



Universidad Nacional del Comahue

Centro Regional Universitario Bariloche

# **Rol de la región locomotora del mesencéfalo en los trastornos de la marcha asociados a la enfermedad de Parkinson**

Trabajo Final para optar por el título de Licenciado en Ciencias Biológicas

Joaquín Alejo Quintana

**Directora:** Dra. María Soledad Espósito

**Co-Directora:** Dra. Diana Lorena Franco

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurobiología del Movimiento, Departamento de Física Médica, Centro Atómico Bariloche.

Año: 2022

Contacto: [quintana.joaquin.alejo@gmail.com](mailto:quintana.joaquin.alejo@gmail.com)

# Índice

<b>Resumen</b>	3
Resumen en español	3
Palabras clave	3
<b>Abstract</b>	4
Key words	4
<b>I. Introducción</b>	5
Epidemiología y diagnóstico clínico de la Enfermedad de Parkinson.	5
Neuropatología y tratamientos.	6
Congelación de la marcha.	9
Circuitos neuronales involucrados en el control de la locomoción.	10
<b>Hipótesis y objetivos</b>	13
<b>II. Materiales y métodos</b>	14
Animales.	14
Operaciones.	14
Inyecciones de virus.	14
Implante de cánulas.	15
Test comportamentales	16
Test de latencia	16
<i>Restricción de agua.</i>	16
<i>Aprendizaje y experimentos.</i>	16
Test en rotarod con aceleración.	17
<b>Análisis</b>	18
Script de python.	18
Análisis de datos.	18
Histología. Inmunohistoquímica y microscopía	18
<b>III. Resultados</b>	20
Puesta a punto del test de latencia	20
Diseño del test.	20
Habitación y entrenamiento.	22
Protocolo de entrenamiento.	24
Puesta a punto del método de ablación	27
Silenciamiento reversible de la actividad del MLR	29
Silenciamiento global del MLR.	29

Silenciamiento de las neuronas glutamatérgicas del MLR	32
<b>IV. Discusión y conclusiones</b>	<b>35</b>
Desarrollo del test que permite evaluar la latencia de la iniciación de la locomoción.	35
Silenciamiento global del MLR mediante la administración de TTX.	36
Silenciamiento de las neuronas glutamatérgicas del MLR mediante la administración de CNO.	37
Experimentos a futuro y conclusión final.	39
<b>V. Bibliografía</b>	<b>41</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>50</b>

## Resumen

### Resumen en español

La locomoción es un comportamiento fundamental para los animales, permitiéndoles desplazarse e interactuar con su ambiente. Esta función motora requiere del correcto funcionamiento de circuitos locales en la médula espinal y de las estructuras supraespinales que se encargan de la selección del programa motor, entre las cuales destaca la región locomotora del mesencéfalo (MLR). El estudio detallado de estas estructuras y los circuitos de los que forman parte es fundamental si se quiere comprender la etiología de ciertos síndromes neurodegenerativos que afectan la capacidad motora. Por ejemplo, la enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por una plétora de síntomas motores y no motores altamente debilitantes y, aunque algunos son aliviados por la administración de derivados de dopamina, hay otros, como la congelación de la marcha (FoG por Freezing of Gait), que no lo son. Este síntoma se define por la imposibilidad de realizar un movimiento a pesar de la intención de hacerlo, causando caídas y afectando negativamente la calidad de vida de los pacientes. Teniendo esto en cuenta y dada la relevancia comprobada del MLR en la generación de locomoción, en este trabajo silenciamos su actividad de manera global y también manipulamos la actividad de un componente celular específico de esta región, las neuronas glutamatérgicas, para estudiar el vínculo entre su mal funcionamiento y el desarrollo de FoG. Para esto, utilizamos estrategias de silenciamiento neuronal en conjunto con un test comportamental novedoso que permite obtener información sobre la latencia del inicio de la locomoción. En conjunto, los resultados aquí presentados amplían las posibilidades de estudio de los síntomas de la EP, remarcan la importancia del MLR en el control del comportamiento locomotor y, al mismo tiempo, señalan la necesidad de profundizar en la implicancia de la pérdida de funcionalidad de subpoblaciones específicas de esta región.

### Palabras clave

Congelación de la marcha, enfermedades neurodegenerativas, locomoción

# Abstract

Locomotion is a fundamental behavior for animals, allowing them to move and interact with their environment. This motor function requires the correct functioning of local circuits in the spinal cord and supraspinal structures responsible for the selection of the motor program, among which the mesencephalic locomotor region (MLR) stands out. The detailed study of these structures and the circuits in which they are embedded is essential if we want to comprehend the etiology of certain neurodegenerative syndromes that impair motor capacity. For example, Parkinson's disease (PD) is characterized by a plethora of highly debilitating motor and non-motor symptoms, and while some of them are relieved by the administration of dopamine derivatives, there are others, such as Freezing of Gait (FoG), which are not. This symptom is defined by the inability to perform a movement despite the intention to do so, causing falls and negatively affecting patients' quality of life. Bearing this in mind and given the proven relevance of the MLR in the generation of locomotion, in this work we globally silence its activity and also manipulate the activity of a specific cellular component of this region, the glutamatergic neurons, to study the link between its malfunction and the development of FoG. In order to do so, we use neuronal silencing strategies in conjunction with a novel behavioral test that provides information on the latency of the onset of locomotion. All together, the results presented here expand the possibilities for PD symptoms' study, highlight the importance of the MLR in the control of locomotor behavior and, at the same time, point out the need to delve into the implication of the loss of functionally distinct neuronal subpopulations in this region.

## Key words

Freezing of gait, neurodegenerative diseases, locomotion

# I. Introducción

La locomoción es una de las funciones motoras más conservadas y esenciales dentro del casi infinito repertorio de movimientos posibles de los animales, y participa en diversos comportamientos o estados de gran relevancia a escala ecológica y evolutiva, como son el escape a un predador, la búsqueda de comida o la búsqueda de pareja. La locomoción animal es el resultado de la interacción compleja entre los sistemas de los sentidos, el procesamiento de la información sensorial externa y el estado interno del animal, y la generación de comandos motores que, por estimulación del sistema músculo-esquelético, permiten el movimiento estereotipado y coordinado de las extremidades del cuerpo (Kandel et al., 2021).

Dada la relevancia de la locomoción, enfermedades que afectan su normal ejecución tienen un impacto muy negativo en la vida de las personas. Por ejemplo, este comportamiento puede verse alterado por el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, las cuales se caracterizan por la pérdida progresiva de grupos específicos de neuronas (Dugger & Dickson, 2017). En general, los desórdenes del movimiento que resultan de síndromes neurológicos pueden categorizarse como hipercinéticos, cuando un individuo manifiesta movimientos involuntarios excesivos, o hipocinéticos, cuando la amplitud de los movimientos se encuentra disminuída ya sea por una visible lentitud o por pausas involuntarias durante su ejecución (Jankovic et al. 2011). En este proyecto nos vamos a focalizar en el estudio de un síndrome hipocinético conocido como Enfermedad de Parkinson (EP).

## Epidemiología y diagnóstico clínico de la Enfermedad de Parkinson.

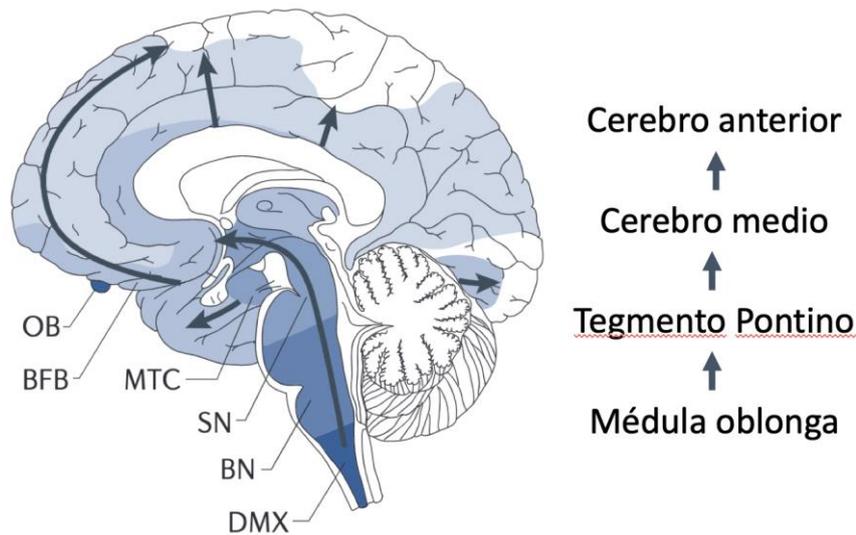
La EP es el síndrome neurodegenerativo más común luego del Alzheimer (Nussbaum & Ellis, 2003). El comienzo de la enfermedad rara vez ocurre antes de los cincuenta años de edad, presentando una incidencia anual a nivel mundial que se aproxima a los 3,26 por cada 100000 habitantes para la población de 40-49 años de edad y 118,86 por cada 100000 para las personas que se encuentran entre los 70-79 años de edad (Hirsch et al., 2016). Se estima que la prevalencia alcanza el 0,3% para la población general, el 1% para la porción de la población que es mayor de sesenta años e incluso el 3% en personas mayores de ochenta años (Dorsey et al., 2018; De Lau & Breteler, 2006).

Los pacientes con EP presentan un conjunto de síntomas motores que causan hipocinesia, como rigidez muscular, inestabilidad postural, enlentecimiento de los

movimientos e incluso temblor de las extremidades que se encuentran en reposo (Morris et al., 2001; Snijders et al., 2011). La presencia de estos síntomas es utilizada, junto a otros criterios, en el diagnóstico clínico de la EP (Postuma et al., 2015). Además, en etapas más avanzadas de la enfermedad los pacientes pueden sufrir congelación de la marcha (FoG, por sus siglas en inglés, Freezing of Gait) (Virmani et al., 2015) y experimentar caídas frecuentes que pueden generar fracturas o traumatismos (Vestergaard et al., 2007). También existen síntomas no motores relacionados a todo tipo de funciones, como problemas en la regulación del ciclo sueño-vigilia, demencia, mal funcionamiento del sistema autónomo (hiperhidrosis, deficiencia urogenital, estreñimiento) (Chaudhuri & Schapira, 2009) e incluso ansiedad (Pontone et al., 2009) y depresión, la cual podría desarrollarse como una consecuencia de todos los síntomas mencionados anteriormente (Reijnders et al., 2007; Schrag et al., 2001). En conjunto, todos estos síntomas afectan significativamente la calidad de vida de las personas con la EP (Rahman et al., 2008).

## Neuropatología y tratamientos.

Los rasgos que caracterizan a la EP incluyen neurodegeneración en varias regiones del cerebro y la formación de depósitos proteicos intracelulares llamados cuerpos de Lewy (CL). Estos agregados están compuestos en gran parte por  $\alpha$ -sinucleína, una proteína encontrada principalmente en el tejido nervioso que participa de la liberación de neurotransmisores, en la transducción de señales vía segundos mensajeros, en la diferenciación neuronal, entre otras funciones (Emamzadeh, 2016; Bendor et al., 2013). La formación de CL es un carácter neuropatológico progresivo, ocurriendo inicialmente en ciertos núcleos de la médula oblonga y esparciéndose, en etapas más avanzadas, hacia el resto del tallo encefálico, estructuras del sistema límbico y áreas de las cortezas de asociación (**Figura 1**) (Braak et al., 2003; Braak et al., 2004).

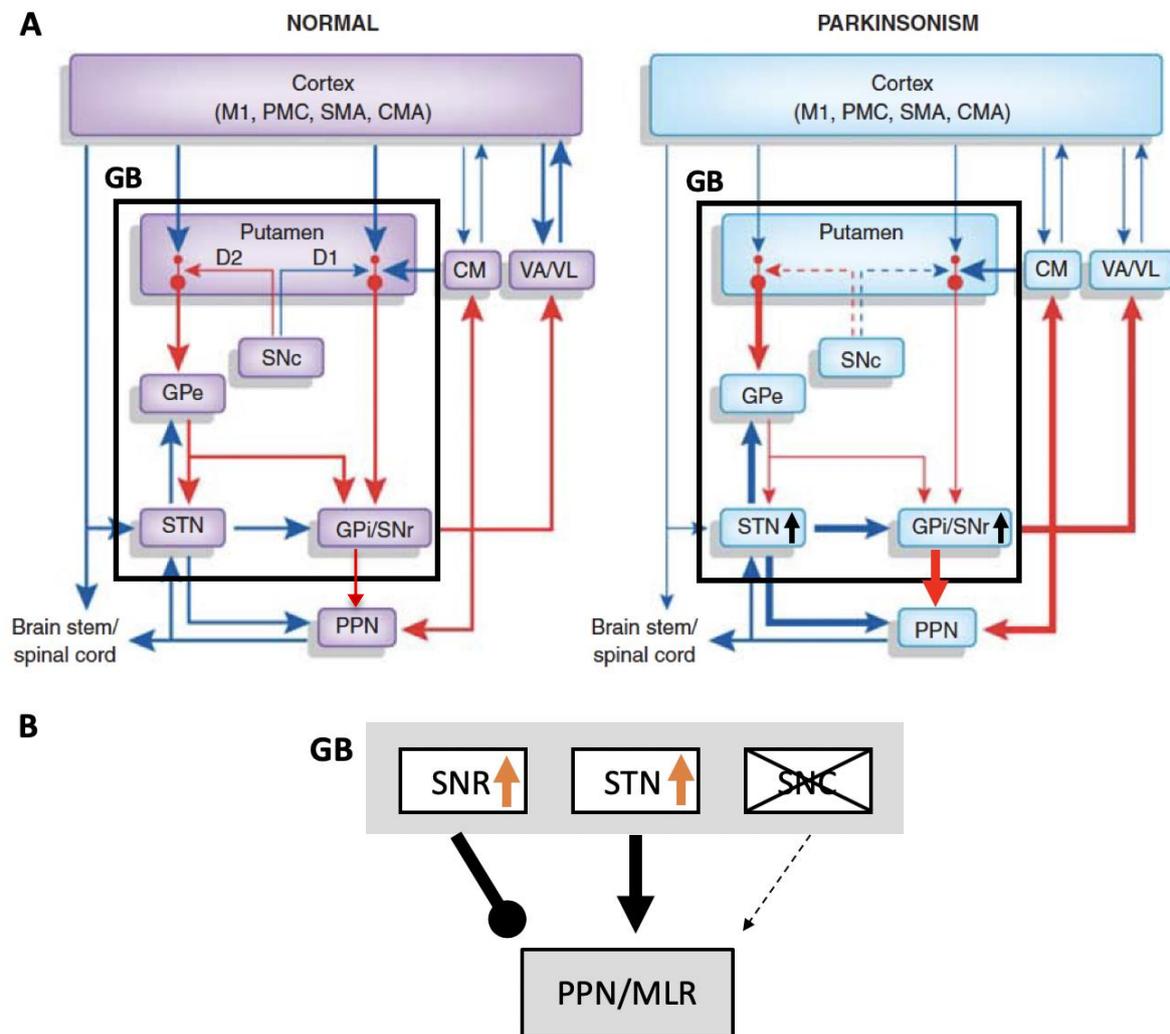


**Figura 1.** Modelo de progresión de la histopatología de la EP. Modificado de Schapira et al., 2017. OB: bulbo olfatorio; BFB: prosencefalo basal; MTC, corteza mesiotemporal; SN, sustancia nigra; BN, núcleos del tronco encefálico; DMX, núcleo motor dorsal del nervio vago.

