



11281

**Universidad Nacional Autónoma
de México**

Instituto de Fisiología Celular

**Modulación de la Transmisión
GABAérgica Neoestriatal**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Biomédicas

P r e s e n t a :

Jaime Napoleón Guzmán Lucero

Director de Tesis: Dr. José Bargas Díaz

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Dedicatoria

A mis padres:

Tomás Guzmán Montenegro (q.d.p)
y
Rosario Lucero Morán

A mis hijos:

Fernanda Ximena y Carlos Augusto

A mi esposa:

Lidia Cruz Mendez

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jaime Napoleón

Guzmán Lucero

FECHA: 31/III/04

FIRMA: Jaime Guzmán Lucero

Agradecimientos

A nuestra máxima casa de estudios,
la **Universidad Nacional Autónoma de México**

A la **Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP-UNAM)**, por haberme otorgado una beca completa para la realización de estos estudios.

Al **Dr. José Bargas**, por la orientación y apoyo invaluable recibido en el desarrollo de esta tesis y en mi formación académica .

A la **Dra. Elvira Galarraga**, por su valiosos comentarios para la consolidación de esta investigación.

A los integrantes de mi comité tutorial: **Dra. María Sitges B** y **Dr. Raúl Aguilar**, por su disponibilidad y comentarios en el desarrollo de este proyecto.

Al **Biol. Dagoberto Tapia**, por sus asistencia técnica y el trabajo anatómico.

Al **Dr. Jorge Aceves** y al **Biol. Adán Hernández**, por los experimentos en el goblo pálido.

A mi hermano **Dr. Diego Guzmán**, por todo lo pasado, lo presente y lo que vendrá

Al **honorable jurado**, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo

A todos mis colegas de laboratorio, con quienes trabajé en equipo en el desarrollo de esta investigación.

Resumen

La dopamina es un modulador crítico para la función de los ganglios basales. Su ausencia produce la enfermedad de Parkinson. Muchas de las acciones celulares de la dopamina aún se desconocen. Esta tesis describe la acción presináptica de los agonistas de los receptores a la dopamina en la transmisión GABAérgica, principalmente la llevada por los axones colaterales que interconectan a las neuronas de proyección del neostriado. Los axones de estas neuronas atraviesan el globo pálido y proyectan a otros núcleos de los ganglios basales. Se lesionó las neuronas intrínsecas del globo pálido y se estimuló antidrómicamente estos axones con un electrodo bipolar localizado en este núcleo. Esta maniobra reveló una corriente sináptica sensible a un bloqueador del receptor GABA_A bicuculina cuando registramos en una neurona de proyección del neostriado. Los agonistas a receptores de dopamina del tipo D₁ facilitaron, mientras que los agonistas a receptores de dopamina del tipo D₂ deprimieron esta corriente sináptica. En contraste, la corriente sensible a bicuculina provocada por un estímulo intraestriatal no se moduló de forma consistente; conforme con estudios anteriores. Los datos de la presente tesis se discuten a partir de los más recientes resultados experimentales y modelos. Las conclusiones son que la inhibición colateral entre neuronas espinosas medianas es cuantitativamente importante, sin embargo, para ser funcionalmente significativa esta inhibición debe de estar condicionada al disparo sincronizado de cierto número de neuronas de proyección (espinosas medianas). La dopamina ejerce un papel importante en la regulación del nivel de inhibición lateral en el neostriado.

Summary

Dopamine is a critical modulator of striatal function; its absence produces Parkinson disease. Most cellular actions of dopamine are still unknown. This work describes the presynaptic actions of dopaminergic receptor agonists on GABAergic transmission between neostriatal projection neurons. Axon collaterals interconnect projection neurons whose main axons project to other basal ganglia nuclei. Most if not all of these projecting axons pass through the globus pallidus. Thus, we lesioned the intrinsic neurons of the globus pallidus and stimulated neostriatal efferent axons antidromically with a bipolar electrode located in this nucleus. This maneuver revealed a bicuculline-sensitive synaptic current while recording in spiny cells. D1 receptor agonists facilitated whereas D2 receptor agonists depressed this synaptic current. In contrast, a bicuculline-sensitive synaptic current evoked by field stimulation inside the neostriatum was not consistently modulated; in agreement with previous studies. Data are discussed under the light of most recent experimental and modeling results. Conclusions were that, inhibition of spiny cells by axon collaterals of other spiny cells is quantitatively important; however, to be functionally important, this inhibition might be conditioned to the synchronized firing of spiny neurons. Finally, dopamine exerts a potentially important role regulating the extent of lateral inhibition.

Tabla de Contenido

<i>Dedicatoria</i>	i
<i>Agradecimientos</i>	ii
<i>Resumen</i>	iii
<i>Abstract</i>	iv
<i>Tabla de Contenido</i>	v
<i>Lista de Figuras</i>	vi
<i>Lista de Abreviaturas</i>	vii
1 Introducción	1
1.1 Consideraciones Generales	1
1.2 Enfermedad de Parkinson y Dopamina	2
1.3 Los ganglios basales	4
1.3.1 Vías directa e indirecta	5
1.4 El Neostriado	15
1.4.1 Receptores dopaminérgicos en el neostriado	17
1.4.2 Entradas GABAérgicas a las NEMs	19
2 Planteamiento del problema	22
3 Hipótesis	24
4 Metodología	26
4.1 Preparación de rebanadas cerebrales	26
4.2 Protocolos experimentales	27
4.3 Método para evaluar la modulación presináptica	28
5 Resultados	33
5.1 Apartado número 1	33
5.2 Apartado número 2	34
6 Discusión	39
7 Conclusiones	49
Bibliografía	51

Lista de Figuras

1.1	Ganglios basales	21
4.1	Diagrama de la rebanada cerebral	28
4.2	Variabilidad cuántica y presencia de fallas	31
5.1	La activación de receptores $GABA_B$ por el agonista específico baclofen, disminuyó las corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSCs) provenientes de las colaterales axónicas	36
5.2	La activación de los receptores $GABA_B$ por el agonista específico baclofen disminuyó las corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSCs) activadas por estimulación intraestriatal	37
5.3	Curso temporal del efecto del baclofen y bloqueo por un antagonista selectivo	38

Lista de Abreviaturas

Por sus siglas en ingles (*)

ADNc	Acido desoxiribonucleico complementario
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico (*)
ARN	Acido ribonucleico
Cx	Corteza
DA	Dopamina
DARP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc (32.000 daltones) (*)
ENK	Enkefalina
EP	Enfermedad de Parkinson
FS	Interneurona con disparo de alta frecuencia (*)
GB	Ganglios basales
GPI	Globo pálido interno
IPSC	Corrientes postsinápticas inhibitorias (*)
LTS	Interneurona con disparo de baja frecuencia (*)
NE	Neocóstriado
NOS	Oxido nítrico sintetasa (*)
NST	Núcleo subtalamico
PKA	Proteína Kinasa dependiente de AMPc (*)
GPe	Globo pálido externo
PP1	Proteína Fosfata 1 (*)
SN	Sistema nervioso
SNc	Sustancia negra parte compacta
SNr	Sustancia negra parte reticulata
SP	Sustancia P
TPP	Tasa de pulsos pareados

Capítulo 1

Introducción

1.1 Consideraciones Generales

Las funciones motoras son comandadas por la actividad neural de las cortezas motora y premotora (Kemp y Powell, 1970; Claude Ghez, 1991). Los comandos corticales se envían a la médula espinal donde están las motoneuronas encargadas de activar a los músculos que efectúan el movimiento (Alexander, 1987). Los ganglios basales regulan estos comandos o programas de activación motora generados por la corteza mientras están en marcha (Alexander, 1995; DeLong et al., 1983). Los ganglios basales, como la mayoría de los circuitos cerebrales, utilizan la neurotransmisión rápida, asociada a receptores-canal activados por ligando, y los neurotransmisores glutamato (excitador) y ácido γ -aminobutírico (GABA) (inhibidor) para conformar sus circuitos. Además, la neurotransmisión rápida está regulada por la llamada neurotransmisión lenta o moduladora, asociada a receptores que activan

cadena de señalización intracelular (e.g., proteínas G).

Uno de los neurotransmisores moduladores más importante de los ganglios basales, es la dopamina (DA) (Hornykiewicz, 1973; Albin et al., 1989). Sin DA, el circuito de los ganglios basales sufre un colapso total y deja de funcionar. Esto constituye un dramático ejemplo de la importancia de este neurotransmisor. La enfermedad de Parkinson es quizás, la primera patología reconocida como desorden de la neuromodulación y de la señalización intracelular en un circuito cerebral específico (DeLong, 1990; Wichmann y DeLong, 1993; Hirsch et al., 2000; Bergman y Deuschl, 2002).

1.2 Enfermedad de Parkinson y Dopamina

La enfermedad de Parkinson (EP) es frecuente, con una prevalencia de 1 a 2 por 1000 en la población general, y de 2 por 100 en la población mayor de 65 años (Aminoff, 2002). Fue descrita por James Parkinson en 1817 (tomado de Aminoff, 2002). La definición original no ha sufrido grandes modificaciones. Es un síndrome que consiste en una combinación variable de temblor (que generalmente cesa con el movimiento voluntario), rigidez, bradicinecia y alteraciones del movimiento y la postura (Bergman y Deuschl, 2002). Como se comentó previamente, esta patología es reconocida como un desorden de la neuromodulación asociado a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta, así como la aparición de inclusiones citoplasmáticas llamadas cuerpos de Lewy (Gibb, 1922). La pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas, las cuales inervan al estriado, sucede con la

edad. Sin embargo se requiere de una pérdida del 80 al 90 % de las neuronas para causar los síntomas de la enfermedad de Parkinson (Tuite y Riss, 2003). La depleción de dopamina provoca las disfunciones motoras y demás signos y síntomas del padecimiento (Tuite y Riss, 2003). El tratamiento farmacológico de elección en los pasados 30 años ha sido la levodopa un precursor de la dopamina, pues la pérdida de neuronas dopaminérgicas sugirió que la dopamina podría restaurar la función (Cotzias et al., 1969; Hornykiewicz, 1973). Sin embargo, el tratamiento a largo plazo con la levodopa es limitado, y la enfermedad es de muy difícil manejo. Además, existen evidencias preclínicas que señalan que la levodopa es tóxica para las neuronas dopaminérgicas (Clarke y Guttman, 2002). Estas limitaciones han hecho dirigir el tratamiento hacia la monoterapia con agonistas a los receptores dopaminérgicos. Los más usados se enlistan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Fármacos usados en la monoterapia para la enfermedad de Parkinson

	Ropinirole	Pramipexole	Cabergoline	Pergolide
Publicación de los datos	2000	2002	1999	2000
Número de pacientes	268	301	419	294
Incidencia de diskinesia				
Comparado con	20 % ^a	25 % ^a	22 % ^a	16 % ^a
Levodopa	40 %	54 %
Incidencia de fluctuaciones				
Comparado con	NA	47 %	34 %	33 %
Levodopa	NA	63 %		
Tipo de agonista dopaminérgico	D ₂	D ₃	D ₂	D ₁ y D ₂

^aP<0.05. NA: No Aplica.

Modificado de Guttman M y Clarke CE, 2002.

Obsérvese que todos los fármacos son agonistas de los receptores dopaminérgicos. En ensayos clínicos estos fármacos han demostrado cierta ventaja sobre el tratamiento clásico.

Sin embargo, hacen falta más ensayos clínicos de largo plazo para evaluar la calidad de una monoterapia que sustituya el tratamiento con L- DOPA (Parkinson Study Group, 2002). Aunque estas terapias y el diseño de fármacos surgen directamente de la investigación básica, todavía quedan por dilucidar muchos aspectos de las acciones dopaminérgicas a este nivel. Su conocimiento ayudaría al entendimiento de la fisiología de los ganglios basales, y de la fisiopatología de las enfermedades motoras. Mientras más se sabe, se diseñan esquemas terapéuticos más específicos para el tratamiento de las enfermedades motoras. Los experimentos de investigación básica utilizan los fármacos recientemente diseñados para dilucidar la fisiología. Este es el caso de la presente tesis.

1.3 Los ganglios basales

Los ganglios basales comprenden grupos neuronales de entrada, como el neostriado (NE), el que a su vez consta de a los núcleos caudado y putamen; núcleos de salida como el globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra reticulada (SNr); y núcleos intrínsecos como la sustancia nigra compacta (SNc), el globo pálido externo (GPe) y el núcleo subtalámico (NST). El NST también puede considerarse de entrada pues recibe aferencias corticales directas (Anderson,1981; Albin et al.,1989; Wilson et al .,1988a).

El NE recibe aferentes de toda la corteza (sensorial, motora, y de asociación). Esto es, recibe copias de perceptos y programas motores en ejecución (Anderson,1981). Grupos de neuronas piramidales arregladas en columnas disparan sincrónicamente (Powel y Mountcas-

tle, 1959; Hubel y Wiesel, 1977; Alexander, 1995; Georgopoulos, 1994) y en secuencia para activar a los músculos que ejecutan un determinado movimiento (sinergia). Hay grupos de neuronas dedicados a cada músculo del cuerpo. Estas neuronas piramidales excitan de manera simultánea a las neuronas de los GB. La conexión entre Cx y NE utiliza neurotransmisión rápida, es decir, las aferentes corticales al NE son glutamatérgicas y activan receptores-canal de los tipo AMPA y NMDA en las neuronas postsinápticas (McGeer y McGeer, 1993). El 95 % de las neuronas neostriatales en roedores son de proyección y GABAérgicas (llamadas espinosas medianas (NEM) debido a la cantidad de espinas dendríticas que poseen) (Chang et al., 1982; Chang y Kitai, 1985). Responden a la activación cortical con trenes de potenciales de acción que anteceden en decenas de milisegundos a la activación muscular (Alexander 1995, Schultz y Romo, 1990, De Long, 1990; Wilson, 1998; Bargas et al, 1991; Vergara et al 2003). La microestimulación de pequeños grupos de neuronas neostriatales activa grupos musculares alrededor de una articulación (Alexander, 1987). Por lo anterior, la actividad de las neuronas espinosas es considerada la salida funcional del NE y constituye el punto de arranque de todos los modelos sistémicos y fisiopatológicos de los GB (Alexander, 1995; Mink, 1996).

1.3.1 Vías directa e indirecta

Las NEM pueden ser divididas en dos grupos dependiendo del sitio al cual proyectan sus axones (Alexander, 1995). Un grupo constituye la denominada "vía indirecta", que inerva a las neuronas del globo pálido externo (GPe). Aparte de GABA estas neuronas sintetizan

encefalinas (ENK). El otro grupo conforma la "vía directa", sus axones envían proyecciones al globo pálido interno (GPi) y a la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Además de GABA sintetizan sustancia P (SP) (Albin et al., 1989; Wilson, 1998; Gerfen y Young, 1988; De Long, 1990).

Los núcleos de salida, GPi y SNr, inervan a los núcleos ventro basales del tálamo (T). De los núcleos tálamicos surgen circuitos tálamo-corticales que modifican la actividad de salida de las cortezas motora y premotora. Así el circuito se inicia y termina en la corteza (Cx). La actividad neural es regresada a la Cx después de ser contrastada con la entradas sensoriales y ser transformada por las vías directa e indirecta de los GB. La investigación actual trata de entender que le hacen los GB a los comandos motores de la corteza. Una hipótesis postula que los GB ayudan a separar funcionalmente a las poblaciones de neuronas que activan músculos agonistas de las que activan músculos antagonistas (Mink, 1996). Esto tiene que hacerse en rápida sucesión pues un programa motor está compuesto de una secuencia de comandos que activan y desactivan a los grupos musculares involucrados siguiendo un patrón temporal. Los músculos antagonistas para un movimiento pueden ser sinergistas para otro movimiento. Así, muchos programas motores sólo son aprendidos después de muchos ensayos y práctica, por lo que se piensa que los GB también están involucrados en el condicionamiento, la memoria y el aprendizaje de procedimientos (Schultz, 1998).

Las neuronas de los núcleos de salida, el GPi y la SNr, son GABAérgicas inhibitorias; su actividad es tónica, disparan potenciales de acción todo el tiempo a frecuencias de entre 20 y 50 Hz, produciendo una inhibición sostenida de las neuronas de los circuitos motores tálamo-

corticales. El GPi y la SNr muestran una representación topográfica de todos los músculos del cuerpo. La actividad tónica de estos núcleos mantiene inhibida la activación de grandes grupos musculares y se opone a la activación generalizada provocada por la actividad de la formación reticular del tallo cerebral. Para que pueda realizarse la activación de algunos músculos, esto es, para realizar un movimiento voluntario, hay que inhibir selectivamente a las neuronas inhibitorias del GPi o SNr que impiden los movimientos de esos músculos (Alexander, 1995; Mink, 2003; Wilson, 2003).

Es decir, el papel del de los GB es "desinhibir" a los circuitos motores tálamo-corticales.

La vía directa

Las neuronas del GPi y la SNr pueden inhibirse selectivamente cuando reciben ráfagas de potenciales de acción enviados por las neuronas GABAérgicas neostriatales de la vía directa. Estas ráfagas de potenciales de acción son comandadas por la Cx (Wilson, 1998). La conexión involucra neurotransmisión rápida inhibitoria utilizando el receptor canal GABAA. Así, dos grupos de neuronas inhibitorias en serie, uno en el NE y otro en el GPi/SNr, permiten realizar una activación neta focalizada de los núcleos tálamo-corticales mediante desinhibición. Esta desinhibición facilita los movimientos voluntarios originados en la Cx (Alexander, 1995).

Papel de la dopamina sobre las neuronas de la vía directa El neurotransmisor DA, liberado por las neuronas de la SNc que innerva al NE, activa receptores para la dopamina principalmente de la familia D₁, en las NEMs de la vía directa (Albin et al., 1989; Gerfen et

al.,1990). Su activación hace que aumente la excitación que ejerce la actividad cortical sobre las neuronas espinosas del NE (Hernández-Lopez et al 1997; Gonon, 1997). esto aumenta la activación (desinhibición) de los circuitos tálamo corticales que activan a los músculos agonistas, y por lo tanto, se facilitan los movimientos (Alexander, 1995).

El efecto "procurador" de la DA sobre la excitabilidad del NE se debe a la facilitación de corrientes de calcio en las neuronas espinosas (Surmeier et al., 1995, Hernández-Lopez et al., 1997) y a la facilitación de corrientes sinápticas de tipo NMDA (Cepeda y Levine, 1998). Ambos efectos llevan a un aumento en la actividad de las neuronas espinosas. Sin embargo, esta acción facilitadora de la DA sólo se presenta si las neuronas están siendo despolarizadas por los comandos corticales. Solo así se alcanzan los voltajes de activación para los canales iónicos involucrados (de calcio de tipo- L y de receptores a glutamato tipo NMDA). La DA es excitadora a potenciales de membrana despolarizados, presentes cuando la célula está siendo activada, y es inhibidora, aumentando el umbral de disparo, a potenciales de membrana hiperpolarizados, presentes cuando la célula está en reposo o inhibida (Hernández-Lopez et al., 1997). Que se presente la acción facilitadora o inhibidora depende del potencial de membrana de la neurona post-sináptica. La DA es inhibidora a potenciales de membrana cercanos a los de reposo debido a que también aumenta la activación de canales de potasio (rectificadores de entrada) a potenciales de membrana negativos (Pacheco - Cano et al., 1996). Esto aumenta el umbral de disparo neuronal, lo que hace que sea más difícil activar una neurona. Ambas acciones de la DA, facilitadora e inhibidora, pueden observarse en la misma neurona, y ambas se deben a la activación del receptor D₁. Esto pre-

cisamente es una diferencia entre la neurotransmisión rápida y la neuromodulación. Mientras que la neurotransmisión rápida sólo activa uno o dos tipos de receptor-canal sobre la neurona post-sináptica, la neuromodulación puede modificar la actividad de varios tipos de canal simultáneamente, provocando así, modificaciones complejas en la excitabilidad que pueden depender del potencial de membrana.

La dopamina también modula pre-sinápticamente las terminales de las NEMs, en sus núcleos blanco (GPi y SNr). En la vía directa a través de los receptores a dopamina del tipo D₁, donde facilita la liberación de GABA en estas terminales (Reubi et al., 1977; Floran et al., 1990; Cameron y Williams, 1993; Aceves et al., 1995; Rosales et al., 1997; Harsing y Zigmond, 1997; Radnikow y Misgeld, 1998).

El que la DA sólo facilite a las neuronas activadas por la Cx, mientras que ayude a inhibir a las neuronas no activadas, podría servir para que se separen mejor las neuronas que activan músculos agonistas de las neuronas que activan a los músculos antagonistas. Esta separación es necesaria para que las secuencias de activación muscular se sucedan tersamente y no de manera brusca o escalonada. Así, cuando esta separación es deficiente, hay co-activación de músculos agonistas y antagonistas; lo que provoca rigidez y aún oposición de las extremidades a ser desplazadas pasivamente (signo de la rueda dentada). Estos signos son característicos de la EP.

La acción de la DA se suma a otras acciones del circuito de los ganglios basales encaminadas a separar la activación de músculos agonistas y antagonistas. Un mecanismo encargado de esta separación es la inhibición lateral entre NEMs ya que con este tipo de

inhibición se puede seleccionar y elegir los comandos corticales que serán ejecutados y los que serán suprimidos. En la presente tesis se estudiará la relevancia funcional de la modulación por dopamina de esta inhibición lateral. Desde las primeras descripciones anatómicas de Ramon y Cajal (Ramon y Cajal, 1911) se conoce que las NEMs envían colaterales axónicas extensas dentro del propio núcleo que hacen sinapsis con otras NEMs. Esto ha sido confirmado por estudios que han usado diferentes técnicas de llenado intracelular (Bishop et al., 1982; Chang et al., 1981; Kawaguchi et al., 1990; Kitai et al., 1976) o tinción de Golgi (Somogyi et al., 1981; Pasik et al., 1979). Además, hay evidencia de doble marcado que demuestra que las NEMs de la vía directa e indirecta están interconectadas entre sí (Aronin et al., 1986; Bolam y Izzo, 1988; Yung et al., 1996). Como las NEMs sintetizan y liberan GABA produciendo inhibición de sus proyecciones e interconexiones (Precht y Yoshida, 1971); estas evidencias morfológicas fueron tomadas como el sustrato de la inhibición mutua entre las NEMs (Groves, 1983). Sin embargo, la evidencia electrofisiológica de la transmisión sináptica entre las NEMs estuvo a debate, ya que se pensó que esta inhibición no era cuantitativamente importante (Jeaguer et al., 1994). Fue hasta que se contó con la posibilidad técnica de registrar pares de NEMs, que se evidenció electrofisiológicamente la existencia e importancia de la inhibición lateral (Tunstall et al., 2002; Czubayko y Plenz, 2002).

