 (8H + 7M) ratones.

R.2.5. Efectos asociados al tratamiento crónico con L-DOPA.

Con el avance del tratamiento con L-DOPA se observó un acortamiento en el tiempo durante el cual se manifestaron las discinesias; esto se evidencia en que los últimos días de tratamiento la severidad de los movimientos anormales, puntuados de forma acumulada entre los 100 y 120 minutos post inyección, disminuyó con respecto al primer día, y esto ocurrió con todas las dosis de L-DOPA utilizadas (**Figura R. 13-A**). Este resultado podría homologarse al fenómeno de “wearing off” o deterioro de fin de dosis que se observa en pacientes como consecuencia del tratamiento crónico con L-DOPA. Cabe remarcar que, clínicamente, el deterioro de fin de dosis refiere a los efectos terapéuticos de la L-DOPA. En etapas avanzadas de la enfermedad, el *wearing off* suele asociarse a fluctuaciones en la respuesta terapéutica, con periodos con respuesta (*on*) y sin ella (*off*), y discinesias de pico de dosis (Nutt, 2001).

Hacia el final de la ventana de tiempo de acción de L-DOPA, las discinesias merman y se pueden observar algunos signos de mejora terapéutica causados por la medicación. Para evaluar efectos de inhibir las iSOM sobre las acciones terapéuticas “de fin de dosis”, analizamos la conducta de los ratones antes, inmediatamente después, y 72 hs después del último tratamiento con L-DOPA. Para esto, realizamos el test del cilindro de 3 minutos de duración, seguido de un ensayo de *open field* de 5 minutos de duración a los 120 minutos de la última inyección de L-DOPA 12mg/kg. Repetimos los ensayos conductuales luego de tres días de finalizada la administración de L-DOPA.

En el *open field* observamos una recuperación en la locomoción bajo los efectos de la L-DOPA, que incluso persistió parcialmente luego de 3 días de lavado de medicación, presentando valores mayores a la primera evaluación, previa al inicio del tratamiento (**Figura R. 13-B izquierda**). Este efecto terapéutico de larga duración es remarcable considerando que va en dirección contraria a la habituación que comúnmente se observa cuando se repite este tipo de prueba conductual. En cuanto a las rotaciones del cuerpo, vemos que bajo los efectos agudos de la L-DOPA, sólo la mitad de los animales presentaron la asimetría característica del modelo de parkinsonismo, pero todos recuperaron el fenotipo luego de 3 días sin medicación (**Figura R. 13-B derecha**). Es decir, esta manifestación conductual no mostró repuesta de larga duración.

El índice de uso de la pata contralateral en el test del cilindro fue más sensible al efecto terapéutico de corta duración de la L-dopa, en comparación con el índice de rotación en el *open field*, ya que sólo un 20% de animales manifestó fenotipo parkinsoniano 120

minutos después de la administración de L-DOPA. Sorprendentemente, el efecto terapéutico de la L-DOPA sobre el desempeño en el test del cilindro permaneció significativo luego de 3 días del tratamiento (**Figura R. 13-C**), confirmando la existencia de una respuesta de larga duración a la L-DOPA en este modelo experimental.

Por otro lado, no se observaron efectos del tratamiento con CNO en estos experimentos. Cabe señalar que prolongar el efecto terapéutico de una dosis de L-DOPA, es decir, reducir el “tiempo en off”, es una estrategia orientada a optimizar la eficacia clínica de la L-DOPA en el manejo de los síntomas motores.

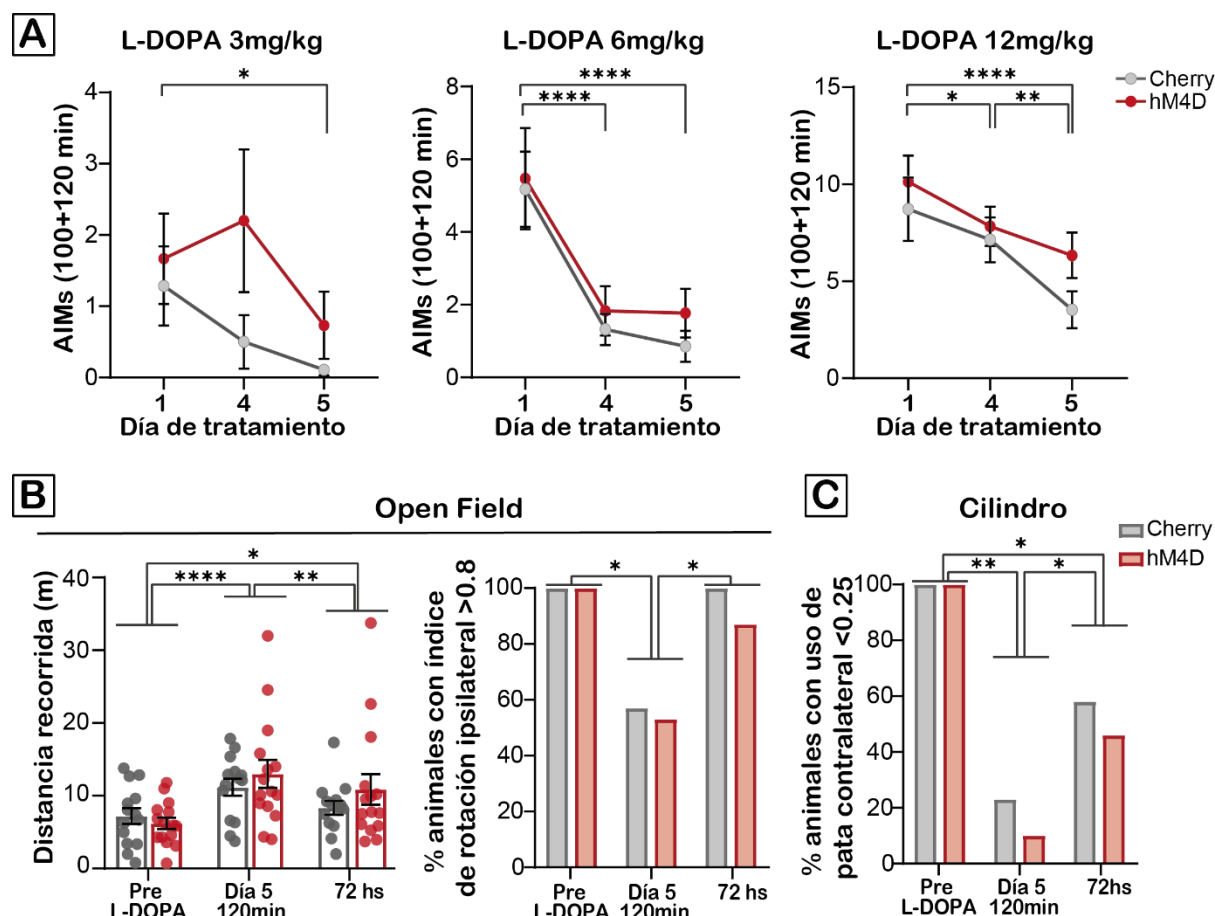


Figura R. 13: Efectos asociados al tratamiento crónico con L-DOPA. **A-** AIMs acumulados en los últimos 20 minutos de la sesión de puntuación (acumulados entre los observados a los 100 y 120 minutos posteriores a la administración de L-DOPA) para cada día de tratamiento, para las 3 dosis de L-DOPA utilizadas (ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns; vector viral ns para las 3 dosis; efecto de día $p=0.0172$ para L-DOPA 3mg/kg; $p<0.0001$ para 6 y 12 mg/kg; comparaciones post hoc de Tukey presentadas en los gráficos). **B y C-** Parámetros medidos en el *open field* y el test del cilindro luego de la lesión nigroestriatal y antes del tratamiento con L-DOPA (“Pre L-DOPA”), el día 5 de tratamiento con L-DOPA 12mg/kg, 120 minutos después de la administración (“Día 5 -120 min”), y 3 días después de la última administración (“72hs”). Distancia recorrida durante los primeros 5 minutos en el *open field* (**B-izquierda**, ANOVA de 2 vías con MR, interacción ns; vector viral ns; efecto de día $p<0.0001$, comparaciones post hoc de Tukey presentadas en el gráfico). Porcentaje de animales con un índice de rotación ipsilateral a la lesión mayor o igual a 0.8, es decir, con fenotipo parkinsoniano según el criterio utilizado (**B-**

derecha, ANOVA de 2 vías, vector viral ns, efecto de día $p=0.0184$, comparaciones post hoc de Tukey presentadas en el gráfico). Porcentaje de animales con un índice de uso de la pata contralateral a la lesión menor o igual a 0.25, es decir, con fenotipo parkinsoniano según el criterio utilizado (**C**, ANOVA de 2 vías vector viral ns, efecto de día $p=0.0074$, comparaciones post hoc de Tukey presentadas en el gráfico).

DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis consistió en evaluar si las interneuronas estriatales que expresan somatostatina (iSOM) tienen un rol en los signos motores asociados con la degeneración nigroestriatal que caracteriza la enfermedad de Parkinson, así como las discinesias que aparecen como un efecto adverso luego del tratamiento crónico con L-DOPA. Esto lo abordamos con registros electrofisiológicos *ex vivo* para evaluar si la actividad intrínseca de las iSOM cambia luego de la lesión dopaminérgica y de la terapia de reemplazo de dopamina; y, usando farmacología en el baño, si se ve afectada la modulación dopaminérgica y colinérgica de las iSOM. Por otro lado, modulamos selectivamente las neuronas iSOM mediante quimiogenética para evaluar el efecto de la inhibición sobre los signos motores. A continuación, discutimos los principales resultados de la tesis.

D.1. Nuevos aspectos clínicos observados en el hemiparkinsonismo experimental inducido por 6-OHDA.

El uso del modelo de parkinsonismo experimental que utilizamos en este trabajo se encuentra muy extendido. Al cruzar los términos *6-hydroxydopamine* and *mouse* en Pubmed se observan más de 2000 registros, mientras que la cruza con *rat*, que fue utilizada primero como modelo, provee más de 10000 documentos. Como se mencionó en la introducción, el modelo que resulta de la administración de la toxina 6-OHDA presenta validez de constructo ya que produce la muerte masiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, y es un buen modelo de la EP avanzada. En esta tesis, esta propiedad del modelo se confirmó mediante el análisis de la abundancia de TH en el estriado y fue de utilidad para evaluar el grado de lesión. Además, presenta validez de apariencia, lo que permite evaluar signos motores asociados a la enfermedad y que correlacionan con el grado de lesión dopaminérgica, como la acinesia del hemicuerpo afectado, y la menor movilidad en general de los animales ([Escande et al., 2016](#)). También presenta validez predictiva, ya que la terapia con L-DOPA puede generar beneficios terapéuticos en dosis bajas y reproducir efectos adversos, incluyendo los movimientos anormales involuntarios denominados discinesias, que se observan en estos estados avanzados de la enfermedad.

En los pacientes también se observan otros fenómenos asociados al tratamiento con L-DOPA: el fenómeno de “wearing off” o deterioro de fin de dosis y la respuesta de larga duración. El fenómeno de **deterioro de fin de dosis o “wearing off”** se manifiesta al avanzar con el tratamiento crónico y refiere a una duración más corta del efecto de cada dosis de L-DOPA, tal que los pacientes vuelven a tener síntomas parkinsonianos antes de tiempo comparado con lo que sucedía con cada dosis al inicio del tratamiento ([Jankovic, 2005](#)). Esto determina que deban ajustarse la dosis de la medicación y la cantidad de dosis. Este fenómeno se pudo observar en los experimentos de esta tesis, al comparar los AIMs de fin de dosis entre la primera y última administración de L-DOPA para todas las dosis de L-DOPA utilizadas (**Figura R. 13-A**).

La **respuesta de larga duración** (o **LDR** por sus siglas en inglés de *Long Duration Response*) refiere a una mejora motora sostenida inducida por un tratamiento crónico con L-DOPA, que va generándose progresivamente al comenzar el tratamiento y se mantiene por días y hasta semanas luego de discontinuarlo. La LDR decae con el avance de la enfermedad, y no hay reportes en modelos murinos de este fenómeno ([Anderson & Nutt, 2011](#)). Luego de 3 días de discontinuar el tratamiento con L-DOPA, hemos podido observar una mejoría en la distancia recorrida de los animales, y en el uso de la pata delantera afectada por la lesión durante la exploración vertical del cilindro (**Figura R. 13-B y C**). El efecto detectado en el *open field* es más leve, pero logra sobrecompensar al efecto esperable por habituación, debido al cual los animales tienden a explorar menores distancias al repetir el ensayo. Según nuestro conocimiento, es la primera vez que se describe el fenómeno de LDR en el modelo animal utilizado.

Cabe remarcar que la LDR suele asociarse a etapas tempranas de la enfermedad, en las que hay todavía cierta capacidad remanente para almacenar DA sintetizada a partir de L-DOPA en las terminaciones dopaminérgicas que aún no degeneraron. Luego la LDR disminuye a medida que progresa la degeneración dopaminérgica. Nuestros datos obtenidos en animales con denervación dopaminérgica casi completa sugieren que, además, debe haber mecanismos adicionales, posiblemente farmacodinámicos (postsinápticos), que contribuyen a la LDR. La observación de este fenómeno abre puertas para investigar los mecanismos de la LDR en modelos animales.

D.2. Aprendizaje motor en el rotarod acelerante.