Una de las regiones afectadas en la EP es la Sustancia Nigra Compacta (SNc), cuyas neuronas dopaminérgicas (DA) tienen un rol modulador sobre la mayoría de los núcleos de los ganglios basales (GB), compuestos por el Núcleo Caudado, el Putamen, el Globo Pálido externo e interno (GPe, GPi), el Núcleo Subtalámico (STN) y la Sustancia Nigra reticulata (SNr). Dado que los GB tienen un rol fundamental en la iniciación y terminación de los movimientos voluntarios, y en la selección del programa motor a ser ejecutado (Klaus et al., 2019), alteraciones en su input modulador afectan significativamente la actividad del circuito.

La muerte de las neuronas DA de la SNc genera un desequilibrio en la actividad de los GB que repercute en la información de salida de dicho circuito (**Figura 2**). En particular, la EP se caracteriza por una hiperactividad de la SNr y el STN, que daría como resultado un aumento en la actividad inhibitoria de las regiones río abajo del circuito motor (**Figura 2**) (McGregor et al., 2019). Es por ello que clásicamente se considera que los síntomas motores característicos de la EP son originados por la muerte de las neuronas de la SNc y el concomitante mal-funcionamiento de los GB. Por lo tanto, el tratamiento más frecuente de la EP es la administración de derivados de la dopamina (L-DOPA), de manera de aumentar la concentración de dopamina y contrarrestar el efecto de la neurodegeneración de las neuronas DA-SNc (Forno, 1996; Brundin & Olanow, 2006). Sin embargo, este tratamiento es sólo capaz de aliviar ciertos síntomas motores como el temblor y la rigidez, pero no es realmente

efectivo contra aquellos síntomas asociados a la marcha, como el FoG, o el balance/equilibrio (Grabli et al., 2012). En casos más severos de EP y/o pacientes resistentes al tratamiento de L-DOPA, se realizan intervenciones quirúrgicas que involucran la estimulación eléctrica del cerebro en el STN o el GPi (Benabid, 2003). Dichos tratamientos tampoco logran revertir los trastornos de la marcha ni la inestabilidad o caídas.



**Figura 2.** Alteraciones funcionales de los GB en la enfermedad de Parkinson. **A.** Esquema del circuito motor identificando las regiones cuya actividad se ve afectada por la EP (derecha) (modificado de Smith et al., 2012). Las líneas rojas representan proyecciones inhibitorias, las azules, proyecciones excitatorias. El cambio de grosor de las flechas indica un aumento (flecha gruesa) o disminución (flecha más fina) en la actividad de disparo de tales conexiones en la EP (derecha) en comparación con la función normal (izquierda). Las líneas punteadas desde la SNc hacia el putamen representan la lesión parcial de este sistema durante la EP. **B.** Posibles mecanismos circuitales en los que la muerte de las neuronas DA-SNc podrían afectar la actividad del PPN/MLR. La flecha discontinua indica la reducción del input moduladorio directo por la muerte de neuronas DA-SNc. La

flecha indica el aumento del input excitatorio del STN producto de los cambios en la actividad de los GB en la EP. La flecha con punta redondeada indica el aumento de input inhibitorio de la SNr producto de los cambios en la actividad de los GB en la EP. Abreviaturas: CM, núcleo centromediano; CMA, área motora del cíngulo; GPe, globo pálido, segmento externo; GPi, globo pálido, segmento interno; M1, corteza motora primaria; PMC, corteza premotora; PPN, núcleo pedunculopontino; SMA, área motora suplementaria; SNc, sustancia nigra pars compacta; SNr, sustancia nigra pars reticulata; STN, núcleo subtalámico; VA/VL, núcleo ventral anterior/ventral lateral del tálamo.

Además de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, existen otras poblaciones neuronales en otras regiones del cerebro afectadas por la EP, cuyo mal-funcionamiento y neurodegeneración puede incluso preceder al de la SNc. Por ejemplo, durante la etapa prodrómica de la enfermedad (antes del diagnóstico clínico basado en síntomas motores) se observa acumulación de CL en las neuronas colinérgicas del núcleo dorsal del vago, las neuronas serotoninérgicas del Rafe, y las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus, localizados en la médula oblonga. La enfermedad luego progresa de manera caudal-rostral afectando progresivamente a las neuronas colinérgicas del núcleo pedunculopontino (PPN) del cerebro medio, y las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert y el bulbo olfatorio en el cerebro anterior, entre otras regiones (Giguère et al., 2018; Braak et al., 2003). La neurodegeneración multisistémica de la EP podría explicar la plétora de síntomas motores y no motores de la enfermedad.

## Congelación de la marcha.

La congelación de la marcha, o FoG, es uno de los síntomas más debilitantes no tratables por la administración de L-DOPA (Ferraye et al., 2013; Perez-Lloret et al., 2014). Dicho síntoma se define por períodos de corta duración durante los cuales el paciente es incapaz de ejecutar un movimiento que le permita avanzar, a pesar de la intención de hacerlo, dificultando la movilidad significativamente (Nutt et al., 2011). El FoG se expresa más comúnmente durante el inicio de la marcha o en el giro, pero también cuando se enfrenta a una restricción especial, como una puerta, estrés o distracción. Se suelen definir tres subtipos de FoG: arrastrando los pies con pequeños pasos, temblando en el lugar sin moverse hacia adelante, o acinesia total (Schaafsma et al., 2003). Aproximadamente entre el 21% y 27% de los pacientes con EP experimentan FoG en etapas tempranas (Tan et al., 2011) y es reconocido como un síntoma común en pacientes que se encuentran en etapas más avanzadas

(Giladi et al., 2001). Acompañado de los impedimentos locomotores, el FoG es una de las causas de caídas frecuentes en pacientes, repercutiendo negativamente en la calidad de vida de los mismos (Bloem et al., 2004).

Actualmente no existe tratamiento capaz de revertir los síntomas asociados al FoG. Si bien la administración de L-DOPA y la estimulación cerebral profunda en las regiones estándar (STN y GBi) logran revertir el temblor en reposo y la bradicinesia, estos tratamientos no han mostrado efectos significativos sobre el FoG (Fasano et al., 2015). Es por ello que se postula que el FoG podría originarse por el mal funcionamiento de otras regiones del cerebro afectadas en la EP. Siguiendo esta línea de pensamiento, se propuso al núcleo pedunculopontino (PPN) como posible región blanco para la estimulación cerebral profunda. El PPN es parte de la región locomotora del mesencéfalo (MLR, por “Mesencephalic Locomotor Región”), cuyo rol en el control de la locomoción ha sido ampliamente demostrado (Shik et al., 1966; Roseberry et al., 2016; Caggiano et al., 2018; Ferreira-Pinto et al., 2021). Existen evidencias tanto en monos como en humanos que lesiones en el PPN dan como resultado el desarrollo de FoG (Aziz et al., 1998; Hathout & Bhidayasiri, 2005; Kuo et al., 2008; Kojima et al., 1997). Es importante destacar también que estudios de neuroimágenes en pacientes con EP han demostrado cómo el mal funcionamiento del MLR contribuye a la congelación de la marcha (Snijders et al., 2016; Fling et al., 2014; Bharti et al., 2019; Lench et al., 2020). Estos resultados, en conjunto con estudios realizados en roedores, resaltan la función conservada del MLR en el control de la locomoción y apoyan la hipótesis de que su disfunción podría originar síntomas similares al FoG (Garcia-Rill et al., 2014).

En base a lo expuesto se comenzó a realizar estimulación cerebral profunda en el PPN de pacientes afectados por la EP. Los resultados publicados hasta el momento parecen indicar una tendencia de mejora en la frecuencia de los episodios de FoG aunque con resultados muy variables de acuerdo a la localización del electrodo de estimulación (Fasano et al., 2015).

## Circuitos neuronales involucrados en el control de la locomoción.

Los circuitos locomotores que controlan la coordinación de los miembros izquierdo y derecho y de los músculos flexores y extensores se encuentran localizados en la médula espinal (Grillner, 2003; Kiehn, 2016). Sin embargo, la instrucción para la iniciación y selección del tipo de marcha se origina en diferentes estructuras supraespinales, siendo el

MLR la estructura neuronal más importante implicada en este tipo de funciones (Jordan et al., 2008; Dubuc et al., 2008; Caggiano et al., 2018).

Inicialmente, el MLR fue definido funcionalmente como un centro del comando locomotor, como su nombre lo indica, basándose en el hecho de que micro-estimulaciones eléctricas en esta región lograban evocar la locomoción coordinada de todo el cuerpo, a velocidades y marchas dependientes de la intensidad del estímulo eléctrico (Shik et al., 1966; Noga et al., 1988). A nivel celular, esta región está compuesta por neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas (Martinez-Gonzalez et al., 2012) distribuidas en los núcleos Cuneiforme, Pedunculopontino y la formación reticular del mesencéfalo adyacente (mRt) (Skinner & Garcia-Rill, 1984; Takakusaki et al., 2015).

Recientemente ha sido posible estudiar en mayor detalle el rol específico de cada uno de los componentes del MLR, y se ha logrado demostrar que la estimulación selectiva de las neuronas glutamatérgicas del MLR es capaz de evocar locomoción desde un estado de reposo y la tasa de disparo de estas neuronas está correlacionada con el movimiento locomotor del animal (Roseberry et al., 2016; Espósito & Arber, 2016; Capelli et al., 2017; Caggiano et al., 2018). Notablemente, las neuronas glutamatérgicas de la región dorsal del MLR, denominada núcleo cuneiforme, participan en la locomoción rápida asociada a respuestas de escape, mientras que las neuronas glutamatérgicas de la región ventral que incluye al PPN contribuyen a la locomoción exploratoria caracterizada por una menor velocidad (Caggiano et al., 2018). El comando locomotor generado en el MLR es transmitido a la médula espinal de manera indirecta por medio de la región lateral paragigantocelular (LPGi) de la médula oblonga (Capelli et al., 2017).

Las neuronas del MLR están reguladas de manera directa por los GB (Garcia-Rill et al., 1983; Mena-Segovia et al., 2004), que inhiben tónicamente al MLR a través del input GABAérgico originado en la SNr (Garcia-Rill et al., 1985; Mori, 1987; Mena-Segovia et al., 2004), sugiriendo que la iniciación de la locomoción requiere de un proceso desinhibitorio. Sin embargo, el MLR también recibe proyecciones axonales glutamatérgicas provenientes del STN y proyecciones modulatorias dopaminérgicas desde la SNc (**Figura 2B**) (Ryczko et al., 2016; Roseberry et al., 2016; Caggiano et al., 2018). Por lo tanto, el mal-funcionamiento de los GB podría tener consecuencias diversas sobre la actividad del MLR. Además, también se ha observado en pacientes con la EP la presencia de CL y neurodegeneración en las neuronas colinérgicas del PPN (Rinne et al., 2008; Karachi et al., 2010; Snijders et al., 2011). Dado



posible tratamiento efectivo contra el FoG en pacientes con EP (Goetz et al., 2018; Mazzone et al., 2005; Stefani et al., 2007).

## **Hipótesis y objetivos**

En base a lo expuesto, en este proyecto postulamos que el mal funcionamiento de las neuronas glutamatérgicas del MLR estaría involucrado en el desarrollo de FoG. Para abordar nuestra hipótesis proponemos:

1. Diseñar un test de latencia para evaluar FoG y trastornos de la marcha en ratones.
2. Estudiar el rol de las neuronas glutamatérgicas del MLR en la iniciación y en el patrón de la locomoción.

A través de experimentos podremos discriminar el origen neuronal de síntomas específicos de la enfermedad de Parkinson y ayudar al diseño de nuevos blancos terapéuticos y nuevos modelos animales de la enfermedad.

## II. Materiales y métodos

### Animales.

Todos los ratones utilizados en esta tesina (N = 36) fueron machos de 2 a 3 meses de edad. Dos líneas fueron utilizadas, una línea C57BL/6 (obtenida de Jackson Laboratory) “wild type”, y una transgénica vGluT2-IRES-Cre (obtenida de Jackson Laboratory) de la cual solo se eligieron animales heterocigotas. Ambas líneas son mantenidas en el bioterio en jaulas estándar (ancho: 16 cm; largo: 35 cm; alto: 13 cm) con no más de cinco ratones por jaula, con acceso a agua y alimento *ad libitum*. El bioterio se mantuvo siempre bajo un ciclo de 12hs de luz/12hs oscuridad, con 40/50% de humedad mantenida por un sistema de humidificación automático casero y 21°C de temperatura. Las cirugías, la manipulación comportamental y las perfusiones/eutanasias fueron realizadas según protocolo aprobado de CICUAL CNEA (N°21/2018).

### Operaciones.

Para poder manipular la actividad de poblaciones neuronales específicas, se utilizaron tanto vectores virales, que permitieran la expresión de diferentes genes de interés, como drogas que generan el silenciamiento neuronal. Tanto para las inyecciones de virus, como para el implante de cánulas y la inyección de TTX (detallada más adelante), los ratones fueron anestesiados con isoflurano en una cámara de inducción y posteriormente colocados en un estereotáxico para poder fijar su cabeza y proceder con las cirugías e inyecciones colocado bajo una lupa con iluminación directa sobre la cabeza.

### Inyecciones de virus.

Una vez anestesiado el ratón y fijado en el estereotáxico, se le aplicó solución yodada en la cabeza para esterilizar y se realizó un corte con escalpelo en la región dorsal medial de la misma, desde la altura de los ojos hasta el medio de las orejas, exponiendo el cráneo. Se midió la ubicación de bregma y lambda en los tres ejes de coordenadas para corroborar que el cráneo esté correctamente ubicado (sin inclinaciones). Luego, se realizó lenta y cuidadosamente un pequeño agujero en el cráneo sobre el MLR (en milímetros desde Lambda, antero-posterior (AP): sutura de lambda; medial-lateral (ML):  $\pm 1,2$ ; dorso-ventral

(DV): 3,0) utilizando una broca. Los virus a utilizar se cargaron en un capilar de vidrio pulido y graduado cada 1 microlitro, el cual fue empleado como aguja de inyección. Una vez dentro del cerebro, se utilizó un sistema de microinyecciones (Picospritzer) para controlar el volumen liberado (50 o 100 nl según se indica en los resultados), dando pulsos de 10 ms hasta que baje el volumen deseado. Luego de la inyección se esperaron 5 minutos antes de retirar muy lentamente el capilar para evitar la dispersión y reflujo del volumen inyectado. Por último, se cerró el corte realizado utilizando La Gotita en gel y se retiró al animal del estereotáxico para su recuperación. Los animales fueron tratados con meloxicam como analgésico postoperatorio. Los virus utilizados fueron los siguientes: pAAV-FLEX-DTR-GFP (AAV2) (título viral:  $5 \times 10^{12}$  vg/mL; inyección en el MLR: 50-100nl; Addgene, código: 124364); pAAV (9)-pCAG-FLEX-tdTomato-WPRE (título viral:  $2 \times 10^{13}$  vg/mL; inyección en el MLR: 50nl; diseñado por la Dr. Arber, Friedrich Miescher Institute, Basilea, Suiza. Producido por Vector Biolabs); pAAV-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (AAV5) (título viral:  $>7 \times 10^{12}$  vg/mL; inyección en el MLR: nl; Addgene, código:44362); pGP-AAV-syn-FLEX-jGCaMP7f-WPRE (AAV9) (título viral:  $\geq 1 \times 10^{13}$  vg/mL; inyección en el MLR: 50nl; Addgene, código: 104492).

