

## Autores:

Jun Tian<sup>1</sup>, Yaping Yan<sup>1</sup>, Wang Xi<sup>2</sup>, Rui Zhou<sup>2</sup>, Huifang Lou<sup>2</sup>, Shumin Duan<sup>2</sup>, Jiang Fan Chen<sup>3</sup> and Baorong Zhang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, China,

<sup>2</sup> Department of Neurobiology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China,

<sup>3</sup> School of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou Medical University, Wenzhou, China.

## Presentado por:

Clara María MB<sup>4</sup>, Ignacio Pozo Cabanell<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Carrera de Biomedicina, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid.

## OBJETIVOS

- Estudiar si la inhibición de las neuronas GABAérgicas del globo pálido (GP) presenta nuevos objetivos de tratamiento para trastornos de movimiento hiperkinético.
- Mediante el uso de la optogenética, investigar el papel de las neuronas GABAérgicas del globo pálido (GP) y las fibras aferentes glutamatergicas del núcleo subtalámico (STN) presentes en el GP para el control del movimiento.

## INTRODUCCIÓN TEÓRICA

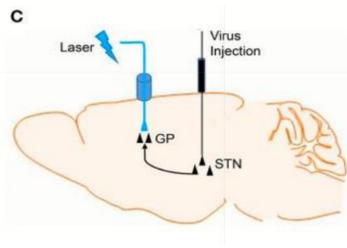
Los ganglios basales (BG), el núcleo subtalámico y la sustancia negra se encargan de recibir y procesar los inputs corticales y regular la actividad cortical.

En roedores, los ganglios basales equivalen al globo pálido (GP) y núcleo entopedular (EPN).

El 95% de las neuronas del GP son neuronas GABAérgicas.

## SUJETOS Y MÉTODOS

- Los sujetos sometidos al experimento fueron ratones transgénicos VGAT-ChR2-EYFP VGAT
- Realizaron cirugía de implante de cánula guía para la estimulación dirigida de ChR2 (Canalrodopsina2) de fibras aferentes glutamatergicas del STN del GP. **Figura 1C**
- Usaron EYFP y GAD67 como marcadores fluorescentes de ChR2 y c-Fos como marcador de actividad neuronal
- Introdujeron mediante inyección viral el virus AAV-CaMKII $\alpha$ -ChR2-mCherry. **Figura 1C**



## RESULTADOS

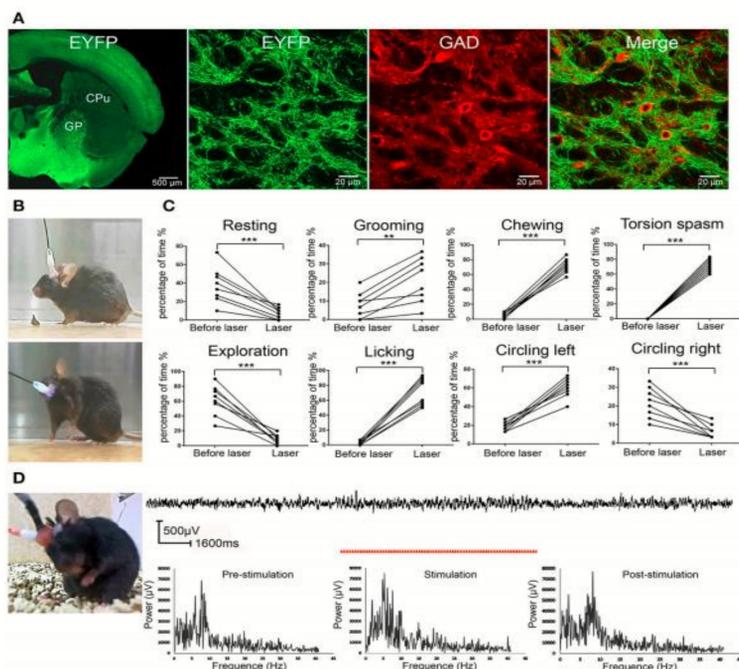
### LA ESTIMULACIÓN ÓPTICA DE NEURONAS GABAÉRGICAS DEL GLOBO PÁLIDO DERECHO PRODUCE HIPERCINESIA

Se comprueba que la expresión de ChR2 era específica de las neuronas GABAérgicas bajo el control del promotor VGAT, que dirige la expresión selectiva de ChR2 en dichas neuronas de estos ratones.

Por la colocalización de EYFP y GAD67 se demuestra la expresión exclusiva y estimulación dirigida de ChR2 en neuronas GABAérgicas. **Figura 2A**

Se descartó una posible actividad epiléptica mediante la realización de un EEG seguido de un FFT.

Mediante la fotoestimulación dirigida (pulsos de 5ms a 20 Hz durante 10-30 s) se activaron las ChR2 de las neuronas GABAérgicas.



Para cuantificar los comportamientos anormales, estudiamos los siguientes comportamientos: 1. reposo (despierto sin movimiento); 2. aseo (limpiándose los bigotes con los miembros delanteros); 3. exploración; 4. lamida; 5. masticación; 6. espasmo de torsión; 7. giro a la izquierda; y 8. giro a la derecha.