Como se ha descripto en otros trabajos de modulación o ablación ([Gazan et al., 2019](#); [Holly et al., 2019](#); [Ribeiro et al., 2018](#)), no encontramos efectos de la inhibición de iSOM sobre conductas exploratorias de los ratones sin lesión dopaminérgica, ni tampoco luego de una lesión dopaminérgica (**Figura R. 9**). Los animales parkinsonianos, por tener afectada la coordinación y el balance, muestran menores latencias a la caída en el rotarod acelerante y esto no se vio afectado por la inhibición de las iSOM. Pero en el grupo sham se pudo observar, en la primera exposición a la prueba, un menor aprendizaje motor en animales con inhibición de iSOM, evidenciado como un peor desempeño luego de la exposición repetida a la tarea (**Figura R. 9-F**). Esto indicaría que la **activación de las iSOM es importante en la primera etapa del aprendizaje motor** de esta tarea, y es necesario utilizar un diseño experimental dedicado, para evaluar su papel en etapas posteriores. Recientemente se publicó un trabajo en el que se confirma este resultado, usando un protocolo de entrenamiento en el rotarod de 5 días consecutivos con administración de CNO diaria, observaron una modulación bidireccional del aprendizaje usando un DREADD excitatorio y uno inhibitorio ([Rotariu et al., 2025](#)). En dicho trabajo se demuestra que las iSOM juegan un rol importante en la reorganización de la actividad estriatal durante el aprendizaje motor. Además, en otro trabajo donde los ratones deben seguir patrones de caminata particulares al avanzar

dentro de una rueda para conseguir agua, al cambiar de patrón de caminata se induce la expresión del marcador de actividad c-Fos en las interneuronas nNOS⁺ del estriado dorso-lateral (Nakamura et al., 2017). En una tarea muy diferente, del tipo de aprendizaje operante de conductas dirigidas a metas, se había visto que las iSOM cumplían un rol, en este caso inhibitorio, en las fases iniciales del aprendizaje (Holly et al., 2019). En conjunto, los resultados sugieren que las iSOM cumplen un rol importante en las primeras etapas de aprendizajes motores.

D.3. Expresión de Som durante el desarrollo

Para los registros electrofisiológicos generamos ratones Som-Cre;Tomato, que expresan la proteína fluorescente roja tomato en las neuronas que expresan Somatostatina, lo que permite identificarlas mediante microscopía de fluorescencia. Verificamos que, en ratones adultos, se identifica una población de células tomato⁺ que no expresa Som, que ya fue descrita (Straub et al., 2016). La expresión de tomato en esta población puede deberse a una expresión transitoria del gen de Somatostatina en estas células durante el desarrollo, que no perdura en el estado adulto. Estas células tienen una media de intensidad de fluorescencia de tomato mayor que las neuronas Som⁺ y se encuentran mayoritariamente en una región ventro-lateral del estriado, predominantemente en la región anterior. Si bien resulta interesante analizar diferencialmente las propiedades de las neuronas Tom⁺/Som⁺ y Tom⁺/Som⁻ del estado adulto en ratones Som-Cre;Tomato, en este trabajo nos basamos en su nivel de expresión del reportero y distribución anatómica para registrar preferencialmente la actividad las células Som⁺ del adulto. Así, favorecimos que los registros de actividad electrofisiológicos representaran de mejor manera la población de células que manipulamos en los experimentos de quimiogenética. En este trabajo, dado que los registros fueron realizados en *cell-attached* no se realizó marcaje con trazadores intracelulares para confirmar la expresión de Som *a posteriori* mediante inmunohistoquímica.

D.4. Actividad intrínseca de las iSOM.

Realizamos registros electrofisiológicos de *patch clamp* para conocer la actividad intrínseca de las iSOM. Como se describió anteriormente, hemos podido observar que las iSOM presentan actividad espontánea intrínseca, con un rango de frecuencias de disparo amplio: en el grupo sham reportamos un rango de 3-22 Hz, similar al que se ha reportado en otro trabajo (Beatty et al., 2012). Encontramos que el patrón predominante es tónico regular, con histogramas de ISI predominantemente unimodales; sin embargo, algunas células presentaron un patrón en salvas de potenciales de acción o *bursty* y otras permanecieron silentes (Figura R. 1). En los casos en los que pudimos registrar las neuronas silentes en *whole cell*, pudimos comprobar que muchas veces coincidía con un potencial de membrana despolarizado, compatible con un estado con bloqueo de canales de sodio por despolarización; estas neuronas eran capaces de generar una

actividad sostenida de potenciales de acción, luego de una hiperpolarización prolongada, tal como se describió anteriormente en otros trabajos ([Beatty et al., 2012](#); [Song et al., 2016](#)). Pudimos observar que una misma célula puede presentar los diferentes patrones de actividad, cada uno asociado a un rango de potencial de membrana; esto sugiere que las iSOM pueden alternar entre distintos estados de actividad, restando identificar qué factores promueven dicha alternancia (**Figura R. 1-G**).

D.5. Cambios en la actividad electrofisiológica de iSOM en parkinsonismo y el estado off L-DOPA.

Dado que las iSOM pueden disparar tónicamente por varios minutos y luego silenciarse, ya sea por hiperpolarización o despolarización, y que está descrito que la diálisis del contenido intracelular en registros en configuración *whole cell* puede sesgar los patrones de actividad, continuamos la caracterización de la actividad de las iSOM mediante registros en *cell-attached*, para estudiar los patrones de actividad predominantes en los grupos experimentales, en condiciones de bloqueo sináptico que revelan actividad intrínsecamente generada. Registramos iSOM en rodajas de animales sham, parkinsonianos y discinéticos, un día después de la última dosis de L-DOPA/benserazida.

Dado que las iSOM expresan receptores D5 para dopamina ([Rivera et al., 2002](#)), nuestra expectativa fue encontrar alteraciones en las iSOM, especialmente en ratones discinéticos. Otra población de interneuronas estriatales que también expresan dicho receptor, las iChAT, mostró cambios profundos de actividad en el estado off L-DOPA de ratones discinéticos ([Paz et al., 2021, 2022](#); [Tubert et al., 2025](#)). Además, las dNEM, que expresan el receptor D1, también muestran profundas alteraciones de actividad en ratones parkinsonianos con o sin discinesias ([Girasole et al., 2018](#); [Ryan et al., 2018, 2024](#)). Tanto en las iChAT como dNEM, se observa una sensibilización de la señalización por cAMP y ERK1/2 ([Cenci & Konradi, 2010](#); [Murer & Moratalla, 2011](#)). Hipotetizamos que estos cambios podrían afectar a otros tipos celulares que expresan dichos receptores.

Sin embargo, no encontramos cambios marcados del patrón de disparo en las iSOM. Observamos un corrimiento significativo hacia ISIs más largos en el grupo parkinsoniano lo que se refleja también en una tendencia hacia menor frecuencia de disparo; aunque este último efecto no fue significativo en nuestra muestra (**Figura R. 4-B**), coincide con lo reportado en un trabajo reciente ([Zhai et al., 2024](#)). Estos cambios se asociaron a modificaciones en la distribución de ISIs: para el caso de los parkinsonianos, el rango de ISIs se extiende hacia valores mayores, y genera histogramas más simétricos y con mayor variabilidad de los ISIs; el tratamiento con L-DOPA genera efectos opuestos, acotando el rango de ISIs (**Figura R. 3-D y E**; **Figura R. 4-E**).

Por otro lado, en los experimentos con el antagonista nicotínico mecamilamina, si bien tuvimos una muestra pequeña que probablemente limitó la potencia del análisis, y un sesgo en el muestreo en el grupo discinético que azarosamente incluyó solo células poco activas (**Figura R. 6-D** en comparación con **Figura R. 4-B**), no encontramos un efecto robusto de la mecamilamina sobre las células registradas, comparando antes y después de agregar la droga. A futuro, será valioso ampliar este cuerpo de datos y analizar también la contribución de receptores muscarínicos en la actividad de las iSOM, ya que se ha sugerido que la disminución en la frecuencia luego de la degeneración nigroestriatal podría ser, al menos en parte, debido a la mayor estimulación de estos receptores ([Zhai et al., 2024](#)).

En suma, los resultados indican que luego de la degeneración nigroestriatal las iSOM disminuyen su frecuencia de disparo intrínseco y que esto se asocia a una mayor variabilidad de los ISI, y que un tratamiento crónico con L-DOPA restablece una actividad intrínseca parecida a la normal. Anteriormente se había reportado un cambio en el patrón de disparo hacia actividad en *burst* en una muestra muy pequeña de presuntas iSOM –neuronas estriatales tipo LTS, no identificadas con marcadores moleculares– luego de la degeneración nigroestriatal ([Dehorter et al., 2009](#)). Además, sobre la base de registros realizados en animales normales con la técnica de *whole cell*, se postuló un bucle de interacción mediado por receptores nicotínicos que podría producir oscilaciones sincrónicas entre iSOM e iChAT ([Elghaba et al., 2016](#)). Sin embargo, aunque en nuestra preparación las iChAT muestran una marcada actividad oscilatoria burst-pausas en ratones discinéticos ([Paz et al., 2021](#)), no observamos este fenómeno en las iSOM, que presentaron mayormente actividad tónica sostenida que no se modificó bajo la influencia de un antagonista de receptores nicotínicos. La falta de una identificación molecular precisa y la diálisis del líquido intracelular, entre otros factores, pueden explicar las diferencias con nuestros resultados.

D.6. Cambios en la actividad electrofisiológica de iSOM durante la estimulación aguda de receptores D1/D5.

Demostramos que las iSOM son susceptibles de modulación por agonistas dopaminérgicos vía el receptor D5 que expresan. El tratamiento agudo de iSOM con SKF81297, un agonista dopaminérgico de receptores D1/D5, aumenta su frecuencia de disparo en los tres grupos experimentales. Esta condición simularía la estimulación dopaminérgica directa que reciben las iSOM durante el estado *on* L-DOPA. Los resultados obtenidos con SKF81297 coinciden con la inducción de c-Fos previamente observada en ratones discinéticos en el estado *on* de la medicación (**Figura I. 12**), lo que refuerza que las iSOM *in vivo* se encuentran más activas ante la estimulación dopaminérgica.

Cabe remarcar que, si bien el análisis formal de nuestros datos indica un efecto del SKF81297 en los tres grupos experimentales, el tamaño del efecto fue casi nulo en el grupo discinético (ver **Figura R. 5**), con un aporte pequeño del grupo sham y uno marcado, que posiblemente explica la significación obtenida en el ANOVA, del grupo parkinsoniano. Este resultado es interesante a la luz de datos previos obtenidos en las iChAT, donde observamos una disminución marcada de la respuesta al SKF81297 en ratones discinéticos, pero con efectos dominantes del receptor D5 mediados por mecanismos independientes de ligando ([Paz et al., 2022](#); [Tubert et al., 2025](#)).

Resultaría de interés, en el futuro, comprender por qué las iSOM no muestran los cambios profundos de actividad mediados por receptor D5 que presentan las iChAT en ratones discinéticos. Una posibilidad es que las iSOM carezcan de los canales iónicos que median los efectos observados en las iChAT. En las iChAT, una disminución de corriente mediada por canales Kv1.1/1.3 es responsable de la hiperexcitabilidad observada y un aumento de Kir2.2 promueve las oscilaciones *burst*-pausa ([Paz et al., 2021, 2022](#); [Tubert et al., 2016](#)). Ninguna de estas corrientes parece tener un rol dominante en las iSOM, que tienen una actividad marcapaso dominada por otros mecanismos ([Beatty et al., 2012, 2015](#); [Song et al., 2016](#)). Además, el receptor D5 puede señalizar por vías alternativas al cAMP, promoviendo aumentos del Ca^{+2} intracelular, que podrían predominar en las iSOM ([Hasbi et al., 2010](#); [So et al., 2009](#)).

Resta analizar si la denervación y/o la terapia de reemplazo de dopamina afectan la respuesta de las iSOM ante la estimulación de distintas aferencias y, de observarse, cómo podría eso afectar el circuito estriatal.

D.7. Efectos de la inhibición quimiogénica de las iSOM sobre las LID.

Para evaluar si la inhibición de las iSOM tiene un efecto antiparkinsoniano y/o antidiscinético optamos por una estrategia quimiogénica, que permitió intervenir sobre las iSOM de forma extendida en el tiempo (**Figura R. 9-C**; **Figura R. 11-C**) con altas eficiencia y especificidad (**Figura R. 8-A, B y C**).

Mediante una validación *ex vivo*, observamos que el CNO genera una inhibición en las iSOM de aproximadamente 50% en cuanto a su frecuencia de disparo (**Figura R. 8-D, E y F**). *In vivo*, observamos que, con la dosis utilizada de CNO, con la que observamos efectos conductuales en un estudio previo ([Keifman et al., 2019](#)), se produce una reducción del aprendizaje motor en ratones control. Con esta herramienta, no encontramos diferencias en ninguno de los parámetros medidos como síntomas motores de parkinsonismo (**Figura R. 9-D, E y F**).

Cabe mencionar que, dado que las iSOM de animales parkinsonianos presentaron una disminución de actividad respecto de las iSOM control, podría verse un efecto

terapéutico sobre los signos motores utilizando una estrategia de estimulación más que de inhibición. Realizamos un experimento preliminar utilizando el DREADD excitatorio hM3D acoplado a proteínas Gq, y no observamos diferencias significativas en estos parámetros motores (ver sección del **Anexo A.3**). Sin embargo, resta completar la comprobación electrofisiológica que demuestre que luego del agregado del CNO las células transfectadas aumentan su frecuencia de disparo. La observación de efectos inhibitorios del hM3D en algunas células que registramos nos hace suponer que la estimulación mediada por DREADD de estas neuronas podría favorecer que entren en *depolarization block* e impedir que se encuentren más activas en el circuito. En el futuro sería muy interesante evaluar formas adecuadas para aumentar la actividad de las iSOM en los animales parkinsonianos, ya que este aspecto no ha podido ser abordado enteramente en esta tesis.