### Implante de cánulas.

Se siguieron los mismos pasos que en la inyección de virus, terminando en la confección de agujeros sobre el MLR de forma bilateral (mismas coordenadas AP y ML antes especificadas). Luego se fijaron dos tornillos de acero inoxidable a la superficie del cráneo. Posteriormente se introdujo una cánula guía de acero inoxidable (400 um de diámetro, Plastic One) a través de los agujeros realizados. Dado que el inyector utilizado más adelante se proyecta 1 mm por debajo de la cánula guía, la misma se colocó a 2 mm desde la superficie del cerebro en eje DV para poder llegar a los 3 mm con el inyector. La cánula se aseguró al cráneo por medio de la aplicación de La Gotita en gel y cemento de dentista para que solidifique rápidamente. Se colocó un dummy dentro de la cánula guía para evitar la oclusión de la cánula, su tapa y se retiró al animal del estereotáxico para su recuperación.

## Test comportamentales

### Test de latencia

#### *Restricción de agua.*

Los ratones utilizados fueron sometidos a una privación de agua para motivarlos a realizar la tarea comportamental. Al comienzo del protocolo de restricción, los ratones fueron pesados y devueltos a sus respectivas cajas sin su fuente de agua. Al día siguiente, entre la media mañana y el medio día, se registró nuevamente su peso y se les permitió beber agua *ad libitum* durante diez (10) o treinta (30) minutos, dependiendo del experimento según se indica en la sección de resultados. Esto último se realizó durante los días necesarios hasta que el peso de los ratones se mantuviera constante (4 a 6 días).

#### *Aprendizaje y experimentos.*

Días antes de comenzar con el entrenamiento, se realizó el manipuleo/habitación de los animales para que se acostumbren al experimentador. Todos los ratones utilizados recorrieron el test de latencia de forma individual. A continuación, se describe una repetición completa: Se ubicó gentilmente al animal dentro del ambiente de la derecha (ver diseño del dispositivo experimental en la Figura 4). Se esperó a que el ratón caminara hacia la puerta y, entonces, se la activó manualmente, prendiéndose primero el LED que indica la próxima apertura de la misma durante un tiempo aleatorio (de 2 a 5 segundos). Una vez que el ratón atravesó el corredor e ingresó al siguiente ambiente, se liberó una gota de agua a través del tubo ubicado en dicho ambiente utilizando una bomba de agua controlada eléctricamente (Med Associates). Este evento se repitió aproximadamente 14 veces para cada ratón. Una vez terminadas las repeticiones, los ratones fueron devueltos a sus cajas para hidratarse según el protocolo de restricción de agua. Esto se realizó durante 4, 5 o 6 días dependiendo del experimento.

Para el experimento utilizando tetrodotoxina (TTX) (Tocris), las primeras inyecciones se realizaron al sexto día de iniciado el entrenamiento en el corredor y aproximadamente luego de 14 días desde la implantación de las cánulas. Para esto, la solución utilizada de TTX fue cargada en una manguerita conectada a una microjeringa Hamilton, en cuyo extremo se colocó un inyector de acero inoxidable (100  $\mu\text{m}$  de diámetro). La microjeringa Hamilton fue

activada de manera controlada por una micro-bomba Micro 4 de World Precision Instruments. Una vez ubicado el animal en el estereotáxico, se retiró la tapa y el dummy de la cánula guía para poder poner el inyector. La tasa de inyección se mantuvo alrededor de los 100 nl/seg. Las diferentes concentraciones de TTX fueron: 0,025 ng/nl (alta), 0,0125 ng/nl (media) y 0,005 ng/nl (baja). Los resultados experimentales surgen de la inyección de 100 a 500 nl de las diferentes soluciones. Luego de la inyección, se esperaron 3 minutos antes de retirar cuidadosamente el inyector. Por último, se colocaron nuevamente el dummy y la tapa y se retiró al animal del estereotáxico para su recuperación y posterior testeo. Los ratones rara vez pudieron moverse hasta, por lo menos, 30 minutos después de la inyección, por lo que el tiempo entre la inyección de TTX y el comienzo del test fue variable y se prolongó entre 1 h 20 minutos y más de 24hs. En este experimento se utilizó como grupo control a los mismos ratones, inyectados con solución fisiológica (SF) luego de que se acabara el efecto de la TTX.

Por otro lado, en el experimento con n-óxido de clozapina (CNO), el tratamiento se realizó al 5to día de haber comenzado con el entrenamiento. La inyección de CNO se realizó de forma intraperitoneal. Cada ratón recibió una dosis de 5mg de CNO por kg de ratón (0,83 mg/ml en solución fisiológica estéril) y se esperaron 45 minutos desde la inyección para poder testearlos. Para este experimento se realizaron dos controles, por un lado un grupo de ratones inyectados con el virus pGP-AAV-syn-FLEX-jGCaMP7f-WPRE (AAV9), que expresa una proteína fluorescente verde (GFP) y que también fueron tratados con CNO con el objetivo de evaluar posibles efectos adversos indeseados de la droga. Por otro lado, tanto los ratones del grupo tratado, inyectados con el virus pAAV-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (AAV5), como los del grupo control fueron inyectados con solución fisiológica y luego testeados nuevamente en el dispositivo de latencia.

### Test en rotarod con aceleración.

Los ratones fueron entrenados para mantenerse en un cilindro de 3 cm de diámetro que gira a velocidades crecientes. El período de entrenamiento duró 5 días, con 5 pruebas por día. Cada repetición comienza con una velocidad inicial de 5 rpm, aumentando gradualmente hasta llegar a 50 rpm en 5 minutos. El experimento finaliza cuando los ratones se caen del cilindro o bien cuando alcanzan los 5 minutos. Al sexto día fueron inyectados vía intraperitoneal (IP) con SF. Al séptimo día fueron inyectados con una dosis de 5mg de CNO por kg de ratón y testeados 45' después para registrar el tiempo de caída del rotarod con

aceleración. Al día siguiente, se realizó nuevamente la tarea luego de inyectarles SF. Estos experimentos fueron llevados a cabo por Leonardo Molano Ramírez.

## **Análisis**

Script de python.

Los datos de latencia mínima y máxima al inicio de la locomoción y la duración del recorrido fueron calculados por un script escrito en Python a partir de las señales analógicas cuadradas y continuas transmitidas por el sensor infrarrojo y el arduino que controla el motor que abre las puertas, registradas como input analógico con el sistema de Omniplex. En resumen, se utilizó el tiempo de cruce del umbral y la función find peaks de scipy.signal de las respectivas señales para obtener los valores de umbral de la señal ascendente. Además, se corrigieron errores en las señales en los que se observa coactivación de los dos sensores debido al reinicio del sistema. Luego, se calculó el valor de umbral más bajo luego de cada evento de apertura de las puertas cuya diferencia da como resultado el valor de latencia mínima. Además, se calculó la latencia máxima como el tiempo que transcurre desde la apertura de la puerta y el cruce más tardío del sensor. Finalmente se obtuvo la duración del recorrido como el tiempo que transcurre entre el cruce más tardío del sensor en el extremo donde se abrió la puerta y el primer cruce del sensor más lejano.

Análisis de datos.

Para cada conjunto de datos, se verificó la distribución normal utilizando los tests de normalidad de D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov. Para los análisis estadísticos se realizaron t-tests o comparaciones múltiples de Tukey (a partir de un ANOVA de una vía), considerando P-Value<0,05 como significativo. Estos análisis y los gráficos utilizados fueron realizados en GraphPad PRISM versión 8.0.1 ó 9.3.1.

## **Histología. Inmunohistoquímica y microscopía**

Al finalizar cada experimento, se realizaron análisis inmunohistoquímicos de todos los ratones utilizados (N = 21). Para esto, los mismos fueron anestesiados con una solución de ketamina-xilacina (200µg/g de ketamina y 20µg/g de xilacina, correspondiente al doble de una dosis normal) y luego perfundidos con PBS, seguido de una solución de

paraformaldehído 4% (PFA) preparada en PBS. Los cerebros extraídos fueron conservados en PFA 4% durante una noche y luego almacenados en una solución de sacarosa 30% preparada en PBS para facilitar su posterior criopreservación, en la cual pueden permanecer hasta dos meses. Después de al menos 2 días en sacarosa, fueron colocados en un molde y congelados rápidamente en un freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El corte de secciones se realizó en un micrótomó de congelación (criostato), obteniendo secciones coronales de  $80\mu\text{m}$  de grosor, las cuales fueron ordenadas secuencialmente en celdas individuales de un multiwell conteniendo PBS y guardadas en una heladera a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para el marcado con anticuerpos, las secciones fueron incubadas durante 1h en solución de bloqueo (1% BSA, 0,2% Triton X-100) preparada en PBS. Después, se aplicó una solución conteniendo anticuerpos primarios en solución de bloqueo y se incubaron las secciones durante 72hs a  $4^{\circ}\text{C}$  en una cámara de humedad. Al finalizar este período, se lavó el anticuerpo primario y fue aplicado el anticuerpo secundario, incubando nuevamente en las mismas condiciones durante 24hs (una noche). Por último, se procedió al montaje de las secciones sobre un portaobjetos, manteniendo el orden rostro-caudal, agregando 250  $\mu\text{l}$  de montaje 2,5% (Mowiol 4-88, Glicerol, Tris-Cl, DABCO) y cubriéndolas con un cubreobjetos. Estos preparados fueron guardados en oscuridad a  $4^{\circ}\text{C}$  para su posterior observación bajo el microscopio. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados fueron: anti-GFP *chicken* (Molecular probes A10262), anti-NeuN *mouse* (Chemicon MAB377), anti-Chicken Alexa488 (Jackson Immuno Research 703-545-155).

Utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon) se tomaron imágenes del tejido con el fin de corroborar sitios y dispersión de las inyecciones, como también el correcto funcionamiento de los virus. Estas imágenes fueron analizadas utilizando el software de procesamiento de imágenes Fiji is Just ImageJ (FIJI), utilizado también para realizar las composiciones presentadas en este trabajo.

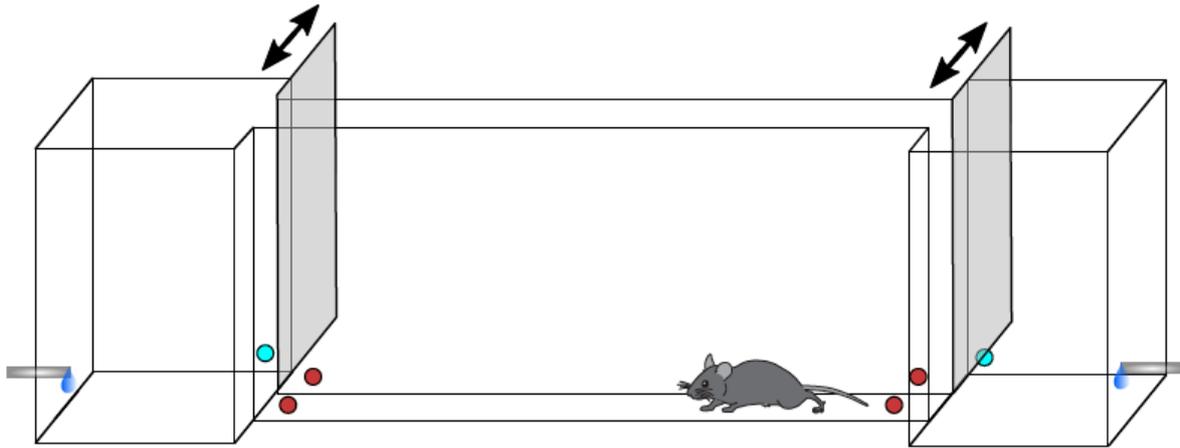
### III. Resultados

#### Puesta a punto del test de latencia

Para poder medir dificultades en la iniciación de la locomoción pensamos en diseñar un test en el que podamos registrar cuando los animales van a iniciar el movimiento. Para ello, diseñamos un dispositivo en el que, al abrirse una puerta automática, a los animales se les habilita el paso por un corredor, el cual deben atravesar para obtener una recompensa en forma de una gota de agua. Los animales están motivados a cruzar el corredor ya que están privados de agua. Este test se realiza en una estructura de acrílico transparente, permitiendo obtener registros de video de los movimientos del animal.

#### Diseño del test.

La arquitectura básica del dispositivo utilizado en test de latencia se resume en dos ambientes cerrados a los extremos conectados entre sí por un corredor recto de 50 cm de longitud. En su conexión con el corredor, los ambientes tienen una puerta corrediza que se abre deslizándose hacia un costado mediante un sistema de piñón y cremallera, las cuales giran por la fuerza de motores paso a paso fijados a la base con acción manual. Para advertirle al ratón la incipiente apertura de la puerta, colocamos un estímulo visual (LED de color) adyacente a la misma, el cual se prende durante un período de tiempo aleatorio (dentro de un intervalo de 2 a 5 segundos) previo a la apertura de la puerta. El objetivo es que el animal aprenda que la señal luminosa predice la apertura de la puerta y le permita prepararse para iniciar el movimiento de locomoción. Inmediatamente después de cada puerta, dentro del corredor y a una altura adecuada, colocamos dos sensores infrarrojos que permiten detectar cuándo el animal ingresa desde el ambiente al corredor, y cuándo llega al otro extremo del corredor y está por salir al otro ambiente. Por último, al llegar al ambiente extremo el animal recibe una recompensa de agua que es entregada por medio de un pequeño tubo (habiendo uno en cada ambiente) conectado a una bomba que permite una liberación manual y precisa (disparada por el experimentador en el momento deseado) (**Figura 4**).

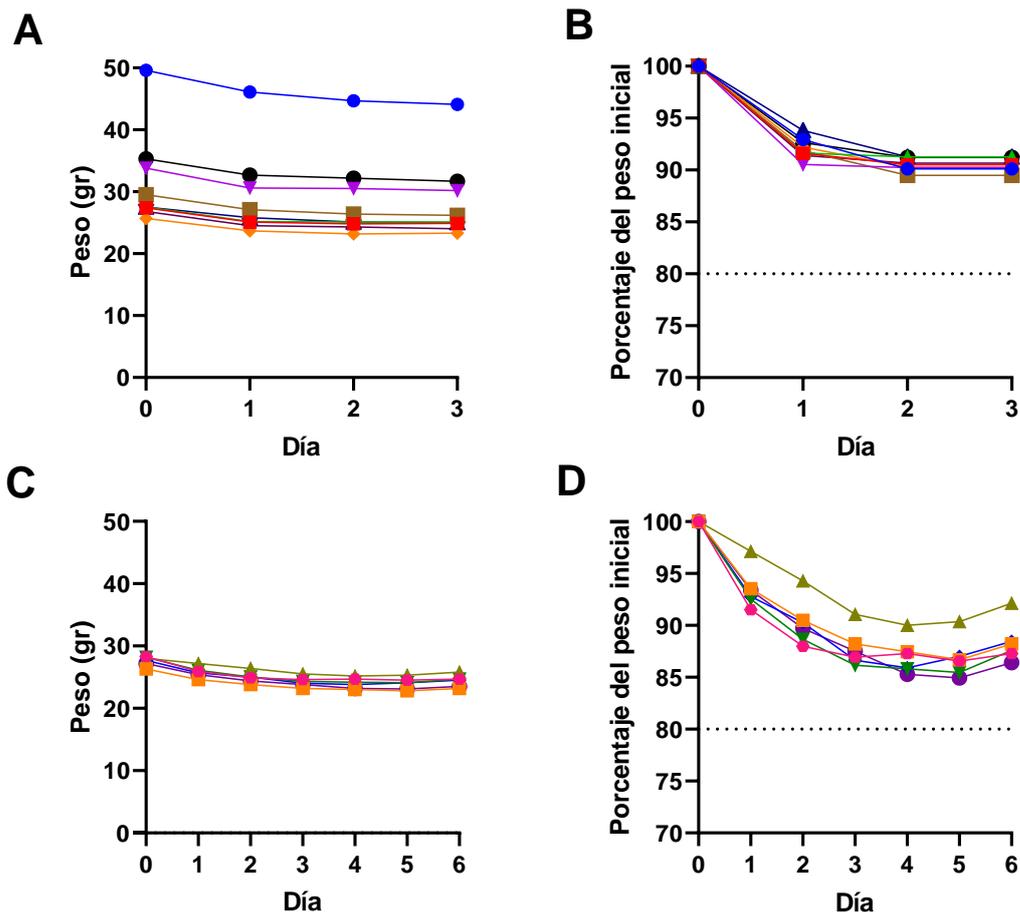


**Figura 4. Estructura y partes del test de latencia.** El test de latencia consiste en dos ambientes cerrados, conectados por un corredor recto. En el punto de unión de cada ambiente con el corredor hay una puerta corrediza. Dentro de cada ambiente hay un tubo por medio del cual se libera la recompensa de agua y, cercano a la puerta, un LED que emite luz azul (círculos celestes). Dentro del corredor, ubicados inmediatamente después de las puertas, hay dos sensores infrarrojos (círculos rojos) que detectan el paso de los ratones.