Por otro lado, la dopamina también cuenta con receptores presinápticos en las terminales de algunas aferentes glutamatérgicas que llegan al NE. Se piensa que las acciones presinápticas de la DA a este nivel, ayudan a seleccionar ciertas aferentes o entradas excitatorias, mientras otras son bloqueadas. (Flores- Hernández et al., 1997).

Un potencial de membrana muy polarizado (-80 mV), durante el estado silente, la fuerte rectificación por corrientes de potasio facilitada por la DA, y la inhibición lateral, son todas características fisiológicas que hacen muy difícil propagar la actividad de las NEM (i.e. el circuito actúa como filtro). A esto debemos agregar que cada aferente cortical produce muy pocos botones sinápticos sobre una neurona espinosa: de 1 a 4 en promedio (Kincaid et al., 1998). Un comando cortical debe de sobrepasar cierta intensidad para pasar el filtro del NE. En términos de fisiología cortical, se tienen que sincronizar varias columnas de neuronas piramidales para poder activar a las neuronas espinosas. Ahora bien, cuando el comando cortical es suficientemente intenso y sincrónico como para generar un tren de potenciales de acción en una neurona espinosa, entonces la DA facilita y prolonga la respuesta en virtud de las acciones moduladoras que favorecen a las corrientes entrantes de Ca y de del receptor a glutamato del tipo NMDA. En otras palabras, una vez que el estímulo pasa el filtro, la dopamina no deja que decaiga la señal sino que la amplifica. Esto afina el comando motor mejorando la proporción señal/ ruido.

Cuando el filtro neostriatal se daña i.e., cuando las neuronas neostriatales se lesionan (por ejemplo en el caso de la enfermedad de Huntington, Corea y atetosis), aparecen movimientos involuntarios que interrumpen y estorban la ejecución de los movimientos voluntarios produciendo incapacidad.

La vía indirecta

La vía indirecta también posee dos neuronas inhibitorias en serie. Las NEM de esta vía inhiben a las neuronas del GPe cuando reciben un comando cortical. Las neuronas del GPe son GABAérgicas, disparan de manera tónica e inhiben a su vez a las neuronas del NST. Así, el disparo de las NEM de la vía indirecta tiene como objeto desinhibir (aumentar la actividad) a las neuronas del NST. Las neuronas del NST también disparan de manera sostenida pero son excitatorias (glutamatérgicas), y sus blancos principales son las neuronas de los núcleos de salida (SNr:GPi) (Rinvik et al.,1993; Hammond et al., 1978; Alexander 1995; Smith et al., 1998), adonde mandan conexiones divergentes y difusas (Mink,1996; Mink, 2003). Por lo tanto, la desinhibición del NST producida por un comando cortical, aumenta la actividad de las neuronas de GPi/SNr. Esto produce una sobreinhibición de los circuitos tálamo corticales que inhibe la ejecución de movimientos. Si el NST se lesiona, aparecen movimientos involuntarios repentinos e incontrolados (balismos).

El NST también recibe entradas directas de la Cx motora. Por lo tanto, este núcleo hace un balance entre las entradas facilitadoras de la Cx motora y las entradas inhibitorias del GPe (Bevan et al.,1995; Hatmann-von et al.,1978; Kita y Deniau, 1981). Solo cuando el NE lo permite, inhibiendo a las neuronas del GPe, se facilitan las entradas corticales y se activa con más fuerza el NST; esto redundando en una fuerte inhibición de circuitos talamocorticales del movimiento para ciertos grupos musculares. Sin embargo, las entradas corticales al NE son de toda la corteza (sensorial y motora), mientras que las entradas de Cx sobre el NST sólo provienen de la Cx motora (Bevan et al., 1995; Hatmann-von et al.,1978; Knzle, 1978;

Nambu et al., 1996). El NST, entonces, se encarga de equilibrar la actividad de diferentes poblaciones corticales; unas se inhiben focalmente, mientras otras mantienen el tono.

Papel de la dopamina en la vía indirecta Pero sucede que las NEMs de la vía indirecta poseen preferentemente receptores dopaminérgicos distintos a los que expresan las neuronas de la vía directa. Las NEMs de la red indirecta expresan mayoritariamente receptores del tipo D₂. La activación de los receptores de tipo D₂ reduce las corrientes persistentes de calcio tipo-L (Hernández-Lopez et al., 2000). Por lo tanto, su activación no favorece la excitación cortical, si no que la frena. Así, la DA a través de los receptores a dopamina tipo D₁ facilita a las neuronas de la vía directa que activan los movimientos y a través de los receptores a dopamina tipo D₂ deprime el disparo de las neuronas de la vía indirecta que inhiben los movimientos. En ambos casos, el resultado final en los núcleos de salida es el de favorecer la activación. El grado de oposición o equilibrio entre las redes directa e indirecta depende entonces de la DA. Ahora bien, los receptores D₂ tienen mayor afinidad por la DA que los receptores D₁ (Missale et al., 1998) y están tónica y parcialmente activados por la liberación basal de DA (Schultz, 1998). En cambio los receptores D₁ se activan por elevaciones fásicas de la concentración de DA (Gonon, 1997; Hernández-Lopez et al., 1997). Esto sugiere que la actividad tónica y generalizada sobre la actividad muscular es modulada por los receptores D₂ (vía indirecta), mientras que el efecto fásico de la DA sobre los receptores D₁ (vía directa) es el que selecciona las poblaciones de neuronas a activar (Mink, 1996). La red indirecta serviría entonces para ajustar el borde o frontera entre las neuronas activadas y las no activadas.

Igual que en la vía directa, la dopamina esta modulando pre-sinápticamente las terminales de las NEMs en sus núcleos blanco de la vía indirecta (GPe). Aquí lo que hace a través de los receptores a dopamina del tipo D₂, al inhibir la liberación de GABA de estas terminales (Floran et al., 1997; Harsing y Zigmond, 1997; Cooper y Stanford, 2001; Querejeta et al., 2001).

Resumiendo, la vía directa activa los circuitos tálamo-corticales del movimiento por desinhibición, mientras la vía indirecta inactiva los circuitos tálamo-corticales del movimiento por aumento de la inhibición aportada por los núcleos de salida que son activados por el NST. Así, los núcleos de salida parecen equilibrar ambas redes, directa e indirecta, que se oponen a este nivel. La dopamina esta modulando la neurotransmisión GABAérgica de manera antagonica en las dos vías, directa e indirecta, aumentando la liberación a través de los receptores D₁ y disminuyendo la liberación a través de los receptores D₂.

La deficiencia de DA provocaría sobreactividad de la vía indirecta e hipoactividad de la vía directa. Si la actividad de la vía indirecta fuera mucho mayor que la de su contraparte, habría una potente inhibición de los circuitos talamocorticales del movimiento. Esto resultaría en acinesia y bradicinesia, o dificultad para realizar o iniciar los movimientos. Otro signo de la enfermedad de Parkinson es que los sujetos tienen dificultad en frenar los movimientos o en cambiar de un programa motor a otro (switch). Se alivia mediante la inhibición con estimulación de alta frecuencia, a las neuronas hiperactivas del NST.

1.4 El Neostriado

Como hemos detallado, la mayor parte de las aferencias a los ganglios basales provenientes de otras estructuras del cerebro convergen en el neostriado. Aferencias provenientes de la corteza cerebral (sensorial, motora y de asociación), de los núcleos intralaminares del tálamo, de la sustancia nigra pars compacta y del núcleo del raphé dorsal (Albin et al.,1989; Smith et al.,1998).

El neostriado se encuentra formado por al menos seis tipos de neuronas de diferente morfología (DiFiglia y Carey, 1986; Wilson,1986a,1986b). En los primates y en los roedores, las NEMs constituyen el 77 % y el 95 %, respectivamente, de la población de neuronas neostriatales (Bennett y Wilson, 2000). El soma tiene un diámetro de 12 a 20 μm , del cual surgen de entre 3 a 6 troncos dendríticos principales, cada uno de los cuales se ramifica en dos procesos, que a su vez se pueden ramificar una o dos veces más, abarcando un volumen esférico de 300-500 μm de diámetro. Las dendritas están densamente cubiertas de espinas, mismas que contribuyen con casi la mitad de la superficie total de la célula (Wilson 1998; Bennett y Wilson, 2000; DiFiglia et al.,1976).

Como se dijo anteriormente, antes de salir hacia sus núcleos blanco el axón de las NEMs deja una arborización extensa dentro del estriado que hace sinapsis con otras NEMs. El número de botones que una NEM deja en otra NEM no ha sido cuantificado, pero se pueden realizar aproximaciones indirectas que son comentadas en la discusión de los datos de la presente tesis.

Estas neuronas sintetizan y liberan el ácido γ aminobutírico (GABA) dando un efecto inhibitorio a sus proyecciones (Precht y Yoshida, 1971).

Los axones de las neuronas dopaminérgicas provenientes de la SNc entran al estriado ramificándose y formando varicosidades que establecen sinapsis "en passant" en prácticamente todo el volumen del estriado. La SNc de la rata contiene aproximadamente 8.000 neuronas dopaminérgicas, mientras que cada NE contiene aproximadamente 2.8 millones de neuronas (Oorschot, 1996), lo que resultaría en un factor de divergencia de 300 a 400 (Schultz, 1988). Cada axon dopaminérgico se ramifica abundantemente en un área limitada y emite aproximadamente 500,000 varicosidades de las cuales se libera DA (Andén et al., 1966). Cada NEM recibiría en promedio 325 sinapsis dopaminérgicas (Bennett y Wilson, 2000).

Los tipos de neuronas restantes son interneuronas y pueden ser agrupados en dos categorías: las interneuronas colinérgicas gigantes y las interneuronas inhibitorias, de las cuales hay varios tipos. Algunas son identificadas por la presencia de la proteína parvoalbúmina y otras por el péptido somatostatina (Wilson, 1998; Kawaguchi et al., 1993; Bennett y Wilson, 2000).

Las interneuronas colinérgicas gigantes constituyen del 1 al 2% de las neuronas del NE en la rata. Expresan la enzima ChAT. Su soma mide entre 50 y 60 μm de diámetro y en el NE son las de mayor tamaño. Estas interneuronas constituyen la única fuente de acetilcolina (ACh) para el NE. El NE posee la mayor concentración de ACh de todo el sistema nervioso central (McGeer y McGeer, 1993).

Las interneuronas inmunoreactivas a parvalbúmina son de naturaleza GABAérgica. Su diámetro somático es de 10 a 30 μm . Sus dendritas son lisas en las regiones proximales y presentan varicosidades en zonas distales al soma. Se sabe que aproximadamente el 20% puede expresar receptores del tipo D₂ (Lenz et al., 1994).

Las interneuronas somatostatinérgicas se caracterizan por liberar somatostatina y se distinguen además por expresar la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) involucrada en la síntesis del neuromodulador óxido nítrico. Son de tipo bipolar y su soma mide entre 10 y 20 μm de diámetro, sus dendritas son lisas, no espinosas y rara vez se ramifican.

1.4.1 Receptores dopaminérgicos en el neostriado

Los receptores dopaminérgicos han sido divididos en dos grandes familias; una que se encuentra positivamente acoplada a la enzima adenilato - ciclasa denominada D₁; y otra que inhibe la formación de adenosina -3-5 monofostato cíclico (AMPc) denominada D₂ (Missale et al., 1998). En años recientes, mediante técnicas de clonación, se han identificado dos isoformas del receptor D₁: los receptores D_{1a} y D₅ o D_{1b}. Mientras que para la familia D₂ se han hallado los subtipos D₂ corto, D₂ largo, D₃ y D₄ (Strange, 1990 ; Missale et al., 1998).

El receptor D₂ fue el primero en ser clonado (Bunzow et al., 1988), este consta de una secuencia de 415 aminoácidos, existiendo también una isoforma alterna del receptor D₂ de 444 aminoácidos (Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989). Posteriormente se descubrió la existencia de un receptor a DA hibridizando una biblioteca de ADNc del cerebro de la rata con una sonda derivada de la secuencia del receptor D₂. A este nuevo receptor se le llamó D₃

(Sokoloff et al., 1990). Así mismo, de una línea celular de neuroblastoma humano se obtuvo la clonación del receptor D_4 , distinguiéndose de los receptores D_2 y D_3 por su alta selectividad por la clozapina (Van Tol et al., 1991).

El receptor D_1 se clonó a partir de bibliotecas génicas así como por el empleo de reacciones en cadena de la polimerasa aplicadas en una línea celular de neuroblastoma (Dearry et al., 1990; Sunahara et al., 1990; Monsma et al., 1990). En células estriatales (Zhou et al., 1990), utilizando la secuencia de dicho receptor, se aisló el segundo miembro de esta familia al que se llamó D_5 (Sunahara et al., 1991).

Los receptores dopaminérgicos forman parte de una familia extensa de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G y están constituidos por siete dominios transmembranales (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000; Sealfon y Olanow, 2000). La familia de los receptores D_1 se caracteriza por poseer una tercera asa intracelular de corta longitud en comparación con la familia D_2 . El dominio corto de los receptores D_1 ha sido asociado con el acople específico con una proteína Gs que promueve la estimulación de la adenilato ciclasa. Por el contrario, los receptores D_2 , al igual que otros receptores con segmento largo en esta asa intracelular, están asociados con la activación específica de Gi/o que inhibe la síntesis de AMPc (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000; Sealfon y Olanow, 2000).

Las dos familias de receptores difieren notablemente en su afinidad por diferentes ligandos. Por ejemplo, la dopamina es más afín a los receptores de la familia D_2 que a los de la familia D_1 . Para los primeros esta catecolamina tiene una constante de inhibición (K_i) menor a 50 nM, mientras que para los receptores de tipo D_1 se ha reportado una K_i entre 0.5 y 5 mM

(Missale et al.,1998).

Mediante el uso de transcripciones inversas seguidas de reacciones en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en células disociadas (Surmeier et al.,1993b;1996; Nicola et al., 2000) se demostró que las neuronas espinosas medianas con niveles detectables de substancia P pero no de encefalina (46 % de una muestra de 35 neuronas) expresaban abundante ARNm del receptor D₁. Una subpoblación considerable de este grupo también coexpresaba ARNm para los receptores D₂ (19%), D₃ (38%), o D₄ (25%). Por otra parte, NEMs con ARNm para encefalina pero no para substancia P (25% de una muestra de 35 neuronas) expresaban niveles abundantes de ARNm para los receptores D₂ (isoformas corta y larga) y una subpoblación de este grupo (10-25%) también coexpresaba ARNm para las isoformas D₁ y D₅. Finalmente, se describió una población de NEMs (29% de su muestra de 35 neuronas) con niveles detectables de ARNm para ambos receptores D₁ y D₂. Así, los seis tipos de receptor dopaminérgico han sido detectados a nivel del neostriado. La colocación en las NEMs de receptores D₁ y D₂ también se ha demostrado con microscopia confocal de alta resolución (Aizman et al., 2000), siendo también corroborado por David y Harrison (2002) quienes reportaron un 80% de colocación. Estos hallazgos ponen en duda la segregación de los receptores dopaminérgicos en las vías directa e indirecta, cuando menos a nivel del soma.

1.4.2 Entradas GABAérgicas a las NEMs

La actividad de las NEMs es controlada por entradas inhibitorias (Aronin et al., 1986; Kita,1993). Estas entradas inhibitorias pueden venir de dos vías: las interneuronas (Kita, 1993;

Bennett y Bolam,1994; Jeaguer et al., 1994; Kawaguchi et al.,1995; Koos y Tepper,1999) y los axones colaterales de otras NEMs (Park et al.,1980; Wilson and Groves, 1980; Somogyi et al.,1981; Bishop et al., 1982; Groves, 1983; Aronin et al., 1986; Bolam and Izzo, 1988; Czubayko and Plenz, 2002; Tunstall et al., 2002; Koos et al., 2002).

Una subpoblación de neuronas del GPe proyectan al NE (25 %) (Spooren et al.,1996; Nambu and Llinas, 1997) intervando selectivamente a las interneuronas GABAérgicas parvoalbúmina positivas (Bevan et al.,1998), aunque un porcentaje pequeño (20 %) puede intervenir a NEMs.

Las sinápsis GABAérgicas del NE, tanto de las NEMs como de las interneuronas GABAérgicas, expresan el receptor metabotrópico $GABA_B$ el cual puede estar modulando la liberación de GABA actuando como autoreceptor en las terminales; tal como se ha reportado para otros núcleos (Kaupmann et al., 1997). En el estriado se ha identificado el receptor de $GABA_{BR1}$, así como sus dos isoformas $GABA_{BR1a}$ y $GABA_{BR1b}$ (Kaupmann et al., 1997). Su distribución en el NE es homogénea y esta presente tanto en las NEMs como en las interneuronas GABAérgicas (Smith et al., 2000).

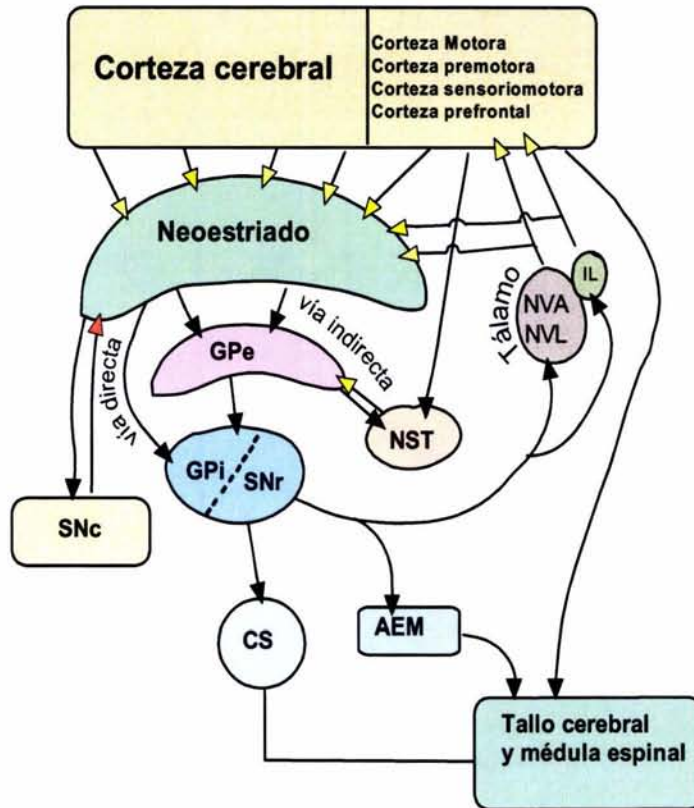


Figura 1.1: Diagrama simplificado de los ganglios basales. Las conexiones excitatorias están indicadas en flechas amarillas, las conexiones inhibitorias están en negro y la entrada dopaminérgica en rojo. GPe, Globo pálido externo; Gpi, Globo pálido interno; IL, Núcleo intralaminar del tálamo; AEM, Area extrapiramidal del cerebro medio, CP coliculo superior; SNc sustancia negra compacta; SNr sustancia negra reticulata; NST, núcleo subtalamico; NVA, Núcleo ventral anterior del tálamo, NVL, núcleo ventro lateral de tálamo.

Capítulo 2

Planteamiento del problema

La inhibición lateral entre NEMs podrá ser clave para determinar el procesamiento de las señales que llegan al neostriado (Beiser y Houk, 1998; Wickens et al., 1991; Wilson y Groves, 1980). Por lo tanto, es importante estudiar la modulación presináptica de las colaterales axónicas que interconectan a las NEMs, incluida la dopaminérgica. Esta será una nueva función para la DA: regular la inhibición lateral.

PREGUNTAS A RESPONDER:

- Puede la dopamina modular presinápticamente a las terminales GABAérgicas que contactan a las NEMs?
- Habría diferencia en la modulación dopaminérgica entre las terminales GABAérgicas que provienen de las NEMs respecto de aquellas que provienen de las interneuronas?
- Pueden modularse diferencialmente las sinapsis GABAérgicas?.

- Las NEMs de la vía directa e indirecta están interconectadas?.

Capítulo 3

Hipótesis

- Si la liberación de GABA de las terminales de las neuronas espinosas en el GPe es inhibida por la activación de los receptores dopaminérgicos de tipo D₂ (Floran et al., 1997; Harsing y Zigmond, 1997; Cooper y Stanford, 2001; Querejeta et al., 2001), entonces, las terminales de las colaterales axónicas intra-estriatales que provengan de esas mismas neuronas deberán también ser inhibidas por la activación de los receptores dopaminérgicos del tipo D₂.
- Si la liberación de GABA de las terminales de las neuronas espinosas en los núcleos de salida (SNr/GPi) es potenciada por la activación de los receptores dopaminérgicos de tipo D₁ (Reubi et al., 1977; Floran et al., 1990; Cameron and Williams, 1993; Aceves et al., 1995; Rosales et al., 1997; Harsing and Zigmond, 1997; Radnikow and Misingeld, 1998), entonces, las terminales de las colaterales axónicas que provengan de esas mismas neuronas deberán también ser potenciadas por la activación de los receptores

dopaminérgicos del tipo D_1 .

- Si la modulación de autoreceptores de tipo $GABA_B$ es común para todo tipo de conexión GABAérgica, entonces, las dos entradas GABAérgicas a las NEMs (colaterales e interneuronas) serán moduladas de igual manera por la activación de receptores de tipo $GABA_B$.

Capítulo 4

Metodología

Los resultados presentados en esta tesis fueron obtenidos mediante registros electrofisiológicos utilizando la técnica de célula entera en rebanadas de cerebro, en la modalidad de fijación de voltaje. La metodología se describe de manera resumida, ya que está explicada a detalle en el artículo publicado como resultado de esta investigación.

4.1 Preparación de rebanadas cerebrales

Se utilizaron ratas Wistar albinas de 18 días de nacidas (27-28 g), sin distinción de sexo. Se lesionó unilateralmente un GPe con ácido iboténico. Después de 3 a 4 días de la lesión se sacrificaron los animales por decapitación con el fin de extraer el cerebro, el cual se sumergió inmediatamente en solución salina fría de composición (en mM): 123 *NaCl*; 3.0 *KCl*; 1.0 *MgCl₂*; 1.0 *CaCl₂*; 25.0 *NaHCO₃*; y 11 glucosa. La solución era saturada con una mezcla

de 95 % O_2 - 5 % CO_2 (298 $\frac{mOsM}{l}$; pH 7.40). Se obtuvieron rebanadas de 300 μm de espesor a baja temperatura con ayuda de un vibratomo. Una vez obtenidas las rebanadas se mantuvieron en incubación con solución salina a temperatura ambiente en un periodo no menor de 60 min. Posteriormente las rebanadas se trasladaron a una cámara de registro.

En estas condiciones es posible obtener registros confiables de más de 2 h de duración sin un deterioro significativo de la preparación. La velocidad de superfusión es constante (3-6 $\frac{ml}{min}$). Todos los fármacos que se utilizan en el presente trabajo fueron disueltos previamente en la solución salina y se administraron a través del dispositivo de superfusión.