Respecto de las LID, realizamos dos protocolos diferentes para poder evaluar el efecto de la inhibición de las iSOM sobre LID ya establecidas y sobre su desarrollo. En el primer caso, observamos que la inhibición de las iSOM genera un leve aumento en la severidad de las LID ya instaladas, con una dosis media de L-DOPA de 6mg/kg (**Figura R. 10-C**), pero no con una dosis menor (**Figura R. 10-B**). Cuando evaluamos el efecto de la inhibición de iSOM desde el primer día de tratamiento con L-DOPA, no encontramos efectos de la inhibición en la expresión de las LID en ninguna etapa del tratamiento, independientemente de la dosis de L-DOPA (**Figura R. 11-D, E y F**). Nuestra interpretación sobre estos resultados es que la plasticidad en el circuito estriatal asociada a la re-estimulación de los receptores dopaminérgicos luego de un período de depleción, recluta a las iSOM y les permite atenuar levemente las LID de forma dependiente de su actividad. Sin embargo, si se las inhibe desde el principio del tratamiento con L-DOPA, se previene la generación de la plasticidad que limita la severidad de las LID. No tenemos información suficiente para entender de qué se trata la plasticidad que se genera en las iSOM: si tiene que ver con la expresión diferencial de receptores, o si involucra el reforzamiento de conexiones con tipos neuronales en particular, pero sería un siguiente paso para investigar en el futuro, contemplando la posibilidad de que potenciar esa plasticidad puede proporcionar beneficio terapéutico sobre las LID. Además, la transfección incompleta obtenida y la posibilidad de que los cambios de actividad de las iSOM se extienden más allá del tiempo acotado durante el cual actúa el DREADD, pueden haber limitado el tamaño de los efectos observados.

Por otro lado, considerando que la enzima nNOS presente en las iSOM requiere de Ca^{+2} y calmodulina para su activación ([Garthwaite, 2008](#)) es posible que la liberación del ON no sea enteramente dependiente de potenciales de acción. Por ejemplo, durante el bloqueo por despolarización las iSOM no disparan potenciales de acción, pero se encuentran suficientemente despolarizadas como para que actúen canales de Ca^{+2} de bajo umbral, con lo cual podría haber una disociación entre disparos de potenciales de acción y liberación de ON. Actualmente aún no disponemos de herramientas fiables que

permitan medir la liberación de ON por parte de las iSOM, y en la literatura hay controversias acerca de si la señalización por ON se encuentra aumentada o disminuida en pacientes, así como en animales modelos de la EP y discinéticos ([Del-Bel et al., 2015](#)), pero varios trabajos han mostrado que diferentes inhibidores de NOS pueden atenuar las LID ([Padovan-Neto et al., 2009](#); [Solís et al., 2015](#); [Takuma et al., 2012](#)), sugiriendo que la vía podría estar sobreestimulada en esta condición. Dicho esto, en este trabajo no podemos descartar que una modulación directa de la producción y/o liberación del ON pueda tener efectos de mayor magnitud o diferentes a los observados en los experimentos de modulación quimiogénica.

CONCLUSIONES

Las iSOM alternan entre distintos tipos de actividad intrínsecamente generada, predominando una actividad tónica del tipo “marcapaso rápido”, diferente a la que ocurre en las iChAT.

Las iSOM muestran una disminución de actividad sin cambios pronunciados en el patrón de disparo en ratones con lesión nigroestriatal crónica, que es parcialmente revertida por la administración crónica de L-DOPA.

La estimulación aguda de receptores para dopamina D1/D5 produce un aumento de la actividad de las iSOM, especialmente en ratones parkinsonianos no tratados, sugiriendo que las iSOM son reclutadas durante el estado *on* L-DOPA.

La inhibición de las iSOM mediante un DRAEDD modula negativamente el aprendizaje motor en ratones normales.

La inhibición quimiogénica de las iSOM aumenta las discinesias inducidas por L-DOPA ya establecidas, hecho que podría indicar que su reclutamiento durante el estado *on* ejerce un efecto antidiscinético.

La inhibición quimiogénica de las iSOM desde el inicio del tratamiento con L-DOPA no previene el desarrollo de discinesias, probablemente, porque su potencial efecto antidiscinético depende de compensaciones que desarrollan las iSOM durante el tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhmedov, D., Mendoza-Rodriguez, M. G., Rajendran, K., Rossi, M., Wess, J., & Berdeaux, R. (2017). Gs-DREADD Knock-In Mice for Tissue-Specific, Temporal Stimulation of Cyclic AMP Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 37(9). <https://doi.org/10.1128/MCB.00584-16>
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Alcacer, C., Santini, E., Valjent, E., Gaven, F., Girault, J. A., & Hervé, D. (2012). Gaolf mutation allows parsing the role of cAMP-dependent and extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling in l-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Journal of Neuroscience*, 32(17), 5900–5910. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0837-12.2012>
- Aldrin-Kirk, P., Heuer, A., Rylander Ottosson, D., Davidsson, M., Mattsson, B., & Björklund, T. (2018). Chemogenetic modulation of cholinergic interneurons reveals their regulating role on the direct and indirect output pathways from the striatum. *Neurobiology of Disease*, 109, 148–162. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2017.10.010>
- Anderson, E., & Nutt, J. (2011). The long-duration response to levodopa: Phenomenology, potential mechanisms and clinical implications. In *Parkinsonism and Related Disorders* (Vol. 17, Issue 8, pp. 587–592). <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.03.014>
- Aosaki, T., Graybiel, A. M., & Kimura, M. (1994). Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5170), 412–415. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8023166>
- Aosaki, T., Kiuchi, K., & Kawaguchi, Y. (1998). Dopamine D1-like receptor activation excites rat striatal large aspiny neurons in vitro. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(14), 5180–5190. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-14-05180.1998>
- Aosaki, T., Miura, M., Suzuki, T., Nishimura, K., & Masuda, M. (2010). Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: An update. *Geriatrics & Gerontology International*, 10, S148–S157. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2010.00588.x>

- Apicella, P. (2002). Tonically active neurons in the primate striatum and their role in the processing of information about motivationally relevant events. *The European Journal of Neuroscience*, 16(11), 2017–2026. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2002.02262.X>
- Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S., & Roth, B. L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 5163–5168. https://doi.org/10.1073/PNAS.0700293104/SUPPL_FILE/00293FIG8.PDF
- Assous, M., Kaminer, J., Shah, F., Garg, A., Koós, T., & Tepper, J. M. (2017). Differential processing of thalamic information via distinct striatal interneuron circuits. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15860>
- Assous, M., & Tepper, J. M. (2019). Excitatory extrinsic afferents to striatal interneurons and interactions with striatal microcircuitry. In *European Journal of Neuroscience* (Vol. 49, Issue 5, pp. 593–603). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ejn.13881>
- Athalye, V. R., Carmena, J. M., & Costa, R. M. (2020). Neural reinforcement: re-entering and refining neural dynamics leading to desirable outcomes. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 60, pp. 145–154). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.11.023>
- Ballion, B., Mallet, N., Bézard, E., Lanciego, J. L., & Gonon, F. (2008). Intratelencephalic corticostriatal neurons equally excite striatonigral and striatopallidal neurons and their discharge activity is selectively reduced in experimental parkinsonism. *European Journal of Neuroscience*, 27(9), 2313–2321. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2008.06192.X>
- Barbeau, A. (1962). The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Canadian Medical Association Journal*, 87(15), 802–807. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13966498>
- Beatty, J. A., Song, S. C., & Wilson, C. J. (2015). Cell-type-specific resonances shape the responses of striatal neurons to synaptic input. *J Neuro-Physiol*, 113, 688–700. <https://doi.org/10.1152/jn.00827.2014.-Neurons>
- Beatty, J. A., Sullivan, M. A., Morikawa, H., & Wilson, C. J. (2012). Complex autonomous firing patterns of striatal low-threshold spike interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 108(3), 771. <https://doi.org/10.1152/JN.00283.2012>

- Bello, E. P., Casas-Cordero, R., Galiñanes, G. L., Casey, E., Belluscio, M. A., Rodríguez, V., Noaín, D., Murer, M. G., & Rubinstein, M. (2017). Inducible ablation of dopamine D2 receptors in adult mice impairs locomotion, motor skill learning and leads to severe parkinsonism. *Molecular Psychiatry*, 22(4), 595–604. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.105>
- Benabid, A. L., Chabardes, S., Mitrofanis, J., & Pollak, P. (2009). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 8(1), 67–81. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70291-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70291-6)
- Bennett, B. D., & Wilson, C. J. (1999). Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(13), 5586–5596. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-13-05586.1999>
- Berlanga, M. L., Simpson, T. K., & Alcantara, A. A. (2005). Dopamine D5 receptor localization on cholinergic neurons of the rat forebrain and diencephalon: A potential neuroanatomical substrate involved in mediating dopaminergic influences on acetylcholine release. *The Journal of Comparative Neurology*, 492(1), 34–49. <https://doi.org/10.1002/cne.20684>
- Bertschinger, N., & Natschläger, T. (2004). Real-time computation at the edge of chaos in recurrent neural networks. *Neural Computation*, 16(7), 1413–1436. <https://doi.org/10.1162/089976604323057443>
- Bevan, M. D., Booth, P. A., Eaton, S. A., & 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), 9438–9452. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-22-09438.1998>
- Birket-Smith, E. (1974). Abnormal involuntary movements induced by anticholinergic therapy. *Acta Neurologica Scandinavica*, 50(6), 801–811. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0404.1974.TB02820.X>
- Blauwendraat, C., Heilbron, K., Vallerger, C. L., Bandres-Ciga, S., von Coelln, R., Pihlstrøm, L., Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Sharma, M., Krohn, L., Siitonen, A., Iwaki, H., Leonard, H., Noyce, A. J., Tan, M., Gibbs, J. R., Hernandez, D. G., Scholz, S. W., Jankovic, J., ... Singleton, A. B. (2019). Parkinson disease age at onset GWAS: defining heritability, genetic loci and α -synuclein mechanisms. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 34(6), 866. <https://doi.org/10.1002/MDS.27659>

- Blazing, R. M., & Franks, K. M. (2020). Odor coding in piriform cortex: mechanistic insights into distributed coding. *Current Opinion in Neurobiology*, 64, 96–102. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2020.03.001>
- Blomeley, C., & Bracci, E. (2005). Excitatory effects of serotonin on rat striatal cholinergic interneurons. *Journal of Physiology*, 569(3), 715–721. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098269>
- Bolam, J. P., Smith, Y., Ingham, C. A., von Krosigk, M., & 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, 73–88. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61339-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61339-4)
- Bordia, T., Perez, X. A., Heiss, J. E., Zhang, D., & Quik, M. (2016). Optogenetic activation of striatal cholinergic interneurons regulates L-dopa-induced dyskinesias. *Neurobiology of Disease*, 91, 47–58. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2016.02.019>
- Bose, A., & Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139, 216–231. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>
- Brown, P. (2007). Abnormal oscillatory synchronisation in the motor system leads to impaired movement. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(6), 656–664. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2007.12.001>
- Buzsáki, G. (2006). Rhythms of the Brain. *Rhythms of the Brain*, 1–464. <https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780195301069.001.0001>
- Buzsáki, G., & Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5679), 1926–1929. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1099745>
- Cains, S., Blomeley, C. P., & Bracci, E. (2012). Serotonin inhibits low-threshold spike interneurons in the striatum. *Journal of Physiology*, 590(10), 2241–2252. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.219469>
- Calzavara, R., Mally, P., & Haber, S. N. (2007). Relationship between the corticostriatal terminals from areas 9 and 46, and those from area 8A, dorsal and rostral premotor cortex and area 24c: an anatomical substrate for cognition to action. *The European Journal of Neuroscience*, 26(7), 2005–2024. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05825.x>
- Cao, C., Li, D., Zhan, S., Zhang, C., Sun, B., & Litvak, V. (2020). L-dopa treatment increases oscillatory power in the motor cortex of Parkinson's disease patients. *NeuroImage. Clinical*, 26. <https://doi.org/10.1016/J.NICL.2020.102255>

- Castello, J., Cortés, M., Malave, L., Kottmann, A., Sibley, D. R., Friedman, E., & Rebolz, H. (2020). The Dopamine D5 receptor contributes to activation of cholinergic interneurons during L-DOPA induced dyskinesia. *Scientific Reports*, 10(1), 102–108. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59011-5>
- Cenci, A., & Konradi, C. (2010). Maladaptive striatal plasticity in l-DOPA-induced dyskinesia. *Progress in Brain Research*, 183, 209–233. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)83011-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)83011-0)
- 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), 105–109. <https://doi.org/10.1007/s00726-001-0116-4>
- Cenci, M. A., & Crossman, A. R. (2018). Animal models of l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 33(6), 889–899. <https://doi.org/10.1002/mds.27337>
- Cenci, M. A., & Lundblad, M. (2007a). Ratings of <scp>L</scp> -DOPA-Induced Dyskinesia in the Unilateral 6-OHDA Lesion Model of Parkinson's Disease in Rats and Mice. *Current Protocols in Neuroscience*, October, 1–23. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0925s41>
- Cenci, M. A., & Lundblad, M. (2007b). Ratings of <scp>L</scp> -DOPA-Induced Dyskinesia in the Unilateral 6-OHDA Lesion Model of Parkinson's Disease in Rats and Mice. *Current Protocols in Neuroscience*, October, 1–23. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0925s41>
- Centonze, D., Picconi, B., Gubellini, P., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2001). Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. In *European Journal of Neuroscience* (Vol. 13, Issue 6, pp. 1071–1077). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01485.x>
- Chambers, N. E., Meadows, S. M., Taylor, A., Sheena, E., Lanza, K., Conti, M. M., & Bishop, C. (2019). Effects of Muscarinic Acetylcholine m1 and m4 Receptor Blockade on Dyskinesia in the Hemi-Parkinsonian Rat. *Neuroscience*, 409, 180–194. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2019.04.008>
- Chang, H. T., & Kitai, S. T. (1982). Large neostriatal neurons in the rat: An electron microscopic study of gold-toned Golgi-stained cells. *Brain Research Bulletin*, 8(6), 631–643. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90091-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90091-0)
- Choi, S. J., Ma, T. C., Ding, Y., Cheung, T., Joshi, N., Sulzer, D., Mosharov, E. V., & Kang, U. J. (2020). Alterations in the intrinsic properties of striatal cholinergic interneurons after dopamine lesion and chronic L-DOPA. *ELife*, 9, 1–24. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.56920>