Las puertas y los sensores tienen un puerto de salida que se conecta al input analógico de un sistema de adquisición comercial (Omniplex, Plexon inc) que adquiere y registra las señales emitidas por ambos elementos de manera sincronizada con los videos. Si bien el diseño experimental tiene el potencial de estudiar en detalle el movimiento del animal a partir de los videos, no hemos alcanzado a desarrollar dicho análisis en el tiempo de esta tesina. Por lo tanto, en este trabajo desarrollamos un script en python que nos permite calcular, a partir de las señales de apertura de las puertas y de los sensores, los siguientes parámetros: la **latencia mínima**, como el tiempo transcurrido entre que se abren las puertas y el ratón cruza el primer sensor; la **latencia máxima**: contempla el hecho que los ratones a veces solo se asoman al corredor y después retroceden, por lo tanto este valor de latencia corresponde al tiempo transcurrido entre que se abre la puerta y el animal cruza por última vez el sensor; y la **duración**: el tiempo que tardan los ratones desde que cruzan el primer sensor hasta que cruzan el segundo.

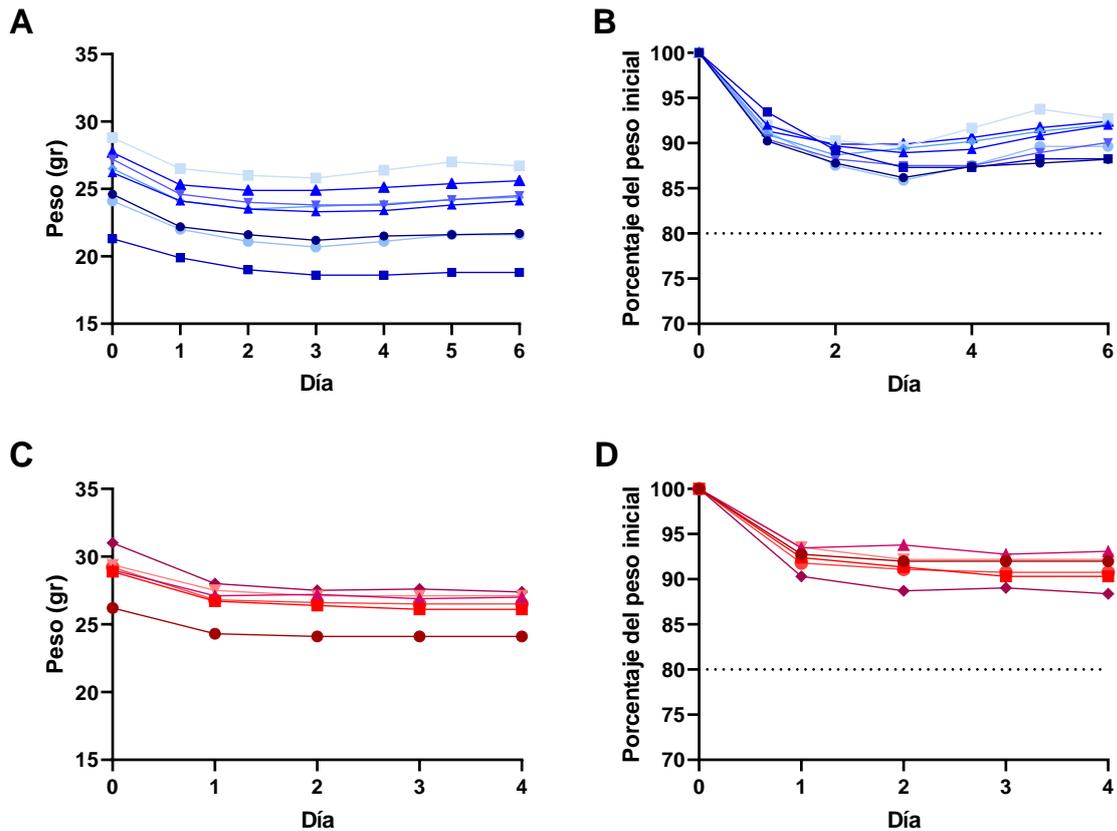
## Habitación y entrenamiento.

Antes de poder estudiar el efecto de la ablación o el silenciamiento neuronal sobre la locomoción, el test requiere de una primera etapa de aprendizaje, en la que los animales logren asociar la luz emitida por el LED a la apertura de la puerta y la obtención de la recompensa líquida al atravesar el corredor y llegar al otro ambiente. En este tipo de estudios es común recurrir a protocolos de restricción de agua para motivar a los animales a realizar la tarea (Toth & Gardiner, 2000) en los que los animales son expuestos a su fuente de agua durante un tiempo restringido por día. Con el objetivo de maximizar la motivación y minimizar el malestar de los animales, realizamos un estudio preliminar sobre la variación del peso de los ratones según el tiempo de hidratación diaria. Dado que la fluctuación del peso de los animales es un índice del bienestar de los mismos, buscamos una condición de hidratación en la que el peso de los animales no caiga por debajo del 85% de su peso inicial. Para ello probamos dos condiciones de hidratación diaria: 30 minutos versus 10 minutos de exposición al agua. La **Figura 5A-D** muestra el peso inicial y la fluctuación del peso de los animales en cada condición. Se observa que en ambas condiciones el peso se mantiene por encima del umbral de 85% de reducción, por lo que decidimos continuar con un protocolo de hidratación de 10 minutos por día.



**Figura 5. Estabilización del peso durante los estudios preliminares.** A y B) Pesos y variación del peso, respectivamente, de los ratones bajo una condición de 30 minutos de agua diarios (n=9). C y D) Pesos y variación del peso, respectivamente, de los ratones bajo una condición de 10 minutos de agua diarios (n=6). La línea punteada en B y D representa el umbral debajo del cual el bienestar de los animales se encuentra comprometido.

Dado que la restricción del acceso al agua suele generar estrés en los animales, los grupos experimentales en los que manipulamos la actividad del MLR fueron primero habituados a la restricción por un período de 4-5 días previo al comienzo del entrenamiento. La **Figura 6** muestra la fluctuación en el peso de los animales experimentales durante la habituación, cuyo valor se estabiliza por encima del 85% de fluctuación antes de iniciar el entrenamiento en el corredor. Los pesos se continúan monitoreando durante todo el experimento.



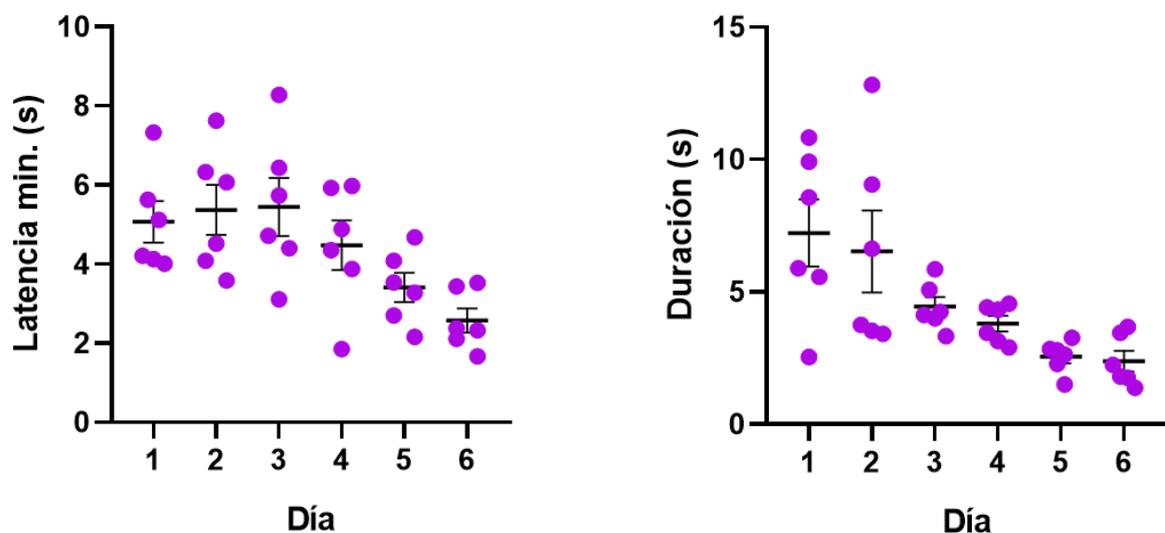
**Figura 6. Estabilización del peso de los grupos experimentales.** A y B) Peso y variación del peso, respectivamente, de los ratones del experimento de silenciamiento global del MLR (n=8). C y D) Peso y variación del peso, respectivamente, de los ratones del experimento de silenciamiento específico de neuronas Glu-MLR (n=6). La línea punteada en B y D representa el umbral debajo del cual el bienestar de los animales se encuentra comprometido.

### Protocolo de entrenamiento.

Para que el desempeño de los ratones en la tarea sea óptimo, es fundamental corregir/ajustar aquellos parámetros que puedan interferir en el correcto aprendizaje por parte de los ratones. Siguiendo este pensamiento, tuvimos que realizar varias modificaciones sobre el diseño original del corredor. Una de las correcciones que realizamos fue el reemplazo del estímulo visual. Inicialmente utilizamos una luz LED roja para indicar la inminente apertura de la puerta, pero notamos que los ratones no respondieron a este color. Por esta razón, y considerando que la retina de los ratones es sensible particularmente a longitudes de onda de 360-365 nm (ultravioleta) y de 511 nm (azul) (Jacobs et al., 1991), cambiamos el color del LED a azul que efectivamente sí visualizaron.

Dado que este test comportamental es nuevo, luego debimos definir la cantidad de días requeridos y el tiempo de entrenamiento necesario para el aprendizaje de la tarea, definido como la estabilización de la performance del animal.

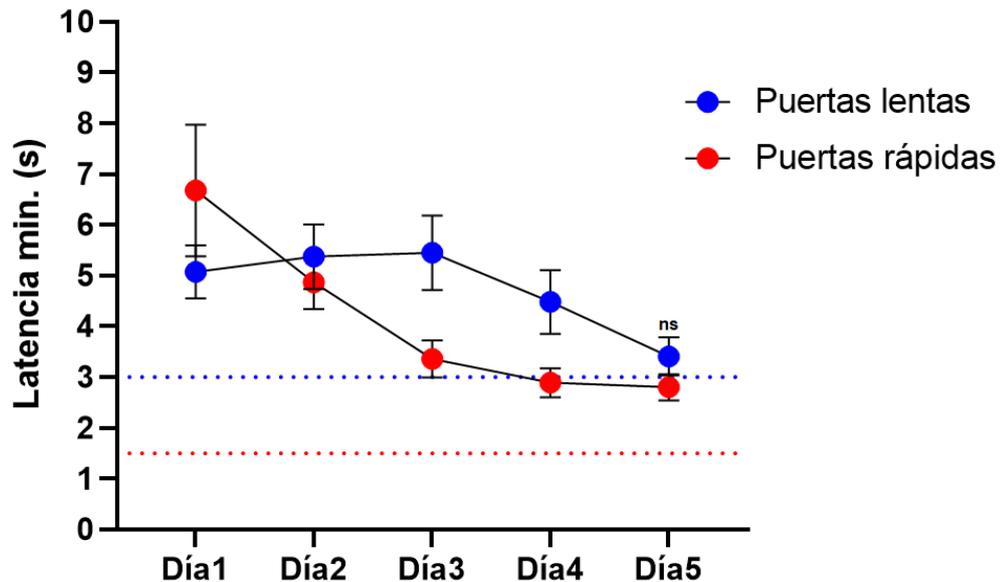
El entrenamiento consistió en colocar a los animales en el aparato una vez al día durante el tiempo necesario para que los animales realicen al menos 14 pasadas por el corredor. Utilizamos los valores de latencia mínima y de duración del recorrido como parámetros para evaluar cambios en la performance del animal a lo largo del entrenamiento. Los resultados de la **Figura 7** muestran la curva de aprendizaje de ratones wild type (C57Bl/6) que, en el transcurso de 6 días, mostraron una reducción significativa tanto de la latencia mínima como de la duración del recorrido.



**Figura 7. Curvas de aprendizaje C57Bl/6.** Se muestra, para cada uno de los seis días, el tiempo promedio de cada ratón, junto con la media  $\pm$  error estándar del total de individuos ( $N = 6$ ) (Paired t-Test, media de la diferencia Latencia Día 1 - Día 6 = 2,495 p-value = 0,0234; media de la diferencia Duración Día 1 - Día 6 = 4,837 p-value = 0,0129).

Al realizar dicho experimento notamos que las puertas se abrían muy lentamente (tardando 3 segundos en abrirse) comparable con el tiempo de respuesta del animal (media y error estándar =  $2,577 \pm 0,3052$  segundos). Dado que la señal de apertura de las puertas es emitida en el momento en el cual los motores comienzan a funcionar aunque el acceso al corredor no sea liberado inmediatamente, la apertura lenta de la puertas puede resultar en un valor de latencia muy alto que no depende de la capacidad de respuesta del animal, sino de la mecánica del aparato. Esto se observa como un valor de latencia mínimo (al finalizar el entrenamiento) similar al tiempo de apertura de las puertas. Esto es muy negativo ya que

podría impedir la detección de diferencias pequeñas entre animales controles y tratados. Por lo tanto, duplicamos la rapidez de la apertura de las puertas y entrenamos otro grupo de animales.



**Figura 8. Relevancia del cambio de puertas.** Diferencia en los tiempos de latencia antes (n=6) y después (n=8) de cambiar las puertas. La línea punteada azul indica la velocidad de apertura con puertas lentas (3 segundos), mientras que la línea punteada roja indica la de las puertas rápidas (1,5 segundos). Se muestra el tiempo medio y el error estándar de cada grupo de ratones para cada día. Paired t-Test, media de la diferencia Puertas lentas – Puertas rápidas = 0,6378; p-value = 0,3721; ns p>0,05.