4.2 Protocolos experimentales

Los registros se obtienen utilizando la técnica de fijación de voltaje en célula entera. Las rebanadas se iluminan con luz infrarroja y se visualizan con un sistema de videomicroscopía. Las corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSCs) fueron provocadas: a) estimulando antidrómicamente en el GPe para diseccionar las IPSCs provenientes de las colaterales (Figura 4.1-A), b) estimulando intraestriatalmente para obtener IPSCs mayoritariamente de interneuronas GABAérgicas (Figura 4.1-B) y c) en la sustancia blanca cortical para confirmar que no hubiera difusión de la carga entre un núcleo y otro con las intensidades de estimulación utilizadas. Las respuestas sinápticas fueron producidas por un electrodo bipolar colocado sobre la superficie de la rebanada a una distancia aproximada de 1 mm del electrodo de registro. La intensidad del estímulo fue ajustada de tal manera que no fuese

posible una difusión de la carga hacia otros núcleos. Así, cuando estimulamos en la sustancia blanca cortical, no fue posible detectar una corriente sináptica sensible a bicuculina. La intensidad del estímulo se puede ajustar para estimular una sola terminal sináptica (Hanse and Gustafson, 2001). Nosotros estimulamos para detectar las IPSCs provenientes de varios botones sinápticos.

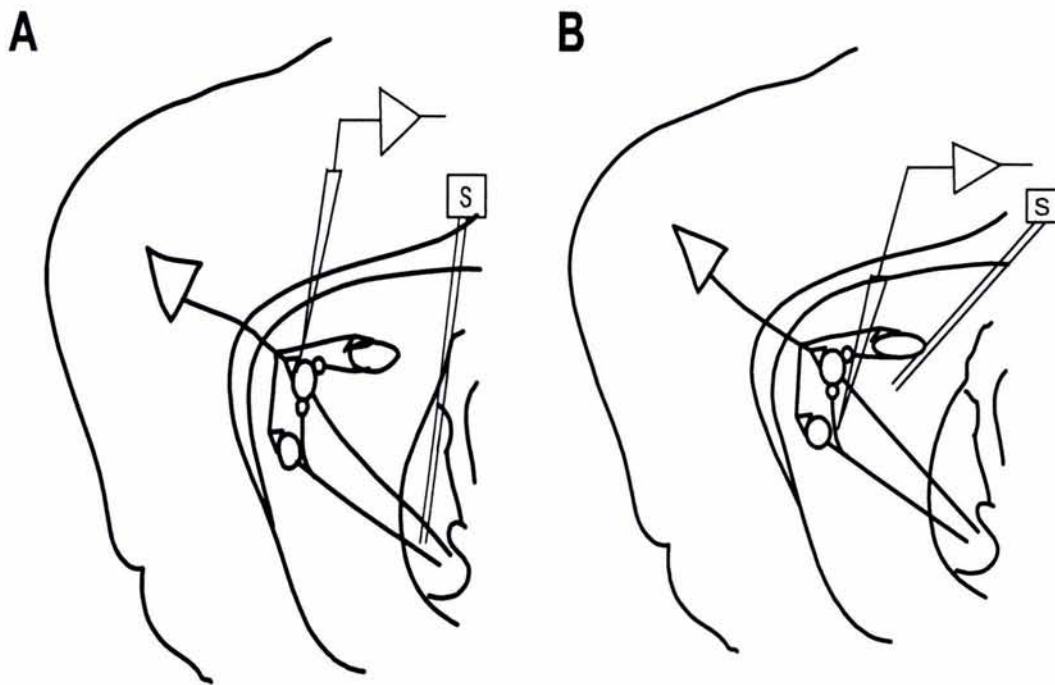


Figura 4.1: Diagrama de la rebanada cerebral donde se muestra la posición de los electrodos de registro y de estimulación. A. Cuando se estimula antidrómicamente en el GPe y se registra en una NEM. B. Cuando estimulamos intraestriatalmente y registramos en una NEM

4.3 Método para evaluar la modulación presináptica

Para evaluar la inhibición y/o facilitación presináptica utilizamos el protocolo de facilitación por pulsos pareados, el cual consiste en dos estímulos de igual intensidad separados

por una ventana de tiempo corta: en nuestros experimentos de 45 a 50 ms. De acuerdo a la "hipótesis del calcio residual de la facilitación sináptica" (Katz y Miledi., 1968. Zucker, 1999), una pequeña fracción del calcio que entra a las terminales en respuesta al primer estímulo permanece por varios milisegundos en estas terminales antes de ser amortiguado. Esta cantidad de calcio se añade al calcio que entra durante el segundo estímulo, por lo tanto, el incremento en la probabilidad de fusión de las vesículas producido por el segundo estímulo es mayor.

Las terminales presinápticas tienen diferentes probabilidades de liberación que dependen en gran medida de la concentración basal de calcio en los botones presinápticos . Así, cambios pequeños en dicha concentración tienen efectos muy relevantes en la liberación del neurotransmisor (Thomson, 2000; Zucker y Regehr, 2002).

Analizamos los cambios en la tasa de amplitudes entre S_2 (segundo evento sináptico) y S_1 (primer evento sináptico) ($\frac{S_2}{S_1}$ = Tasa de pulsos pareados = TPP). Cuando estimulamos con pulsos pareados una terminal presináptica en una solución con calcio normal (1-2 mM), los botones que liberan el neurotransmisor durante el primer estímulo son los que tienen mayor probabilidad de liberación. Durante el segundo estímulo, por el efecto del calcio residual, habría más calcio en las terminales que no liberan durante el primer estímulo. Este pequeño incremento de calcio aumentaría la probabilidad de liberación de los botones de menor probabilidad, provocando un aumento en la liberación del neurotransmisor (TPP>1). En las mismas condiciones experimentales pero con una solución con bajo calcio externo (≈ 0.5 mM), durante el primer estímulo hay una entrada de calcio menor comparado con

las condiciones anteriores (calcio normal) y solo liberan pocos botones que tienen muy alta probabilidad de liberación, siendo S_1 de menor amplitud comparado con S_1 obtenido en una solución de calcio normal. Durante el segundo estímulo, el calcio residual aumenta la probabilidad de liberación de los demás botones, provocando un aumento en la liberación de neurotransmisor ($TPP > 1$). Este aumento es mayor al obtenido en condiciones de calcio normal. Esto es, concentraciones bajas de calcio externo aumenta la facilitación sináptica aunque los eventos individuales sean menores. Por último, en condiciones experimentales de alto calcio externo (≈ 4 mM) hay una entrada masiva de calcio con el primer estímulo y la mayoría de botones liberan. Esto provoca que S_1 sea de mayor amplitud comparado con S_1 en soluciones de calcio externo normal y bajo. Pero cuando llega el segundo estímulo son muy pocos los botones que quedan disponibles para liberar provocando una menor liberación de neurotransmisor durante S_2 ($TPP < 1$). Hay depresión sináptica durante los pulsos pareados. Esto es, concentraciones altas de calcio externo facilita la depresión de pulsos pareados. Por lo tanto, facilitación de los pulsos pareados ($TPP > 1$) significa que los botones sinápticos poseen baja probabilidad de liberación, mientras que depresión de pulsos pareados ($TPP < 1$) significa que los botones poseen alta probabilidad de liberación.

En nuestras condiciones experimentales, donde la intensidad del estímulo es tal que nos permite estimular pocos botones incluso uno o dos botones sinápticos, observamos variabilidad cuántica y la presencia de fallas (Figura 4.2). La intensidad de la estimulación tiene efectos similares a los cambios en la concentración de calcio extracelular. Así; cuando disminuimos la intensidad del estímulo, es como si disminuyéramos la concentración de calcio,

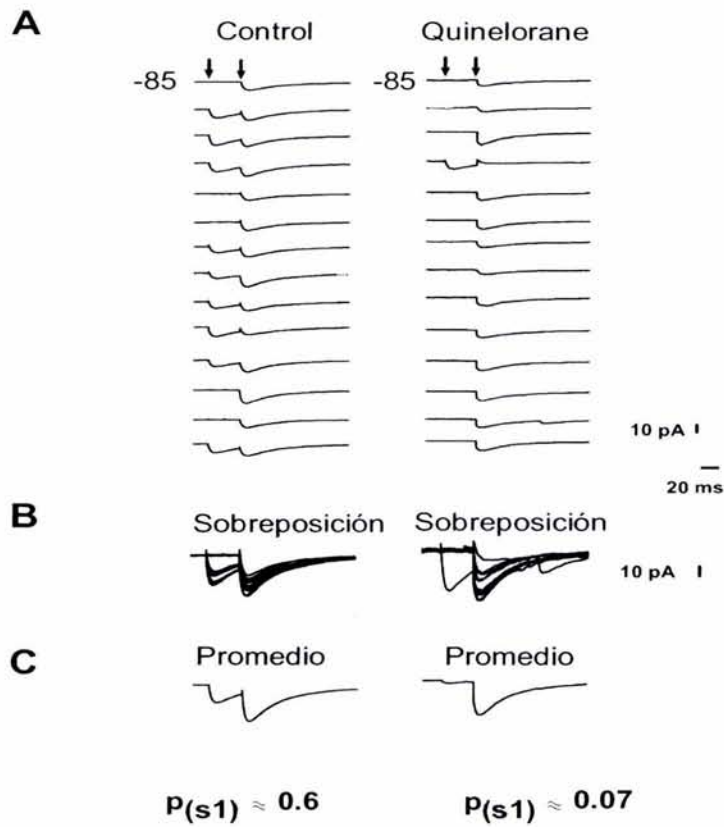


Figura 4.2: Variabilidad cuántica y presencia de fallas. A- Pulsos pareados donde se observan IPSCs. Nótese que en presencia de un agonista de receptores a dopamina del tipo D_2 (quinolorane 200 nM) el número de fallas en S_1 aumenta. B- La sobreposición de los trazos hace evidente la variabilidad cuántica. Como también la disminución en la probabilidad de la liberación en el primer evento producido por el quinolorane. C- promedio de todos los trazos donde observamos un aumento en la facilitación en la TPP producido por el quinolorane. (En los registros subsiguientes sólo ilustramos los promedios. Nótese como un aumento en la TPP refleja una disminución de p ($p_{(S_1)}$)=probabilidad de liberación del primer evento sináptico.)

ambas maniobras producen facilitación de pulsos pareados. Si aumentamos la intensidad del estímulo a niveles cercanos al máximo depletamos muchas terminales con el primer estímulo. Esto es similar a aumentar la concentración de calcio, lo que produce depresión de pulsos pareados. Si la intensidad del estímulo es moderada observamos facilitación o depresión similares a las observadas con concentraciones de calcio normal. Por lo que tenemos estas dos variables para manipular en la situación control.

Los argumentos anteriores nos hacen suponer que si un neuromodulador, como la dopamina, actúa a nivel presináptico, disminuyendo la entrada de calcio y por tanto disminuyendo la liberación del neurotransmisor, encontraremos facilitación en la tasa de pulsos pareados ($TTP > 1$). Por el contrario, si el neurotransmisor aumentará la entrada de calcio a nivel presináptico y aumentará la probabilidad de liberación del neurotransmisor, hallaremos depresión en la tasa de pulsos pareados ($TTP < 1$), que es igual a la facilitación de la liberación presináptica.

Se utilizaron electrodos de vidrio fabricados a partir de capilares de borosilicato; con una resistencia D.C en la punta de 3 a 6 $M\Omega$. La solución interna consistió en (mM): 72 KH_2PO_4 , 36 KCl , 2 $MgCl_2$, 10 $HEPES$, 1.1 $EGTA$, 0.2 Na_2ATP , 0.2 Na_3GTP , 5 $QX - 314$ y 0.5 % biocitina. Nótese que con las concentraciones de cloro de nuestras soluciones externa e interna, $E_{Cl} = -30$ mV, por lo que nuestras IPSCs serán entrantes. Esto lo hacemos para distinguir mejor las IPSCs. Además en el electrodo de registro tenemos $QX - 314$ para bloquear las corrientes de acción tanto ortodrómicas como antidrómicas, de esta manera evitamos la distorsión de las IPSCs.

El estímulo y la corriente registrada fueron desplegados en el osciloscopio y almacenados en cintas de video (VHS) para su posterior análisis.

Capítulo 5

Resultados

Con el objeto de facilitar la lectura de esta tesis los resultados han sido divididos en 2 apartados.

5.1 Apartado número 1

En este apartado se anexa el artículo principal de esta tesis, donde se demuestra que la inhibición lateral entre las NEMs es modulada presinápticamente por dopamina.

Dopaminergic Modulation of Axon Collaterals Interconnecting Spiny Neurons of the Rat Striatum

Jaime N. Guzmán,¹ Adán Hernández,² Elvira Galarraga,¹ Dagoberto Tapia,¹ Antonio Laville,¹ Ramiro Vergara,¹ Jorge Aceves,² and José Bargas¹

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City DF 04510, México, and ²Departamento de Fisiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, México City DF 07000, México

Dopamine is a critical modulator of striatal function; its absence produces Parkinson's disease. Most cellular actions of dopamine are still unknown. This work describes the presynaptic actions of dopaminergic receptor agonists on GABAergic transmission between neostriatal projection neurons. Axon collaterals interconnect projection neurons, the main axons of which project to other basal ganglia nuclei. Most if not all of these projecting axons pass through the globus pallidus. Thus, we lesioned the intrinsic neurons of the globus pallidus and stimulated neostriatal efferent axons antidromically with a bipolar electrode located in this nucleus. This maneuver revealed a bicuculline-sensitive synaptic current while recording in spiny cells. D₁ receptor agonists facilitated whereas D₂ receptor agonists depressed this synaptic current. In contrast, a bicuculline-sensitive synaptic current evoked by field stimulation inside the neostriatum was not consistently modulated, in agreement with previous studies. The data are discussed in light of the most recent experimental and modeling results. The conclusion was that inhibition of spiny cells by axon collaterals of other spiny cells is quantitatively important; however, to be functionally important, this inhibition might be conditioned to the synchronized firing of spiny neurons. Finally, dopamine exerts a potentially important role regulating the extent of lateral inhibition.

Key words: dopamine; neostriatum; basal ganglia; presynaptic modulation; lateral inhibition; GABA

Introduction

Activity of neostriatal projection neurons is controlled by inhibitory inputs (Aronin et al., 1986; Kita, 1993). Inhibition comes from two main sources: interneurons (Kita, 1993; Bennett and Bolam, 1994; Jaeger et al., 1994; Kawaguchi et al., 1995; Koos and Tepper, 1999) and recurrent axon collaterals interconnecting projection neurons (Park et al., 1980; Wilson and Groves, 1980; Somogyi et al., 1981; Bishop et al., 1982; Groves, 1983; Aronin et al., 1986; Bolam and Izzo, 1988; Czubayko and Plenz, 2002; Koos et al., 2002; Tunstall et al., 2002). We asked whether dopamine regulates the strength of synapses between projection neurons.

Synaptic terminals from spiny neurons are presynaptically modulated by dopamine at their target nuclei (e.g., pallidum and substantia nigra reticulata) (Floran et al., 1990, 1997; Radnikow and Misgeld, 1998; Cooper and Stanford, 2001). Consequently, our hypothesis was that the same type of regulation should be present within the neostriatum. To address this hypothesis, we examined synaptic inhibition between spiny neurons by activating axon collaterals antidromically from the pallidum (Park et al.,

1980). The globus pallidus (GP) was first lesioned with ibotenic acid to destroy intrinsic pallidal cells. Related questions were whether modulation produced by D₁ receptor agonists is different from, or even opposed to, that produced by D₂ receptor agonists (Floran et al., 1990, 1997; Radnikow and Misgeld, 1998; Cooper and Stanford, 2001) and whether spiny neurons from the direct and the indirect pathways (Gerfen and Young, 1988; Albin et al., 1989) are synaptically interconnected (Aronin et al., 1986; Bolam and Izzo, 1988; Yung et al., 1996).

To observe whether there was a difference in the modulation of synaptic currents, recordings resulting from axon collaterals stimulation were compared with those evoked after intrastriatal field stimulation. The latter responses are likely to be variable because they come from a mixed source of GABAergic terminals: several classes of interneurons and recurrent axon collaterals (Kita, 1993; Jaeger et al., 1994; Kawaguchi et al., 1995; Koos and Tepper, 1999; Fitzpatrick et al., 2001). In case all interneuron types do not respond in the same manner to different classes of dopamine receptor agonists (Aosaki et al., 1998; Bracci et al., 2002; Centonze et al., 2002, 2003; Yasumoto et al., 2002; Gao et al., 2003), it is expected that variety will make this mixed source inconsistent when responding to the agonists. In contrast, if antidromic stimulation from the pallidum evokes IPSCs from a single source (i.e., axon collaterals), then the responses in this case are likely to be more consistent.

A dopaminergic modulation should be seen as consistent, however, even after intrastriatal field stimulation, if its presence is somehow ubiquitous or predominant (Pisani et al., 2000; Mo-

Received March 21, 2003; revised Aug. 6, 2003; accepted Aug. 11, 2003.

This work was supported by the following grants: Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Mexico) IN202300 (J.B.) and IN202100 (E.G.); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) 31839-N (J.B.); and The Millennium Research Initiative W-8072/35806-N (J.B., E.G.). We thank M. C. Vilchis and the Microscopy Unit of Instituto de Fisiología Celular-UNAM for technical support. We also thank F. Tecuapetla for intensity–amplitude plots.

Correspondence should be addressed to José Bargas, Instituto de Fisiología Celular, Circuito exterior s/n (P.O. Box 70–253 for ordinary mail) Universidad Nacional Autónoma de México, México City DF 04510, México. E-mail: jbargas@fisiol.unam.mx.

Copyright © 2003 Society for Neuroscience 0270-6474/03/238931-10\$15.00/0

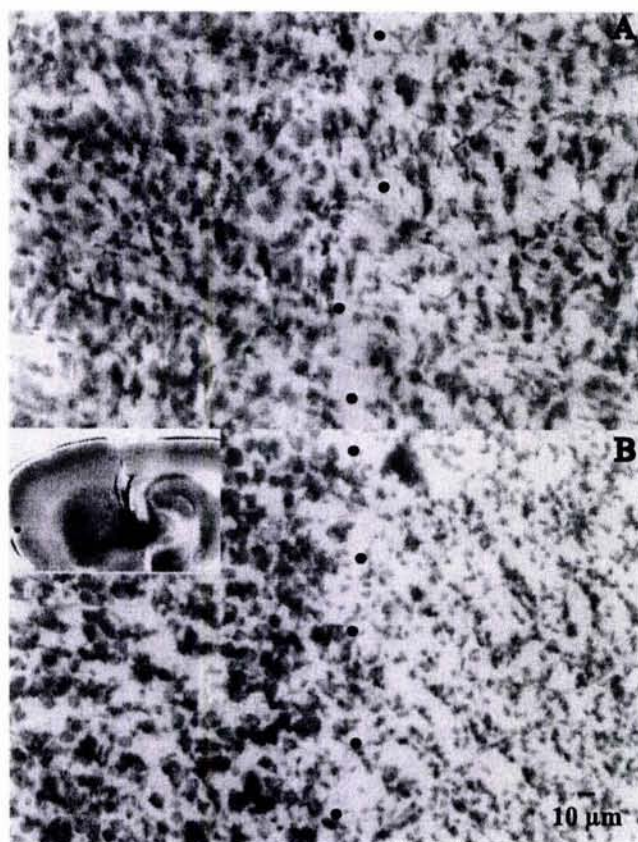


Figure 1. Pallidal lesions. *A*, A $40\ \mu\text{m}$ histological section taken from a sagittal $300\ \mu\text{m}$ slice obtained from an animal perfused transcardially with saline containing choline instead of Na^+ (see Materials and Methods). Dots approximately depict the border between pallidum (right) and neostriatum (left). *B*, A similar section taken from an ibotenic acid-lesioned animal. Notice a marked reduction in cellular profiles in the right side (pallidum). The inset shows the approximate trajectory of the lesioning needle when using the coordinates described in Materials and Methods. Injections were placed as far as possible from the striatopallidal border to avoid diffusion of ibotenic acid into the neostriatum. Methylene blue was used to stain the injection site. Histological sections were processed for Nissl staining.

miyama and Koga, 2001; Centonze et al., 2003). Otherwise, modulation would be concealed by the mixed source of differentially modulated inputs (Fitzpatrick et al., 2001). This work reports strong evidence of a selective role of dopamine in the presynaptic modulation of recurrent axon collaterals that interconnect spiny neurons.

Parts of this work have been reported previously in abstract form (Guzman et al., 2002).

Materials and Methods

Animals. Eighteen-day-old Wistar rats (27–28 gm) from our animal house were lesioned unilaterally in the GP with ibotenic acid (Fig. 1). Under sodium pentobarbital anesthesia (50 mg/kg), animals were placed in a stereotaxic instrument (David Kopf, Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden). Ibotenic acid solution (dissolved in PBS adjusted to pH 7.4 with NaOH) or the same volume (3.0 μg /0.4 μl) of vehicle in the controls was injected into the GP using the stereotaxic coordinates: 1.5 mm posterior to bregma, 3.8 mm lateral to the midline, and 5.0 mm from the dorsal surface. These values follow the system of Paxinos and Watson (1982) to establish coordinates (i.e., referred to bregma), but they do not correspond to the values for adult animals (Fig. 1*B*, inset). Animals were anesthetized 1–2 d after the lesion and killed by decapitation. The National Institutes of Health publication, *Principles of Laboratory Animal Care*, was followed, and procedures were approved by the Animal Care Commission of the Instituto de Fisiologia Celular.

Slice preparation and electrophysiology. Commonly, the brain was removed into ice-cold saline (4°C) containing the following (in mM): 123 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 25 NaHCO_3 , and 11 glucose (pH 7.4 with NaOH, 298 mOsm/l with glucose; saturated with 95% CO_2 and 5% O_2). Choline–chloride and choline– HCO_3^- substituted for NaCl and NaHCO_3 , respectively, when preparation was used to record from pallidal neurons. In these latter cases, rats were perfused transcardially with choline–saline previously to better preserve pallidal cells (Fig. 1*A*, right). Parasagittal neostriatal slices ($300\ \mu\text{m}$ thick) were cut in 4°C saline using a vibratome (Ted Pella, Reading, CA). Slices were then transferred to room temperature saline ($23\text{--}25^\circ\text{C}$) and allowed to recover for 1 hr. Thereafter, slices were transferred to a custom Plexiglas recording chamber and superfused continuously with oxygenated saline (3–6 ml/min; Na-salts in all cases). Individual neurons were visualized ($40\times$ water immersion objective) under differential interference contrast enhanced visual guidance using infrared videomicroscopy in an adapted upright microscope (Diaphot; Nikon, Melville, NY) with a camera (CCD-100; Dage-MTI, Michigan City, IN).