- Chung, J. W., Burciu, R. G., Ofori, E., Coombes, S. A., Christou, E. A., Okun, M. S., Hess, C. W., & Vaillancourt, D. E. (2018). Beta-band oscillations in the supplementary motor cortex are modulated by levodopa and associated with functional activity in the basal ganglia. *NeuroImage. Clinical*, 19, 559–571. <https://doi.org/10.1016/J.NICL.2018.05.021>
- Connolly, B. S., & Lang, A. E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*, 311(16), 1670–1683. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2014.3654>
- Contant, C., Umbriaco, D., Garcia, S., Watkins, K. C., & Descarries, L. (1996). Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience*, 71(4), 937–947. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00507-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00507-2)
- Costa, R. M., Cohen, D., & Nicolelis, M. A. L. (2004). Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Current Biology*, 14(13), 1124–1134. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.053>
- Courtemanche, R., Fujii, N., & Graybiel, A. M. (2003). Synchronous, focally modulated beta-band oscillations characterize local field potential activity in the striatum of awake behaving monkeys. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(37), 11741–11752. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-37-11741.2003>
- Crutcher, M. D., & DeLong, M. R. (1984). Single cell studies of the primate putamen. II. Relations to direction of movement and pattern of muscular activity. *Experimental Brain Research*, 53(2), 244–258. <https://doi.org/10.1007/BF00238154>
- Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., & Costa, R. M. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, 494(7436), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11846>
- Darmopil, S., Martín, A. B., De Diego, I. R., Ares, S., & Moratalla, R. (2009). Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. *Biological Psychiatry*, 66(6), 603–613. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2009.04.025>
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I. B., Deisseroth, K., Paul Bolam, J., Gerdjikov, T., & Mena-Segovia, J. (2014). A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for*

- Neuroscience*, 34(13), 4509–4518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5071-13.2014>
- DeBoer, P., & Abercrombie, E. D. (1996). Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes - PubMed. *J Pharmacol Exp Ther* ., 277, 775–783. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8627558/>
- DeBoer, P., Abercrombie, E. D., Heeringa, M., & Westerink, B. H. C. (1993). Differential effect of systemic administration of bromocriptine and L-DOPA on the release of acetylcholine from striatum of intact and 6-OHDA-treated rats. *Brain Research*, 608(2), 198–203. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91459-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91459-6)
- Deffains, M., Iskhakova, L., Katabi, S., Haber, S. N., Israel, Z., & Bergman, H. (2016). Subthalamic, not striatal, activity correlates with basal ganglia downstream activity in normal and parkinsonian monkeys. *ELife*, 5(AUGUST). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.16443>
- Deffains, M., Iskhakova, L., Katabi, S., Israel, Z., & Bergman, H. (2018). Longer β oscillatory episodes reliably identify pathological subthalamic activity in Parkinsonism. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 33(10), 1609–1618. <https://doi.org/10.1002/MDS.27418>
- Dehorter, N., Guigoni, C., Lopez, C., Hirsch, J., Eusebio, A., Ben-Ari, Y., & Hammond, C. (2009). Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(24), 7776–7787. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1527-09.2009>
- Del Bel, E., Padovan-Neto, F. E., Bortolanza, M., Tumas, V., Aguiar, A. S., Raisman-Vozari, R., & Prediger, R. D. (2015). Nitric oxide, a new player in L-dopa-induced dyskinesia? *Frontiers in Bioscience - Elite*, 7E(1), 193–221. <https://doi.org/10.2741/E726/PDF>
- Delaville, C., McCoy, A. J., Gerber, C. M., Cruz, A. V., & Walters, J. R. (2015). Subthalamic nucleus activity in the awake hemiparkinsonian rat: relationships with motor and cognitive networks. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(17), 6918–6930. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0587-15.2015>
- Del-Bel, E., Padovan-Neto, F. E., Bortolanza, M., Tumas, V., Aguiar, A. S., Raisman-Vozari, R., & Prediger, R. D. (2015). Nitric oxide, a new player in L-DOPA-induced dyskinesia? *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 7, 168–192. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25553372>

- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90110-V](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-V)
- Demartini, D. R., Schilling, L. P., da Costa, J. C., & Carlini, C. R. (2014). Alzheimer's and Parkinson's diseases: An environmental proteomic point of view. *Journal of Proteomics*, 104, 24–36. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2014.04.014>
- Descarries, L., Gisiger, V., & Steriade, M. (1997). Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Progress in Neurobiology*, 53(5), 603–625. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00050-6)
- DiFiglia, M., & Carey, J. (1986). Large neurons in the primate neostriatum examined with the combined Golgi-electron microscopic method. *The Journal of Comparative Neurology*, 244(1), 36–52. <https://doi.org/10.1002/cne.902440104>
- Ding, J., Guzman, J. N., Tkatch, T., Chen, S., Goldberg, J. A., Ebert, P. J., Levitt, P., Wilson, C. J., Hamm, H. E., & Surmeier, D. J. (2006). RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nature Neuroscience*, 9(6), 832–842. <https://doi.org/10.1038/nn1700>
- Ding, Y., Won, L., Britt, J. P., Lim, S. A. O., McGehee, D. S., & Kang, U. J. (2011). Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 840–845. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006511108>
- Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., Marshall, F. J., Ravina, B. M., Schifitto, G., Siderowf, A., & Tanner, C. M. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68(5), 384–386. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000247740.47667.03>
- Dupre, K. B., Cruz, A. V., McCoy, A. J., Delaville, C., Gerber, C. M., Eyring, K. W., & Walters, J. R. (2016). Effects of L-dopa priming on cortical high beta and high gamma oscillatory activity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 86, 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2015.11.009>
- Duvoisin, R. C. (1967). Cholinergic-Anticholinergic Antagonism in Parkinsonism. *Archives of Neurology*, 17(2), 124–136. <https://doi.org/10.1001/archneur.1967.00470260014002>

- Duysens, J., & Nonnekes, J. (2021). Parkinson's Kinesia Paradoxa Is Not a Paradox. *Movement Disorders*, 36(5), 1115–1118. <https://doi.org/10.1002/MDS.28550>
- Elghaba, R., Vautrelle, N., & Bracci, E. (2016). Mutual Control of Cholinergic and Low-Threshold Spike Interneurons in the Striatum. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 111. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00111>
- Escande, M. V., Taravini, I. R. E., Zold, C. L., Belforte, J. E., & Murer, M. G. (2016). Loss of Homeostasis in the Direct Pathway in a Mouse Model of Asymptomatic Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*, 36(21), 5686–5698. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0492-15.2016>
- Eusebio, A., & Brown, P. (2009). Synchronisation in the beta frequency-band — The bad boy of parkinsonism or an innocent bystander? *Experimental Neurology*, 217(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2009.02.003>
- Eve, D. J., Nisbet, A. P., Kingsbury, A. E., Temlett, J., Marsden, C. D., & Foster, O. J. F. (1997). Selective increase in somatostatin mRNA expression in human basal ganglia in Parkinson's disease. *Molecular Brain Research*, 50(1–2), 59–70. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00172-1](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00172-1)
- Fabbrini, G., Brotchie, J. M., Grandas, F., Nomoto, M., & Goetz, C. G. (2007). Levodopa-induced dyskinesias. *Movement Disorders*, 22(10), 1379–1389. <https://doi.org/10.1002/MDS.21475>
- Farrell, M. S., Pei, Y., Wan, Y., Yadav, P. N., Daigle, T. L., Urban, D. J., Lee, H. M., Sciaky, N., Simmons, A., Nonneman, R. J., Huang, X. P., Hufeisen, S. J., Guettier, J. M., Moy, S. S., Wess, J., Caron, M. G., Calakos, N., & Roth, B. L. (2012). A Gas DREADD Mouse for Selective Modulation of cAMP Production in Striatopallidal Neurons. *Neuropsychopharmacology* 2013 38:5, 38(5), 854–862. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.251>
- Figueredo-Cardenas, G., Morello, M., Sancesario, G., Bernardi, G., & Reiner, A. (1996). Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in striatal interneurons in rats. *Brain Research*, 735(2), 317–324. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00801-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00801-3)
- Fino, E., Glowinski, J., & Venance, L. (2007). Effects of acute dopamine depletion on the electrophysiological properties of striatal neurons. *Neuroscience Research*, 58(3), 305–316. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2007.04.002>
- Francardo, V. (2018). Modeling Parkinson's disease and treatment complications in rodents: Potentials and pitfalls of the current options. *Behavioural Brain Research*, 352, 142–150. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2017.12.014>

- Francardo, V., & Cenci, M. A. (2014). Investigating the molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse. *Parkinsonism and Related Disorders*, 20(SUPPL.1), S20–S22. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70008-7](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70008-7)
- Francardo, V., Recchia, A., Popovic, N., Andersson, D., Nissbrandt, H., & Cenci, M. A. (2011). Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 42(3), 327–340. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2011.01.024>
- Ganguly, G., Chakrabarti, S., Chatterjee, U., & Saso, L. (2017). Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 797–810. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S130514>
- Gao, H.-M., Kotzbauer, P. T., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2008). Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(30), 7687–7698. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0143-07.2008>
- Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *The European Journal of Neuroscience*, 27(11), 2783. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2008.06285.X>
- Gazan, A., Rial, D., & Schiffmann, S. N. (2019). Ablation of striatal somatostatin interneurons affects MSN morphology and electrophysiological properties, and increases cocaine-induced hyperlocomotion in mice. *European Journal of Neuroscience*, ejn.14581. <https://doi.org/10.1111/ejn.14581>
- George, J., Mok, S., Moses, D., Wilkins, S., Bush, A., Cherny, R., & Finkelstein, D. (2009). Targeting the Progression of Parkinson's Disease. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.2174/157015909787602814>
- George, J. S., Strunk, J., Mak-McCully, R., Houser, M., Poizner, H., & Aron, A. R. (2013). Dopaminergic therapy in Parkinson's disease decreases cortical beta band coherence in the resting state and increases cortical beta band power during executive control. *NeuroImage : Clinical*, 3, 261. <https://doi.org/10.1016/J.NICL.2013.07.013>
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4986), 1429–1432. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2147780>

- Gerfen, C. R., Miyachi, S., Paletzki, R., & Brown, P. (2002). D1 Dopamine Receptor Supersensitivity in the Dopamine-Depleted Striatum Results from a Switch in the Regulation of ERK1/2/MAP Kinase. *The Journal of Neuroscience*, 22(12), 5042. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-12-05042.2002>
- Girasole, A. E., Lum, M. Y., Nathaniel, D., Bair-Marshall, C. J., Guenthner, C. J., Luo, L., Kreitzer, A. C., & Nelson, A. B. (2018). A Subpopulation of Striatal Neurons Mediates Levodopa-Induced Dyskinesia. *Neuron*, 97(4), 787-795.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.017>
- Gittis, A. H., Nelson, A. B., Thwin, M. T., Palop, J. J., & Kreitzer, A. C. (2010). Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *Journal of Neuroscience*, 30(6), 2223-2234. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4870-09.2010>
- Glickstein, M., & Stein, J. (1991). Paradoxical movement in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 14(11), 480-482. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90055-Y](https://doi.org/10.1016/0166-2236(91)90055-Y)
- Goetz, C. G. (2024). Historical Perspectives of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a041642. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>
- Gomez, G., Gershanik, O., & Taravini, I. (2019). *Contribución de las interneuronas estriatales al desarrollo de disquinesias inducidas por L-DOPA en un modelo murino de hemiparkinsonismo*. Universidad de Buenos Aires.
- Goudreau, J. L., Pérez, A., Aminoff, M. J., Boyd, J. T., Burau, K. D., Christine, C. W., Leehey, M., & Morgan, J. C. (2016). Choice of dopaminergic therapy among early, mild Parkinson disease subjects in North America. *Journal of the Neurological Sciences*, 366, 74-81. <https://doi.org/10.1016/J.JNS.2016.04.021>
- Graybiel, A. M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 244-254. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90104-I](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90104-I)
- Graybiel, A. M., & Grafton, S. T. (2015). The Striatum: Where Skills and Habits Meet. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a021691. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A021691>
- Group, T. P. S. (2004). Levodopa and the Progression of Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 351(24), 2498-2508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa033447>
- Guettier, J. M., Gautam, D., Scarselli, M., De Azua, I. R., Li, J. H., Rosemond, E., Ma, X., Gonzalez, F. J., Armbruster, B. N., Lu, H., Roth, B. L., & Wess, J. (2009). A