La **Figura 8** compara los valores de latencia obtenidos con las puertas de apertura lenta y rápida. Si bien los valores de latencia obtenidos en el último día de entrenamiento no son significativamente diferentes entre ambos grupos, esta modificación nos permite estar seguros que la latencia obtenida refleja el comportamiento animal y no limitaciones técnicas del aparato. Además, el cierre rápido de las puertas logró evitar que los ratones se movieran más rápido que estas, saliendo del ambiente en el que reciben la recompensa antes de que las puertas se cierren detrás de ellos y quedando atrapados en el corredor, frecuente en ratones avanzados en el entrenamiento. Esto podría generar un impedimento en la consolidación del aprendizaje sobre la tarea, ya que ante esta situación el test debía reiniciarse manualmente, interrumpiendo el desarrollo continuo del entrenamiento.

En conclusión, logramos diseñar un nuevo test comportamental que nos permite evaluar la latencia al inicio de la locomoción y el tiempo de locomoción, brindándonos la

herramienta necesaria para evaluar el rol del MLR en dichos comportamientos y su posible participación en el FoG.

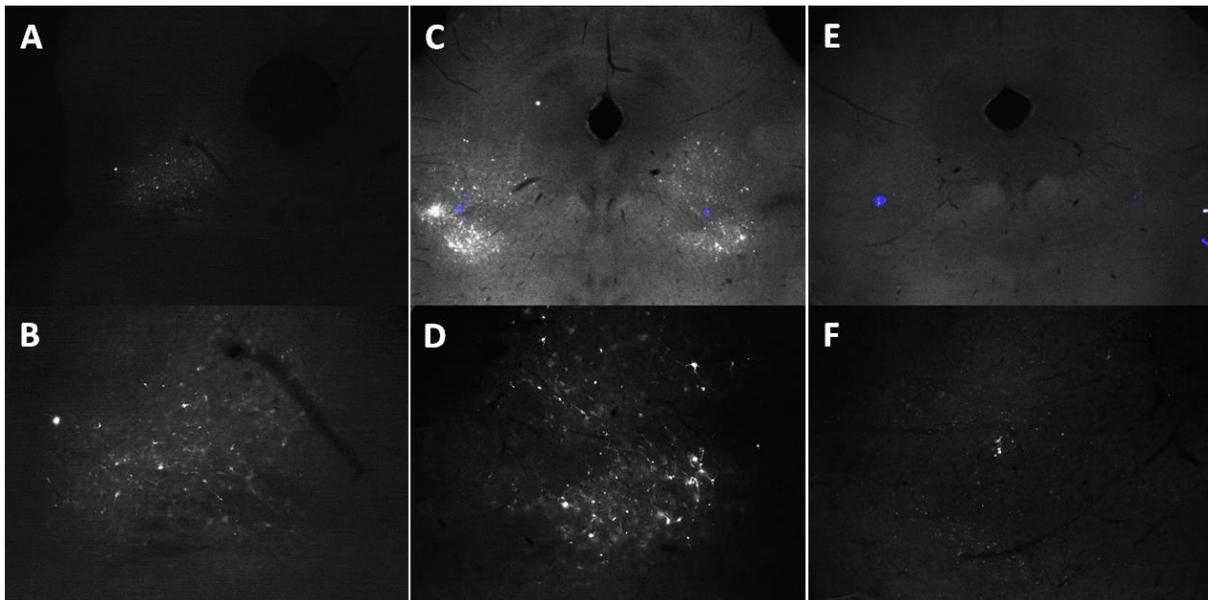
## Puesta a punto del método de ablación

En este trabajo nos propusimos manipular de manera selectiva la actividad de las neuronas glutamatérgicas de la región locomotora del mesencéfalo (Glu-MLR) ya que las mismas están directamente relacionadas con el control de la locomoción. Para ello decidimos utilizar un método de ablación selectiva que se basa en la inducción de apoptosis disparada por la activación del receptor de la toxina diftérica (DTR) en respuesta a su ligando DTA. Esta estrategia permite el control temporal de la ablación a través de la inyección de la DTA y un alto grado de especificidad dado por la expresión controlada del DTR. Esta se logra mediante la inyección local en el MLR de un vector viral adeno-asociado (AAV) que porta el gen de DTR fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP), cuya expresión es dependiente de Cre (pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP) en ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre en neuronas glutamatérgicas subcorticales, incluyendo al tronco encefálico (vGlut2-IRES-Cre). Si bien esta estrategia fue utilizada numerosas veces por la directora de este proyecto en trabajos previos, en este proyecto utilizamos un vector viral diferente por lo que se debió poner a punto el protocolo. Para ello, inyecté 10 animales: ocho con el virus pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP y dos con una mezcla 1:1 de los virus pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP y pAAV(9)-pCAG-FLEX-tdTomato. Los ratones inyectados con pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP fueron divididos al azar en dos grupos: 4 ratones "tratamiento" que recibieron una inyección intraperitoneal de DTA pasadas las dos semanas desde la inoculación del vector viral, y cuatro ratones "control" que no recibieron DTA.

Los ratones inyectados con pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP y pAAV(9)-pCAG-FLEX-tdTomato también fueron divididos en un grupo "control" y un grupo "tratamiento". La marca lograda a través de los vectores virales depende de varios factores: el título (concentración) del virus, el serotipo, y el promotor utilizado. El virus pAAV(9)-CAG-FLEX-tdTomato utiliza un promotor fuerte (CAG) y un serotipo (AAV(9)) que difunde bastante en el tejido. El virus pAAV(2)-CBA-FLEX-DTR-GFP utiliza un promotor más débil (CBA) y un serotipo (AAV(2)) que presenta una difusión restringida en el tejido. Por lo tanto, la co-inyección de ambos virus resulta útil tanto para evaluar la expresión del virus pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP en comparación con un virus de expresión conocida, como su capacidad de

inducir la ablación neuronal. Esperamos ver, en el grupo control, una región con marca verde (DTR-GFP) y roja (Tomato) restringida al centro de la inyección rodeada por una zona más grande únicamente roja (debida a la diferencia de difusión de los virus). Por otra parte, en el grupo tratado, esperamos ver la desaparición de neuronas GFP+, mientras que la presencia de neuronas Tomato+ restantes (un poco más alejadas del centro de inyección) nos permite confirmar la precisión del sitio de inyección.

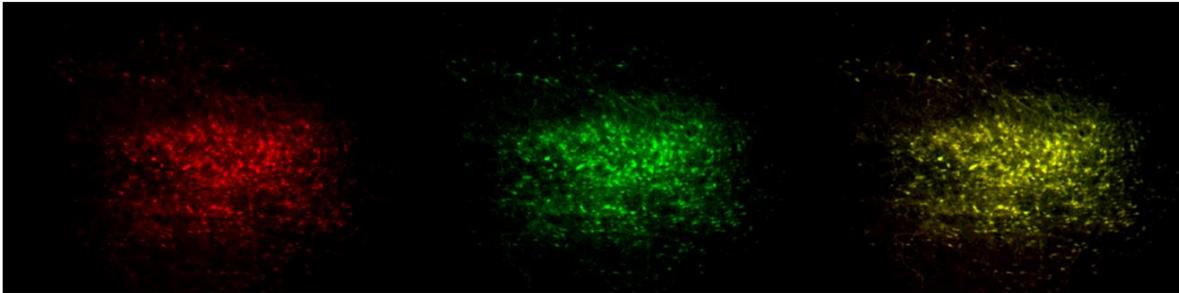
Sorprendentemente, las inyecciones del virus pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP en los ratones control no solo mostraron muy pocas neuronas con marca, sino que, además, fue posible observar indicios de muerte neuronal, como debris celulares fluorescentes y neuronas deformadas (**Figura 9A-B**). El aumento del volumen de virus inyectado no permitió aumentar la cantidad de neuronas marcadas sino todo lo contrario, resultó en mayor muerte neuronal inespecífica (**Figura 9C-D**). Esto nos sugiere una posible toxicidad basal del virus utilizado. En el caso de los ratones de este grupo que recibieron el tratamiento con DTA, las inyecciones resultaron en una completa desaparición de la marca de fluorescencia verde indicando la muerte neuronal (**Figura 9E-F**).



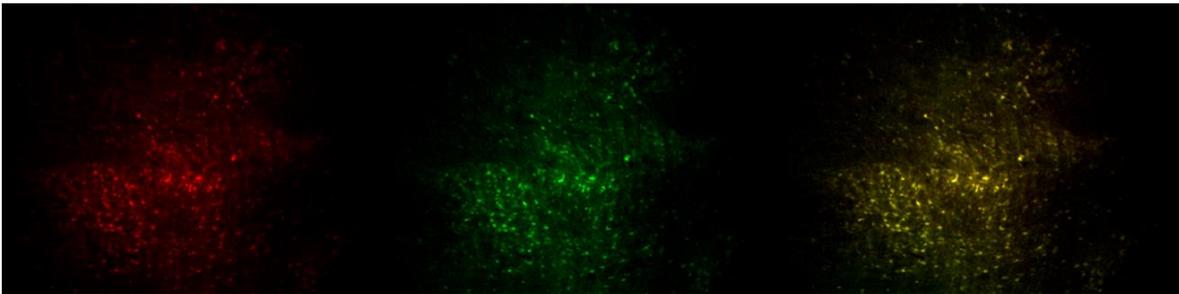
**Figura 9. Sitios de inyección, expresión del virus pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP y muerte neuronal.** A y B) Control: Sitio de inyección en 4x (arriba) y 10x (abajo). Inoculación: 50nl de virus (n=1). C y D) Control: Sitio de inyección en 4x (arriba) y 10x (abajo). Inoculación: 100 nl de virus más partículas fluorescentes (BEADS) que marcan de manera puntual el sitio de inyección en azul (n=3). E y F) Tratamiento con DTA: Sitio de inyección en 4x (arriba) y 10x (abajo). Inoculación: 100 nl de virus (n=4) más BEADS en azul.

Lamentablemente, la inyección de pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP y pAAV(9)-pCAG-FLEX-tdTomato resultó en una completa coincidencia de ambas marcas, tanto en el control como en tratamiento con DTA (**Figura 10A-B**). Es altamente probable que la fluorescencia roja de tomate, al ser una señal tan fuerte, esté cruzando al canal verde, obteniéndose una imagen incorrecta.

**A**



**B**



**Figura 10. Resultados de la co-inyección viral.** Virus pAAV(2)-FLEX-DTR-GFP (verde), pAAV(9)-pCAG-FLEX-tdTomato (rojo) y superposición de ambas marcas (amarillo). **A.** Individuo control (n=1). **B.** Individuo tratamiento (n=1).

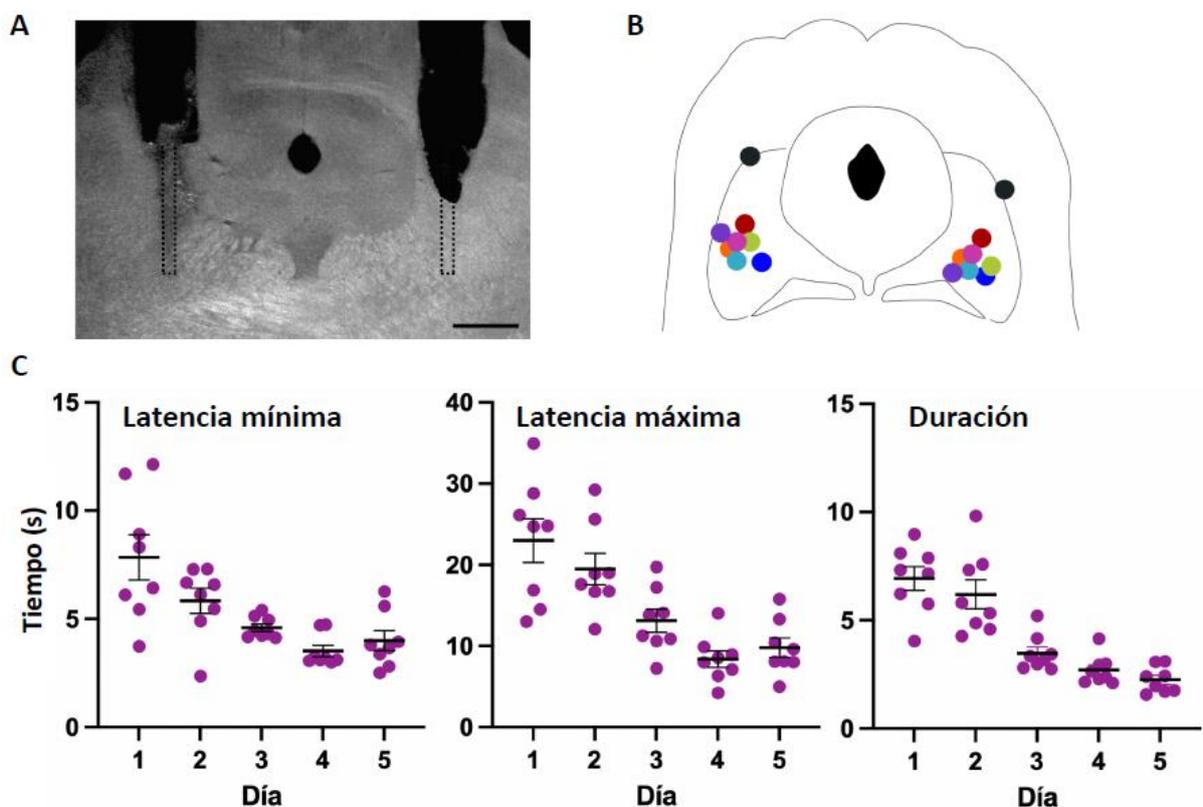
En base a estos resultados, optamos por abandonar el método de ablación neuronal dada la aparente toxicidad y baja eficiencia del virus adquirido para esta estrategia, continuando con la utilización de otras técnicas en las que se recurre al silenciamiento temporal de las neuronas.

## Silenciamiento reversible de la actividad del MLR

### Silenciamiento global del MLR.

Para poner a prueba la capacidad del test de medir cambios en la latencia al caminar, decidimos silenciar de forma general las neuronas del MLR por medio de la inyección directa de tetrodotoxina (TTX). Esta droga bloquea de forma reversible los canales de sodio

dependientes de voltaje, interrumpiendo la conducción de potenciales de acción como también la transmisión sináptica (Kaneda et al., 1989). Para focalizar su acción sobre las neuronas del MLR, implanté cánulas bilaterales en 8 ratones de manera tal que permitieran la inyección de la droga directamente en dicha región (**Figura 11A-B**). Luego de que se recuperaron de la operación y que su peso se estabilizó (**Figura 6A-B**), los ratones fueron entrenados en el test de latencia durante cinco días, durante los cuales se volvieron expertos en la tarea, reduciendo su latencias mínima y máxima al inicio de la locomoción y la duración del tiempo de recorrido (**Figura 11C**). Luego, evaluamos el efecto de la administración local de diferentes dosis de TTX en la performance del test en comparación con el último día de entrenamiento o la administración de solución fisiológica (SF) realizada en días posteriores a la administración de TTX (**Figura 12**). Finalmente, corroboramos los sitios de implantación mediante un análisis anatómico e inmunohistoquímico (**Figura 11A-B**). De los 8 animales implantados, hubo uno cuyas cánulas quedaron muy dorsales no llegando a tocar al MLR, por lo que fue descartado del posterior análisis (**Figura 11B**, círculos negros).