Micropipettes were made with borosilicate glass pulled in a Flaming–Brown puller (Sutter Instruments, Novato, CA) fire polished for DC resistances of $\sim 3\text{--}6\ \text{M}\Omega$. Because some previous attempts to record inhibition between spiny neurons may have failed as a result of the small amplitude of the signal, our internal solution had a high Cl^- concentration containing the following (in mM): 72 KH_2PO_4 , 36 KCl, 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na_2ATP , 0.2 Na_3GTP , 5 QX-314, and 0.5% biocytin, pH 7.2, 275 mOsm/l (Koos et al., 2002). QX-314 was added to block both antidromic and orthodromic unclamped action currents that distorted evoked synaptic currents (see Fig. 2*A*). A striatal field potential is shown in Figure 2*A1* to compare the latencies of its antidromic (N_1) and orthodromic (N_2) components with those obtained in the whole-cell configuration. A method to obtain population spikes in slices has been described previously (Bargas et al., 1998). Whole-cell recordings used standard techniques. Cells with zero current potential more negative than $-70\ \text{mV}$, input resistance $>200\ \text{M}\Omega$, and holding current (in voltage-clamp mode) $\leq 0.025\ \text{nA}$ to maintain a holding potential near the resting potential of the cell were chosen. Neostriatal cells were selected deeper than two cell layers below the surface of the slice. Whole-cell recordings were made using an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Whole-cell access resistances were in the range of 5–20 $\text{M}\Omega$. Access resistance was monitored continuously, and experiments were abandoned if changes $>20\%$ were encountered. No cell capacitance, series resistance, or liquid junction potential (2 mV) compensations were made.

Synaptic events were evoked with a bipolar concentric tungsten electrode ($12\ \mu\text{m}$ at the tip; $50 \pm 8\ \text{k}\Omega$ DC resistance) (FHC, Bowdoinham, ME). Paired shock stimulation (45–50 msec of interstimulus interval; 0.2–0.4 msec duration; 1–4 V delivered to the stimulating electrode at a frequency of 0.1 Hz) was controlled with a computer interface (see below). Isolation units (Digitimer, Hertfordshire, UK) between the computer and the stimulating electrodes were used to quickly adjust stimulus parameters during the experiment. The stimulus strength was such that cortical stimulation did not evoke monosynaptic (charge spread) or polysynaptic (extensive striatal activation) IPSCs (see Fig. 3*A*) as tested in a sample of slices. The distance between recording and stimulating electrode in all configurations was $\sim 1\ \text{mm}$. In theory, field stimulation can be adjusted to stimulate a single synaptic terminal (Hanse and Gustafsson, 2001), and the recruitment of a given number of terminals is proportional to stimulus strength (see Fig. 2*C3*); however, terminals recruited by field stimulation may belong to different axons. Terminals releasing during the first shock might be the ones with the higher probability of release, whereas those recruited with the second shock might be those that had a release probability that was enhanced by residual Ca^{2+} (Zucker, 1999). Stimulus strength cannot be raised without limit, because obvious damage to the tissue is evident at high intensities. In the present study, stimulus strength was maintained below the first local “ceiling” or saturation of the intensity–amplitude plot as shown in Figure 2*C3* ($\sim 1\text{--}4\ \text{V}$). Synaptic responses evoked with this stimulus strength were recognized by its having quantal variation (see Fig. 8), and in some cases, failures (data not shown), although we did not perform intensity–

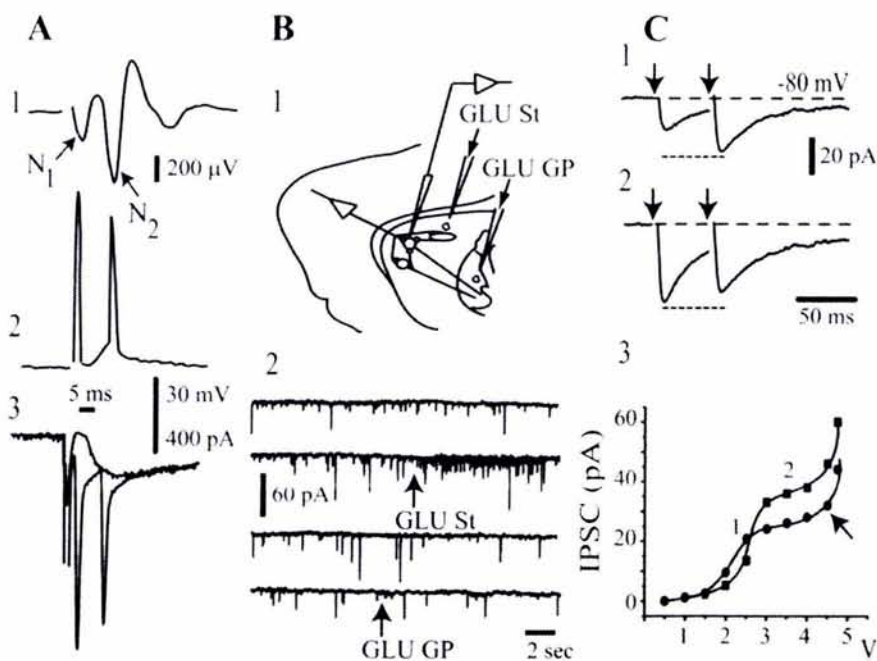


Figure 2. Orthodromic responses evoked antidromically. *A*, Top to bottom, Striatal population spike (1) voltage recording (2) and whole-cell currents (3) evoked during GP stimulation in the absence of CNQX or QX-314. *B*, The scheme depicts the experimental protocol to evoke synaptic activity with glutamate puffs (1). Synaptic activity is enhanced only after a glutamate puff in the neostriatum (arrows) (2). *C*, IPSCs evoked after antidromic stimulation of striatal axons in the GP. Weak stimulus strength produces paired-pulse facilitation (1), whereas stronger stimulus strength evokes paired-pulse depression (2). Twenty-five trials with failures were averaged for each trace. The intensity–amplitude relationship was plotted (3) for both first (filled circles) and second (filled squares) IPSCs. St, Striatum.

amplitude plots in each case. Unless stated otherwise, traces shown are the average of ~ 2 min recordings (10 traces) taken after the amplitude had been stabilized in a given condition. A small hyperpolarizing voltage command (15 mV) was constantly given during the experiment to monitor input conductance. Changes in input conductance were detected in some cells during the addition of D_1 receptor agonists (see Discussion).

The relative importance of pallidostriatal transmission on spiny cells was assessed by comparing the effects of glutamate applications on the synaptic activity of the recorded spiny cell. Choline-perfused unlesioned animals were used for this test. Thus, glutamate was added with pressure pulses or “puffs” (20 psi; 1 sec) on either the pallidum or the striatum near (1 mm) the recorded neuron (see Fig. 2*B*) by means of a pneumatic drug ejection system, PDES-2L (npi Electronics, Tamme, Germany), connected with a low-resistance pipette (0.2–0.5 M Ω) filled with bath saline and glutamate (20 μ M) placed ~ 50 μ M under the slice surface.

All recordings were filtered at 1–3 kHz and digitized with an AT-MIO-16E10 (National Instruments, Austin, TX) DAQ (NI-DAQ) board in a PC clone. On-line data acquisition used custom programs made in the Labview environment (National Instruments). The NI-DAQ board was used to save the data on binary files in the computer hard disk for additional off-line analysis.

Data processing. Digitized data saved on disk were imported for analysis and graphing into commercial graphing software (Origin v. 6.; Microcal, Northampton, MA). IPSC amplitudes were measured from basal line to peak for the first response (IPSC1). For the second response (IPSC2), the basal line remaining from the first response was subtracted. Only IPSC1 was used to compare amplitudes before and during drug application. The paired-pulse ratio (PPR) was IPSC2 amplitude over IPSC1 amplitude. PPR in the control condition was a function of stimulus strength. Lower stimulus strength tended toward facilitation (when all traces including failures were averaged). In a certain range (1–4 V) controls could exhibit either depression or facilitation. Distribution-free statistical procedures (Systat v.7.; SPSS, Chicago, IL) were used to find data significance.

Pharmacology. Drugs were dissolved in the bath saline from stock solu-

tions made daily using a gravity-driven superfusion system. Equilibrated concentrations of the drugs were achieved in 4–5 min. In this work, only one dopaminergic selective receptor agonist was used in the same preparation to avoid complex effects such as receptor cooperativity or interactions. All of the following were purchased from Sigma (St. Louis, MO): 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline disodium salt (CNQX), D-(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5), L-glutamic acid [glutamate (GLU)], SKF 81297, SCH 23390, bicuculline, QX-314, quinlorane, quinpirole, and sulpiride.

Immunohistochemistry. Neurons were filled with biocytin during recording. Slices with a single filled neuron were taken into consideration for immunocytochemistry. A combination of intracellular labeling and substance P (SP) or enkephalin (ENK, Leu, or Met) immunocytochemistry, but not both, was used to determine the peptide expressed in each recorded cell. Slices containing injected neurons were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and 1% picric acid in 0.1 M PBS, pH 7.4. The slices were then infiltrated with 30% sucrose and cut on a vibratome into 40 μ m sections. The sections were incubated 4–6 hr in PBS solution containing 0.2 Triton X-100 and avidin conjugated to Texas Red (12.5 μ g/ml; Vector Laboratories, Burlingame, CA) to label the recorded neuron.

Sections were then processed for conventional immunocytochemistry and fluorescence to demonstrate either SP or ENK using commercially available antisera (Peninsula Labs, San Carlos, CA) conjugated to fluorescein isothiocyanate. Slices were not processed for both antisera but one was chosen in each case. Thus, in each trial, either SP- or ENK-negative neurons could also be recorded. Therefore, our cell samples were divided into four pools with $p \approx 0.25$ of appearance: SP- and ENK-positive and SP- and ENK-negative, to report dopaminergic actions (see Results). Briefly, sections were rinsed in PBS and incubated for 18–24 hr at 4°C with primary rabbit antibody against ENK or SP (diluted 1:200). After rinsing in PBS, sections were reincubated for 1 hr with secondary antibodies conjugated to FITC (diluted 1:100). Sections were mounted in an anti-queenching media (Vectashield, Vector Laboratories) and examined under a confocal microscope (MRC-1024; Bio-Rad, Natford, UK) equipped with a krypton–argon mixed-gas laser. Two laser lines emitting at 490 and 560 nm were used for exciting FITC and Texas Red, respectively. Immunostained cells were studied either on single confocal images or on reconstructed sections made by projecting z-series of three to four consecutive confocal images 10 μ m apart collected throughout the thickness of the section. The background noise was reduced averaging three to six images. Digitized images were transferred to a personal computer (Confocal Assistant, T. C. Brelje). Negative controls were to run an assay with excess SP or ENK (5 nM) mixed with primary antiserum, or omission of the primary antibodies, applying only the secondary antibody. Our goal was to immunoreact biocytin-filled neurons. In $\sim 50\%$ of cases, the biocytin-filled neuron was negative (or positive) to the antiserum tested in the presence of neighboring positive and negative neurons.

Results

Synaptic currents from spiny axon collaterals can be isolated

Figure 2*A* illustrates responses of neostriatal neurons after field stimulation in the GP in the absence of any blocker. The striatal field potential (Fig. 2*A*1, population spike) recorded in these conditions exhibits N_1 and N_2 components. The N_1 component is known to represent the population antidromic action potential,

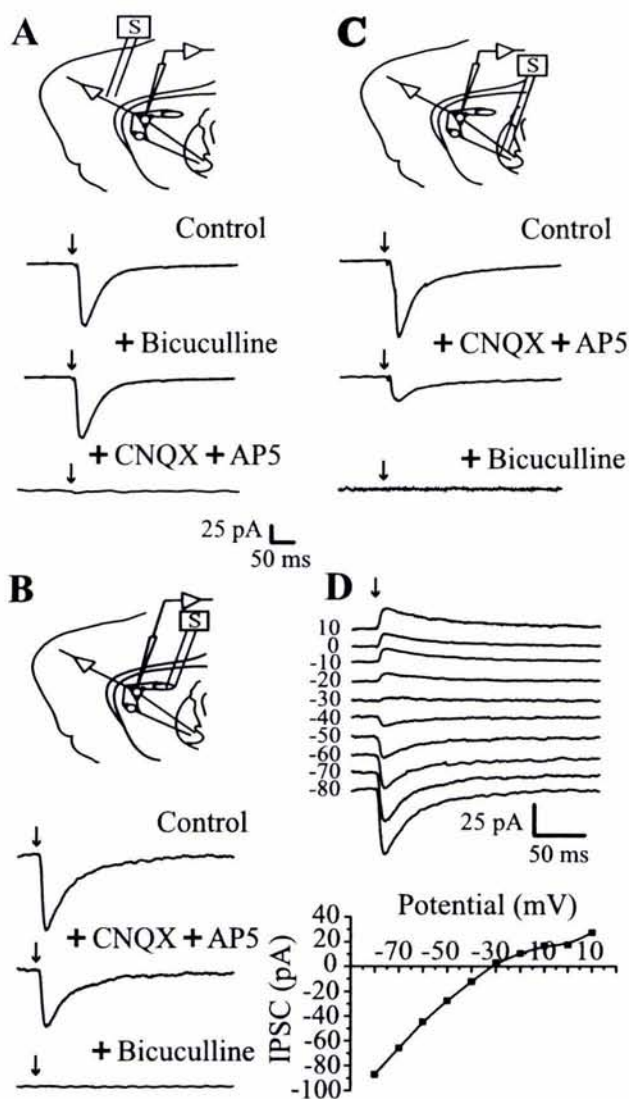


Figure 3. Evoked synaptic responses in a corticostriatal slice preparation. Top scheme in each frame illustrates the position of stimulating and recording electrodes; two medium spiny (round) and one local interneuron (ovoid) are symbolized. *A*, Synaptic currents were evoked by cortical stimulation (in this case, recordings are averages of 200 trials). Currents were blocked by CNQX (10 μ M) plus AP5 (50 μ M). No bicuculline-sensitive component was recorded with these stimulating conditions (1–4 V) (see Materials and Methods). *B*, Stimulation and recording in the neostriatum evoked synaptic currents that were only partially blocked by glutamatergic antagonists (CNQX and AP5 as before). Bicuculline (10 μ M) blocked a GABAergic component. *C*, Stimulation in the GP (lesioned with ibotenic acid) and recording in the neostriatum. Axons from spiny cells were activated antidromically to turn on collaterals interconnecting spiny cells. Glutamatergic components (cortical projections also pass through GP) were blocked by CNQX plus AP5. A clear bicuculline-sensitive component was disclosed. *D*, Synaptic currents evoked by antidromic stimulation in the GP. Reversal potential was -28.7 ± 7 mV ($n = 12$), which was not significantly different from the chloride equilibrium potential (-30.5 mV).

and it is ~ 10 –20% of the amplitude of the orthodromic component N_2 (Bargas et al., 1998), meaning that in 1 of 10 neurons, an antidromic spike is evoked with this stimulation protocol. In fact, whole-cell recordings in both current-clamp (Fig. 2A2) and voltage-clamp modes (Fig. 2A3) show antidromic and orthodromic action potential–currents with similar latencies as the N_1 and N_2 components in a portion of cells ($n = 2$ of 10). Orthodromic spikes arise from underlying synaptic events. Figure 2A3 illustrates a subthreshold synaptic event. An increase of stimulus strength produced the appearance of action currents. This shows

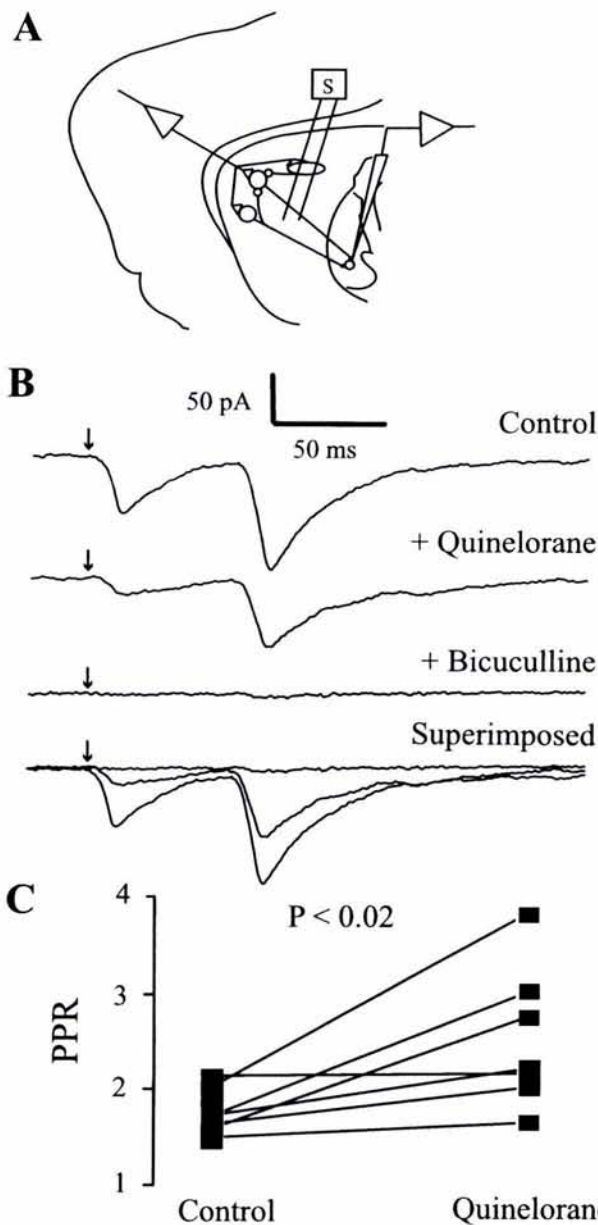


Figure 4. Dopaminergic modulation of striatopallidal transmission. *A*, Recording of pallidal neurons during striatal stimulation. *B*, Top to bottom, Control synaptic currents in the presence of CNQX (10 μ M) and AP5 (50 μ M). The action of quinelorane (100 nM) reduced synaptic currents and increased PPR in six of seven cells; bicuculline blocked all currents evoked from the striatum. The last trace superimposes all of the above records. *C*, Graph summarizing the results.

that striatopallidal axons can be stimulated antidromically from the GP.

Electrical stimulation, such as that used in Figure 2A, may activate both nearby axons (striatopallidal and cortical descending) and pallidal neurons. To test the possible participation of the pallidostriatal connection (Rajakumar et al., 1994; Bevan et al., 1998; Kita and Kita, 2001) in the responses of Figure 2A, we needed to stimulate pallidal somata without activating passing axons. Glutamate ionotropic receptors are located in the somatodendritic but not axonal membrane. Therefore, glutamate was administered by pressure (puff) with a micropipette located around the recorded neuron (1 mm) (Fig. 2B1, scheme) (see Materials and Methods). Synaptic activity was enhanced only after a glutamate puff in the neostriatum (Fig. 2B2, arrows); however, it was not enhanced when glutamate was released on the GP

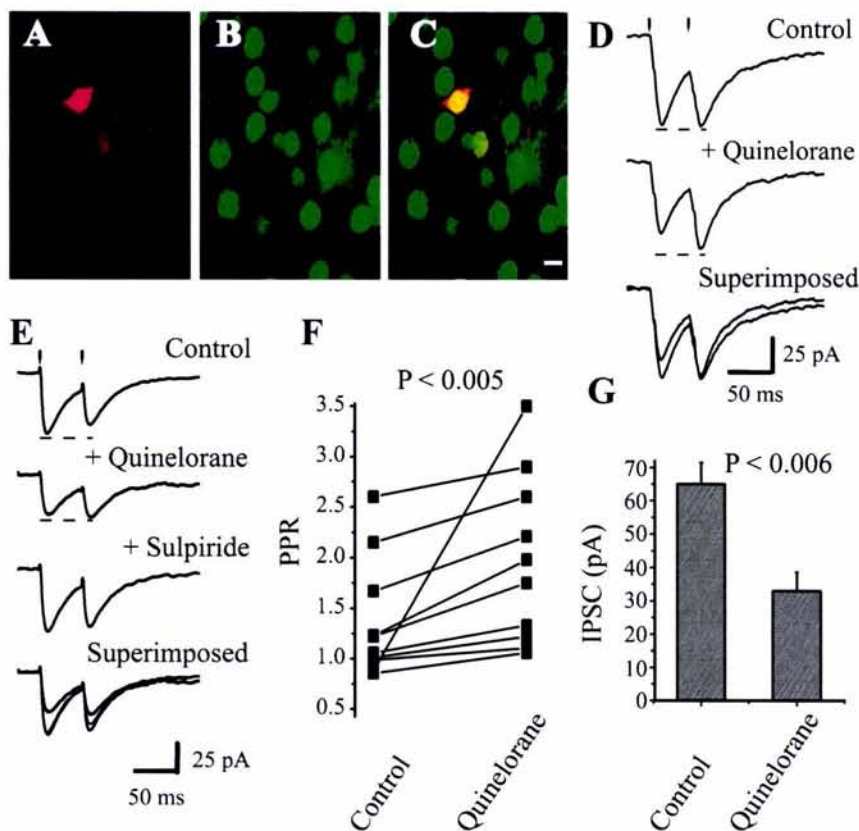


Figure 5. Dopaminergic modulation of medium spiny axon collaterals. Activation of D_2 receptors. Stimulating and recording electrodes as in Figure 1C. *A*, Neostriatal neuron filled with biocytin. *B*, Same preparation showing neurons immunoreactive for SP. *C*, Superimposition of *A* and *B* with confocal microscopy; recorded neuron was SP positive. *D*, Top to bottom, First control synaptic current (in CNQX plus AP5) was reduced by 100 nM quinelorane, whereas PPR was increased. Bottom trace shows superimposition of top and middle traces. *E*, Sulpiride (200 nM) reverses the action of quinelorane (100 nM) in another cell. *F*, Paired line graph illustrates PPR changes in a sample of spiny neurons ($p < 0.005$; $n = 10$). *G*, Using the same stimulus strength, mean IPSC amplitude (first response of the pair) before and during quinelorane is significantly different ($p < 0.006$).

($n = 6$). This result suggests that pallidostriatal input on spiny cells is mild. Despite this result, the GP was lesioned in the present work (see Materials and Methods) because of a possible selective pallidostriatal input to some spiny neurons.