- chemical-genetic approach to study G protein regulation of β cell function in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19197. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0906593106>
- Güttler, C., Altschüler, J., Tanev, K., Böckmann, S., Haumesser, J. K., Nikulin, V. V., Kühn, A. A., & van Riesen, C. (2021). Levodopa-Induced Dyskinesia Are Mediated by Cortical Gamma Oscillations in Experimental Parkinsonism. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 36(4), 927–937. <https://doi.org/10.1002/MDS.28403>
- Haber, S. N. (2014). The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. *Neuroscience*, 282, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.008>
- Haber, S. N., Fudge, J. L., & McFarland, N. R. (2000). Striatonigrostriatal Pathways in Primates Form an Ascending Spiral from the Shell to the Dorsolateral Striatum. *Journal of Neuroscience*, 20(6), 2369–2382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-06-02369.2000>
- Haber, S. N., Kim, K.-S., Maily, P., & Calzavara, R. (2006). Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(32), 8368–8376. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0271-06.2006>
- Hasbi, A., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2010). Heteromerization of dopamine D2 receptors with dopamine D1 or D5 receptors generates intracellular calcium signaling by different mechanisms. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2009.09.011>
- Hathway, G. J., Humphrey, P. P. A., & Kendrick, K. M. (2004). Somatostatin induces striatal dopamine release and contralateral turning behaviour in the mouse. *Neuroscience Letters*, 358(2), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.09.056>
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., & Nakanishi Shigetada, S. (2010). Distinct Roles of Synaptic Transmission in Direct and Indirect Striatal Pathways to Reward and Aversive Behavior. *Neuron*, 66(6), 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.011>
- Hirschmann, J., Özkurt, T. E., Butz, M., Homburger, M., Elben, S., Hartmann, C. J., Vesper, J., Wojtecki, L., & Schnitzler, A. (2013). Differential modulation of STN-cortical and cortico-muscular coherence by movement and levodopa in Parkinson's disease. *NeuroImage*, 68, 203–213. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2012.11.036>

- Holloway, R., Shoulson, I., Fahn, S., Kieburtz, K., Lang, A., Marek, K., McDermott, M., J, S., W, W., B, M., C, K., M, W., A, S., R, P., L, B., J, H., P, L., J, M., O, S., ... A, W. (2004). Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial. *Archives of Neurology*, 61(7), 1044–1053. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.61.7.1044>
- Holly, E. N., Davatolhagh, M. F., Choi, K., Alabi, O. O., Vargas Cifuentes, L., & Fuccillo, M. V. (2019). Striatal Low-Threshold Spiking Interneurons Regulate Goal-Directed Learning. *Neuron*, 103(1), 92-101.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.016>
- Holly, E. N., Davatolhagh, M. F., España, R. A., & Fuccillo, M. V. (2021). Striatal low-threshold spiking interneurons locally gate dopamine. *Current Biology*, 31(18), 4139-4147.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2021.06.081>
- Jackson, M. J., Swart, T., Pearce, R. K. B., & Jenner, P. (2014). Cholinergic manipulation of motor disability and l-DOPA-induced dyskinesia in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated common marmosets. *Journal of Neural Transmission*, 121(2), 163–169. <https://doi.org/10.1007/S00702-013-1082-1/FIGURES/4>
- Jankovic, J. (2005). Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: Clinical manifestations. *Movement Disorders*, 20(S11), S11–S16. <https://doi.org/10.1002/MDS.20458>
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79(4), 368–376. <https://doi.org/10.1136/JNNP.2007.131045>
- Jenkinson, N., & Brown, P. (2011). New insights into the relationship between dopamine, beta oscillations and motor function. *Trends in Neurosciences*, 34(12), 611–618. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2011.09.003>
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Katzenschlager, R., Sampaio, C., Costa, J., & Lees, A. (2003). Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2, CD003735. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003735>
- Kawaguchi, Y. (1992). Large aspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro: physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents. *Journal of Neurophysiology*, 67(6), 1669–1682. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.67.6.1669>

- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(11), 4908–4923. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-11-04908.1993>
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, 18(12), 527–535. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)98374-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)98374-8)
- Keifman, E., Coll, C., Tubert, C., Paz, R. M., Belforte, J. E., Murer, M. G., & Braz, B. Y. (2022). Preserved Motility after Neonatal Dopaminergic Lesion Relates to Hyperexcitability of Direct Pathway Medium Spiny Neurons. *Journal of Neuroscience*, 42(47), 8767–8779. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1992-21.2022>
- Keifman, E., Ruiz-DeDiego, I., Pafundo, D. E., Paz, R. M., Solís, O., Murer, M. G., & Moratalla, R. (2019). Optostimulation of striatonigral terminals in substantia nigra induces dyskinesia that increases after L-DOPA in a mouse model of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*, 176(13), bph.14663. <https://doi.org/10.1111/bph.14663>
- Kimura, M., Rajkowski, J., & Evarts, E. (1984). Tonicly discharging putamen neurons exhibit set-dependent responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(15), 4998–5001. <https://doi.org/10.1073/PNAS.81.15.4998>
- Kondabolu, K., Roberts, E. A., Bucklin, M., McCarthy, M. M., Kopell, N., & Han, X. (2016). Striatal cholinergic interneurons generate beta and gamma oscillations in the corticostriatal circuit and produce motor deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), 3159–3168. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27185924/>
- Koós, T., & Tepper, J. M. (2002). Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(2), 529–535. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-02-00529.2002>
- Koralek, A. C., Jin, X., Long, J. D., Costa, R. M., & Carmena, J. M. (2012). Corticostriatal plasticity is necessary for learning intentional neuroprosthetic skills. *Nature*, 483(7389), 331–335. <https://doi.org/10.1038/nature10845>
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by

- optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>
- Kühn, A. A., Doyle, L., Pogosyan, A., Yarrow, K., Kupsch, A., Schneider, G. H., Hariz, M. I., Trottenberg, T., & Brown, P. (2006). Modulation of beta oscillations in the subthalamic area during motor imagery in Parkinson's disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 129(Pt 3), 695–706. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWH715>
- Kühn, A. A., Kempf, F., Brücke, C., Doyle, L. G., Martinez-Torres, I., Pogosyan, A., Trottenberg, T., Kupsch, A., Schneider, G. H., Hariz, M. I., Vandenberghe, W., Nuttin, B., & Brown, P. (2008). High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus suppresses oscillatory beta activity in patients with Parkinson's disease in parallel with improvement in motor performance. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(24), 6165–6173. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0282-08.2008>
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>
- Lang, A. E., & Lees, A. (2002). Anticholinergic therapies in the treatment of Parkinson's disease. In *Management of Parkinson's disease: an evidence-based review* (Vol. 17, Issue S4, pp. S7–S12). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/mds.5556>
- Leblois, A., Boraud, T., Meissner, W., Bergman, H., & Hansel, D. (2006). Competition between Feedback Loops Underlies Normal and Pathological Dynamics in the Basal Ganglia. *Journal of Neuroscience*, 26(13), 3567–3583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5050-05.2006>
- Lees, A. J., Hardy, J., & Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *The Lancet*, 373(9680), 2055–2066. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60492-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60492-X)
- Lemaire, N., Hernandez, L. F., Hu, D., Kubota, Y., Howe, M. W., & Graybiel, A. M. (2012). Effects of dopamine depletion on LFP oscillations in striatum are task- and learning-dependent and selectively reversed by L-DOPA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), 18126–18131. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1216403109>
- Lester, D. B., Miller, A. D., & Blaha, C. D. (2010). Muscarinic receptor blockade in the ventral tegmental area attenuates cocaine enhancement of laterodorsal tegmentum stimulation-evoked accumbens dopamine efflux in the mouse. *Synapse*, 64(3), 216–223. <https://doi.org/10.1002/syn.20717>

- Little, S., Pogosyan, A., Kuhn, A. A., & Brown, P. (2012). *Beta band stability over time correlates with Parkinsonian rigidity and bradykinesia*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.04.024>
- Lofredi, R., Tan, H., Neumann, W. J., Yeh, C. H., Schneider, G. H., Kühn, A. A., & Brown, P. (2019). Beta bursts during continuous movements accompany the velocity decrement in Parkinson's disease patients. *Neurobiology of Disease*, 127, 462–471. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2019.03.013>
- Lu, J. Q., & Stoessl, A. J. (2002). Somatostatin modulates the behavioral effects of dopamine receptor activation in parkinsonian rats. *Neuroscience*, 112(2), 261–266. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00081-7)
- Macintosh, F. C. (1941). The distribution of acetylcholine in the peripheral and the central nervous system. *The Journal of Physiology*, 99(4), 436–442.
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunken, 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., & Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Neuroscience*, 13(1), 133–140. <https://doi.org/10.1038/nn.2467>
- Mahler, S. V., Brodник, Z. D., Cox, B. M., Buchta, W. C., Bentzley, B. S., Quintanilla, J., Cope, Z. A., Lin, E. C., Riedy, M. D., Scofield, M. D., Messinger, J., Ruiz, C. M., Riegel, A. C., España, R. A., & Aston-Jones, G. (2019). Chemogenetic Manipulations of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons Reveal Multifaceted Roles in Cocaine Abuse. *Journal of Neuroscience*, 39(3), 503–518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0537-18.2018>
- Mallet, N., Schmidt, R., Leventhal, D., Chen, F., Amer, N., Boraud, T., & Berke, J. D. (2016). Arkypallidal Cells Send a Stop Signal to Striatum. *Neuron*, 89(2), 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.017>
- Marchant, N. J., Whitaker, L. R., Bossert, J. M., Harvey, B. K., Hope, B. T., Kaganovsky, K., Adhikary, S., Prinszano, T. E., Vardy, E., Roth, B. L., & Shaham, Y. (2015). Behavioral and Physiological Effects of a Novel Kappa-Opioid Receptor-Based DREADD in Rats. *Neuropsychopharmacology* 2016 41:2, 41(2), 402–409. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.149>
- Matsumoto, N., Minamimoto, T., Graybiel, A. M., & Kimura, M. (2001). Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events. *Journal of Neurophysiology*, 85(2), 960–976. <https://doi.org/10.1152/JN.2001.85.2.960/ASSET/IMAGES/LARGE/9K0211514014.JPEG>

- Maurice, N., Liberge, M., Jaouen, F., Ztaou, S., Hanini, M., Camon, J., Deisseroth, K., Amalric, M., Kerkerian-Le Goff, L., & Beurrier, C. (2015). Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal Ganglia Function in Experimental Parkinsonism. *Cell Reports*, 13(4), 657–666. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.034>
- Maurice, N., Mercer, J., Chan, C. S., Hernandez-Lopez, S., Held, J., Tkatch, T., & Surmeier, D. J. (2004). D2 Dopamine Receptor-Mediated Modulation of Voltage-Dependent Na⁺ Channels Reduces Autonomous Activity in Striatal Cholinergic Interneurons. *J. Neurosci.*, 21(17), 6492–6501. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2155-04.2004>
- McDonald, C., Gordon, G., Hand, A., Walker, R. W., & Fisher, J. M. (2018). 200 Years of Parkinson's disease: what have we learnt from James Parkinson? *Age and Ageing*, 47(2), 209–214. <https://doi.org/10.1093/AGEING/AFX196>
- Melendez-Zaidi, A. E., Lakshminarasimhah, H., & Surmeier, D. J. (2019). Cholinergic modulation of striatal nitric oxide-producing interneurons. *European Journal of Neuroscience*, ejn.14528. <https://doi.org/10.1111/ejn.14528>
- Meredith, G. E., & Kang, U. J. (2006). Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: A new look at an old problem. *Movement Disorders*, 21(10), 1595–1606. <https://doi.org/10.1002/mds.21010>
- Mesulam, M.-M., Mash, D., Hersh, L., Bothwell, M., & Geula, C. (1992). Cholinergic innervation of the human striatum, globus pallidus, subthalamic nucleus, substantia nigra, and red nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 323(2), 252–268. <https://doi.org/10.1002/cne.903230209>
- Moran, R. J., Mallet, N., Litvak, V., Dolan, R. J., Magill, P. J., Friston, K. J., & Brown, P. (2011). Alterations in Brain Connectivity Underlying Beta Oscillations in Parkinsonism. *PLOS Computational Biology*, 7(8), e1002124. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1002124>
- Morris, G., Arkadir, D., Nevet, A., Vaadia, E., & Bergman, H. (2004). Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron*, 43(1), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.012>
- Muñoz-Manchado, A. B., Bengtsson Gonzales, C., Zeisel, A., Munguba, H., Bekkouche, B., Skene, N. G., Lönnerberg, P., Ryge, J., Harris, K. D., Linnarsson, S., & Hjerling-Leffler, J. (2018). Diversity of Interneurons in the Dorsal Striatum Revealed by Single-Cell RNA Sequencing and PatchSeq. *Cell Reports*, 24(8), 2179–2190.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.053>

- Murer, M. G., & Moratalla, R. (2011). Striatal Signaling in L-DOPA-Induced Dyskinesia: Common Mechanisms with Drug Abuse and Long Term Memory Involving D1 Dopamine Receptor Stimulation. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5, 51. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00051>
- Nakamura, T., Nagata, M., Yagi, T., Graybiel, A. M., Yamamori, T., & Kitsukawa, T. (2017). Learning new sequential stepping patterns requires striatal plasticity during the earliest phase of acquisition. *European Journal of Neuroscience*, 45(7), 901–911. <https://doi.org/10.1111/EJN.13537>
- Nambu, A., Tokuno, H., & Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico–subthalamo–pallidal ‘hyperdirect’ pathway. *Neuroscience Research*, 43(2), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00027-5)
- Nutt, J. G. (1990). Levodopa-induced dyskinesia: Review, observations, and speculations. *Neurology*, 40(2), 340–345. <https://doi.org/10.1212/WNL.40.2.340/ASSET/664D6C84-976B-47DD-9BFA-DC94F019E1D2/ASSETS/WNL.40.2.340.FP.PNG>
- Nutt, J. G. (2001). Motor fluctuations and dyskinesia in Parkinson’s disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 8(2), 101–108. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(01\)00024-4](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(01)00024-4)
- Okamoto, S., Sohn, J., Tanaka, T., Takahashi, M., Ishida, Y., Yamauchi, K., Koike, M., Fujiyama, F., & Hioki, H. (2020). Overlapping Projections of Neighboring Direct and Indirect Pathway Neostriatal Neurons to Globus Pallidus External Segment. *iScience*, 23(9). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101409>
- Ozawa, A., & Arakawa, H. (2021). Chemogenetics drives paradigm change in the investigation of behavioral circuits and neural mechanisms underlying drug action. *Behavioural Brain Research*, 406, 166–4328. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2021.113234>
- Ozturk, M., Abosch, A., Francis, D., Wu, J., Jimenez-Shahed, J., & Ince, N. F. (2020). Distinct subthalamic coupling in the ON state describes motor performance in Parkinson’s disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 35(1), 91–100. <https://doi.org/10.1002/MDS.27800>
- Padovan-Neto, F. E., Echeverry, M. B., Tumas, V., & Del-Bel, E. A. (2009). Nitric oxide synthase inhibition attenuates l-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson’s disease. *Neuroscience*, 159(3), 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.034>
- Pavón, N., Martín, A. B., Mendiáldua, A., & Moratalla, R. (2006). ERK Phosphorylation and FosB Expression Are Associated with L-DOPA-Induced Dyskinesia in