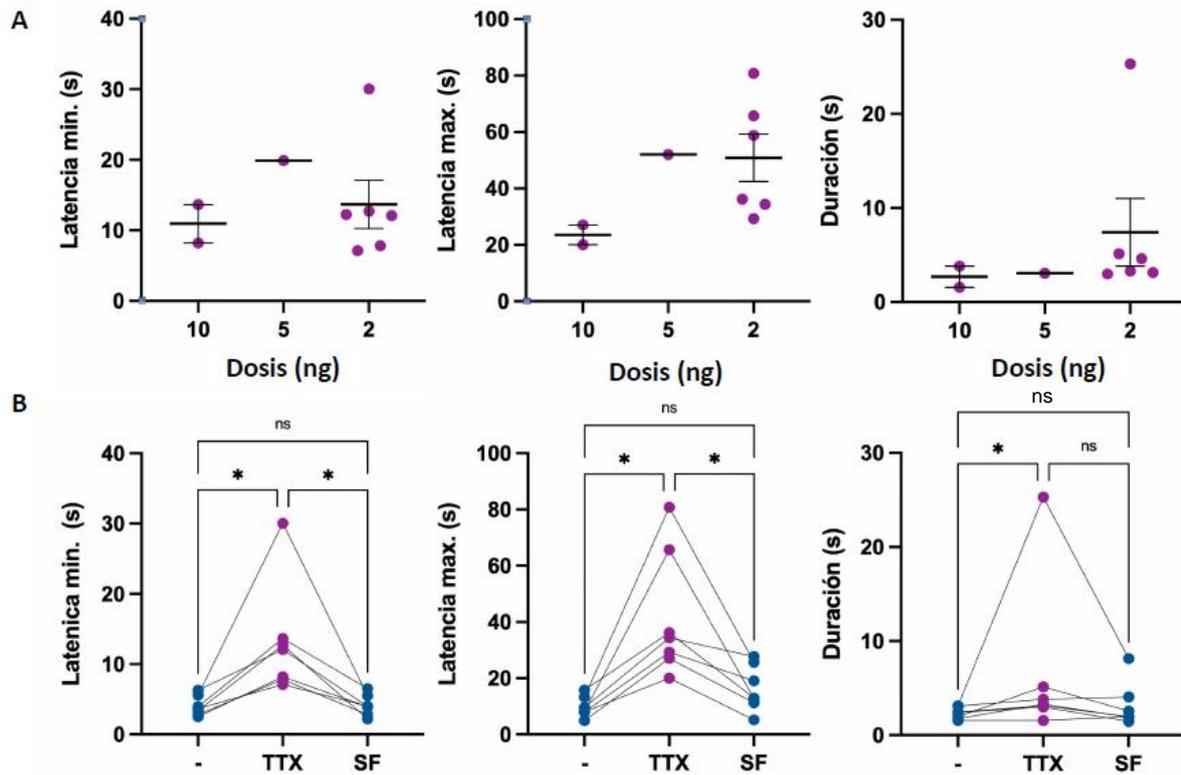
**Figura 11. Implantes y entrenamiento.** A) Corte coronal que muestra la entrada de una cánula; escala = 500  $\mu$ m. B) Esquema con los diferentes sitios de inyección, cada color representa una cánula bilateral (N = 8). C) Latencia mínima, máxima y duración del recorrido durante el entrenamiento. Se

muestra, para cada día, el promedio de cada ratón y la media  $\pm$  error estándar del total de individuos (N = 8).

En base a los datos de la literatura, probamos el efecto de 3 dosis de TTX: 10ng (N = 2), 5ng (N = 1) y 2 ng (N = 6). Encontramos que la administración de una dosis alta de TTX provocó una completa inmovilidad del animal por varias horas, efecto que puede llegar a permanecer en un animal por más de 24 horas. Además, una vez que fueron capaces de levantarse, los ratones que recibieron esta dosis rara vez lograron moverse en línea recta, realizando giros en un solo sentido y sobre un mismo lugar por un par de horas. Los animales inyectados con dosis alta fueron testeados en el corredor una vez que fueron capaces de caminar voluntariamente en su jaula aunque con cierta dificultad y fueron re-evaluados a dosis más bajas. Si bien por el conocido rol del MLR en la locomoción esperábamos observar un efecto en la movilidad del animal, la severidad del efecto observado fue mucho mayor de lo esperado. Cabe destacar que la ablación de las neuronas glutamatérgicas del MLR no afecta a simple vista el movimiento del animal (datos no mostrados).

Dada la severidad del efecto de la TTX decidimos no probar en todos los animales las dosis altas y focalizarnos en las bajas (2 a 5 ng). Si bien el número de animales testeados en cada dosis es pequeño, igualmente evaluamos si se observaba una tendencia en la curva dosis-respuesta (**Figura 12A**). Observamos valores similares o a veces menores en la latencia y duración del recorrido de animales tratados con dosis altas. La falta de un mayor efecto en dosis altas puede deberse a la dilución del efecto a lo largo del tiempo.

La **Figura 12B** muestra los valores de la respuesta comportamental a dosis bajas. Se observó un aumento significativo en el valor de la latencia mínima y máxima al inicio de la locomoción, como también en la duración del recorrido entre el último día de entrenamiento y el tratamiento, pero no fue así entre el tratamiento y el control para éste último parámetro.



**Figura 12. Efectos de las dosis utilizadas sobre los parámetros medidos.** **A)** Promedio de la latencia mínima, máxima y duración del recorrido según las dosis utilizadas: 10 ng (n=2), 5 ng (n=1) y 2 ng (n=6). Se muestra la media  $\pm$  error estándar. **B)** Latencia mínima, máxima y duración del recorrido al final del entrenamiento (-), durante el tratamiento (TTX) y el control (SF). ANOVA de una vía para medidas repetidas, post-test Tukey de comparaciones múltiples. N=7. \* $p < 0,05$ ; ns  $p > 0,05$ .

Estos resultados nos permiten concluir que el test diseñado permite evaluar cambios en la latencia al caminar, y que el MLR es necesario para el correcto inicio de la locomoción.

### Silenciamiento de las neuronas glutamatérgicas del MLR

Para poder estudiar el rol específico de las neuronas glutamatérgicas del MLR, realizamos un último experimento silenciando específicamente estas neuronas. Para esto, utilizamos un virus de expresión Cre dependiente que porta el gen de la proteína hM4Di, un receptor de membrana asociado a proteína-G artificial diseñado para ser activado específicamente por un ligando sintético denominado N-Óxido de Clozapina (CNO). Esta técnica químico-genética actúa generando una hiperpolarización de la membrana y el silenciamiento de las neuronas de manera reversible, ya que la activación del receptor hM4Di gatillada por la unión del CNO comienza una cascada de señalización asociada a proteína G

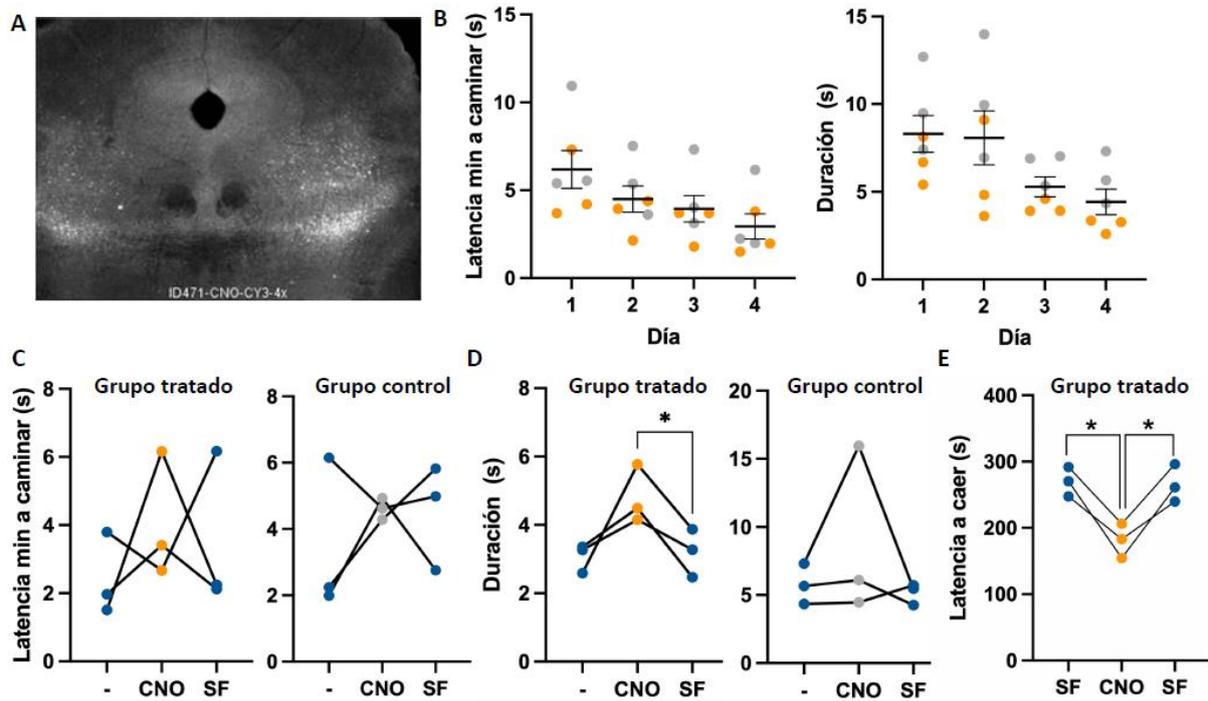
que termina en la activación de canales importantes en la regulación de la excitabilidad neuronal, como los canales de potasio. Como el ligando es inerte y logra atravesar la barrera hematoencefálica, este puede ser inyectado por vía intraperitoneal (IP) permitiendo controlar el momento del silenciamiento, teniendo una acción máxima aproximadamente a los 45' de realizar la inyección IP de CNO (Armbruster et al., 2007; Parfitt et al., 2017; Miao et al., 2007).

Para lograr el silenciamiento selectivo de las neuronas Glu- MLR utilizamos un vector viral de expresión dependiente de la recombinasa Cre (pAAV(5)-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry), el cual fue inyectado en el MLR de ratones transgénicos vGlut2-IRES-Cre (animales recibidos gentilmente de Leonardo Molano Ramirez, estudiante de doctorado del laboratorio) (**Figura 13A**). Como grupo control utilizamos animales inyectados con un vector viral dependiente de Cre que expresa la proteína fluorescente verde (GFP). Nuevamente, como la expresión del genoma viral es Cre-dependiente y los ratones transgénicos utilizados expresan la recombinasa Cre solo en neuronas glutamatérgicas, la expresión del gen de interés ocurre únicamente en estas neuronas, confiriendo a la técnica una alta especificidad de acción.

Los ratones (n=6) fueron entrenados en el test de latencia durante cuatro días (**Figura 13-B**) y al quinto día, registramos nuevamente su desempeño 45' después de la administración IP de CNO. La inyección de CNO en animales controles nos permite verificar la ausencia de efectos indeseados ocasionados por la droga. Dado que el efecto del CNO es reversible, al día siguiente testeamos nuevamente a los animales para analizar su recuperación. Si bien el experimento realizado es preliminar (n=3 de cada grupo), no hubo diferencias significativas en la latencia mínima tanto dentro del grupo tratamiento como del control (**Figura 13-C**). Sin embargo, el tratamiento sí tuvo un efecto significativo en la duración del recorrido en el grupo experimental, no observada, como es de esperarse, en el control (**Figura 13-D**). Cabe mencionar que los animales no mostraron ningún fenotipo evidente como en el caso de la inyección de TTX.

Es importante destacar que estos mismos ratones habían sido entrenados y testeados previamente en la prueba de rotarod con aceleración. Dicho test consiste en evaluar el tiempo en que el animal permanece sobre un cilindro que gira a velocidades crecientes (latencia a caer). La **Figura 13-E** muestra los resultados de los mismos animales expertos en el rotarod al silenciar las neuronas Glu-MLR y ser evaluados en la tarea del rotarod con aceleración

(resultados cedidos por Leonardo Molano Ramirez). Los resultados muestran que, en dicho paradigma comportamental, el tratamiento con CNO sí originó dificultades en el desempeño de la tarea (**Figura 13-E**) indicando que la estrategia utilizada es capaz de dar un fenotipo dependiendo de los requerimientos de la tarea.



**Figura 13.** Efecto del silenciamiento de neuronas Glu-MLR en el test del corredor. **A.** Sitio de inyección de uno de los animales experimentales donde se observa la expresión del virus en el MLR. **B.** Latencia mínima y duración del recorrido a lo largo del entrenamiento en el test del corredor. Los puntos naranjas corresponden al grupo experimental y los grises al grupo control. Se muestra el promedio y error estándar. **C-D.** Latencia mínima y duración del recorrido en el grupo experimental (izquierda) y el grupo control (derecha). **E.** Mismo grupo de animales testeado en el rotarod con aceleración. \* $p < 0,05$ .

## IV. **Discusión y conclusiones**

En este trabajo diseñamos exitosamente un test comportamental novedoso que nos permitió entrenar ratones en una tarea comprensible y realizable por los individuos, haciendo posible el registro de la latencia en la iniciación de la locomoción. Además, implementamos dos estrategias que permiten controlar reversiblemente la actividad de la región locomotora del mesencéfalo de forma general como también específicamente de sus neuronas glutamatérgicas para evaluar su importancia y papel en la locomoción empleando dicho test comportamental. Durante el silenciamiento general del MLR observamos una notable disminución en la capacidad locomotora de los animales. Por otro lado, encontramos preliminarmente que el silenciamiento selectivo de las neuronas glutamatérgicas por medio de técnicas farmacogenéticas no genera un efecto marcado sobre el inicio de la locomoción de los animales.

### Desarrollo del test que permite evaluar la latencia de la iniciación de la locomoción.

En estudios sobre la locomoción y patrones de marcha en modelos murinos de la EP, los tests de comportamiento comúnmente utilizados, como el open field, el rotarod con aceleración, las cintas caminadoras y demás, permiten observar cambios en la continuidad de la marcha, su velocidad, los diferentes patrones existentes o el desarrollo de dificultades de estabilidad. De esta forma, evidencian claramente el efecto de síntomas que afectan directamente la ejecución de movimientos, la marcha o la postura de los animales (Amende et al., 2005; Thevathasan et al., 2012; Baik et al., 1995), de manera que resultan muy útiles en el caso de síntomas característicos de la EP como la bradicinesia o la rigidez. Sin embargo, no existe hasta ahora un test capaz de evaluar el FoG, uno de los síntomas más debilitantes y no tratables de la EP. Con el test de latencia que desarrollamos en esta tesina, evaluamos la relación entre la ejecución de un movimiento y el comando de iniciación del mismo, lo que nos habilita a hacer una aproximación al estudio de la congelación de la marcha o FoG. Nuestros resultados muestran que, tras repetidos entrenamientos, el desempeño de los ratones en el dispositivo de latencia mejora significativamente, aprendiendo la tarea en corto tiempo. Luego, demostramos la capacidad del test diseñado de poner en evidencia defectos del movimiento inducidos por el silenciamiento de las neuronas del MLR.

El dispositivo diseñado y puesto a punto en esta tesina tiene la potencialidad de ser utilizado para el estudio de otros síntomas de la EP, ya que existe la posibilidad de hacer registros de la marcha y de los trastornos asociados a la misma por medio de cámaras, obteniendo datos sobre el movimiento de las patas en una vista lateral y/o ventral. Al ser abierto en su parte superior, no genera impedimentos para los materiales utilizados en estudios de optogenética, registro de actividad neuronal, u otras estrategias que también requieran de largas proyecciones de cables desde el animal hacia los equipos de adquisición/control.