The efferent axons of all neostriatal projection neurons pass through and project to the GP (Bishop et al., 1982; Kawaguchi et al., 1990). Results illustrated in Figure 2, *A* and *B*, suggested that inhibition from medium spiny neurons could be recorded, in medium spiny neurons, without important pallidostriatal contamination if antidromic stimulation of striatal axons was given in the GP. Figure 2C illustrates a representative test of this inference: paired-pulse synaptic responses evoked by antidromic GP stimulation in the presence of the glutamate ionotropic receptor antagonists CNQX (10 μ M) and AP5 (50 μ M). This maneuver blocked excitatory responses evoked by stimulating descending cortical fibers antidromically. In addition, QX-314 (5 mM) was used in the recording pipette to block antidromic or orthodromic action currents such as those recorded in Figure 2A (see Materials and Methods). These two maneuvers isolated IPSCs evoked by antidromic stimulation of striatal axons in the GP (Fig. 2C). Weaker stimulus strengths had more probability to elicit paired-pulse facilitation (Fig. 2C1), whereas stronger stimulus always elicited paired-pulse depression (Fig. 2C2). A representative in-

tensity–amplitude plot of antidromically evoked IPSCs is depicted in Figure 2C3. It has a sigmoidal shape with a local maximum (saturation) for both first (circles) and second (squares) IPSCs. Additional increases in stimulus strength may recruit more terminals (Fig. 2C3, arrow) and give a ladder-like appearance to the plot; however, we chose to limit stimulus strength to that which evokes responses equal to or below the local maximum, which may elicit facilitation (Figs. 2C1, 5D, 6D) or depression (Figs. 2C2, 5E, 6E) for the control pair. The amplitude of this first maximum could attain up to 250 pA; range, 10–250 pA ($n = 6$). In contrast, IPSCs evoked intra-strially had a local maximum amplitude range of 20–500 pA ($n = 11$) (see below).

To assess the extent of charge diffusion with this stimulation strength (≈ 1 –4 V), we recorded responses to cortical stimulation. It was seen that this stimulus strength did not activate GABAergic components in a neostriatal cell recorded 1 mm apart because evoked currents were unchanged by bicuculline ($n = 10$) (Fig. 3A), but they were totally blocked by CNQX plus AP5. This result suggested that there was no charge diffusion from one nucleus to the other when the recorded cell and the stimulating electrode were 1 mm apart. Stronger stimulus strength might produce polysynaptic GABAergic components (data not shown).

The same range of stimulus strength and distance between recording and stimulating electrodes was used to stimulate intra-strially (Fig. 3B). In this case, CNQX plus AP5 failed to block all evoked

current, and a bicuculline-sensitive (5 μ M) synaptic component was always recorded. It has been suggested that this IPSC is mostly attributable to the activation of GABAergic interneurons (Kita, 1993; Jaeger et al., 1994; Kawaguchi et al., 1995).

Figure 3C shows that synaptic responses evoked by antidromic stimulation from the GP also have a bicuculline-sensitive component, although somewhat smaller than that evoked intra-strially with similar stimulation parameters (amplitudes mean \pm SEM): 67 ± 4.5 pA ($n = 26$) versus 93 ± 7.1 pA ($n = 17$), respectively ($p < 0.005$; Mann–Whitney U test). The reversal potential of these IPSCs was -28 ± 7 mV ($n = 12$) (Fig. 3D) ($E_{Cl} = -30.5$ mV) (see Materials and Methods).

Probing dopaminergic receptor agonists with the paired-pulse paradigm

When stimulating in the neostriatum and recording in pallidal cells, 100 nM quinelorane reduced the synaptic responses from 172 ± 42 to 84 ± 38 pA ($n = 7$; $p < 0.02$; Wilcoxon's T test) (Fig. 4B). PPR increased from 1.7 ± 0.8 in the control to 2.5 ± 0.3 during quinelorane ($p < 0.02$; Wilcoxon's T test). Quinpirole had the same effects ($n = 3$). Figure 4C illustrates a summary of PPR change in a sample of experiments.

Presynaptic modulation of axon collaterals by the activation of dopaminergic receptors

Figure 5A shows a recorded neostriatal neuron filled with biocytin (Texas Red immunofluorescence). Figure 5B shows the same field immunoreacted against substance P. SP-positive neurons were always surrounded by SP-negative ones. Figure 5C shows previous figures superimposed. The recorded cell was clearly immunolabeled for SP (double labeling) and exhibited D_2 -mediated presynaptic inhibition of axon collaterals, as shown in Figure 5D. Two other SP-positive cells expressed D_2 modulation, whereas four SP-positive cells expressed D_1 modulation (see below); however, we did not test the same section with both SP and ENK antisera. This yielded negative cells. SP-negative cells had either D_2 ($n = 3$) or D_1 ($n = 3$) modulation when tested. Figure 5D (top) shows a pair of evoked IPSCs recorded in the spiny neuron, as indicated in Figures 2C and 3C (antidromic GP stimulation). Quinelorane (100 nM) reduced the first response; however, PPR was increased (middle). Superimposed traces are shown at the bottom. It is possible to see a representative time course of this effect (see Fig. 8A). Quinelorane effects were blocked by sulpiride (Fig. 5E), showing reversibility and specificity for D_2 -mediated modulation. Mean PPR increased from 1.15 ± 0.1 to 1.52 ± 0.17 during quinelorane ($p < 0.005$; $n = 10$; Wilcoxon's T test) (Fig. 5F). Mean IPSC amplitude was reduced from 65 ± 6.5 to 33 ± 5.6 pA ($p < 0.006$; Wilcoxon's T test) (Fig. 5G). Quinpirole had the same actions ($n = 3$). These results demonstrate dopaminergic D_2 -mediated modulation of recurrent axon collaterals of spiny neurons.

Figure 6A shows a neostriatal neuron filled with biocytin, whereas Figure 6B shows the same field immunoreacted against enkephalins. Figure 6C shows superimposition of A and B. The recorded cell was immunolabeled for ENK (double labeling). This and three other ENK-positive cells exhibited D_1 -mediated presynaptic potentiation of axon collaterals, whereas four other cells exhibited D_2 modulation. Six ENK-negative cells had D_2 ($n = 4$) or D_1 ($n = 2$) modulation. Figure 6D shows that first, evoked IPSC was potentiated during 100 nM SKF 81297 ($n = 12$ of 16), a selective D_1 receptor agonist. The second synaptic event was almost always reduced, and therefore PPR was decreased ($n = 14$ of 16) from 1.3 ± 0.13 to 0.9 ± 0.08 during SKF 81297 ($n = 16$; $p < 0.0005$; Wilcoxon's T test) (Fig. 6F). D_1 receptor activation was blocked by the selective D_1 receptor antagonist SCH 23390 (200 nM) (Fig. 6E). IPSC amplitude of the first response exhibited a tendency toward significant change from 68 ± 6.2 to 86 ± 9.2 pA ($n = 16$; $p < 0.09$ for Wilcoxon's T test, but $p < 0.02$ for the Student's t test) (Figure 6G), despite a reduction of IPSC amplitude in some cells ($n = 3$ of 16 cells), probably resulting from a postsynaptic change caused by the D_1 agonist (Pacheco-Cano et al., 1996). These experiments show that PPR is

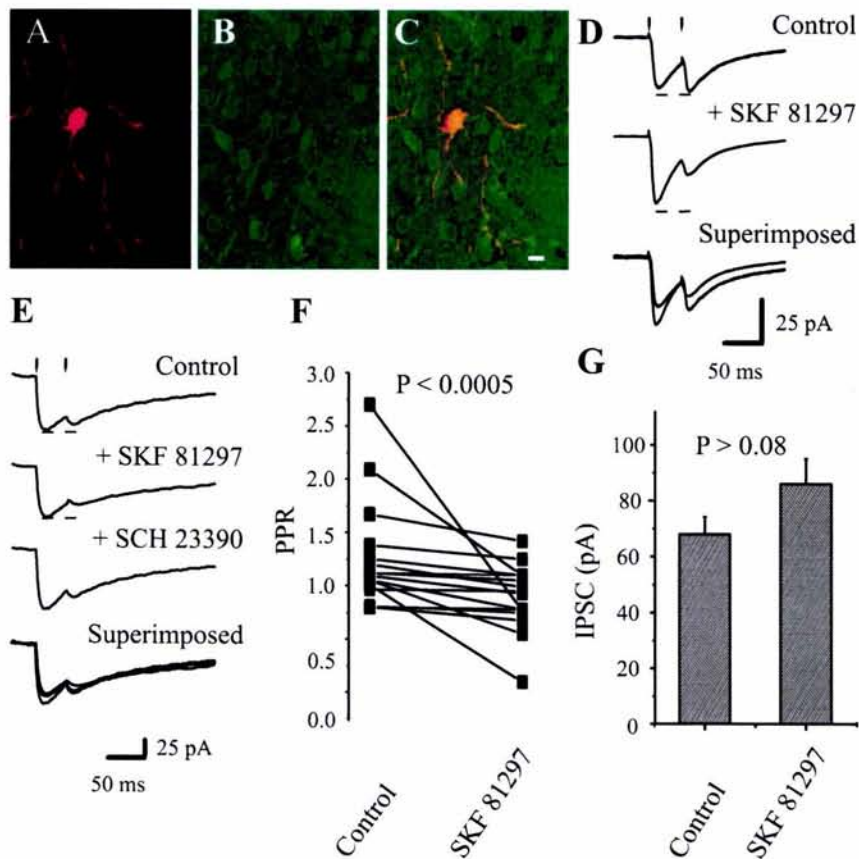


Figure 6. Dopaminergic modulation of medium spiny axon collaterals. Activation of D_1 receptors. Stimulating and recording electrodes as in Figure 1C. *A*, Neostriatal neuron filled with biocytin. *B*, Same preparation showing neurons immunoreactive for ENK. *C*, Superimposition of *A* and *B* with confocal microscopy; recorded neuron was ENK-positive. *D*, Top to bottom, First control synaptic current (in CNQX + AP5) was enhanced (12 of 16) by 100 nM SKF 21897, whereas PPR was decreased (14 of 16). Bottom trace shows superimposition of top and middle traces. *E*, SCH 23390 (100 nM) reverses the action of SKF 81297 in another cell. *F*, Paired line graph illustrates PPR reductions in a sample of spiny neurons ($p < 0.0005$; $n = 16$). *G*, Using the same stimulus strength, the mean of IPSC amplitudes (first response of the pair) before and during SKF 81297.

a more reliable test than IPSC amplitude. We illustrated the time course of one of these cases (see Fig. 8B). These results demonstrate D_1 -mediated modulation of recurrent axon collaterals in spiny cells.

Actions of dopaminergic receptor agonists on synaptic responses evoked with intrastriatal field stimulation

Figure 7 illustrates the actions of dopaminergic receptor agonists on IPSCs elicited by stimulation within the neostriatum (Fig. 3B). Quinelorane (100 nM), in the presence of CNQX and AP5, modified significantly neither IPSC amplitudes nor the PPR in most (70%) cells (Fig. 7A). The time course of a representative case is illustrated in Figure 8C. PPR changes were inconsistent from mean 1.4 ± 0.07 to 1.34 ± 0.12 during quinelorane ($n = 7$; $p > 0.4$; Wilcoxon's T test) (Fig. 7B; compare with Figs. 5F and 6F). Average IPSC amplitude was unchanged (Fig. 7C).

Figure 7D illustrates a typical case for D_1 action (100 nM SKF 81297). Bicuculline-sensitive currents, evoked intrastrially, were significantly reduced by the D_1 agonist ($p < 0.01$) (Fig. 7F) (Flores-Hernández et al., 2000; Gao et al., 2003). In some cases IPSC amplitude did not change, as seen in the time course of Figure 8D. This is opposite from the findings after antidromic GP stimulation. PPR did not change consistently or significantly when all cases were taken together: mean 1.3 ± 0.16 in controls

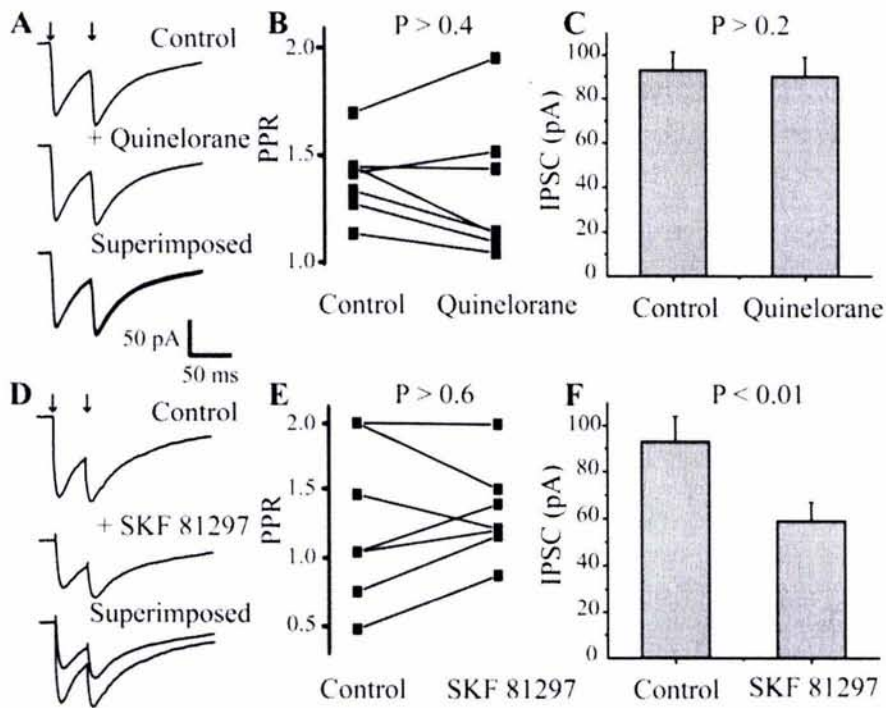


Figure 7. Lack of consistent dopaminergic modulation of synaptic currents evoked with intrastriatal field stimulation. Stimulating and recording electrodes as in Figure 1*B*. *A*, Quinolorane (100 nM) does not consistently change IPSC amplitude or PPR. *B*, Paired line graph shows an inconsistent pattern of PPR change. No more than one-third of cases exhibited a PPR increase ($p > 0.4$); some showed a decrease. *C*, When evoked intrastrially, mean IPSC amplitude did not change during D_2 agonist ($p > 0.2$). *D*, SKF 81297 (100 nM) does not consistently change PPR. In the case shown, IPSC was reduced (in contrast to GP antidromic stimulation). *E*, Paired line graph shows an irregular pattern of PPR change ($p > 0.6$). *F*, Intrastrially evoked mean IPSC exhibited a striking contrast with antidromically evoked mean IPSC; its average amplitude is reduced instead of enhanced ($p < 0.01$).

versus 1.3 ± 0.1 during D_1 agonist ($n = 10$; $p > 0.6$; Wilcoxon's *T* test) (Fig. 5*E*). These results reinforce the view that the two different sites of stimulation (neostriatum and GP) evoke synaptic responses from different sets of terminals.

Discussion

Measurement of PPR has proven to be a reliable method for studying presynaptic modulation (Dunwiddie and Haas, 1985; Kamiya and Zucker, 1994; Zucker, 1999; Barral et al., 2001; Cooper and Stanford, 2001; Gerdeman et al., 2002). With this method, a presynaptic D_2 -mediated modulation similar to that shown on the striatopallidal pathway (Cooper and Stanford, 2001; Mengual and Pickel, 2002) or in the cholinergic or fast-spiking (FS) interneurons (Pisani et al., 2000; Momiyama and Koga, 2001; Centonze et al., 2003) was shown. Similarly, a presynaptic modulation by D_1 receptor agonists as that reported in the striatonigral pathway (Floran et al., 1990, 1997; Cameron and Williams, 1993; Radnikow and Misgeld, 1998) was also shown, despite postsynaptic dopaminergic actions (Pacheco-Cano et al., 1996) on the subthreshold inward rectification (Galarraga et al., 1994; Nisenbaum and Wilson, 1995; Mermelstein et al., 1998; Farries and Perkel, 2000) that shunts inhibitory inputs (Fitzpatrick et al., 2001).

To summarize, D_1 receptor agonists increase whereas D_2 receptor agonists decrease GABAergic transmission between spiny cells.

IPSCs from axon collaterals

Amplitude dissimilarities of unitary IPSCs reported previously (current clamp) were probably attributable to differences in neu-

ronal input impedance and somatic shunt. Thus, IPSCs of microvolts or millivolts can be measured when comparing intracellular (Tunstall et al., 2002) with whole-cell (Czubayko and Plenz, 2002) recordings, in both adult and young spiny cells. In voltage-clamp mode, unitary IPSCs range from 20 to 250 pA (Koos et al., 2002); the minimum is in the range of quantal events in other synapses (Hanse and Gustafsson, 2001). With our stimulation parameters, the average synaptic current, 67 pA (10–250 pA), was in the unitary range. Therefore, an average of five boutons per connection is a reasonable number (quantum, 10–20 pA, depending on intracellular Ca^{2+}). Similar stimulation parameters yielded an average IPSC of 93 pA (20–500 pA) for intrastriatal inhibition, suggesting that axon collateral inhibition is quantitatively less than interneuron inhibition; however, a spiny neuron receives ~10,000 asymmetrical (Kincaid et al., 1998) and ~2500 symmetrical synapses (Ingham et al., 1998). Symmetrical synapses can be dopaminergic, cholinergic, or GABAergic, with dopaminergic being ~13% (Roberts et al., 2002). Assuming that cholinergic inputs are a similar percentage, 650 symmetrical synapses per spiny cell are not GABAergic. This leaves 1850 GABAergic synapses per spiny cell. How many come from axon collaterals? There are ~2840 striatal neurons in the volume of a spiny dendritic tree (Oorschot, 1996; Kincaid et al., 1998). Most spiny neurons have their axon collaterals restricted to this volume (Kawaguchi et al., 1990). If 95% of the neurons are spiny, the number of potentially contacting neurons onto a single centered spiny cell is ~2700. Only ~10% of neighboring spiny neurons are connected with one another (Czubayko and Plenz, 2002; Tunstall et al., 2002); therefore, connecting spiny neurons total only ~270. An average of five contacts yields 1350 inhibitory synapses per spiny cell arising from axon collaterals: two-thirds of the GABAergic inputs. A similar calculation for interneurons explains the remaining contacts: 5% of the surrounding 2840 striatal neurons are interneurons, which is ~140. One-fourth of the surrounding spiny cells receive inputs from a centered interneuron (Koos and Tepper, 1999), which leaves ~30 interneurons converging in a single spiny cell. Fast- and low-threshold spiking interneurons might leave up to 15 (range, 8–15) contacts per spiny cell (Kubota and Kawaguchi, 2000). Thus, $30 \times 15 = 500$ contacts from interneurons. The later calculation has experimental support: 4–27 FS interneurons may converge on a single projection cell (Koos and Tepper, 1999). This makes an average of 16 interneurons of a single class converging on a spiny cell, which makes $16 \times 15 = 240$ contacts from one class of interneuron. Assuming the same number of contacts from both GABAergic interneuron genres (Kubota and Kawaguchi, 2000), the number of interneuronal contacts is again ~500. Thus, 70% of all GABAergic contacts are from axon collaterals, and 30% are from interneurons. These calculations are subject to error (e.g., various interneurons may be as complex as in the cortex), but assuming, provisionally, that these percentages may be correct, there is need

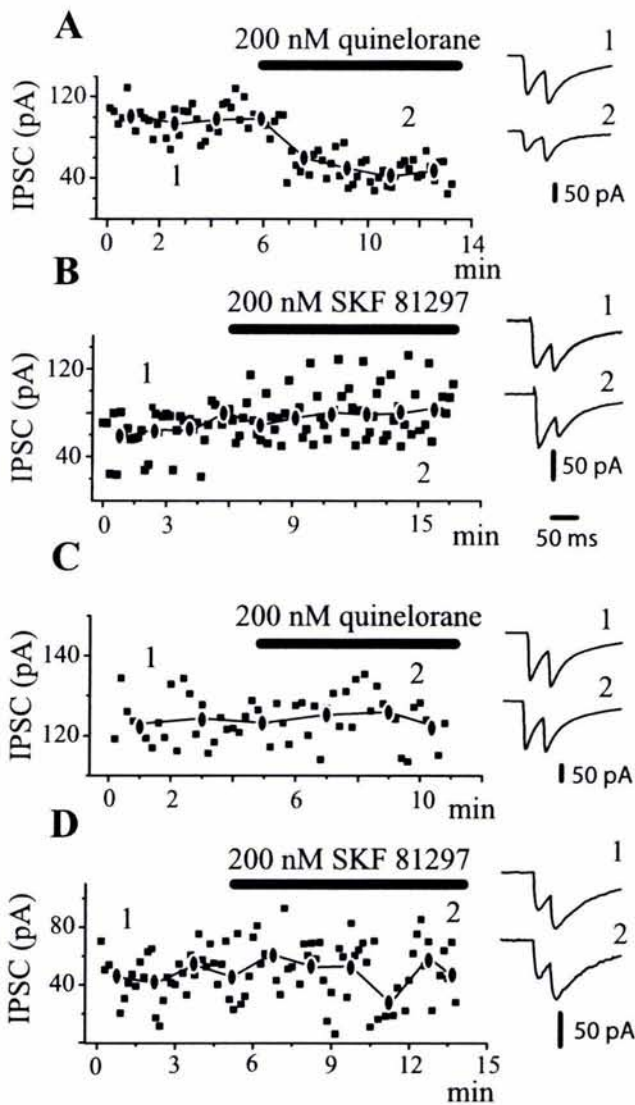


Figure 8. Time course of action of dopaminergic drugs. IPSCs exhibited amplitude variation from trial to trial, suggesting that only a few terminals were being activated. Amplitudes in each trial and mean amplitude of first IPSC were graphed in all cases (A–D). A, IPSCs were evoked with antidromic stimulation from the GP, thus favoring activation of terminals from recurrent axon collaterals (as in Fig. 1C). After several minutes of control recordings, 200 nM quinellorane (dopaminergic D_2 receptor agonist) was added to the superfusion. Quinellorane reduced IPSC amplitude and produced paired-pulse facilitation (PPR > 1). Recordings at right, in this and the other frames, were taken before and during drug application, as indicated by the numbers. B, Same experimental arrangement as in A, except that 200 nM SKF 81297 (dopaminergic D_1 receptor agonist) was administered. A tendency to exhibit larger IPSC amplitudes is accompanied with paired-pulse depression (PPR < 1). C, IPSCs are now intrastrially evoked (as in Fig. 1B). Quinellorane produced neither amplitude nor PPR changes in most cases. D, Same experimental arrangement as in C, except that SKF 81297 is administered. In this case, there was no consistent change of either mean amplitude or PPR. In several cases, the IPSC was reduced. Stimulus frequency was 0.2 Hz. The traces at right are averages of 2 min recordings at approximate times indicated by the numbers.

to explain why the IPSC that is evoked intrastrially is larger and why it responds inconsistently to dopaminergic receptor agonists.