- Hemiparkinsonian Mice. *Biological Psychiatry*, 59(1), 64–74.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2005.05.044>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press.
- Paz, R. M., Stahl, A. M., Rela, L., Murer, M. G., & Tubert, C. (2022). D1 / D5 Inverse Agonists Restore Striatal Cholinergic Interneuron Physiology in Dyskinetic Mice. *Movement Disorders*, 37(8), 1693–1706. <https://doi.org/10.1002/mds.29055>
- Paz, R. M., Tubert, C., Stahl, A. M., Amarillo, Y., Rela, L., & Murer, M. G. (2021). Levodopa Causes Striatal Cholinergic Interneuron Burst-Pause Activity in Parkinsonian Mice. *Movement Disorders*, 1–15.
<https://doi.org/10.1002/mds.28516>
- Picconi, B., Bagetta, V., Ghiglieri, V., Paille, V., Filippo, M. Di, Pendolino, V., Tozzi, A., Giampa, C., Fusco, F. R., Sgobio, C., & Calabresi, P. (2011). Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal long-term depression and reduces levodopa-induced dyskinesia. *Brain : A Journal of Neurology*, 134, 375–387.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21183486>
- Piña-Fuentes, D., Little, S., Oterdoom, M., Neal, S., Pogosyan, A., Tijssen, M. A. J., van Laar, T., Brown, P., van Dijk, J. M. C., & Beudel, M. (2017). Adaptive DBS in a Parkinson's patient with chronically implanted DBS: A proof of principle. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(8), 1253–1254. <https://doi.org/10.1002/MDS.26959>
- Pisani, A., Bonsi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2003). Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: Focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 45(1), 45–56.
[https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00137-0)
- Pittman-Polletta, B. R., Quach, A., Mohammed, A. I., Romano, M., Kondabolu, K., Kopell, N. J., Han, X., & McCarthy, M. M. (2018a). Striatal cholinergic receptor activation causes a rapid, selective and state-dependent rise in cortico-striatal β activity. *European Journal of Neuroscience*, 48(8), 2857–2868.
<https://doi.org/10.1111/EJN.13906>
- Pittman-Polletta, B. R., Quach, A., Mohammed, A. I., Romano, M., Kondabolu, K., Kopell, N. J., Han, X., & McCarthy, M. M. (2018b). Striatal cholinergic receptor activation causes a rapid, selective and state-dependent rise in cortico-striatal β activity. *The European Journal of Neuroscience*, 48(8), 2857–2868.
<https://doi.org/10.1111/EJN.13906>

- Ponzi, A., & Wickens, J. R. (2013). Optimal Balance of the Striatal Medium Spiny Neuron Network. *PLOS Computational Biology*, 9(4), e1002954. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1002954>
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 29(13), 1583–1590. <https://doi.org/10.1002/MDS.25945>
- Puspita, L., Chung, S. Y., & Shim, J.-W. (2017). Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Molecular Brain*, 10(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0340-9>
- Qian, D., Li, W., Xue, J., Wu, Y., Wang, Z., Shi, T., Li, S., Yang, J., Qiu, S., Wang, S., Shu, Y., Chen, L., Wang, Q., Yuan, T. F., Zhou, D., & Lu, W. (2022). A striatal SOM-driven ChAT-iMSN loop generates beta oscillations and produces motor deficits. *Cell Reports*, 40(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111111>
- Rafalovich, I. V., Melendez, A. E., Plotkin, J. L., Tanimura, A., Zhai, S., & Surmeier, D. J. (2015). Interneuronal Nitric Oxide Signaling Mediates Post-synaptic Long-Term Depression of Striatal Glutamatergic Synapses. *Cell Reports*, 13(7), 1336–1342. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.015>
- Rascol, O., Brooks, D. J., Korczyn, A. D., De Deyn, P. P., Clarke, C. E., Lang, A. E., Abdalla, M., Harmant, J., Jacquy, J., King, D., Martin, W., Destee, A., Durif, F., Aharon-Peretz, J., Reches, A., Bergamasco, B., Bracco, F., Frattolla, L., Nordera, P., ... Wroe, S. V. (2006). Development of dyskinesias in a 5-year trial of ropinirole and L-dopa. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 21(11), 1844–1850. <https://doi.org/10.1002/MDS.20988>
- Ravel, S., Legallet, E., & Apicella, P. (1999). Tonically active neurons in the monkey striatum do not preferentially respond to appetitive stimuli. *Experimental Brain Research*, 128(4), 531–534. <https://doi.org/10.1007/S002210050876>
- Raz, A., Feingold, A., Zelanskaya, V., Vaadia, E., & Bergman, H. (1996). Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates. *Https://Doi.Org/10.1152/Jn.1996.76.3.2083*, 76(3), 2083–2088. <https://doi.org/10.1152/JN.1996.76.3.2083>
- 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. *Soc NeuroscienceA Raz, V Frechter-Mazar, A Feingold, M Abeles, E Vaadia, H BergmanThe Journal of Neuroscience*, 2001•Soc Neuroscience. <https://www.jneurosci.org/content/jneuro/21/3/RC128.full-text.pdf>

- Reynolds, J. N. J., Awisati, R., Dodson, P. D., Fisher, S. D., Oswald, M. J., Wickens, J. R., & Zhang, Y. F. (2022). Coincidence of cholinergic pauses, dopaminergic activation and depolarisation of spiny projection neurons drives synaptic plasticity in the striatum. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28950-0>
- Ribeiro, E. A., Salery, M., Scarpa, J. R., Calipari, E. S., Hamilton, P. J., Ku, S. M., Kronman, H., Purushothaman, I., Juarez, B., Heshmati, M., Doyle, M., Lardner, C., Burek, D., Strat, A., Pirpinias, S., Mouzon, E., Han, M. H., Neve, R. L., Bagot, R. C., ... Nestler, E. J. (2018). Transcriptional and physiological adaptations in nucleus accumbens somatostatin interneurons that regulate behavioral responses to cocaine. *Nature Communications*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05657-9>
- Rivera, A., Alberti, I., Martín, A. B., Narváez, J. A., De la Calle, A., & Moratalla, R. (2002). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *European Journal of Neuroscience*, 16(11), 2049–2058. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02280.x>
- Rotariu, S., Zalcman, G., Badreddine, N., Appaix, F., Sarno, S., Bureau, I., & Fino, E. (2025). Somatostatin interneurons select dorsomedial striatal representations of the initial motor learning phase. *Cell Reports*, 44(5), 115670. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2025.115670>
- Ryan, M. B., Bair-Marshall, C., & Nelson, A. B. (2018). Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia. *Cell Reports*, 23(12), 3438–3446.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.059>
- Ryan, M. B., Girasole, A. E., Flores, A. J., Twedell, E. L., McGregor, M. M., Brakaj, R., Paletski, R. F., Hnasko, T. S., Gerfen, C. R., & Nelson, A. B. (2024). Excessive firing of dyskinesia-associated striatal direct pathway neurons is gated by dopamine and excitatory synaptic input. *Cell Reports*, 43(8), 114483. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114483>
- Salin, P., López, I. P., Kachidian, P., Barroso-Chinea, P., Rico, A. J., Gómez-Bautista, V., Coulon, P., Kerkerian-Le Goff, L., & Lanciego, J. L. (2009). Changes to interneuron-driven striatal microcircuits in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 34(3), 545–552. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2009.03.006>
- Sanchez, G., Rodriguez, M. J., Pomata, P., Rela, L., & Murer, M. G. (2011). Reduction of an afterhyperpolarization current increases excitability in striatal cholinergic interneurons in rat parkinsonism. *The Journal of Neuroscience : The Official*

- Journal of the Society for Neuroscience*, 31(17), 6553–6564.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6345-10.2011>
- Santini, E., Heiman, M., Greengard, P., Valjent, E., & Fisone, G. (2009). Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. *Science Signaling*, 2(80), ra36. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000308>
- Santis, S., Kastellakis, A., Kotzamani, D., Pitarokoili, K., Kokona, D., & Thermos, K. (2009). Somatostatin increases rat locomotor activity by activating sst2 and sst4 receptors in the striatum and via glutamatergic involvement. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379(2), 181–189. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0346-z>
- Sanz-Blasco, S., Bordone, M. P., Damianich, A., Gomez, G., Bernardi, M. A., Isaja, L., Taravini, I. R., Hanger, D. P., Avale, M. E., Gershanik, O. S., & Ferrario, J. E. (2018). The Kinase Fyn As a Novel Intermediate in L-DOPA-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 55(6), 5125–5136. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0748-3>
- Schulz, J. M., & Reynolds, J. N. J. (2013). Pause and rebound: sensory control of cholinergic signaling in the striatum. *Trends in Neurosciences*, 36(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2012.09.006>
- Sharott, A., Magill, P. J., Harnack, D., Kupsch, A., Meissner, W., & Brown, P. (2005). Dopamine depletion increases the power and coherence of beta-oscillations in the cerebral cortex and subthalamic nucleus of the awake rat. *The European Journal of Neuroscience*, 21(5), 1413–1422. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2005.03973.X>
- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., & Surmeier, D. J. (2008). Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science*, 321(5890), 848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1160575>
- Shen, W., Plotkin, J. L., Francardo, V., Ko, W. K. D., Xie, Z., Li, Q., Fieblinger, T., Wess, J., Neubig, R. R., Lindsley, C. W., Conn, P. J., Greengard, P., Bezard, E., Cenci, M. A., & Surmeier, D. J. (2015). M4 Muscarinic Receptor Signaling Ameliorates Striatal Plasticity Deficits in Models of L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Neuron*, 88(4), 762–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.017>
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 11(3–4), 151–167. <https://doi.org/10.1007/BF03033565>
- Smith, Y., Bevan, † M D, Shink, E., & Bolam, J. P. (1998). *MICROCIRCUITRY OF THE DIRECT AND INDIRECT PATHWAYS OF THE BASAL GANGLIA*. <https://ac.els->

- cdn.com/S0306452298000049/1-s2.0-S0306452298000049-main.pdf?_tid=437e944f-4c61-4175-9c67-03fa7e7c3c4f&acdnat=1548788146_d5aa2e994e3e3b3026816858b5e262c4
- So, C. H., Verma, V., Alijaniam, M., Cheng, R., Rashid, A. J., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2009). Calcium Signaling by Dopamine D5 Receptor and D5-D2 Receptor Hetero-Oligomers Occurs by a Mechanism Distinct from That for Dopamine D1-D2 Receptor Hetero-Oligomers. *Molecular Pharmacology*, 75(4), 843–854. <https://doi.org/10.1124/MOL.108.051805>
- Solís, O., Espadas, I., Del-Bel, E. A., & Moratalla, R. (2015). Nitric oxide synthase inhibition decreases L-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in Pitx3^{-/-} aphakia mice. *Neurobiology of Disease*, 73, 49–59. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2014.09.010>
- Song, S. C., Beatty, J. A., & Wilson, C. J. (2016). The ionic mechanism of membrane potential oscillations and membrane resonance in striatal LTS interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 116(4), 1752–1764. <https://doi.org/10.1152/jn.00511.2016>
- Spyraki, C., Fibiger, H. C., & Phillips, A. G. (1982). Attenuation by Haloperidol of Place Preference Conditioning Using Food Reinforcement. In *Psychopharmacology* (Vol. 77).
- Straub, C., Saulnier, J. L., Bègue, A., Feng, D. D., Huang, K. W., & Sabatini, B. L. (2016). Principles of Synaptic Organization of GABAergic Interneurons in the Striatum. *Neuron*, 92(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.007>
- Surmeier, D. J., Shen, W., Day, M., Gertler, T., Chan, S., Tian, X., & Plotkin, J. L. (2010). The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits. *Progress in Brain Research*, 183, 148–167. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)83008-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)83008-0)
- Takuma, K., Tanaka, T., Takahashi, T., Hiramatsu, N., Ota, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2012). Neuronal nitric oxide synthase inhibition attenuates the development of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-Parkinsonian rats. *European Journal of Pharmacology*, 683(1–3), 166–173. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2012.03.008>
- Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., Kvitsani, D., Fu, Y., Lu, J., Lin, Y., Miyoshi, G., Shima, Y., Fishell, G., Nelson, S. B., & Huang, Z. J. (2011). A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron*, 71(6), 995–1013. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.026>

- Tanimura, A., Du, Y., Kondapalli, J., Wokosin, D. L., & Surmeier, D. J. (2019). Cholinergic Interneurons Amplify Thalamostriatal Excitation of Striatal Indirect Pathway Neurons in Parkinson's Disease Models. *Neuron*, 101(3), 444-458.e6. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.12.004>
- Taravini, I. R., Larramendy, C., Gomez, G., Saborido, M. D., Spaans, F., Fresno, C., González, G. A., Fernández, E., Murer, M. G., & Gershanik, O. S. (2016). Contrasting gene expression patterns induced by levodopa and pramipexole treatments in the rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 101, 576-589. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2015.04.018>
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S. Q., & Costa, R. M. (2016). Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell*, 166(3), 703-715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.032>
- Tecuapetla, F., Matias, S., Dugue, G. P., Mainen, Z. F., & Costa, R. M. (2014). Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5315>
- Tepper, J. M., Koós, T., Ibanez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Faust, T. W., & Assous, M. (2018). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons: Update 2018. In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00091>
- Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koós, T., & Ibáñez-Sandoval, O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 4, Issue DEC, p. 150). Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00150>
- Tinkhauser, G., Pogosyan, A., Tan, H., Herz, D. M., Kühn, A. A., & Brown, P. (2017). Beta burst dynamics in Parkinson's disease OFF and ON dopaminergic medication. *Brain: A Journal of Neurology*, 140(11), 2968-2981. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWX252>
- Triplett, J. C., Zhang, Z., Sultana, R., Cai, J., Klein, J. B., Büeler, H., & 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), 750-765. <https://doi.org/10.1111/jnc.13039>
- Tsang, E. W., Hamani, C., Moro, E., Mazzella, F., Saha, U., Lozano, A. M., Hodaie, M., Chuang, R., Steeves, T., Lim, S. Y., Neagu, B., & Chen, R. (2012). Subthalamic deep brain stimulation at individualized frequencies for Parkinson disease.