Finalmente, el desarrollo de un test de latencia que permite evaluar efectos en el comportamiento semejantes al FoG facilitará la comprensión de los mecanismos circuitales subyacentes a dicho síntoma y a evaluar la eficacia de nuevas estrategias terapéuticas que apunten a aliviarlo.

### Silenciamiento global del MLR mediante la administración de TTX.

Desde su inicial descripción funcional, la región locomotora del mesencéfalo ha sido caracterizada como una región de suma importancia en el comportamiento locomotor, siendo suficiente en la generación de patrones locomotores a partir de su estimulación eléctrica (Shik et al., 1966). Desde entonces, se han realizado múltiples estudios sobre su activación durante la marcha y el efecto de su estimulación en diferentes especies, que continuaron apoyando su participación conservada en el control de la locomoción (Brudzynski & Wang, 1996; Jordan, 1998; Garcia-Rill et al., 1985; Le Ray et al., 2011). Los experimentos de activación neuronal de manera artificial son útiles para evaluar si las mismas son suficientes para evocar una respuesta, aunque muchas veces es difícil distinguir entre el rol de las neuronas activadas *per se* y el del circuito al que pertenecen.

Por otro lado, la estrategia que adoptamos en este trabajo recurre al silenciamiento general de esta región, de esta manera nos enfocamos específicamente en evaluar la necesidad del MLR para la locomoción. Para lograr esto utilizamos tetrodotoxina (TTX) porque, en comparación con anestésicos locales como la lidocaína o los neurotransmisores inhibitorios como GABA, su efecto habilita una ventana temporal más amplia durante la cual poder realizar experimentos comportamentales y observar la expresión de un fenotipo (Freund et al., 2010; Malpeli, 1999). Además, según la literatura la difusión de, por ejemplo, 200nl (5,0 ng/0,2 µl) alcanza los 0,6 mm de diámetro desde el sitio de inyección (Sanford et

al., 2005) y el MLR se extiende 1mm en dirección rostro-caudal, 1mm dorsal-ventral y 500-800 micrones lateral, por lo que esperábamos que aproximándonos a este volumen el efecto se limitara al MLR. Sin embargo, al unirse directamente a canales de sodio, existe la posibilidad de que también afecte a axones que pasan a través del MLR, generando efectos no deseados.

Tras el silenciamiento del MLR, los ratones tuvieron grandes dificultades para moverse y, una vez que recuperaron su movilidad voluntaria, pudimos observar un aumento significativo en el inicio de la marcha. Estos resultados demuestran que efectivamente el correcto funcionamiento del MLR es necesario para la iniciación de la locomoción. Esto coincide con hallazgos de experimentos previos en los que la actividad del MLR se ve comprometida. Por ejemplo, Brudzynski et al. (1993) demuestran que la interferencia de la transmisión sináptica dentro del MLR en ratas genera una disminución significativa en la locomoción, aunque no llega a generar parálisis total. También hay reportes de casos de estudio particulares, en los que pacientes con lesiones discretas en el cerebro presentan ataxia (imposibilidad de moverse) e indecisión en la marcha (Hathout & Bhidayasiri, 2005). Otro ejemplo es el trabajo de García-Rill et al. (1985), en el que demuestran que es posible bloquear la locomoción por medio de la inyección de GABA o muscimol.

Sin embargo, los primeros estudios sobre lesiones específicas dirigidas al CnF o el PPN, ambos componentes del MLR, proporcionaron resultados poco claros y conflictivos. Por ejemplo, en algunos experimentos se muestra que lesiones realizadas en un núcleo o el otro no generaban efectos negativos sobre la locomoción espontánea (Allen et al., 1996; Inglis et al., 1994), mientras que, en otros, la lesión de zonas similares en el PPN sí resultaban en una reducción de la actividad locomotora (Brudzynski & Mogenson, 1985). Es posible que esto se deba a la dificultad de manipular selectivamente regiones del cerebro tan pequeñas y con una compleja heterogeneidad funcional.

## Silenciamiento de las neuronas glutamatérgicas del MLR mediante la administración de CNO.

El MLR es anatómicamente muy heterogéneo, desde la variedad neuronal que lo compone, como neuronas glutamatérgicas, gabaérgicas y colinérgicas (Martinez-Gonzalez et al., 2011; Wang & Morales, 2009) hasta las proyecciones aferentes y eferentes, tanto corticales, subcorticales y espinales (Sherman et al., 2015; Sébille et al., 2017). Dada la

heterogeneidad del circuito, la comprensión del origen de ciertos síntomas de la EP, como el FoG, requiere de la utilización de técnicas más modernas que permiten una excelente precisión celular. En este trabajo exploramos particularmente el efecto comportamental del silenciamiento específico de las neuronas glutamatérgicas del MLR (Glu-MLR). Inicialmente, este experimento se iba a realizar por medio de la ablación selectiva de las neuronas Glu-MLR, utilizando una estrategia de inducción de apoptosis mediante la inyección en el MLR de ratones vGlut2-Cre con un vector viral que codifica de manera condicional el receptor de la toxina diftérica y la posterior administración IP de su ligando. Sin embargo, ante la evidente toxicidad de dicho virus, resultó necesario recurrir al uso de otra estrategia, basada en el silenciamiento de la actividad neuronal por medio de otro vector viral que expresa el receptor h4MDi de manera condicional y que se activa por su ligando CNO inyectado vía IP. Si bien las inyecciones fueron realizadas exitosamente en la región deseada, es importante destacar que el silenciamiento continúa siendo general, ocurriendo sobre todas las neuronas glutamatérgicas del MLR en conjunto, sin distinguir entre subregiones intra-MLR. Bajo esta estrategia, nuestros datos preliminares no mostraron cambios significativos en el test de latencia, lo cual podría indicar que la pérdida de función de las neuronas Glu-MLR no tendría efecto sobre la iniciación de la locomoción, lo que podría descartar que puedan llegar a participar en el desarrollo de trastornos de la marcha asociados a la EP. Sin embargo, si bien estos datos son aún preliminares (N=3 por grupo), el silenciamiento de las neuronas Glu-MLR sí produjo un leve aumento en la duración del recorrido, lo cual también podría estar implicado en formas diferentes de FoG en donde el síntoma se caracteriza por el arrastre de los pies con pequeños pasos, o por otro tipo de síntomas de la EP como la bradicinesia. El estudio del movimiento de las patas a través de los videos nos permitirá discernir entre estas posibilidades.

Es importante destacar que los mismos animales que fueron estudiados en el test de latencia durante el silenciamiento de las neuronas Glu-MLR también fueron evaluados en las mismas condiciones en el rotarod con aceleración, donde se observaron diferencias significativas. Esto nos indica que la concentración de CNO utilizada y la expresión del receptor es lo suficientemente alta como para obtener un fenotipo comportamental a pesar de que es sabido que estas estrategias no logran silenciar completamente la actividad neuronal. Sin embargo, el rotarod es un test que evalúa una habilidad recientemente aprendida mientras que el test de latencia estudia una capacidad innata del animal, que podría contar con

múltiples circuitos compensatorios. Estas diferencias podrían explicar los resultados obtenidos.

La heterogeneidad anatómica y funcional del MLR ha sido ampliada aún más en el último tiempo. Estudios recientes (Caggiano et al., 2018; Ferreira-Pinto et al., 2021) demuestran que, dentro del MLR, existen subpoblaciones de neuronas glutamatérgicas que se diferencian tanto por sus proyecciones como también por su rol en el comportamiento locomotor, por lo que silenciar sin discriminar entre grupos funcionalmente diferentes podría llevar a resultados poco claros respecto al papel de neuronas específicas en el comportamiento locomotor. Para sustentar esta idea, por ejemplo, Capelli et al. (2017) muestran que la estimulación optogenética conjunta de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en una región locomotora del tallo encefálico caudal no tiene ningún efecto comportamental, mientras que la estimulación discreta de los grupos por separado sí lo tiene, sugiriendo que la activación/inhibición de subpoblaciones con funciones opuestas puede enmascarar la aparición de un efecto comportamental. En este contexto, la existencia en el MLR de subpoblaciones de neuronas glutamatérgicas con respuestas procinéticas y anticinéticas ante la estimulación optogenética distinguibles por su proyección axonal descendente o ascendente (Ferreira-Pinto et al., 2021), permitiría especular una situación de enmascaramiento del efecto comportamental en nuestros resultados.

En base a lo expuesto en esta sección, surge la necesidad de realizar un trabajo de manipulación neuronal con mayor capacidad de resolución entre grupos diferentes, con el fin de determinar claramente si la expresión de trastornos de la marcha específicos en pacientes con EP se relaciona con la pérdida de funcionalidad de subpoblaciones neuronales GLU-MLR específicas.

### Experimentos a futuro y conclusión final.

En base a lo expuesto en este trabajo, a continuación realizamos diferentes propuestas que permitan el avance y extensión del mismo. En primer lugar, sería necesario validar el test de latencia utilizando un modelo de Parkinson tradicional basado en ratones transgénicos que permitan la ablación selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (DAT-Cre), que acabamos de recibir en el laboratorio. Además, esto permitiría evaluar si las neuronas dopaminérgicas de la SNc contribuyen, o no, a los síntomas de FoG. Alternativamente, se podrían utilizar modelos de sobreexpresión de alfa-sinucleína mediante vectores virales

condicionales o la inyección de fibrillas preformadas de alfa-sinucleína, modelos que permiten estudiar la progresión y transmisión de la enfermedad a lo largo del tiempo. Estos modelos permiten no solo comprender el origen de los síntomas sino también correlacionar el grado de disfunción neuronal con la aparición del defecto comportamental. En segundo lugar, es necesario poner a punto un protocolo de producción de virus en el laboratorio para poder utilizar otros vectores virales que permitan la expresión de DTR sin causar toxicidad y, con ellos, lograr realizar el experimento de ablación de las neuronas Glu-MLR. Por último, es posible que sea necesario inhibir, activar o ablacionar específicamente las diferentes subpoblaciones de neuronas glutamatérgicas del MLR para determinar claramente si la expresión de trastornos de la marcha específicos en pacientes con EP se relaciona con la pérdida de su funcionalidad.

En conclusión, el trabajo realizado durante esta tesina brinda un acercamiento novedoso al estudio experimental de los desórdenes de la locomoción generados por enfermedades neurodegenerativas, contribuyendo al mismo tiempo con la búsqueda y el estudio de las neuropatologías que las subyacen. Además, los resultados aquí desarrollados apoyan el ampliamente establecido papel de la región locomotora del mesencéfalo en el control de los movimientos y el desplazamiento de los animales, sosteniendo su deterioro como posible factor involucrado en el desarrollo de síntomas motores como el FoG característico de la Enfermedad de Parkinson.

## V. Bibliografía

1. Allen, L. F., Inglis, W. L., & Winn, P. (1996). *Is the cuneiform nucleus a critical component of the mesencephalic locomotor region? An examination of the effects of excitotoxic lesions of the cuneiform nucleus on spontaneous and nucleus accumbens induced locomotion*. Brain research bulletin, 41(4), 201-210.
2. Amende, I., Kale, A., McCue, S., Glazier, S., Morgan, J. P., & Hampton, T. G. (2005). *Gait dynamics in mouse models of Parkinson's disease and Huntington's disease*. Journal of neuroengineering and rehabilitation, 2(1), 1-13.
3. 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 potently activated by an inert ligand*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(12), 5163–5168. doi:10.1073/pnas.0700293104
4. Aziz, T. Z., Davies, L., Stein, J. & France, S. (1998). *The role of descending basal ganglia connections to the brain stem in Parkinsonian akinesia*. Br J Neurosurg 12, 245–249.
5. Baik, J. H., et al. (1995). *Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors*. Nature, 377(6548), 424-428.
6. Benabid, A. L. (2003). *Deep brain stimulation for Parkinson's disease*. Current Opinion in Neurobiology, 13(6), 696–706. doi:10.1016/j.conb.2003.11.001
7. Bendor, J. T., Logan, T. P., & Edwards, R. H. (2013). *The Function of  $\alpha$ -Synuclein*. Neuron, 79(6), 1044–1066. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.004
8. Bharti, K., Suppa, A., Tommasin, S., Zampogna, A., Pietracupa, S., Berardelli, A., & Pantano, P. (2019). *Neuroimaging advances in Parkinson's disease with freezing of gait: a systematic review*. NeuroImage: Clinical, 24, 102059.
9. Bloem, B. R., Hausdorff, J. M., Visser, J. E., & Giladi, N. (2004). *Falls and freezing of gait in Parkinson's disease: a review of two interconnected, episodic phenomena*. Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society, 19(8), 871-884.
10. Braak, H. et al. (2004). *Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology*. Cell Tissue Res 318:121–134. DOI 10.1007/s00441-004-0956-9

11. Braak, H., et al. (2003). *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. *Neurobiology of aging*, 24(2), 197–211. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00065-9).
12. Brudzynski, S. M., & Wang, D. (1996). *C-Fos immunohistochemical localization of neurons in the mesencephalic locomotor region in the rat brain*. *Neuroscience*, 75(3), 793-803.
13. Brudzynski, S. M., Wu, M., & Mogenson, G. J. (1993). *Decreases in rat locomotor activity as a result of changes in synaptic transmission to neurons within the mesencephalic locomotor region*. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 71(5-6), 394-406.
14. Brudzynski, S. M., & Mogenson, G. J. (1985). *Association of the mesencephalic locomotor region with locomotor activity induced by injections of amphetamine into the nucleus accumbens*. *Brain Research*, 334(1), 77-84.
15. Brundin, P. & Olanow, C. W. (2006). *Restorative Therapies in Parkinson's Disease*. Springer Science & Business Media.
16. Caggiano, V., et al. (2018). *Midbrain circuits that set locomotor speed and gait selection*. *Nature*, 553(7689), 455-460.
17. Capelli, P., Pivetta, C., Esposito, M. S., & Arber, S. (2017). *Locomotor speed control circuits in the caudal brainstem*. *Nature*, 551(7680), 373-377.
18. Chaudhuri, K. R., & Schapira, A. H. (2009). *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment*. *The Lancet Neurology*, 8(5), 464–474. doi:10.1016/s1474-4422(09)70068-7.
19. De Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). *Epidemiology of Parkinson's disease*. *The Lancet Neurology*, 5(6), 525–535. doi:10.1016/s1474-4422(06)70471-9
20. Dorsey, E. R., et al. (2018). *Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. *The Lancet Neurology*. doi:10.1016/s1474-4422(18)30295-3.
21. Dubuc, R. et al. (2008). *Initiation of locomotion in lampreys*. *Brain Res. Rev.* 57, 172–182.
22. Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). *Pathology of Neurodegenerative Diseases*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 9(7), a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>

23. Emamzadeh, F. N. (2016). *Alpha-synuclein structure, functions, and interactions*. Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences, 21, 29. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>
24. Espósito, M. S., & Arber, S. (2016). Motor control: illuminating an enigmatic midbrain locomotor center. *Current Biology*, 26(7), R291-R293.
25. Fasano, A., Aquino, C. C., Krauss, J. K., Honey, C. R., & Bloem, B. R. (2015). *Axial disability and deep brain stimulation in patients with Parkinson disease*. *Nature reviews. Neurology*, 11(2), 98–110. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.252>.
26. Ferraye, M.U. et al. (2013). *Levodopa-resistant freezing of gait and executive dysfunction in Parkinson's disease*. *Eur. Neurol.* 69, 281–288.
27. Ferreira-Pinto, M. J., Kanodia, H., Falasconi, A., Sigrist, M., Esposito, M. S., & Arber, S. (2021). *Functional diversity for body actions in the mesencephalic locomotor region*. *Cell*, 184(17), 4564–4578.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.002>
28. Fling, B. W. et al. (2014). *Functional Reorganization of the Locomotor Network in Parkinson Patients with Freezing of Gait*. *PLoS ONE* 9(6): e100291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100291>
29. Forno, L.S. (1996). *Neuropathology of Parkinson's disease*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 259–272.
30. Freund, N., Manns, M., & Rose, J. (2010). *A method for the evaluation of intracranial tetrodotoxin injections*. *Journal of neuroscience methods*, 186(1), 25-28.
31. Garcia-Rill, E., Hyde, J., Kezunovic, N., Urbano, F.J. & Petersen, E. (2014). *The physiology of the pedunculopontine nucleus: implications for deep brain stimulation*. *J Neural Transm.*
32. Garcia-Rill, E., Skinner, R. D. & Fitzgerald, J. A. (1985). *Chemical activation of the mesencephalic locomotor region*. *Brain research*, 330(1), 43-54
33. Garcia-Rill, E., Skinner, R.D., Gilmore, S.A. & Owings, R. (1983). *Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR) II. Afferents and efferents*. *Brain Res Bull* 10, 63–71.
34. Giguère, N., Burke Nanni, S., & Trudeau, L.-E. (2018). *On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease*. *Frontiers in Neurology*, 9. doi:10.3389/fneur.2018.00455.
35. Giladi, N., Treves, T., Simon, E. et al. (2001). *Freezing of gait in patients with advanced Parkinson's disease*. *J Neural Transm* 108, 53–61.