First, the distance chosen between stimulating and recording electrodes (1 mm) very probably decreased the probability of stimulating axon collaterals connected to the recorded cell (Czubayko and Plenz, 2002; Tunstall et al., 2002). Second, field stimulation activates nearby axons. All other things being equal, the most potent inhibition will come from axons that possess the

largest number of synchronously releasing contacts. Moreover, interneurons are prone to fire repetitively and tend to synchronize one another through gap junctions (Koo and Tepper, 1999), and each terminal bouton tends to have more than one active zone (Bevan et al., 1998). In addition, the FS interneurons preferentially target the perisomatic region and not only the dendrites of projection cells (Bennett and Bolam, 1994; Koo and Tepper, 1999; Kubota and Kawaguchi, 2000). Therefore, a striatal field stimulus will be biased toward interneurons and a larger IPSC (Jaeger et al., 1994). In support of this inference, large amplitude events (which need a number of synchronous boutons) interspersed with small ones can be recorded during spontaneous synaptic activity (Fig. 2B2). Furthermore, 4-aminopyridine reveals two types of inhibition in the neostriatum: one asynchronous with small IPSPs and the other, rhythmic, exhibiting barrages of large amplitude IPSPs, which persist in the presence of CNQX plus AP5 (Flores-Hernández et al., 1994).

The conclusion is that field stimulation inside the neostriatum activates a mixed source of GABAergic terminals favoring the terminals from interneurons. A lack of consistency in the action of dopaminergic drugs on intrastrially evoked inhibition, as recorded in spiny cells, has been reported previously (Delgado et al., 2000; Fitzpatrick et al., 2001) and probably results from a great variety of dopaminergic actions on a diverse array of GABAergic terminals and interneurons targeting spiny cells (Lenz et al., 1994; Pisani et al., 2000; Momiyama and Koga, 2001; Bracci et al., 2002; Yasumoto et al., 2002; Centonze et al., 2003; Gao et al., 2003). When none of these actions predominate over the others in most trials, inconsistent effects should be seen.

In contrast, antidromic stimulation from the GP may isolate IPSCs from collaterals (Park et al., 1980; Katayama et al., 1981; Czubayko and Plenz, 2002; Koo et al., 2002; Tunstall et al., 2002). If that were true, a consistent dopaminergic modulation should be seen, which was the case, resulting in the initial description of this modulation. In addition, neostriatal projection neurons express D_1 or D_2 receptors (Surmeier et al., 1993; Hernandez-Lopez et al., 1997, 2000; Aizman et al., 2000), and consistent presynaptic actions as the result of the activation of these receptors have been reported at the target nuclei (Floran et al., 1990, 1997; Cameron and Williams, 1993; Radnikow and Misgeld, 1998; Cooper and Stanford, 2001). Moreover, D_1 postsynaptic actions are facilitatory (Hernandez-Lopez et al., 1997), whereas D_2 postsynaptic actions depress firing (Hernandez-Lopez et al., 2000) in spiny neurons. Such actions are consistent with what was found at the terminals of axon collaterals.

The GP was lesioned with ibotenic acid to minimize contamination from pallidostriatal fibers (Kuo and Chang, 1992; Bevan et al., 1998). This contamination should be small, because local stimulation of pallidal neurons with glutamate showed little effect on spiny neurons. Pallidal neurons are much less than neostriatal neurons (Oorschot, 1996), and only one-fourth of them innervate the neostriatum (Bevan et al., 1998; Kita and Kita, 2001): 1 of 240 spiny cells (Oorschot, 1996; Bevan et al., 1998). There are 800 intrastriatal boutons for each pallidal cell. More than half of them (up to 80%) innervate interneurons (Bevan et al., 1998; Kita and Kita, 2001). Assuming that half of them (400) innervate spiny cells [4.6×10^6 boutons; 2.6×10^6 spiny cells (Oorschot, 1996)], the result is 2 boutons per spiny cell. Therefore, the probability of activating pallidostriatal terminals on spiny neurons instead of axon collaterals is low; however, a selective pallidostriatal innervation to certain spiny cells cannot be discarded.

Which is the predominant inhibition? When a class of interneurons is stimulated, the number of activated terminals (Kubota and Kawaguchi, 2000) will make a potent inhibition (Koos and Tepper, 1999). On the other hand, if a large group of spiny cells has a physiological way to be turned on synchronously, the inhibition of axon collaterals will become relevant. This may occur during certain net states such as the up and down form of voltage oscillations (Stern et al., 1998). Thus, the predominant inhibition may be conditioned by the state of the net (such as when comparing climbing vs parallel inputs on Purkinje cells).

Although the effects of dopamine agonists on intrastrially evoked IPSCs are inconsistent in the present sample, cases of clear modulation can be separated (Delgado et al., 2000), and they may come from either axon collaterals or interneurons (Aosaki et al., 1998; Centonze et al., 2003). On the other hand, although PPR did not change consistently during D_1 receptor agonists, a significant and consistent decrease in IPSCs amplitude was seen, suggesting a mixture of postsynaptic (Flores-Hernández et al., 2000) and presynaptic (Centonze et al., 2003; Gao et al., 2003) D_1 effects. This latter effect is the opposite of that found on IPSCs from axon collaterals and striatonigral terminals (Radnikow and Misgeld, 1998), demonstrating that the same modulator may have opposite actions on different GABAergic connections and neurons.

Dopaminergic modulation of recurrent inhibition

D_1 receptor agonists increase (Radnikow and Misgeld, 1998) whereas D_2 receptor agonists decrease (Cooper and Stanford, 2001) GABAergic transmission between spiny cells. D_1 and D_2 agonists were effective at nanomolar concentrations, and their actions were blocked by their respective antagonists. Combined, the data demonstrate that terminals in charge of lateral inhibition express dopaminergic receptors and may be modulated by dopamine. This is supported by a recent preliminary report using pair recordings with high intracellular chloride to enhance unitary IPSCs (Koos et al., 2002), as well as by other indirect studies (Rebec and Curtis, 1988). It was shown that neurons immunoreactive for SP and ENK received GABAergic synapses modulated by either D_1 or D_2 receptor agonists, suggesting that pathways containing one or both receptor types (Gerfen et al., 1990; Gerfen, 2000) communicate with one another (Aronin et al., 1986; Bolam and Izzo, 1988; Gerfen and Young, 1988; Yung et al., 1996).

Physiological relevance

Lateral inhibition is a mechanism used to explain basal ganglia function (Groves, 1983; Wickens, 1993), because it might generate a type of neuronal competition (Wickens, 1993; Wickens and Oorschot, 2000) to filter, choose, or switch motor programs (Redgrave et al., 1999; Bar-Gad and Bergman, 2001) and contribute to establish working memory traces (Beiser and Houk, 1998). The present experimental work shows that lateral inhibition may be modulated by dopamine.

References

- Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A (2000) Anatomical and physiological evidence for D_1 and D_2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3:226–230.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375.
- Aosaki T, Kiuchi K, Kawaguchi Y (1998) Dopamine D_1 -like receptor activation excites rat striatal large aspiny neurons *in vitro*. *J Neurosci* 18:5180–5190.
- Aronin N, Chase K, DiFiglia M (1986) Glutamic acid decarboxylase and enkephalin immunoreactive axon terminals in the rat neostriatum synapse with striatonigral neurons. *Brain Res* 365:151–158.
- Bar-Gad I, Bergman H (2001) Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 11:689–695.
- Bargas J, Ayala GX, Hernandez E, Galarraga E (1998) Ca^{2+} -channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res Bull* 45:521–524.
- Barral J, Poblette F, Mendoza E, Pineda JC, Galarraga E, Bargas J (2001) High-affinity inhibition of glutamate release from corticostriatal synapses by omega-agatoxin TK. *Eur J Pharmacol* 430:167–173.
- Beiser DG, Houk JC (1998) Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events. *J Neurophysiol* 79:3168–3188.
- Bennett BD, Bolam JP (1994) Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neuroscience* 62:707–719.
- Bevan MD, Booth PA, Eaton SA, Bolam JP (1998) Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *J Neurosci* 18:9438–9452.
- Bishop GA, Chang HT, Kitai ST (1982) Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 7:179–191.
- Bolam JP, Izzo PN (1988) The postsynaptic targets of substance P-immunoreactive terminals in the rat neostriatum with particular reference to identified spiny striatonigral neurons. *Exp Brain Res* 70:361–377.
- Bracci E, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2002) Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J Neurophysiol* 87:2190–2194.
- Cameron DL, Williams JT (1993) Dopamine D_1 receptors facilitate transmitter release. *Nature* 366:344–347.
- Centonze D, Bracci E, Pisani A, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P (2002) Activation of dopamine D_1 -like receptors excites LTS interneurons of the striatum. *Eur J Neurosci* 15:2049–2052.
- Centonze D, Grande C, Usiello A, Gubellini P, Erbs E, Martin AB, Pisani A, Tognazzi N, Bernardi G, Moratalla R, Borrelli E, Calabresi P (2003) Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *J Neurosci* 23:6245–6254.
- Cooper AJ, Stanford IM (2001) Dopamine D_2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs *in vitro*. *Neuropharmacology* 41:62–71.
- Czubayko U, Plenz D (2002) Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15764–15769.
- Delgado A, Sierra A, Querejeta E, Valdiosera RF, Aceves J (2000) Inhibitory control of the GABAergic transmission in the rat neostriatum by D_2 dopamine receptors. *Neuroscience* 95:1043–1048.
- Dunwiddie TV, Haas HL (1985) Adenosine increases synaptic facilitation in the *in vitro* rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol (Lond)* 369:365–377.
- Farriss MA, Perkel DJ (2000) Electrophysiological properties of avian basal ganglia neurons recorded *in vitro*. *J Neurophysiol* 84:2502–2513.
- Fitzpatrick JS, Akopian G, Walsh JP (2001) Short-term plasticity at inhibitory synapses in rat striatum and its effects on striatal output. *J Neurophysiol* 85:2088–2099.
- Floran B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D (1990) Activation of D_1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 116:136–140.
- Floran B, Floran L, Sierra A, Aceves J (1997) D_2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett* 237:1–4.
- Flores-Hernández J, Galarraga E, Pineda JC, Bargas J (1994) Patterns of extrinsic and intrinsic synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-aminopyridine. *J Neurophysiol* 72:2246–2256.
- Flores-Hernández J, Hernandez S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P, Surmeier DJ (2000) D_1 dopamine receptor activation reduces GABA_A receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol* 83:2996–3004.
- Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández JV, Bargas J (1994) Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res* 100:239–249.
- Gao WJ, Wang Y, Goldman-Rakic PS (2003) Dopamine modulation of

- perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci* 23:1622–1630.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5:446–451.
- Gerfen CR (2000) Dopamine-mediated gene regulation in models of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47:S42–S50.
- Gerfen CR, Young III WS (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an *in situ* hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460:161–167.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma Jr FJ, Sibley DR (1990) D₁ and D₂ dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429–1432.
- Groves PM (1983) A theory of the functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of movement. *Brain Res* 286:109–132.
- Guzman JN, Hernandez A, Galarraga E, Laville E, Vergara R, Elij P, Valdivosera R, Aceves J, Vargas J (2002) Differential presynaptic modulation of inhibitory inputs to neostriatal projection neurons: dopamine modulates inputs from spiny axon collaterals but not from interneurons. *Soc Neurosci Abstr* 28:164.13.
- Hanse E, Gustafsson B (2001) Quantal variability at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *J Physiol (Lond)* 531:467–480.
- Hernandez-Lopez S, Vargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D₁ receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J Neurosci* 17:3334–3342.
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Vargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLCβ₁-IP₃-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987–8995.
- Ingham CA, Hood SH, Taggart P, Arbutnot GW (1998) Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Neurosci* 18:4732–4743.
- Jaeger D, Kita H, Wilson CJ (1994) Surround inhibition among projection neurons is weak or nonexistent in the rat neostriatum. *J Neurophysiol* 72:2555–2558.
- Kamiya H, Zucker RS (1994) Residual Ca²⁺ and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371:603–606.
- Katayama Y, Miyazaki S, Tsubokawa T (1981) Electrophysiological evidence favoring intracaudate axon collaterals of GABAergic caudate output neurons in the cat. *Brain Res* 216:180–186.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10:3421–3438.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527–535.
- Kincaid AE, Zheng T, Wilson CJ (1998) Connectivity and convergence of single corticostriatal axons. *J Neurosci* 18:4722–4731.
- Kita H (1993) GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99:51–72.
- Kita H, Kita T (2001) Number, origins, and chemical types of rat pallidostriatal projection neurons. *J Comp Neurol* 437:438–448.
- Koos T, Tepper JM (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2:467–472.
- Koos T, Tepper JM, Goldman-Rakic P, Wilson CJ (2002) Electrophysiological properties and dopaminergic modulation of GABAergic inhibition among neostriatal projection neurons. *Soc Neurosci Abstr* 28:764.17.
- Kubota Y, Kawaguchi Y (2000) Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. *J Neurosci* 20:375–386.
- Kuo H, Chang HT (1992) Ventral pallido-striatal pathway in the rat brain: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 321:626–636.
- Lenz S, Perney TM, Qin Y, Robbins E, Chesselet MF (1994) GABA-ergic interneurons of the striatum express the Shaw-like potassium channel Kv3.1. *Synapse* 18:55–66.
- Mengual E, Pickel VM (2002) Ultrastructural immunocytochemical localization of the dopamine D₂ receptor and tyrosine hydroxylase in the rat ventral pallidum. *Synapse* 43:151–162.
- Mermelstein PG, Song WJ, Tkatch T, Yan Z, Surmeier DJ (1998) Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci* 18:6650–6661.
- Momiyama T, Koga E (2001) Dopamine D₂-like receptors selectively block N-type Ca²⁺ channels to reduce GABA release onto rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol (Lond)* 533:479–492.
- Nisenbaum ES, Wilson CJ (1995) Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci* 15:4449–4463.
- Oorschot DE (1996) Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the Cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol* 366:580–599.
- Pacheco-Cano MT, Vargas J, Hernandez-Lopez S, Tapia D, Galarraga E (1996) Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs⁺-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 110:205–211.
- Park MR, Lighthall JW, Kitai ST (1980) Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res* 194:359–369.
- Paxinos G, Watson C (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic.
- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P, Bernardi G (2000) Activation of D₂-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20:RC69(1–6).
- Radnikow G, Misgeld U (1998) Dopamine D₁ receptors facilitate GABA_A synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 18:2009–2016.
- Rajakumar N, Elisevich K, Flumerfelt BA (1994) The pallidostriatal projection in the rat: a recurrent inhibitory loop? *Brain Res* 651:332–336.
- Rebec GV, Curtis SD (1988) Reciprocal zones of excitation and inhibition in the neostriatum. *Synapse* 2:633–635.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K (1999) The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89:1009–1023.
- Roberts RC, Force M, Kung L (2002) Dopaminergic synapses in the matrix of the ventrolateral striatum after chronic haloperidol treatment. *Synapse* 45:78–85.
- Somogyi P, Bolam JP, Smith AD (1981) Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. *J Comp Neurol* 195:567–584.
- Stern EA, Jaeger D, Wilson CJ (1998) Membrane potential synchrony of simultaneously recorded striatal spiny neurons *in vivo*. *Nature* 394:475–478.
- Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS, Ariano MA (1993) Are neostriatal dopamine receptors co-localized? *Trends Neurosci* 16:299–305.
- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR (2002) Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol* 88:1263–1269.
- Wickens JR (1993) A theory of the striatum. New York: Pergamon.
- Wickens JR, Oorschot DE (2000) Neuronal dynamics and surround inhibition in the neostriatum: a possible connection. In: *Brain dynamics and the striatal complex*. (Miller R, Wickens JR, eds), pp 141–150. Sydney: Harwood Academic.
- Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular injections of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599–615.
- Yasumoto S, Tanaka E, Hattori G, Maeda H, Higashi H (2002) Direct and indirect actions of dopamine on the membrane potential in medium spiny neurons of the mouse neostriatum. *J Neurophysiol* 87:1234–1243.
- Yung KK, Smith AD, Levey AI, Bolam JP (1996) Synaptic connections between spiny neurons of the direct and indirect pathways in the neostriatum of the rat: evidence from dopamine receptor and neuropeptide immunostaining. *Eur J Neurosci* 8:861–869.
- Zucker RS (1999) Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 9:305–313.

5.2 Apartado número 2

En este apartado se presenta evidencia electrofisiológica de la modulación presináptica de las colaterales de NEMs por agonistas a receptores de tipo GABA_B.

Modulación presináptica de las terminales de las colaterales de las NEMs por la activación del receptor GABA_B.

Cuando se estimularon antidrómicamente las colaterales axónicas de las NEMs desde el GPe, y se registraron las IPSCs provocadas en una NEM en presencia de CNQX y AP5, el agonista a los receptores GABA_B, baclofen, a una concentración de 500 nM, redujo la respuesta sináptica S₁ promedio de 47 ± 8 a 22 ± 5 pA ($n = 6$; $p < 0.05$; prueba de Wilcoxon) en tanto que la tasa de pulsos pareados se incrementó de 1.3 ± 0.18 a 1.7 ± 0.23 ($p < 0.03$; $n = 6$; prueba de Wilcoxon) (Figura 5.1). El antagonista selectivo a los receptores GABA_B hidroxisaclofen (500 nM), fue capaz de bloquear este efecto (Figura 5.3), demostrando que esta modulación es presináptica y a través de la activación de receptores GABA_B.

Modulación presináptica de las entradas inhibitorias de las NEM provenientes de terminales GABAérgicas intraestriatales por la activación del receptor GABA_B.

Estimulando intraestriatalmente y registrando en NEM en presencia de CNQX y AP5, el agonista a receptores GABA_B baclofen (500 nM), redujo la respuesta sináptica S₁ de 148.4 ± 47 a 60 ± 19 ($n = 5$; $p < 0.05$ prueba de Wilcoxon), mientras que la TPP se incrementó de 0.8 ± 0.18 a 1.09 ± 0.2 ($p < 0.05$; $n = 5$; prueba Wilcoxon) (Figura 5.2). Igual que con las IPSCs de las colaterales, el antagonista GABA_B hidroxisaclofen fue capaz de bloquear el efecto del baclofen en las IPSCs evocadas intraestriatalmente (Figura 5.3).

En conclusión, el GABA_B, a diferencia de la dopamina no exhibió heterogeneidad en sus acciones presinápticas: todas las sinapsis probadas, fueron sensibles.

La activación de los receptores GABA_B modula presinápticamente la liberación de GABA de las colaterales que interconectan a las NEM.

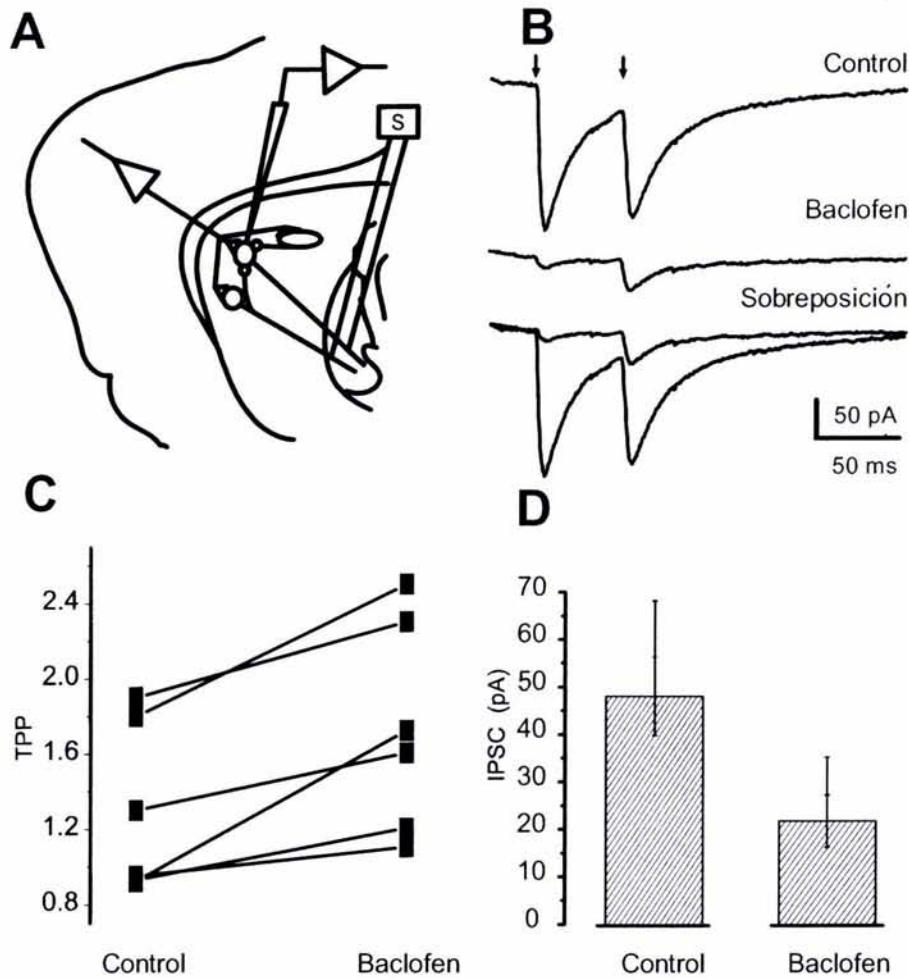


Figura 5.1: La activación de receptores GABA_B por el agonista específico baclofen, disminuyó las corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSCs) provenientes de las colaterales axónicas. A- Esquema que ilustra la posición del electrodo de estimulación y el de registro. B- Arriba, las corrientes sinápticas control en presencia de CNQX más AP5, fueron reducidas por baclofen (500 nM) (trazo medio), produciendo facilitación en la tasa de pulsos pareados. En la parte de abajo se superponen los dos trazos anteriores para observar con claridad el efecto del baclofen. C- Gráfica que ilustra el cambio en la tasa de pulsos pareados (TPP) ($p < 0.03$, $n = 6$). D- Comparación del promedio de la amplitud de la primera IPSCs en condiciones control y en presencia de baclofen ($p < 0.05$).

La activación de los receptores GABA_B modula presinápticamente la liberación de GABA de las terminales inhibitorias intraestriatales.