- Neurology*, 78(24), 1930–1938.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E318259E183>
- Tubert, C., & Murer, G. (2020). What's wrong with the striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease? Focus on intrinsic excitability. *European Journal of Neuroscience*, 1–32.
- Tubert, C., Paz, R. M., Stahl, A. M., Sanchez Armijos, K. M., Rela, L., & Murer, M. G. (2025). Striatal cholinergic interneuron pause response requires Kv1 channels, is absent in dyskinetic mice, and is restored by dopamine D5 receptor inverse agonism. *ELife*, 13. <https://doi.org/10.7554/eLife.102184>
- Tubert, C., Taravini, I. R. E., Flores-Barrera, E., Sánchez, G. M., Prost, M. A., Avale, M. E., Tseng, K. Y., Rela, L., & Murer, M. G. (2016). Decrease of a Current Mediated by Kv1.3 Channels Causes Striatal Cholinergic Interneuron Hyperexcitability in Experimental Parkinsonism. *Cell Reports*, 16(10), 2749–2762. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.016>
- Twelves, D., Perkins, K. S. M., & Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 18(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/MDS.10305>
- Urban, D. J., & Roth, B. L. (2015). DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): Chemogenetic tools with therapeutic utility. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 55, pp. 399–417). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124803>
- Vardy, E., Robinson, J. E., Li, C., Olsen, R. H. J., DiBerto, J. F., Giguere, P. M., Sassano, F. M., Huang, X. P., Zhu, H., Urban, D. J., White, K. L., Rittiner, J. E., Crowley, N. A., Pleil, K. E., Mazzone, C. M., Mosier, P. D., Song, J., Kash, T. L., Malanga, C. J., ... Roth, B. L. (2015). A New DREADD Facilitates the Multiplexed Chemogenetic Interrogation of Behavior. *Neuron*, 86(4), 936–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.065>
- Wang, D. D., de Hemptinne, C., Miocinovic, S., Ostrem, J. L., Galifianakis, N. B., Luciano, M. S., & Starr, P. A. (2018). Pallidal Deep-Brain Stimulation Disrupts Pallidal Beta Oscillations and Coherence with Primary Motor Cortex in Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(19), 4556–4568. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0431-18.2018>
- West, A. R., & Tseng, K. Y. (2011). Nitric oxide-soluble guanylyl cyclase-cyclic GMP signaling in the striatum: New targets for the treatment of Parkinson's disease? *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5(JUNE 2011). <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00055>

- West, T., Farmer, S., Berthouze, L., Jha, A., Beudel, M., Foltynie, T., Limousin, P., Zrinzo, L., Brown, P., & Litvak, V. (2016). The Parkinsonian subthalamic network: Measures of power, linear, and non-linear synchronization and their relationship to L-DOPA treatment and OFF state motor severity. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10(OCT2016), 223023. <https://doi.org/10.3389/FNHUM.2016.00517/BIBTEX>
- Wider, C., & Wszolek, Z. K. (2007). Clinical genetics of Parkinson's disease and related disorders. *Parkinsonism & Related Disorders*, 13, S229–S232. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(08\)70007-5](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(08)70007-5)
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 5, Issue 6, pp. 483–494). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn1406>
- Wise, R. A., Schwartz, H. V., & SCHWARTZ Pimozide, H. V. (1981). Pimozide Attenuates Acquisition of Lever-Pressing for Food in Rats I. In *Pharmacology Biochemistry & Behavior* (Vol. 15).
- Won, L., Ding, Y., Singh, P., & Kang, U. J. (2014). Striatal cholinergic cell ablation attenuates L-DOPA induced dyskinesia in Parkinsonian mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(8), 3090–3094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2888-13.2014>
- Wyart, V., de Gardelle, V., Scholl, J., & Summerfield, C. (2012). Rhythmic fluctuations in evidence accumulation during decision making in the human brain. *Neuron*, 76(4), 847–858. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2012.09.015>
- Yan, Z., & Surmeier, D. J. (1996). Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2592–2604. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-08-02592.1996>
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2006). Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. *Behavioural Brain Research*, 166(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.07.012>
- Yin, H. H., Mulcare, S. P., Hilário, M. R. F., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M. I., Hansson, A. C., Lovinger, D. M., & Costa, R. M. (2009). Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nature Neuroscience*, 12(3), 333–341. <https://doi.org/10.1038/nn.2261>

- Yin, H. H., Ostlund, S. B., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *European Journal of Neuroscience*, 22(2), 513–523. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04218.x>
- Yu, Y., Sanabria, D. E., Wang, J., Hendrix, C. M., Zhang, J., Nebeck, S. D., Amundson, A. M., Busby, Z. B., Bauer, D. L., Johnson, M. D., Johnson, L. A., & Vitek, J. L. (2021). Parkinsonism Alters Beta Burst Dynamics across the Basal Ganglia–Motor Cortical Network. *Journal of Neuroscience*, 41(10), 2274–2286. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1591-20.2021>
- Zhai, S., Otsuka, S., Xu, J., Ellis-Davies, G. C. R., Contractor, A., James, D., & Correspondence, S. (2024). Ca²⁺-dependent phosphodiesterase 1 regulates the plasticity of striatal spiny projection neuron glutamatergic synapses. *CellReports*, 43, 114540. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114540>
- Ztaou, S., Maurice, N., Camon, J., Guiraudie-Capraz, G., Kerkerian-Le Goff, L., Beurrier, C., Liberge, M., & Amalric, M. (2016). Involvement of striatal cholinergic interneurons and M1 and M4 muscarinic receptors in motor symptoms of parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 36(35), 9161–9172. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0873-16.2016>

ANEXO

A.1. Caracterización histológica de los animales Som-Cre;Tomato.

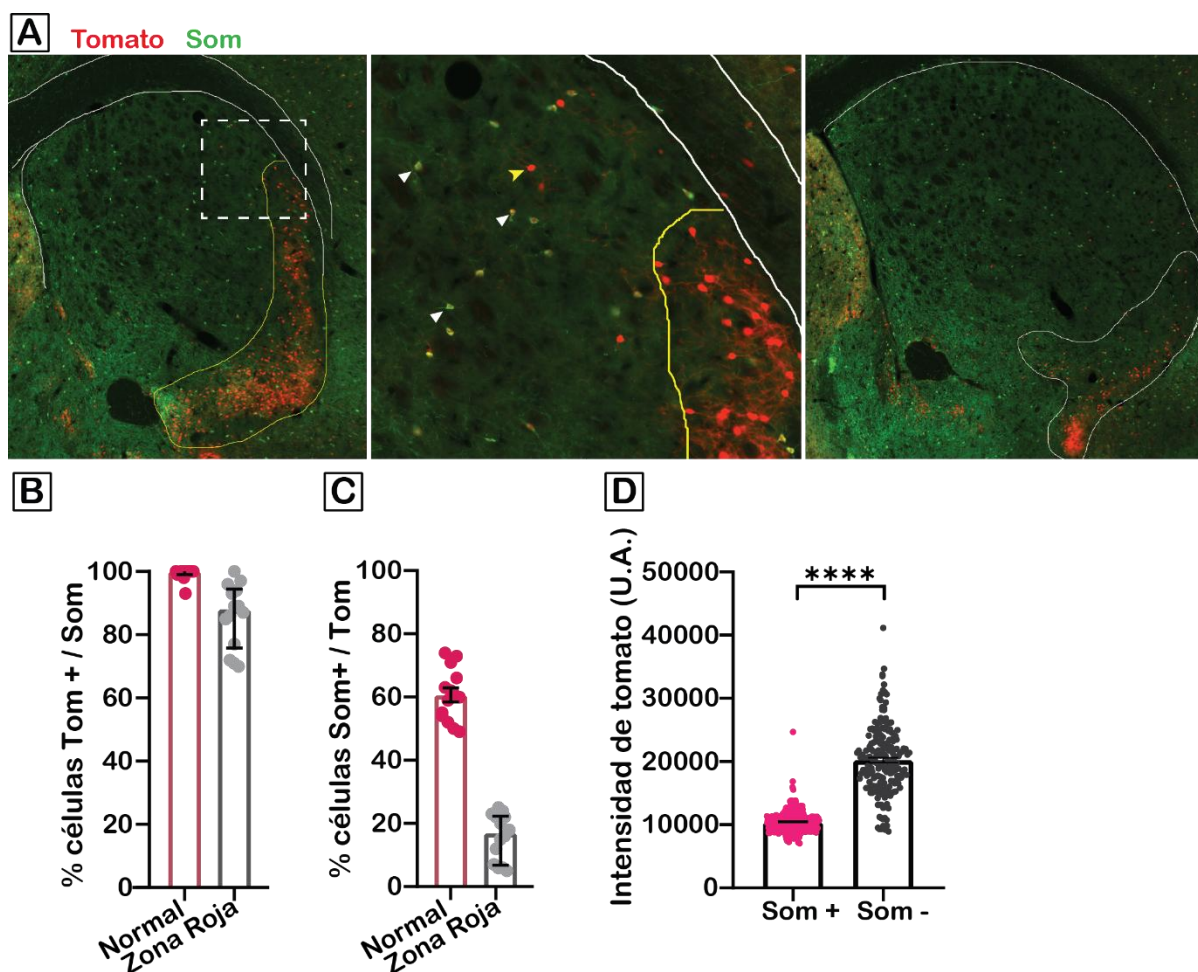


Figura A.1: Caracterización histológica de los animales Som-Cre;Tomato. **A**-Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra Som (verde) en animales som-Cre;Tomato (Tom, en rojo) adultos. En el corte más anterior (1.2 mm de Bregma aprox., imagen de la izquierda), se marca la región con alta densidad de células Tomato+ de mucha intensidad y baja colocalización con Som (denominada aquí como “Zona Roja”). En la Imagen del medio se observa una magnificación de la zona dorso-lateral donde se marcan células Som+/Tom+ (flecha blanca), que son las predominantes en la región del estriado fuera de la “Zona Roja” y algunas pocas Som-/Tom+ cerca de la Zona Roja. En la imagen de la derecha, perteneciente a un corte estriatal más posterior (aprox. 0.8mm de Bregma), se ve que esta zona está reducida. **B**- Cuantificación de la proporción de células Som+ que colocalizan con Tom en las regiones del estriado diferenciadas como normal o Zona Roja. **C**- Cuantificación de la proporción de células Tom+ que

colocalizan con Som en las mismas regiones. **D**- Intensidad de marca fluorescente roja en las células Som+ y Som- (Mann Whitney test $p < 0.0001$).

A.2. Análisis extendido de los efectos de la inhibición de las iSOM sobre los déficits motores de la EP.

Referido a la sección **R.2.2**, una cohorte separada de animales Som-Cre+/- fue lesionada unilateralmente con 6-OHDA para generar el modelo de EP, y tratada ipsilateralmente en el estriado con el vector viral que permite la expresión dependiente de Cre de hM4D. Se siguió el mismo esquema experimental descrito en la **Figura R. 9-A**, pero estos animales lesionados fueron tratados con una dosis mayor de CNO (5mg/kg). Los valores obtenidos en los test conductuales son comparables con los obtenidos con la menor dosis: índice de rotación ipsilateral (**Figura A.2-A izquierda**), velocidad máxima (**Figura A.2-A medio**), porcentaje de la distancia recorrida en el centro del *open field* (**Figura A.2-A derecha**), distancia recorrida (**Figura A.2-B izquierda**) y tiempo de inmovilidad (**Figura A.2-B derecha**). Se vio un efecto de habituación en el *open field*, donde la distancia recorrida fue menor el segundo día de exposición al ensayo y el tiempo de inmovilidad fue mayor, en todos los grupos e independientemente del tratamiento (**Figura A.2-B**). En el test del cilindro tampoco encontramos diferencias en la asimetría del uso de las patas delanteras durante la exploración vertical, entre las dosis de CNO (**Figura A.2-C**), ni en el desempeño en el rotarod acelerante (**Figura A.2-D**).