36. Goetz, L., et al. (2018). *Deep Brain Stimulation of the Pedunculopontine Nucleus Area in Parkinson Disease: MRI-Based Anatomoclinical Correlations and Optimal Target*. Neurosurgery. doi:10.1093/neuros/nyy151.
37. Grabli, D. et al. (2012). *Normal and pathological gait: what we learn from Parkinson's disease*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. 83, 979–985.
38. Grillner, S. (2003). *The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks*. Nat. Rev. Neurosci. 4, 573–586.
39. Hathout, G. M., & Bhidayasiri, R. (2005). *Midbrain ataxia: an introduction to the mesencephalic locomotor region and the pedunculopontine nucleus*. American Journal of Roentgenology, 184(3), 953-956.
40. Hirsch, L., et al. (2016). *The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Neuroepidemiology, 46(4), 292–300. <https://doi.org/10.1159/000445751>.
41. Inglis, W. L., Allen, L. F., Whitelaw, R. B., Latimer, M. P., Brace, H. M., & Winn, P. (1994). *An investigation into the role of the pedunculopontine tegmental nucleus in the mediation of locomotion and orofacial stereotypy induced by d-amphetamine and apomorphine in the rat*. Neuroscience, 58(4), 817-833.
42. Jacobs, G. H., Neitz, J., & Deegan, J. F. (1991). *Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light*. Nature, 353(6345), 655–656. doi:10.1038/353655a0
43. Jankovic, J., Fahn, S., & Hallet, M. (2011). *Principles and practice of movement disorders (2nd edition)*. Churchill Livingstone, Elsevier: Philadelphia, PA.
44. Jordan, L. M., Liu, J., Hedlund, P. B., Akay, T. & Pearson, K. G. (2008). *Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals*. Brain Res. Rev. 57, 183–191.
45. Jordan, L. M. (1998). *Brainstem projections from mesencephalic locomotor regions (MLR) in the rat: I. Identification of the MLR by induction of c-fos in the nucleus cuneiformis following treadmill locomotion*. Submitted
46. Kandel, E. R., Koester, J. D., Mack, S. H., Siegelbaum, S. A. (2021). *Principles of neural science (6<sup>th</sup> edition)*. McGraw Hill.
47. Kaneda, M., Oyama, Y., Ikemoto, Y., & Akaike, N. (1989). *Blockade of the voltage-dependent sodium current in isolated rat hippocampal neurons by tetrodotoxin and lidocaine*. Brain Research, 484(1-2), 348–351. doi:10.1016/0006-8993(89)90379-x

48. Karachi, C., et al. (2010). *Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease*. *The Journal of clinical investigation*, 120(8), 2745-2754.
49. Kiehn, O. (2016). *Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion*. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 224–238.
50. Klaus, A., Alves da Silva, J., & Costa, R. M. (2019). *What, If, and When to Move: Basal Ganglia Circuits and Self-Paced Action Initiation*. *Annual review of neuroscience*, 42, 459–483. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031033>.
51. Kojima, J., Yamaji, Y., Matsumura, M., et al. (1997). *Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus produce contralateral hemiparkinsonism in the monkey*. *Neurosci. Lett.* 226, 111–114.
52. Kuo, S.H., Kenney, C. & Jankovic, J. (2008). *Bilateral pedunculopontine nuclei strokes presenting as freezing of gait*. *Mov. Disord.* 23, 616–619.
53. Le Ray, D., Juvin, L., Ryczko, D., & Dubuc, R. (2011). *Supraspinal control of locomotion: the mesencephalic locomotor region*. *Progress in brain research*, 188, 51-70.
54. Lench, D. H., Embry, A., Hydar, A., Hanlon, C. A., & Revuelta, G. (2020). *Increased on-state cortico-mesencephalic functional connectivity in Parkinson disease with freezing of gait*. *Parkinsonism & related disorders*, 72, 31-36.
55. Malpeli, J. G. (1999). *Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection*. *Journal of neuroscience methods*, 86(2), 119-128.
56. Martinez-Gonzalez, C., Wang, H.L., Micklem, B.R., Bolam, J.P. & Mena-Segovia, J. (2012). *Subpopulations of cholinergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the pedunculopontine nucleus contain calcium-binding proteins and are heterogeneously distributed*. *Eur. J. Neurosci.* 35, 723–734.
57. Martinez-Gonzalez, C., Bolam, J. P., & Mena-Segovia, J. (2011). *Topographical organization of the pedunculopontine nucleus*. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 22.
58. Mazzone, P., Lozano, A., Stanzione, P., Galati, S., Scarnati, E., Peppe, A., & Stefani, A. (2005). *Implantation of human pedunculopontine nucleus: a safe and clinically relevant target in Parkinson's disease*. *Neuroreport*, 16(17), 1877–1881. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000187629.38010.12>
59. McGregor, M. M., Nelson, A. B. (2019) *Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease*. *Neuron*. 101(6):1042-1056. doi:10.1016/j.neuron.2019.03.004.

60. Mena-Segovia, J., Bolam, J. P., & Magill, P. J. (2004). *Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family?*. Trends in neurosciences, 27(10), 585-588.
61. Miao, C., Cao, Q., Ito, H. T., Yamahachi, H., Witter, M. P., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2015). *Hippocampal Remapping after Partial Inactivation of the Medial Entorhinal Cortex*. *Neuron*, 88(3), 590–603. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.051
62. Mori, S. (1987). *Integration of posture and locomotion in acute decerebrate cats and in awake, freely moving cats*. Progress in neurobiology, 28(2), 161-195.
63. Morris, M. E., Huxham, F. E., McGinley, J. & Ianseck, R. (2001). *Gait disorders and gait rehabilitation in Parkinson's disease*. Adv Neurol 87, 347–361.
64. Noga, B. R., Kettler, J., and Jordan, L. M. (1988). *Locomotion produced in mesencephalic cats by injections of putative transmitter substances and antagonists into the medial reticular formation and the pontomedullary locomotor strip*. J Neurosci 8, 2074-2086.
65. Noga, B. R., Kriellaars, D. J. & Jordan, L. M. (1991). *The effect of selective brainstem or spinal cord lesions on treadmill locomotion evoked by stimulation of the mesencephalic or pontomedullary locomotor regions*. J Neurosci 11, 1691–1700.
66. Nussbaum, R. L., & Ellis, C. E. (2003). *Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. The New England journal of medicine, 348(14), 1356–1364. <https://doi.org/10.1056/NEJM2003ra020003>
67. Nutt, J. G., Bloem, B. R., Giladi, N., Hallett, M., Horak, F. B., & Nieuwboer, A. (2011). *Freezing of gait: moving forward on a mysterious clinical phenomenon*. The Lancet Neurology, 10(8), 734-744.
68. Parfitt, G. M., et al. (2017). *Bidirectional control of anxiety-related behaviors in mice: role of inputs arising from the ventral hippocampus to the lateral septum and medial prefrontal cortex*. Neuropsychopharmacology, 42(8), 1715-1728.
69. Perez-Lloret, S., Negre-Pages, L., Damier, P., Delval, A., Derkinderen, P., Destée, A., Meissner, W. G., Schelosky, L., Tison, F., Rascol, O. (2014) *Prevalence, determinants, and effect on quality of life of freezing of gait in Parkinson disease*. JAMA Neurol. 1;71(7):884-90. doi:10.1001/jamaneurol.2014.753.
70. Plaha, P., & Gill, S. S. (2005). *Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine nucleus for Parkinson's disease*. Neuroreport, 16(17), 1883–1887. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000187637.20771.a0>

71. Pontone, G. M., et al. (2009). *Prevalence of anxiety disorders and anxiety subtypes in patients with Parkinson's disease*. *Movement Disorders*, 24(9), 1333–1338. doi:10.1002/mds.22611.
72. Postuma, R. B., et al. (2015). *MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease*. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 30(12), 1591–1601. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>
73. Rahman, S., et al. (2008). *Quality of life in Parkinson's disease: The relative importance of the symptoms*. *Movement Disorders*, 23(10), 1428–1434. doi:10.1002/mds.21667
74. Reijnders, J. S. A. M., et al. (2007). *A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease*. *Movement Disorders*, 23(2), 183–189. doi:10.1002/mds.21803
75. Rinne, J. O. et al. (2008). *Loss of cholinergic neurons in the pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease is related to disability of the patients*. *Parkinsonism & related disorders*, 14(7), 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.01.006>
76. Roseberry, T. K., Lee, A. M., Lalive, A. L., Wilbrecht, L., Bonci, A., & Kreitzer, A. C. (2016). *Cell-type-specific control of brainstem locomotor circuits by basal ganglia*. *Cell*, 164(3), 526-537
77. Ryczko, D. et al. (2016). *A descending dopamine pathway conserved from basal vertebrates to mammals*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(17), E2440-E2449.
78. Sanford, L. D., Yang, L., Tang, X., Ross, R. J., & Morrison, A. R. (2005). *Tetrodotoxin inactivation of pontine regions: Influence on sleep–wake states*. *Brain research*, 1044(1), 42-50.
79. Schaafsma, J. D., et al. (2003). *Characterization of freezing of gait subtypes and the response of each to levodopa in Parkinson's disease*. *European journal of neurology*, 10(4), 391–398. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2003.00611.x>
80. Schapira, A. H., Chaudhuri, K., & Jenner, P. (2017). *Non-motor features of Parkinson disease*. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(7), 435-450.
81. Schrag, A., et al. (2001). *What contributes to depression in Parkinson's disease?*. *Psychological medicine*, 31(1), 65–73. <https://doi.org/10.1017/s0033291799003141>
82. Sébille, S. B. et al. (2017). *Anatomical evidence for functional diversity in the mesencephalic locomotor region of primates*. *Neuroimage*, 147, 66-78.

83. Shefchyk, S. J., Jell, R. M. & Jordan, L. M. (1984). *Reversible Cooling of the Brain-Stem Reveals Areas Required for Mesencephalic Locomotor Region Evoked Treadmill Locomotion*. *Exp Brain Res* 56, 257–262.
84. Sherman, D. et al. (2015). *Anatomical location of the mesencephalic locomotor region and its possible role in locomotion, posture, cataplexy, and parkinsonism*. *Frontiers in neurology*, 6, 140.
85. Shik, M.L., Severin, F.V., and Orlovskii, G.N. (1966). *Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain*. *Biofizika* 11, 659-666.
86. Skinner, R.D. & Garcia-Rill, E. (1984). *The Mesencephalic Locomotor Region (MLr) in the Rat*. *Brain Res.* 323, 385–389.
87. Smith, Y., Wichmann, T., Factor, S. A., & DeLong, M. R. (2012). *Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa*. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 213-246.
88. Snijders, A. H., Takakusaki, K., Debu, B., Lozano, A. M., Krishna, V., Fasano, A., Aziz, T. Z., Papa, S. M., Factor, S. A., & Hallett, M. (2016). *Physiology of freezing of gait*. *Annals of neurology*, 80(5), 644–659. <https://doi.org/10.1002/ana.24778>
89. Snijders, A. H., Leunissen, I., Bakker, M. & Overeem, S. (2011) *Gait-related cerebral alterations in patients with Parkinson's disease with freezing of gait*. *Brain*. doi:10.1093/brain/awq324.
90. Stefani, A., et al. (2007). *Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine and subthalamic nuclei in severe Parkinson's disease*. *Brain*, 130(6), 1596-1607.
91. Takakusaki, K., Chiba, R., Nozu, T. & Okumura, T. (2015). *Brainstem control of locomotion and muscle tone with special reference to the role of the mesopontine tegmentum and medullary reticulospinal systems*. *J Neural Transm*. doi:10.1007/s00702-015-1475-4.
92. Tan, D. M., McGinley, J. L., Danoudis, M. E., Iansek, R., Morris, M. E. (2011) *Freezing of gait and activity limitations in people with Parkinson's disease*. *Arch Phys Med Rehabil*. 92,1159–1165.
93. Thevathasan, W. et al. (2012). *Alpha oscillations in the pedunculopontine nucleus correlate with gait performance in parkinsonism*. *Brain*, 135(1), 148-160.
94. Toth, L. A., & Gardiner, T. W. (2000). *Food and water restriction protocols: physiological and behavioral considerations*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 39(6), 9-17.

95. Vestergaard, P., et al. (2007). *Fracture risk associated with parkinsonism and anti-Parkinson drugs*. *Calcified tissue international*, 81(3), 153–161. <https://doi.org/10.1007/s00223-007-9065-6>.
96. Virmani, T., et al. (2015). *Clinicopathological characteristics of freezing of gait in autopsy-confirmed Parkinson's disease*. *Movement Disorders*, 30(14), 1874–1884. doi:10.1002/mds.26346.
97. Wang, H. L., & Morales, M. (2009). *Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat*. *European Journal of Neuroscience*, 29(2), 340-358.

# Agradecimientos

A mi directora, Sole, por su guía y eterna paciencia, por hacer posible la finalización de este trabajo con el tiempo justo y por abrirme las puertas de las Neurociencias. A mi co-directora, Lore, por su excelente desempeño como profesora en la carrera y por su ayuda en el desarrollo de esta tesina. A mi compañero de laboratorio, Leo, porque sin su ayuda mucho no se hubiera logrado.

A mi familia, mamá, papá, Euge y Juli por el continuo acompañamiento y cariño, por darme la libertad de elegir mi camino y apoyar cada decisión tomada. Por todo.

A mis amigos, los de toda la vida, por su afecto incondicional.

A Gonza, Guido, Lic, Meli y Vicki, porque sin ellos la vida misma hubiera sido más pesada.

Al sistema público de educación superior de Argentina, por permitirme estudiar esta hermosa carrera de forma libre, gratuita y de excelente nivel académico.