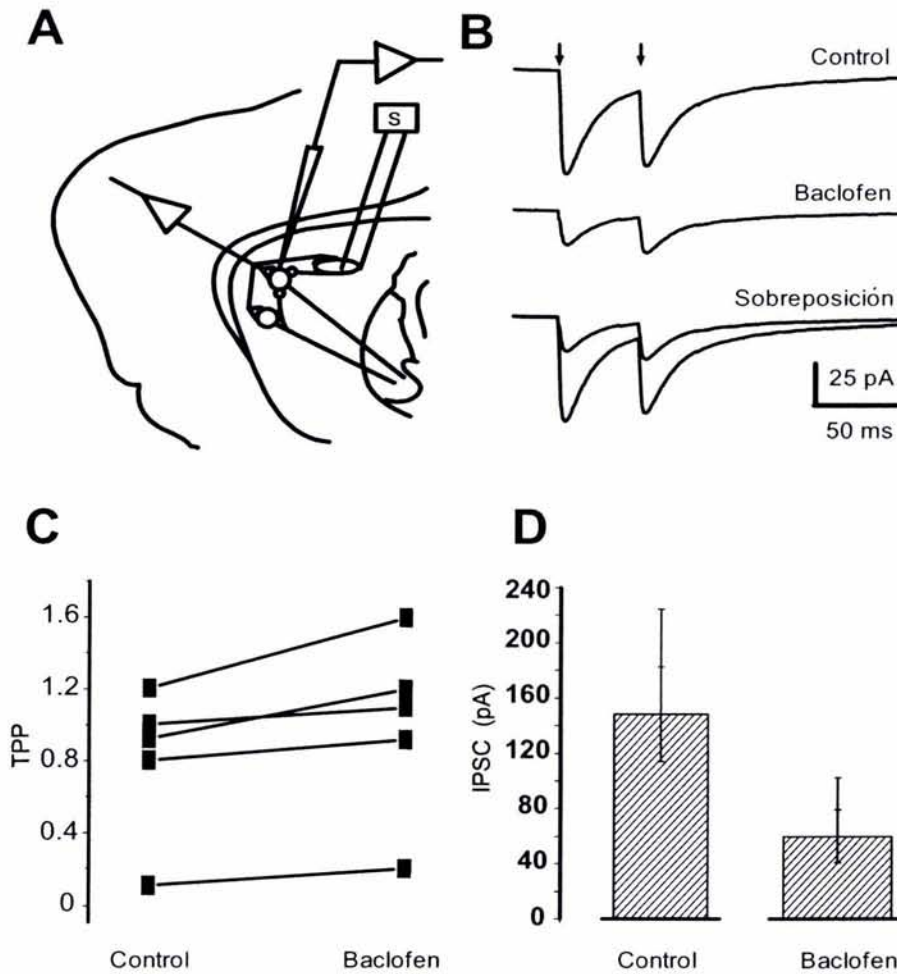


Figura 5.2: La activación de los receptores GABA_B por el agonista específico baclofen disminuyó las corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSCs) activadas por estimulación intraestriatal. A- Esquema que ilustra la posición de los electrodos de estimulación y el de registro. B- Arriba, las corrientes sinápticas control en presencia de CNQX y AP5, fueron reducidas por baclofen (500 nM) (en medio), produciendo facilitación en la tasa de pulsos pareados. En la parte de abajo se superponen los dos trazos anteriores para observar con claridad el efecto del baclofen. C- Gráfica de pulsos pareados que ilustra el cambio en la tasa de pulsos pareados (TPP) ($p < 0.05$, $n = 5$). D- Comparación del promedio de la amplitud de la primera IPSC en condiciones control y en presencia de baclofen ($p < 0.05$).

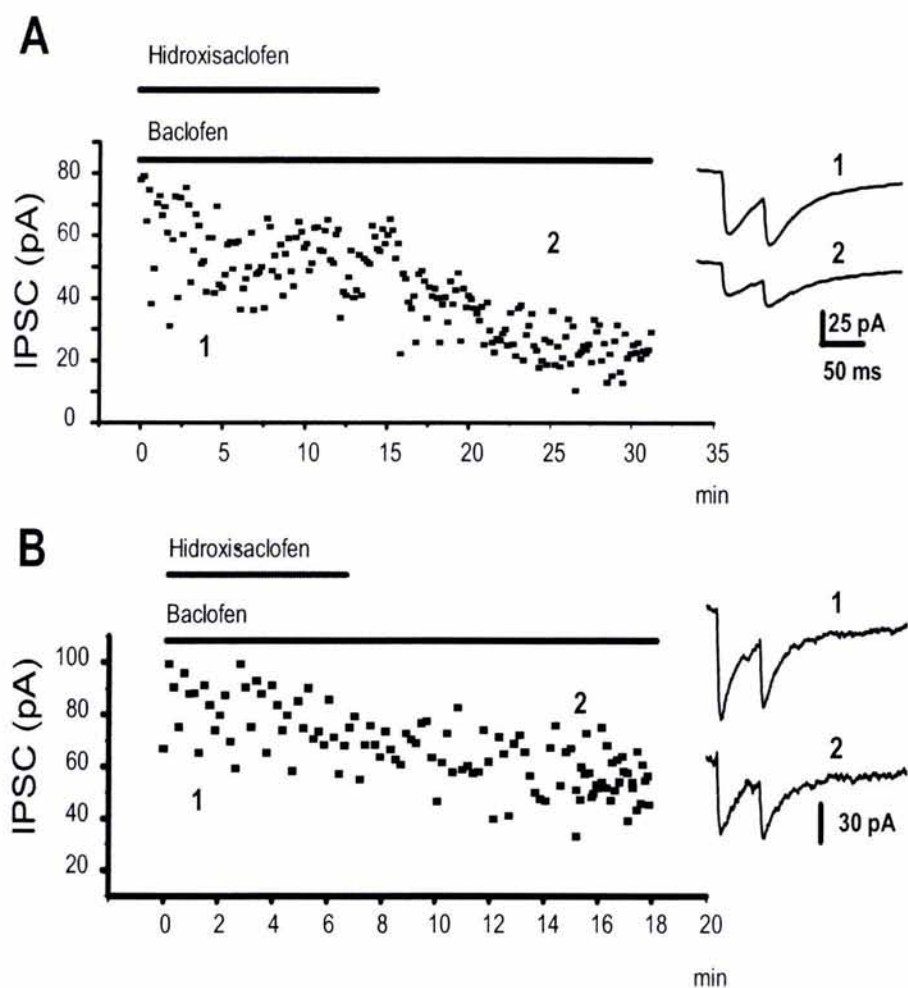


Figura 5.3: Curso temporal del efecto del baclofen y bloqueo por un antagonista selectivo. A- IPSCs de las colaterales provocadas por un estímulo antidrómico. El antagonista a $GABA_B$, hidroxisaclofen (500 nM) es capaz de impedir la mayor parte del efecto del agonista baclofen. El efecto aparece al remover el antagonista del medio. Los trazos representativos a la derecha se obtuvieron donde se indica con número en el curso temporal. Obsérvese el aumento en la TPP. B- IPSCs provocadas por estímulo intraestriatal. De igual manera que en A, el antagonista hidroxisaclofen es capaz de bloquear el efecto del agonista baclofen. El efecto se vuelve evidente cuando se retira el antagonista de la superfusión los trazos representativos a la derecha se obtuvieron donde se indica con número en el curso temporal.

Capítulo 6

Discusión

La entrada sináptica GABAérgica a las neuronas espinosas medianas puede proceder de axones colaterales de otras neuronas espinosas medianas (Aronin et al., 1986; Bishop et al., 1982; Bolam et al., 1988; Lenz et al., 1994; Wilson et al., 1980; Yung et al., 1996), o de interneuronas GABAérgicas intrínsecas al neocórtex (Bennett et al., 1994; Cowan et al., 1990; Kita, 1996; Kita et al., 1990; Plenz et al., 1998; Kawaguchi et al., 1989). La estimulación antidrómica desde el GPe nos permitió aislar electrofisiológicamente las entradas GABAérgicas provenientes de las colaterales axónicas que interconectan a las NEM. Encontramos que la dopamina modula la liberación de GABA de estas terminales. Los agonistas de los receptores a dopamina del tipo D_1 incrementaron la liberación de GABA, de manera similar a lo que ocurre en las terminales estriato-nigrales de la vía directa, donde se ha reportado que la activación del receptor D_1 modula presinápticamente estas terminales aumentando la liberación de neurotransmisor (Reubi et al., 1977; Floran et al., 1990; Cameron and Williams, 1993; Aceves et

al., 1995; Rosales et al., 1997; Harsing and Zigmond, 1997; Radnikow and Misgeld, 1998). Por el contrario, la activación de los receptores a dopamina del tipo D_2 , provocó una disminución de la liberación de GABA en las colaterales de las NEMs, de igual manera a como lo hace en las terminales de los núcleos de salida de la vía indirecta (GPe) (Floran et al., 1997; Harsing y Zigmond, 1997; Cooper y Stanford, 2001; Querejeta et al., 2001).

Las IPSCs provocadas por estimulación antidrómica en el globo pálido tuvieron una amplitud promedio de 67 pA (rango entre 10-250 pA). Mientras que las IPSCs provocadas por estimulación intraestriatal fueron más grandes: 93 pA (rango entre 20-500pA); sugiriendo que la inhibición colateral es cuantitativamente menor que la inhibición proveniente de las terminales neoestriatales. Hasta el momento no existe ningún trabajo que describan la cantidad de botones sinápticos que deja una NEM sobre otra; no obstante existen estudios donde se aporta suficiente información como para hacer un cálculo aproximado. Así; una NEM recibe 10.000 sinápsis asimétricas (glutamatérgicas) (Kincaid et al., 1988) y 2500 sinápsis simétricas (Ingham et al., 1988). Las sinápsis simétricas pueden ser dopaminérgicas, colinérgicas, o GABAérgicas. Aproximadamente el 13% son dopaminérgicas (Roberts et al., 2002), si consideramos un porcentaje similar para las entradas colinérgicas, tendríamos que 650 sinapsis simétricas no son GABAérgicas, por lo que una NEM recibiría algo así como 1850 sinapsis GABAérgicas.

Cuántas de estas sinapsis GABAérgicas provienen de otras NEMs, y cuántas de las interneuronas? Hay 2840 NEMs dentro del volumen dendrítico de una NEM (Oorschot, 1996; Kincaid et al., 1998). La mayor parte de los axones colaterales de las NEMs están circun-

scritos a este volumen (Kawaguchi et al., 1990). En la rata las NEMs constituyen el 95% de la población neuronal en el NE (Bennett y Wilson, 2000). Por lo tanto el número de contactos potenciales con otra NEM es de 2700. Pero solamente el 10% de NEMs están conectadas entre sí (Czubayko y Plenz, 2002; Tunstall et al., 2002). Por lo que 270 NEMs podrían estar interconectadas. Cinco contactos es un promedio razonable pues la amplitud promedio de las IPSCs fue de 67 pA con un intervalo de 10 a 250. Si un cuanto mide de 10 a 20 pA, tendríamos que 1350 sinapsis inhibitorias provienen de axones de otras NEMs. Esto es dos terceras partes de las entradas inhibitorias de una NEM. Un cálculo similar para las entradas inhibitorias provenientes de interneuronas nos da que el 5% de 2850 neuronas, que abarca el volumen de una NEM, serían 140 interneuronas. Koos y Tepper (1999) calcularon los límites máximo y mínimo de convergencia y divergencia, así: la divergencia está en los rangos de 135-541 NEMs por interneurona con disparo de alta frecuencia (conocida como "fast spiking" o FS en inglés). Por lo que la convergencia es de 4-27 FS por NEM. Tanto las interneuronas FS como las de disparo de bajo umbral (conocidas como "low threshold spiking" o LTS en inglés) pueden dejar entre 8 a 15 contactos por NEM (Kubota y Kawaguchi, 2000). Esto hace un total de 32 (mínimo)- 405 (máximo) = 4×15 (mínimo) - 27×15 (máximo) contactos de interneuronas sobre una NEM. En promedio 16 interneuronas de una sola clase estarían convergiendo en una NEM, así tendríamos $16 \times 15 = 240$ contactos de una sola clase de interneuronas GABAérgicas. Asumiendo que las dos clases de interneuronas GABAérgicas dan a la NEM el mismo número de botones, tendríamos 500 contactos provenientes de interneuronas. Entonces, el 70% de las sinápsis GABérgicas sobre las NEM sería proveniente

de axones de otras NEM, y el 30% vendría de interneuronas.

Por qué entonces las amplitudes promedio de las IPSC's, provenientes de las interneuronas, son mayores, que las provenientes de las colaterales axónicas? La inhibición más potente hacia las NEM parece venir de las interneuronas, pues sus axones poseen mayor número de sitios sincrónicos de liberación, además de que las interneuronas pueden unirse entre sí por medio de sinápsis eléctricas (Koos y Tepper, 1999). Cada terminal de una neurona FS puede tener más de una zona activa (Bevan et al., 1998), preferentemente hacen sinápsis con la región perisomática (Koos y Tepper, 1999). Al contrario, la inhibición lateral entre las NEM es difusa y altamente divergente (Czubayco y Plenz, 2002). La probabilidad de encontrar NEMs conectadas entre sí es inversamente proporcional a la distancia de registro, entre más alejados estén el sitio de estimulación y el de registro menos probabilidad hay de que dos NEMs estén conectadas (Czubayco y Plenz, 2002; Tunstall et al., 2002). La distancia elegida entre el electrodo de registro y el electrodo de estimulación en el presente trabajo fue de 1 mm, por lo que muy probablemente disminuimos la posibilidad de estimular colaterales axónicas cuando estimulamos dentro del NE. Así, aunque dentro del estriado hay terminales tanto de colaterales axónicas como de interneuronas, es posible que nuestras condiciones favorezcan la activación de aquellas sinapsis que provienen de las interneuronas.

Cuando se realizaron pruebas para ver si las corrientes provocadas intraestriatalmente eran susceptibles de ser moduladas por agonistas a receptores de dopamina tanto del tipo D_1 como del tipo D_2 , no encontramos consistencia en los resultados, esto es, algunas veces había y otras veces no había modulación, unas veces la modulación iba en un sentido (e.g., depre-

sión) otras en el otro (e.g., facilitación): evidenciando diversos tipos de terminal. Se sabe de la presencia del receptor del tipo D_2 en un pequeño porcentaje de interneuronas FS (20%) (Lenz et al., 1994). Resultados previos de estudios electrofisiológicos de IPSCs provocadas por estímulo intraestriatal no encontraron una modulación consistente con agonistas de receptores dopaminérgicos del tipo D_2 (Fitzpatrick et al., 2001). En otro estudio sólo se mostró modulación en el 25 a 30% de los casos (Delgado et al., 2000). Estudiando IPSCs provocadas por estimulación intraestriatal y registrando en interneuronas colinérgicas Momiyama y Koga (2001) encontraron una modulación consistente con agonistas a receptores a dopamina del tipo D_2 . Estas interneuronas reciben entradas GABAérgicas provenientes sobre todo de NEMs. En el mismo trabajo no se encontró evidencia de que las IPSCs provocadas por estímulo intraestriatal sobre las interneuronas colinérgicas pudieran ser moduladas por el receptor a dopamina del tipo D_1 . Será que las interneuronas colinérgicas reciben preferencialmente entradas GABAérgicas de NEM encefalinérgicas?. Habría que descartarlo. En el presente trabajo, cuando se probó un agonista a receptores de dopamina del tipo D_1 sobre las IPSCs provocadas por estímulo intraestriatal, encontramos una reducción significativa de la amplitud de las IPSCs. Por el momento, no hay estudios que hayan demostrado que las interneuronas del estriado (FS o LTS) posean receptores a dopamina del tipo D_1 , sin embargo, se conoce que en otras estructuras cerebrales como la corteza, diferentes tipos de interneuronas (FS y LTS) son moduladas a través del receptor a dopamina de tipo D_1 , de manera diferente y contraria. Las interneuronas FS, que preferentemente inervan a la región perisomática de las neuronas piramidales son moduladas presinápticamente a través

del receptor a dopamina del tipo D_1 , disminuyendo la liberación de GABA, mientras que, las interneuronas LTS, que preferentemente inervan la región dendrítica, son moduladas presinápticamente a través del receptor a dopamina del tipo D_1 aumentando la liberación de GABA (Gao et al 2003). Además se conoce que la activación del receptor a dopamina del tipo D_1 , disminuye las corrientes de GABA_A en NEM, a nivel postsináptico, a través de cascadas de señalización intracelular que involucran a la cascada PKA / DARP-32 / PP1 (Flores-Hernández et al., 2000). Entonces el efecto del agonista a receptores a dopamina del tipo D_1 encontrado sobre las IPSC provocadas por estimulación intraestriatal, podría ser explicado, tanto por efectos presinápticos como postsinápticos.

La estimulación antidrómica desde el GPe, fue capaz de separar las IPSCs provenientes de las colaterales axónicas que interconectan a las NEMs. Aquí mostramos una modulación consistente tanto por receptores a dopamina del tipo D_2 como del tipo D_1 . Esta modulación fue similar a la que ocurre en los núcleos de salida y el GPe donde se sabe que la dopamina esta modulando la liberación de GABA de las terminales de las NEMs. En la vía directa la DA aumenta la liberación a través de los receptores del tipo D_1 (Reubi et al., 1977; Floran et al., 1990; Cameron and Williams, 1993; Aceves et al., 1995; Rosales et al., 1997; Harsing and Zigmond, 1997; Radnikow and Misgeld, 1998) y en la vía indirecta disminuye la liberación de GABA a través de los receptores del tipo D_2 (Floran et al., 1997; Harsing y Zigmond, 1997; Cooper y Stanford, 2001; Querejeta et al., 2001).

Una subpoblación de neuronas del GPe proyecta al NE, por lo que en el presente trabajo se lesionó este núcleo para evitar una contaminación con IPSCs provenientes de neuronas del

GPe. Esta contaminación podría ser mínima. Bevan et al (1998) estudiaron en detalle esta entrada GABAérgica al estriado. Encontraron que una de cada cuatro neuronas del GPe inerva al neostriado. Del grupo de neuronas del GPe que inerva al estriado más del 80% lo hace selectivamente sobre interneuronas. Además, hay que tener en cuenta que la diferencia entre el número de neuronas del neostriado y el GPe es de dos ordenes de magnitud (2.79 millones versus 46.000) (Oorschot, 1996). Si de estas 46.000 neuronas del GPe solo una cuarta parte inerva al neostriado, tenemos que 11500 neuronas estarían inervándolo, con una divergencia de 1 a 240. Si asumimos que el 80% del total de las 11500 neuronas inerva a las interneuronas y que una neurona del GPe tiene aproximadamente 800 botones (Bevan et al., 1998; Kita and Kita, 2001; Bolam et al 2000), entonces tendríamos aproximadamente dos botones por cada NEM. Con esto podemos concluir que la posibilidad de activar terminales palidoestriatales inervando a las NEMs es muy baja.

La alta tasa de fallas en la transmisión sináptica entre las NEMs, sugiere que la inhibición lateral es muy débil (Jaeger et al., 1996). Sin embargo, se ha demostrado que la inhibición colateral cambia drásticamente su respuesta después de activaciones repetitivas (Czubayko y Plenz, 2002). Esto es, la inhibición lateral cobra relevancia fisiológica cuando un grupo de NEMs se sincroniza y/o aumenta de manera fásica su patrón de disparo, lo que puede ocurrir en ciertos estados fisiológicos como en el estado depolarizado o "up state" (Stern et al., 1998; Vergara et al., 2003) de las NEMs.

La teoría de la función del NE, durante los últimos años fue dominada por la hipótesis de que la inhibición más potente y poderosa provenía de las interneuronas GABAérgicas (FS,

LTS), y que la inhibición colateral era muy débil o no existía puesto que estudios electrofisiológicos no habían podido evidenciarla. Sin embargo existen numerosos estudios anatómicos donde se provee bastante evidencia de la existencia de colaterales interconectando a las NEMs (revisado en Plenz 2003). Estudios recientes con diversas técnicas electrofisiológicas demostraron que la inhibición lateral entre las NEM existe (Tunsatall et al., 2002; Czubyko y Plenz, 2002). El presente trabajo concuerda con esos resultados, y demuestra además que la inhibición lateral es modulada por la dopamina. El neostriado entonces es una red de neuronas que cuenta con dos tipos de inhibición funcionalmente diferentes: una proveniente de las interneuronas y otra de las colaterales que las interconectan (Wickens, 2000; Plenz, 2003). Los dos tipos de inhibición concuerdan con la naturaleza dual de la salida del neostriado, la vía directa y la vía indirecta, así como con que la realización de un movimiento requiere tanto de la activación de un grupo de músculos (agonistas) como de la inhibición de otro grupo (antagonistas). Para la explicación de la dinámica de la red del neostriado y la inhibición lateral es común usar un modelo del tipo "el ganador toma todo" (del inglés "winner-takes-all") donde un grupo de neuronas interactúa inhibiéndose entre sí. La neurona que dispara con mayor frecuencia inhibirá a las demás. Este modelo predice que la inhibición lateral seleccionará y categorizará la información que saldrá del NE. En cambio, la inhibición de las interneuronas serviría para suprimir estados previos de la red permitiendo que una nueva información sea procesada.

La dopamina está modulando presinápticamente la inhibición lateral, que será el mecanismo fundamental de procesamiento de la información en muchas regiones del SN. Así, la

dopamina estaría optimizando la selección dada por la inhibición lateral a través de los receptores a dopamina del tipo D_1 , pero la frenaría a través de los receptores a dopamina del tipo D_2 , disminuyendo la liberación de GABA de las colaterales.

Esto podría querer decir que un movimiento fino (e.g., escribir) requerirá seleccionar precisamente los grupos neuronales implicados, por lo que la función del receptor D_1 se estaría utilizando al máximo, mientras que un movimiento grueso (e.g., levantar un peso) no requerirá mucha precisión pero si muchas neuronas reclutadas, por lo que el receptor D_2 sería el más requerido. Esto es, proponemos que el balance entre la activación de los receptores D_1 y D_2 modula finamente el número de neuronas requeridas para cada tarea.

La complejidad en la dinámica de la transmisión sináptica sugiere que estos circuitos de retroalimentación e inhibición lateral estén sujetos no sólo a la modulación por dopamina, sino también a la plasticidad sináptica de corto y de largo plazo. La plasticidad a su vez pudiera estar siendo modulada por diferentes neurotransmisores e.g., dopamina, acetilcolina, etc.

Nuestros resultados también muestran que la activación presináptica de los receptores $GABA_B$, tanto de las colaterales axónicas de las NEMs, como de las interneuronas GABAérgicas del neostriado, inhibe la liberación de GABA. Este hallazgo concuerda con múltiples estudios donde se muestra que el papel principal de los autoreceptores en el sistema nervioso central es la inhibición presináptica de la liberación de diferentes neurotransmisores (Barral et al., 2000; revisado en Bowery, 1993; Parnas et al.,). En este caso al mismo GABA (Anderson y Mitchell 1985; revisado en Misgeld et al., 1995). El papel funcional del receptor

GABA_B en estas terminales (interneuronas y NEMs) sería regular la liberación de GABA actuando como autorreceptor proporcionando un control de retroalimentación negativa sobre la liberación de GABA. Nótese que a diferencia de los receptores dopaminérgicos, que están distribuidos heterogéneamente, los receptores GABAérgicos son ubicuos, lo que nos habla de una función homeostática sobre las terminales GABAérgicas o la transmisión GABAérgica en general. En contraste la modulación dopaminérgica estaría más implicada en la regulación selectiva de las vías o circuitos encargados de que el NE participe en la función motora.