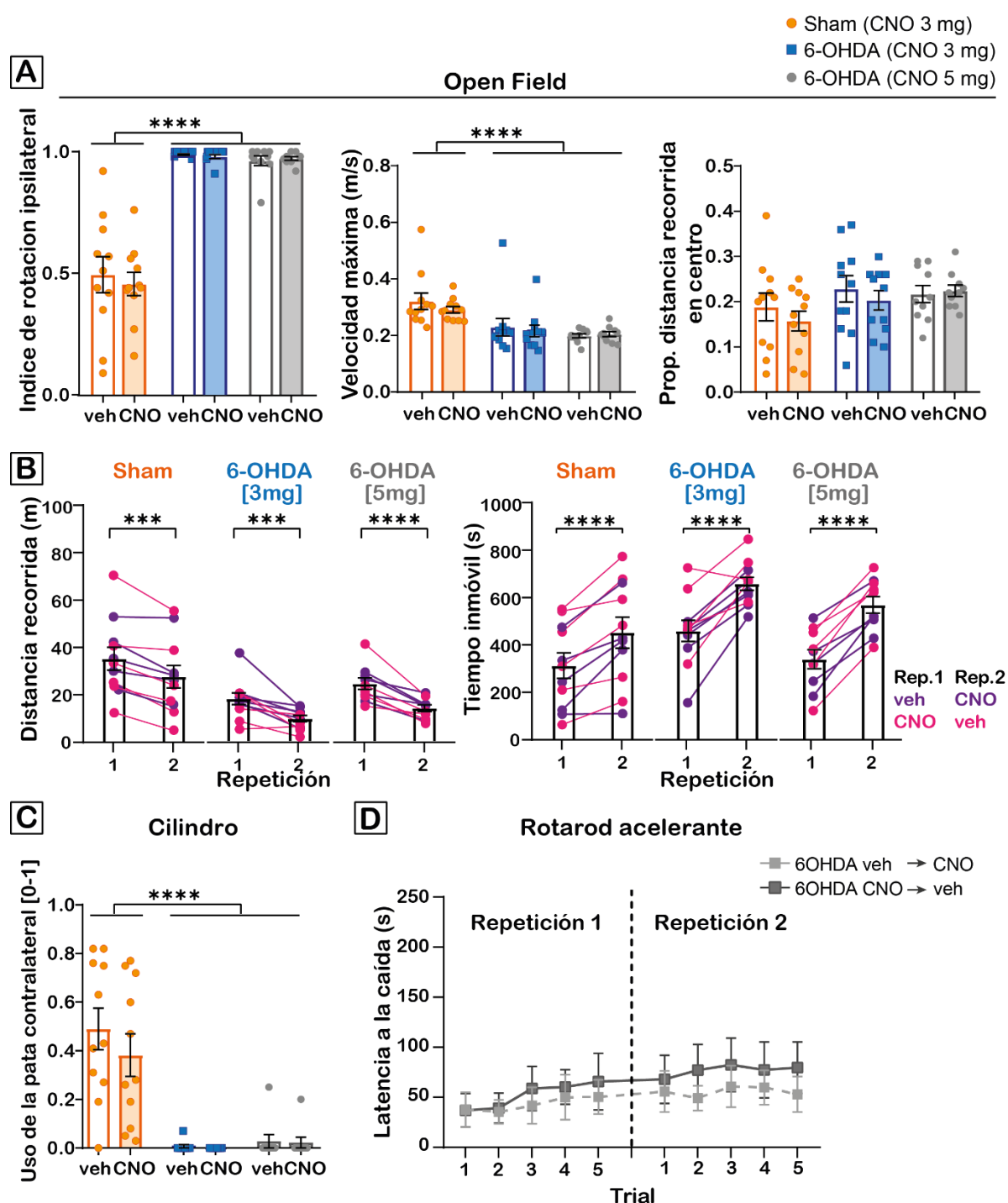


Figura A.2: Análisis extendido de los efectos de la inhibición de las iSOM sobre los déficits motores de la EP. **A-** Algunos parámetros medidos en el open field para los grupos sham y lesionado con 6-OHDA que recibieron una dosis de CNO de 3mg/kg o de 5mg/kg: índice de rotación ipsilateral (ANOVA de 2 vías con MR: interacción ns, CNO ns, Lesión $p < 0.0001$), velocidad máxima (ANOVA de 2 vías con MR: interacción ns, CNO ns, Lesión $p < 0.0001$) y proporción de distancia recorrida en el centro (ANOVA de 2 vías con MR interacción ns, Inhibición ns, Lesión $p = 0.0262$). **B-** Distancia recorrida (ANOVA de 2 vías con MR: interacción ns, Inhibición ns, Lesión $p = 0.0262$) y tiempo de inmovilidad (ANOVA de 2 vías con MR: interacción ns, Inhibición ns, Lesión ns $p = 0.0914$) en el *open field*, representados según el día del ensayo y distinguiendo si los animales recibieron CNO la primera exposición a la prueba (puntos rosas) o

vehículo (violetas). **C-** Índice de uso de la pata delantera contralateral durante la exploración vertical del cilindro (ANOVA de 2 vías de MR interacción ns, CNO ns, Lesión $p < 0.0001$). **D-** Latencia a la caída en el rotarod acelerante en función de los trials de cada día de ensayo para el grupo 6-OHDA tratado con CNO 5mg/kg. Se indica el tratamiento recibido cada día. Sham $n=11$ (3H+8M); 6-OHDA [3mg] $n=11$ (7H + 4M); 6-OHDA [5mg] $n=10$ (6H + 4M) ratones.

A.3. Experimento piloto sobre los efectos de la activación quimiogénica de las iSOM sobre los déficit motores de la EP y las LID.

Realizamos una primera prueba experimental para evaluar el efecto de la activación de las iSOM sobre los síntomas motores de la EP y sobre la expresión de las LID. Como en los experimentos anteriores, en la misma cirugía administramos en el MFB la toxina 6-OHDA y en el estriado el vector viral que permite la expresión de un DREADD excitatorio derivado del receptor muscarínico M3 que se acopla a proteínas Gq, fusionado con una proteína reportera: hM3D-Cherry (AAV8-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry-WPRE-hGPA; Virovek Estados Unidos, plásmido Addgene # 44361).

Pasado el periodo de recuperación postquirúrgica, los animales fueron evaluados en el *open field* y el test del cilindro. De igual forma que con el DREADD inhibitorio, utilizamos un diseño de cuadrado latino, en el que cada animal es testeado una vez luego de la administración de CNO, de modo de activar las iSOM, y otra vez luego de la administración de su vehículo, de modo de tener el valor de la conducta en situación experimental y control para cada animal. La mitad de los animales recibió el CNO en la primera repetición del ensayo (indicado en color rosa en el esquema de la **Figura A.3-A**), mientras que la otra mitad recibió vehículo, (indicado en violeta). Nos quedamos sólo con los datos de los animales que presentaron una denervación dopaminérgica de al menos el 80% (área con fibras TH+ en estriado de hasta el 20%). Los animales presentaron asimetría en el uso de las patas delanteras durante la exploración vertical, y en las rotaciones del cuerpo en exploraciones horizontales, características del modelo de hemiparkinsonismo utilizado, pero no encontramos efectos del CNO en ninguno de los parámetros evaluados en el test del cilindro (**Figura A.3-B**) ni en el *open field* (**Figura A.3-C**).

Respecto al efecto de la activación sobre la expresión de LID, realizamos el mismo protocolo que describimos en la **Figura R. 10**, donde los animales pueden desarrollar discinesias los primeros dos días de tratamiento sólo con L-DOPA, y luego se coadministra CNO o vehículo el día 3 y 4. Utilizamos 3 dosis crecientes de L-DOPA (3mg/kg, 6mg/kg y 12 mg/kg, todas con 12mg/kg de benserazida) en semanas consecutivas (**Figura A.3-A**). Los cuatro animales desarrollaron LID desde el primer día con la dosis más baja, pero no observamos diferencias en la severidad de las LID debidas al tratamiento con CNO en ninguna de las dosis utilizadas (**Figura A.3-D, E y F**).

No pudimos registrar suficientes células Cherry+ en estos animales para la validación electrofisiológica de la herramienta, pero observamos que una célula se silenció a los 15 minutos luego del agregado de CNO luego de una disminución en la amplitud de los potenciales de acción, lo que nos hace suponer que pudo deberse a *depolarization block* (Figura A.3-G).

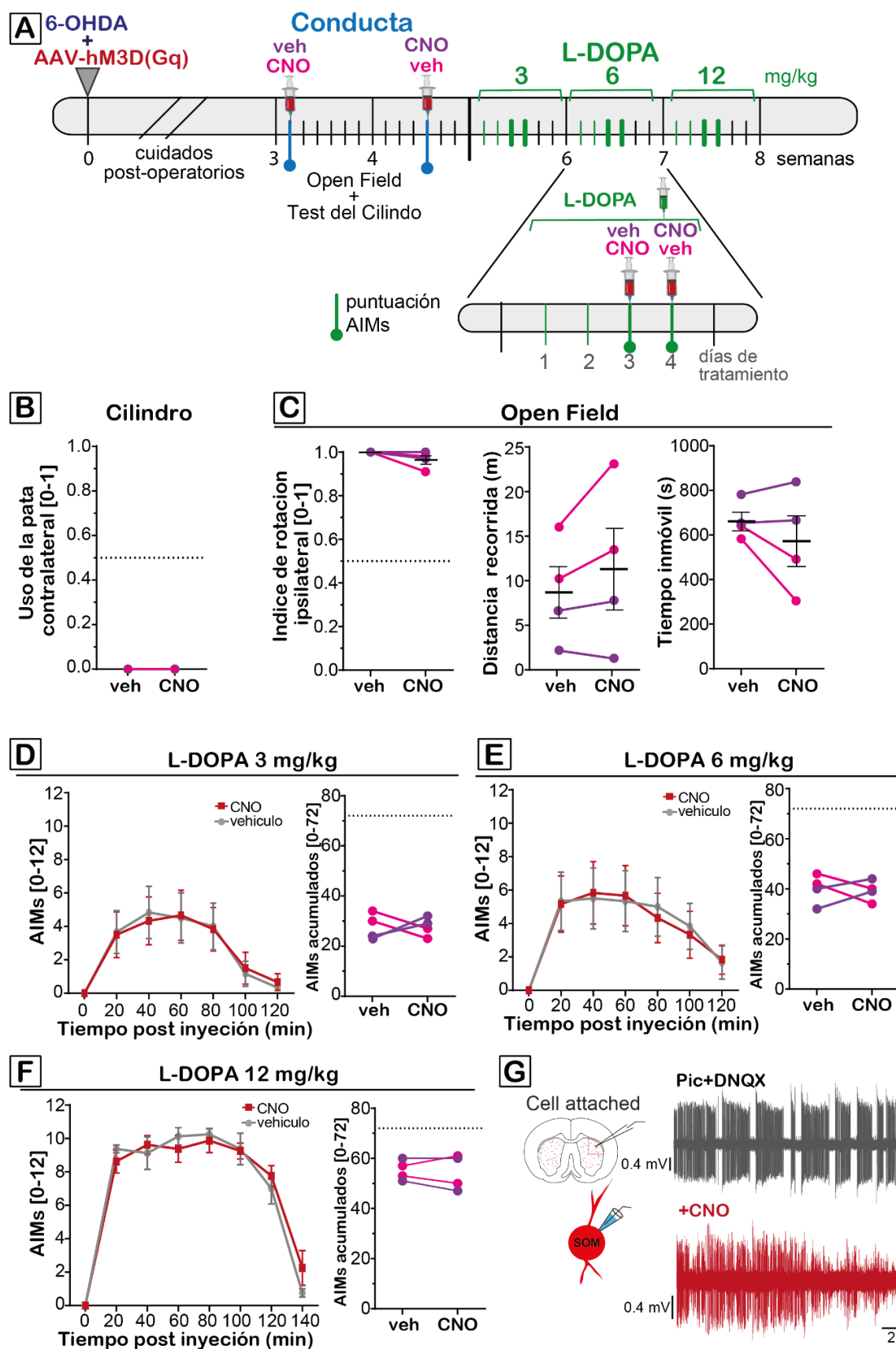


Figura A.3: Resultados preliminares de la evaluación de la activación quimiogénica de las iSOM sobre síntomas motores de la EP y LID. A-Esquema de la línea temporal del experimento, con detalle del tratamiento con L-DOPA. Todos los animales fueron lesionados con 6-OHDA y

recibieron el vector que contiene el hM3D. El diseño experimental es un cuadrado latino en el que todos los animales realizan las pruebas conductuales (*open field* y test del cilindro) una vez luego de la administración del ligando CNO y otra vez luego de su vehículo. Luego se permite que los animales desarrollen LID durante 2 días, para posteriormente evaluar el efecto de la activación de las iSOM en los días 3 ó 4 de tratamiento con L-DOPA, en los que se coadministra CNO o vehículo con la L-DOPA. **B-** Índice en el uso de la pata delantera contralateral a la lesión en la exploración vertical de las paredes del cilindro (prueba de Wilcoxon pareada: *ns*). **C-** Parámetros medidos en el *open field*: índice de rotación ipsilateral a la lesión con 6-OHDA, distancia recorrida y tiempo de inmovilidad durante los 15 minutos que dura el ensayo (prueba de Wilcoxon pareada: *ns* en los tres casos). **D a F-** Izquierda, movimientos anormales involuntarios (AIMs) cuantificados durante los días 3 y 4 de tratamiento con cada dosis, según si los animales recibieron vehículo o CNO (ANOVA de 2 vías con MR: interacción *ns*; CNO *ns*; tiempo $p < 0.0001$ en los tres casos). Derecha, AIMs acumulados en la sesión, según el tratamiento recibido, discriminando por color los que recibieron el CNO el día 3 (puntos rosas) respecto de los que lo recibieron el día 4 (puntos violetas), para las dosis de 3mg/kg (**D**), 6mg/kg (**E**) y 12mg/kg (**F**) de L-DOPA (prueba de Wilcoxon pareada según CNO: *ns*; según día de tratamiento: *ns*, para las tres dosis). **G-** Trazos de una célula Cherry+ del estriado dorso-lateral registrada mediante *Patch clamp* en configuración *cell-attached* antes (trazo negro) y después de 10 minutos del agregado de CNO en el baño (trazo rojo). Se muestra Media $\pm$ SEM. 6-OHDA N=4 ratones.