Bajo condiciones normales, los ratones mostraron comportamientos más estereotipados (descanso, exploración y aseo), mientras que durante estimulación óptica, los ratones mostraron comportamientos más discinesicos (lamido y masticación) y distonía (torsión y giros). **Figura 2C**

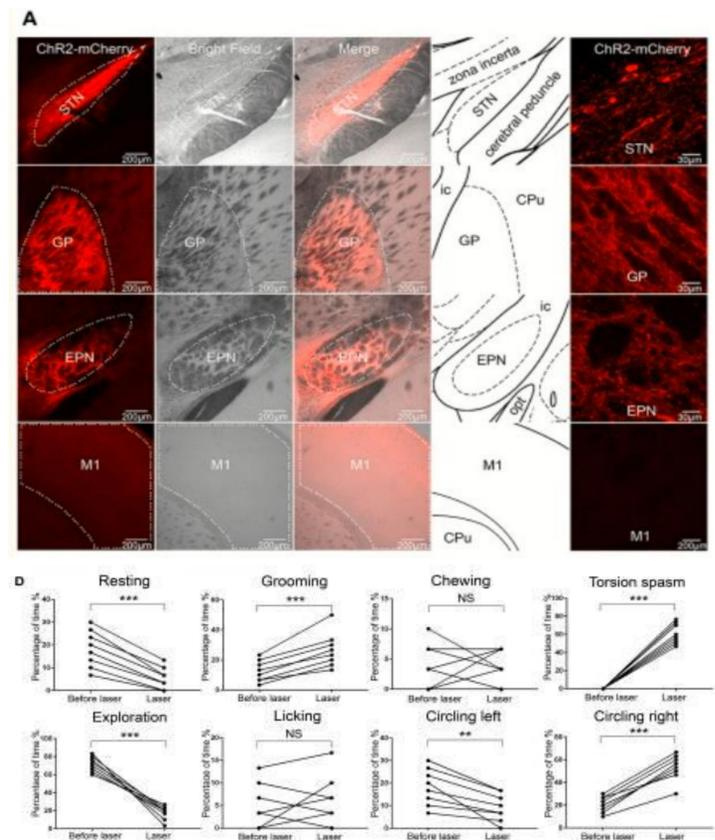
### LA ESTIMULACIÓN DE LAS FIBRAS AFERENTES GLUTAMATÉRGICAS DEL NÚCLEO SUBTALÁMICO (NST) EN EL GP POR LA ChR2 PRODUCE DISCINESIA

Se estimularon las neuronas del GP a través de la activación de sus entradas excitatorias desde el STN mediante:

- Inyección del virus AAV-CaMKII $\alpha$ -ChR2-mCherry, con el fin de introducir ChR2 en las neuronas glutamatergicas.
- Estimulación de la luz en el GP para estudiar la actividad neuronal. (No se observó actividad en M1)

Tras la estimulación ChR2 en las neuronas glutamatergicas del GP, los ratones mostraron movimientos estereotipados (aseo) y comportamientos similares a la distonía (torsión del cuello y del miembro anterior) similares a los comportamientos producidos por la estimulación por ChR2 de las neuronas GABAérgicas en el GP en los ratones transgénicos. **Figura 3D**

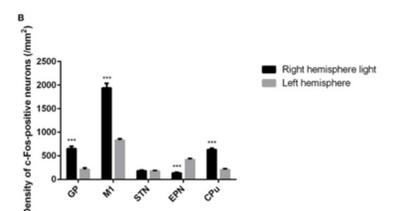
Atribuimos los resultados a que una sobreestimulación selectiva de ChR2-mCherry en el NST, el GP y el EPN implica tal intensidad del input, que las neuronas GABAérgicas no son lo suficientemente eficientes en la inhibición del impulso. Esto resulta en una falta de control del movimiento, por lo que se observó discinesia.



### LA ESTIMULACIÓN DE CHR2 EN FIBRAS AFERENTES GLUTAMATÉRGICAS DEL STN EN EL GP PRODUCE CAMBIOS SIMILARES EN LOS CIRCUITOS DE LOS GANGLIOS BASALES COMO INDICA LA EXPRESIÓN DE C-FOS EN GP, M1, STN, EPN Y CPU

Se indujo fotoestimulación en los ganglios basales y corteza; y posteriormente, se procedió a la incubación con anti-c-Fos.

Apenas se detectaron neuronas c-Fos positivas en la EPN. Puesto que la EPN es el principal núcleo inhibitor de los outputs los ganglios basales, concluyeron que una disminución de la actividad de la EPN llevará un aumento de la actividad de la corteza. **Figura 4B**



## CONCLUSIONES

La sobreestimulación optogenética de las neuronas GABAérgicas del globo pálido o las fibras aferentes glutamatergicas del núcleo subtalámico en el GP producían hiperkinesia.

Se verifica la implicación de rutas intrínsecas de los ganglios basales en el control inhibitor de los movimientos anormales. Aún así, se necesitan estudios futuros para abordar la contribución específica de las neuronas prototípicas de GABAérgicas del globo pálido al control motor.

Nuestros hallazgos reafirman que la excesiva actividad del GP podría ser el sustrato neural de los movimientos involuntarios anormales que se encuentran en los trastornos del movimiento como la enfermedad de Huntington y la distonía.