Capítulo 7

Conclusiones

- Las técnicas electrofisiológicas modernas permiten medir la acción de un transmisor (e.g., GABA) aislando las acciones de las diferentes aferentes que lo liberan. Pudimos separar la contribución de las terminales GABAérgicas que producen la inhibición lateral recíproca entre neuronas principales por estimulación antidrómica de sus axones, de la inhibición "mixta" (producida por varios tipos de interneuronas).
- La probabilidad de liberar GABA de las colaterales axónicas es modulada por dopamina.
- La activación de los receptores dopaminérgicos de tipo D_2 produce inhibición pre-sináptica de la inhibición lateral.
- La activación de los receptores dopaminérgicos de tipo D_1 produce facilitación pre-sináptica de la inhibición lateral.

- Neuronas inmunopositivas a encefalinas (ENK) (vía indirecta) y a sustancia P (SP) (vía directa) reciben ambos tipos de terminal. Las NEMs de la vía directa (SP positivas) reciben inhibición de neuronas NEMs de la vía indirecta (ENK positivas) así como de otras NEMs de la misma vía. Esto aplica también para las NEMs de la vía indirecta.
- Los agonistas dopaminérgicos no modulan consistentemente la inhibición cuando esta es provocada intraestriatalmente. Esto probablemente se deba a que las IPSCs que provienen de diferentes tipos de neuronas (NEMs e interneuronas) no poseen, o poseen distintos tipos de receptor a dopamina.
- A diferencia de los efectos dopaminérgicos el receptor a GABA_B está modulando presinápticamente la probabilidad de liberación de GABA tanto en las colaterales de las NEM, como en las sinapsis de las interneuronas GABAérgicas.

Bibliografía

- [1] Aceves J, Floran B, Sierra A, Mariscal S (1995) **Receptor mediated modulation of the release of gamma-aminobutyric acid by endogenous dopamine in the basal ganglia of the rat.** *Prog-Neuropsychopharmacol-Biol-Psychiatry*. 19:727-39.
- [2] Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey A, Forssberg H, Greengard P y Aperia A (2000) **Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons.** *Nature Neurosci*. 3:226-230.
- [3] Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) **The functional anatomy of basal ganglia disorders.** *TINS* 12:366-375.
- [4] Alexander GE (1987) **Selective neural discharge in monkey putamen reflects intended direction of planned limb movements.** *Exp. Brain Res*. 67:623-634.
- [5] Alexander GE (1995) **Basal-ganglia: in handbook of Brain theory and Neural Networks:** (Arbib, M. A; Ed); Pp 139-144: The MIT Press; Cambridge, MA.
- [6] Aminoff MJ (2002) **Parkinson disease and other extrapyramidal disorders.** En: **Harrison Principles of internal medicine**, eds.
- [7] Andén NE, Fuxe K, Hamberger B y Hkelt TA (1966) **A quantitative study on the nigro-neostriatal dopamine neurons.** *Acta Physiol Scand* 67:306-312.
- [8] Anderson ME (1981) **The basal ganglia and movement.** In **Motor coordination**. Vol. 5. *Handbook of behavioral neurobiology*, ed. A. L. Towe and E. S. Luschei, pp. 367-399. New York: Plenum Press.
- [9] Anderson RA y Mitchell R (1985) **Evidence for GABAB autoreceptor in median eminence .** *Eur J Pharmacol* 118: 355-398
- [10] Aronin N, Chase K, DiFiglia M (1986) **Glutamic acid decarboxylase and enkephalin immunoreactive axon terminals in the rat neostriatum synapse with striatonigral neurons.** *Brain Res*. 365:151-398.
- [11] Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1988) **En: Fisiología. Células, órganos y sistemas.** Vol. 5. Cap. X. 13. pp 257-273. ed F.C.E. Mxico.
- [12] Barral J, Toro S, Galrraga E, Bargas J (2000) **GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channels.** *Neurosci Lett*. 283: 33-36.
- [13] Beiser DG, Houk JC (1998) **Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events.** *J. Neurophysiol*. 79, 3168-3188.
- [14] Bennett BD, Bolam JP (1994) **Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat.** *Neuroscience* 62:707-719.

- [15] Bennet BD y Wilson CJ (2000) **Synaptology and physiology of neostriatal neurons.** En: **Brain dynamics and striatal complex.** ED. Miller r y Wickens JR. pp11-140. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- [16] Bergman H. Deuschl G (2002) **Pathophysiology of parkinson's disease: From clinical neurology to basic neuroscience and back.** *Movement disorders.* 17 S3:28-40.
- [17] Bevan MD. Francis CM. Bolam JP (1995) **The glutamate-enriched cortical and thalamic input to neurons in the subthalamic nucleus of the rat:convergence with GABA-positive terminals.** *J. Com. Neurol.* 361:491-511.
- [18] Bevan MD. Booth PAC. Eaton SA. Bolam JP (1998) **Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat.** *J. Neurosci.* 18:9438-9452.
- [19] Bishop GA. Chang HT. Hitai ST (1982) **Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat.** *Neuroscience* 7:361-377.
- [20] Bolam JP. Izzo PN (1988)**The postsynaptic targets of substance P-immunoreactive terminals in the rat neostriatum with particular reference to identified spiny striatonigral neurons.** *Expl Brain Res.* 70: 361-677.
- [21] Bolam JP. Hanley JJ. Booth PAC. Bevan MD (2000) **Synaptic organisation of the basal ganglia.** *J Anat.* 196:527-542.
- [22] Bowery NG (1993) **GABAB receptor pharmacology.** *Ann Rev Pharmac Toxicol* 33: 109-147.
- [23] Bunzow JR. Van Tol HHM, Grandy DK. Albert P. Salon J, Christie MD, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) **Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA.** *Nature* 336:783-787.
- [24] Calabresi P. Mercuri N. Stanzione P, Stefani A, Bernardi G (1987) **Intracellular studies on the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons in vitro: evidence for D1 receptor involvement.***Neuroscience* 20:757-771.
- [25] Cameron DL, Williams JT (1993) **Dopamine D1 receptors facilitate transmitter release.** *Nature* 366:344-347.
- [26] Cepeda C, Levine MS (1998) **Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum.** *Dev Neurosci.* 20:1-18.
- [27] Chang HT. Wilson CJ. Kitai ST (1981) **Single neostriatal efferents axons in the globus pallidus: a light and electron microscopic study.** *Science* 213:915-918.
- [28] Chang HT. Wilson CJ, Kitai ST (1982) **A Golgi study of rat neostriatal neurons: light microscopic analysis.** *J Comp Neurol.* 208:107-26.
- [29] Chang HT. Kitai ST (1985) **Large neostriatal neurons in the rat: an electron microscopic study of gold-toned Golgi-stained cells.** *Brain Res Bull.* 8:631-43.
- [30] Clarke CE, Gutmann M (2002) **Dopamine agonist monotherapy in Parkinsons disease.** *The Lancet* 360:1767-1769.
- [31] Cooper AJ, Stanford IM (2001) **Dopamine D2 receptor mediates presynaptic inhibition of striatopallidal GABA (A) IPSCs in vitro.** *Neuropharmacology* 41:62-71.
- [32] Cotzias GC, Papavasiliou PS. and Gellene R. (1969) **Modification of parkinsonism-chronic treatment with L-DOPA.** *New Engl. J. Med.* 280:337-345.
- [33] Cowan RL, Wilson CJ, Emson PC, Heizmann CW (1990) **Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum.** *J Comp Neurol.* 302:197-205

- [34] Czubyko U, Plenz D (2002) **Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:15764-15769.
- [35] David DJ y Harrison MB (2002) **Colocalization of dopaminergic and muscarinic receptor subtypes on medium spiny striatal neurons in the rat:** Program No. 63.1. 2002. *Abstract Viewer/Itinerary planner*. Washington, DC:Society for Neuroscience. CD-ROM.
- [36] Dearth A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT Jr, Bates MD, Caron MG (1990) **Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor.** *Nature* 347:72-76.
- [37] DiFiglia M, Pasik P, Pasik T (1976) **A Golgi study of neural types in the neostriatum of monkeys.** *Brain Res*. 224:245 - 256.
- [38] DiFiglia M, Carey J (1986) **Large neurons in the primate neostriatum axamined with the combined Golgi - electron microscopic method.** *J Comp Neurol*. 244:36 - 52.
- [39] DeLong MR, Georgopoulos AP (1981) **Motor functions of the basal ganglia.** In *Handbook of Physiology*(eds Brookhart J.M, Mountcastle V.B and Geiger S.R), Vol 11, pp1017-1061. American Physiological Society, Bethesda, MD.
- [40] DeLong MR, Georgopoulos AP, Crutcher MD (1983) **Cortico-basal ganglia relations and coding of motor performance.** *Expl Brain Res, Suppl.7*: 30-40.
- [41] DeLong MR (1990) **Primate models of movement disorders of basal ganglia origin.** *TINS* 13:281-285.
- [42] Dubinsky JM (1989) **Development of inhibitory synapses among striatal neurons in vitro.** *J Neurosci*. 9:3955-3965.
- [43] Dunwinde TV, Hass HL (1985) **Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action.** *J Physiol Lond*. 369:365-377
- [44] Floran B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D (1990) **Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat.** *Neurosci-Lett*. 116:136-40.
- [45] Floran, B, Floran L, Sierra A, Aceves J (1997) **D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus.** *Neurosci-Lett*. 237:1-4.
- [46] Flores-Hernández, Galarraga E, Bargas J (1997) **Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurones.** *Synapse* 25:185-195.
- [47] Flores-Hernández J, Hernández S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P, Surmeier DJ (2000) **D1 dopamine receptor activation reduces GABAA receptor currents in neostriatal neurons though a PKA/DARP-32/PP1 signaling cascade.** *J Neurophysiol* 83:2996-3004.
- [48] Gerfen CR, Young WS (1988) **Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both paxth and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and flourescent retrograde tracing study.** *Brain Res* 460:161-167.
- [49] Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990) **D1 and D2 dopamine receptor regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons.** *Science* 250:1429-1432.
- [50] Gibb W.R. (1992) **Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes.** *Neurol. Clin*, 10:361-376
- [51] Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) **Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms.** *Nature* 342:923- 926.

- [52] Gonon F (1997) **Prolonges and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo.** *J Neurosci.* 17:5972-5978.
- [53] Groves PM (1983) **A theory of the functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movement.** *Brain Res.* 286:109-132.
- [54] Hammond C, Deniau JM, Rizk A, Féger J (1978) **Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat.** *Brain Res.* 151:235-244.
- [55] Hartmann-von Monakow K, Akert K, Knzle H (1978) **Projections of the precentral motor cortex and other cortical areas of the frontal lobe to the subthalamic nucleus in the monkey.** *Expl Brain Res.* 33:395-403
- [56] Harsing LG Jr, Zigmond MJ (1997) **Influence of dopamine of GABA release in striatum: evidence for D1-D2 interactions and non- synaptic influences.** *Neuroscience* 77:419-429.
- [57] Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) **D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurones by modulating an L-Type Ca²⁺ conductance.** *J Neurosci.* 17:3334-3342.
- [58] Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) **D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability through a novel PLC β /IP₃/calcineurin signaling cascade.** *J Neurosci.* 15:20(24):8987-95.
- [59] Hornykiewicz O (1973) **Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA).** *Br Med Bull* 29:172-178.
- [60] Hubel DH, Wiesel TN (1977) **The functional architecture of the macaque visual cortex.** *Proc.R. Soc. Lond. B. Biolo. Sci.* 198:1-59.
- [61] Jeager D, Kita H, Wilson CJ (1994) **Surround inhibition among projection neurons is weak or nonexistent in the rat neostriatum.** *J Neurophysiol.* 72:2555-2558.
- [62] Katz B, Miledi DS (1968) **The role of calcium in neuromuscular facilitation.** *Journal of physiology.* 234 : 481-492.
- [63] Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990) **Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin.** *J Neurosci.* 10:3421-3438.
- [64] Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) **Striatal interneurons Chemical, physiological and morphological characterization.** *TINS* 18:527-535.
- [65] Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor J, Bischoff S, Mickel J, McMster C, Angst C, Bittiger, H, Froesti W, Bettier B (1997) **Expression cloning GABAB receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors.** *Nature* 386:239-246.
- [66] Kemp JM and Powel TPS (1970) **The cortico-striate projection in the monkey.** *Brain.* 93:525-546.
- [67] Kincaid AE, Zheng T, Wilson CJ (1998) **Connectivity and convergence of single corticostriatal axons.** *J. Neurosci.* 18:4722-4731.
- [68] Kitai ST, Kocsis JD, Preston RJ, Sugimori M (1976) **Monosynaptic inputs to caudate neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase.** *Brain Res.* 536:601-606.
- [69] Kitai ST, Preston RJ, Bishop GA, Kocsis J D (1979) **Striatal projection neurons: morphological and electrophysiological studies.** *Advances in Neurology.* 20:45-51.

- [70] Kitai ST, Deniau JM (1981) **Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis.** *Brain Res.* 214:411-415.
- [71] Kitai T, Kosaka T, Eizmann C W (1990) **Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study.** *Brain Res.* 536:1-15.
- [72] Koós T, Tepper JM (1999) **Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons.** *Nature Neurosci.* 2:467-472.
- [73] Koós T, Tepper JM, Goldman-Rakic P, Wilson CJ (2002) **Electrophysiological properties and dopaminergic modulation of GABAergic inhibition among neostriatal projection neurons.** *Soc. for Neurosci. Abs.* 764.17.
- [74] Kunzle H (1978) **An autoradiographic analysis of the efferent connections from premotor and adjacent prefrontal regions (areas 6 and 9) in Macaca fascicularis.** *Brain Behav Evol.* 15:185-234.
- [75] Lenz S, Perney TM, Qin Y, Robbins E, Cheselet MF (1994) **GABAergic interneurons of striatum express the Shaw-like potassium channel Kv3.1.** *Synapse* 24:65-78.
- [76] McGeer PL, McGeer EG (1993) **Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia.** *Adv. Neurol.* 60:93-101.
- [77] Mink JW (1996) **the basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs.** *Prog Neurobiol.* 50:381-425.
- [78] Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W (1995) **A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system.** *Prog Neurobiol* 46:423-462.
- [79] Missale C, Nash SR, Robinson W, Mohamed J, Caron MG (1998) **Dopamine receptors: from structure to function.** *Physiol Rev.* 78:189-225.
- [80] Monsma FJ, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR (1989) **Multiple D₂ dopamine receptors produced by alternative RNA splicing.** *Nature* 342:926-929.
- [81] Monsma FJ Jr, Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR (1990) **Molecular cloning and expression of a D₁ dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:6723-6727.
- [82] Nambu A, Llinas R (1994) **Morphology of globus pallidus neurons: its correlation with electrophysiology in guinea pig brain slices.** *J Comp Neurol* 377:85-94.
- [83] Nambu A, Takada M, Inase M, Tokuno H (1996) **Dual somatotopic representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area.** *J. Neurosci.* 16:2671-2683.
- [84] Nicola SM, Surmeier DJ, Malenka RC (2000) **Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens.** *Annu Rev Neurosci.* 23:185- 215.
- [85] Oorschot DE (1996) **Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods.** *J Comp Neurol.* 366:580-99.
- [86] Oorschot DE (2000) **The domain hypothesis: A central organizing principle for understanding neostriatal circuitry?.** **En: Brain dynamics and striatal complex.** Eds. Miller R y Wickens JR, pp 151-163. Harwood Academic publisher, Amsterdam.
- [87] Pacheco-Cano MT, Bargas J, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E (1996) **Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs⁺-sensitive conductance in neostriatal neurons.** *Exp Brain Res.* 110:205-211.

- [88] Pasik P, Pasik T, DiFiglia M (1979) **The internal organization of the neostriatum in mammals.** In *Neostriatum* (eds Divac I. and Berg R. G. E), pp. 5-36. Pergamon, Oxford.
- [89] Park MR, Lighthall JW, Kitai ST (1980) **Recurrent inhibition in the rat neostriatum.** *Brain Res.* 194: 359-369.
- [90] Parkinson Study Group (2002) **Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole versus levodopa on Parkinson disease progression.** *JAMA.* 287:1653-61.
- [91] Pleniz D (2003) **When inhibition goes incognito: feedback interaction between spiny projection neurons in striatal function.** *TINS.* 26: 436- 443.
- [92] Powel T, Mountcastle V (1959) **Some aspects of the functional organization of the cortex of the monkey: a correlation of findings obtained on a single unit analysis with cytoarchitecture.** *Bull. Johns Hopkins Hos.* 105:133-162.
- [93] Precht W, Yoshida M (1971) **Blockage of caudate-evoked inhibition of neurons in the substantia nigra by picrotoxin.** *Brain Res.* 32:229-233.
- [94] Querejeta E, Delgado A, Valdiosera R, Erlij D, Aceves J (2001) **Intrapallidal D2 dopamine receptors control globus pallidus neuron activity in the rat.** *Neurosci Lett.* 300:79-82.
- [95] Ramon y Cajal, S (1911) **Histologie du système Nerveux de l'homme et des vertèbres** (Maloine, Paris); Trans. Swanson, N & Swanson, L. W. (1995) *Histology of the Nervous System* (Oxford Univ. Press, London), vol.2.
- [96] Radnikow G, Misgeld U (1998) **Dopamine D1 receptors facilitate GABA synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata.** *J Neurosci.* 18:2009-2016.
- [97] Reubi JC, Iversen LL, Jessell TM (1977) **Dopamine selectively increases 3H-GABA release from slices of rat substantia nigra in vitro.** *Nature* 268:652-4.
- [98] Rinvink E, Ottersen OP (1993) **Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat.** *J Chem Neuroanat.* 6: 19-30.
- [99] Rosales MG, Martinez-Fong D, Morales R, Nuez A, Flores G, Gongora Alvaro J, Floran B, Aceves J (1997) **Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study.** *Neuroscience* 80:803-10.
- [100] Schultz W (1998) **Predictive reward signal of dopamine neurons.** *J Neurophysiol.* 80:1-27.
- [101] Seabrook GR, Howson W, Lacey MG. (1991) **Subpopulations of GABA-mediated synaptic potentials in slices of rat dorsal striatum are differentially modulated by presynaptic GABAB receptors.** *Brain Res.* 562: 332-334.
- [102] Sealfon SC, Olanow W (2000) **Dopamine receptors: from structure to behaviour.** *TINS* 23:S34-S40.
- [103] Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) **Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia.** *Neuroscience* 86:353-387.
- [104] Smith Y, Charara A, Hanson JE, Paquet M, Levey AI (2000) **GABAB and group I metabotropic glutamate receptors in the striatopallidal complex in primates.** *J Anat.* 196:555-576.
- [105] Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) **Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics.** *Nature* 347:146-151.

- [106] Somogyi P, Bolam JP, Smith AD (1981) **Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic estudy using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure.** *J Comp Neurol.* 195:567-584.
- [107] Strange PG (1990) **Aspects of the structure of the D2 dopamine receptor.** *TINS* 13:73-78.
- [108] Spooren WPJM, Lynd-Balta E, Mitchell S, Haber SN (1996) **Ventral pallidostriatal pathway in the monkey; evidence for modulation of basal ganglia circuit.** *J Comp Neurol* 370:295-312.
- [109] Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Stormann TM, Braam MR, Kennedy JL, Gelernter JE, Rozmahel R, Yang Y, Israel Y, Seeman P, ODowd BF (1990) **Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5.** *Nature* 347:80-83.
- [110] Sunahara RK, Guan HC, ODowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HHM, Niznik HB (1991) **Cloning of the gene for a human D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1.** *Nature* 350:614-619
- [111] Surmeier, DJ, Kitai ST (1993a) **D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons.** *Prog Brain Res.* 99:309-324.
- [112] Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS, Ariano MS (1993b) **Are neostriatal dopamine receptors colocalized?.** *TINS.* 16:299-305.
- [113] Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P (1995) **Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons.** *Neuron* 14:385-97
- [114] Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z. (1996) **Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons.** *J Neurosci.* 16:6579-6591.
- [115] Suszkiw JB (1996) **Motor functions of the brain.** In: **Essentials of Physiology.** 2nd. Ed. (Sperelakis, N, Banks, R.O. Ed.) pp:141-152. Little Brown, Boston.
- [116] Thomson AM (2000) **Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses.** *TINS* 23: 305-312.
- [117] Tuite P, Riss J (2003) **Recent developments in the pharmacological treatment of Parkinson's disease.** *Expert Opin Investig Drugs* 12:1335-52.
- [118] Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR **Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum.** *J Neurophysiol.* 88:1263-1269.
- [119] Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) **Structure and function of dopamine receptors.** *Neurosci Bio Rev.* 24:125-132.
- [120] Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) **Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine.** *Nature* 350:610-614.
- [121] Vergara R, Rick C, Hernandez-Lopez S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E, Surmeier DJ, Bargas J (2003) **Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice.** *J Physiol.* 553 (Pt 1):169-82.
- [122] Vincent SR, Johansson O, Hkefelt T, Shirboll L, Elde RP, Terenius L, Kimmel J, Goldstein M (1983) **NADPH-diaphorase-A selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)- like immunoreactives.** *J Comp Neurol.* 217-263.

- [123] Wichmann y DeLong (1993) **Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities.** *Adv Neurol.* 60:53-61.
- [124] Wickens J (1993) **A Theory of the Striatum.** New York, Pergamon.
- [125] Wilson CJ, Groves PM (1980) **Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the neostriatum.** *J Comp Neurol.* 194:599-615.
- [126] Wilson CJ (1986a) **Postsynaptic potential evoked in spiny neostriatal projection neurons by stimulation of ipsilateral or contralateral neocortex.** *Brain Res.* 367:201 - 213.
- [127] Wilson CJ (1986b) **Three - dimensional analysis of dendritic spines by means of HVEM** *J Electron Microsc.* 35 (Suppl):1151 - 1155.
- [128] Wilson CJ (1988a) **Basal ganglia. In: The Synaptic organization of the brain.** pp. 329-376 Ed.Oxford University Press. Compilador: Shepherd G.M.
- [129] Wilson CJ (1988b). **Cellular mechanisms controlling the strength of synapse.** *J Electron Microsc Tech.* 10:293-313.
- [130] Yoshida M, Rabin A, Anderson M (1972) **Monosynaptic inhibition of pallidal neurons by axon collaterals of caudo-nigral fibers.** *Experimental Brain Research* 15:333-347.
- [131] Yung KK, Smith AD, Levey AI, Bolam JP (1996) **Synaptic connections between spiny neurons of the direct and indirect pathways in the neostriatum of the rat: evidence from dopamine receptor and neuropeptide immunostaining.** *Eur J Neurosci.* 8:861-869.
- [132] Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Van Tol HH, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O (1990) **Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors.** *Nature* 347:76-80.
- [133] Zucker RS (1999) **Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity.** *Curr Opin Neurobiol.* 9:305-313.
- [134] Zucker RS, Regehr WG. (2002) **Short-term synaptic plasticity.** *Annu Rev Physiol.* 64: 355-405.