



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

“CONTROL DOPAMINÉRGICO DE LA ENTRADA  
GLUTAMATÉRGICA A TRAVÉS DE LAS CLASES DE  
RECEPTOR D1 Y D2 Y EL ESTUDIO DE LA GENERACIÓN  
DE UN PATRÓN RÍTMICO DE DISPARO EN LAS  
NEURONAS GABAÉRGICAS DE LA SUSTANCIA NEGRA  
RETICULAR AL MIMETIZAR, *IN VITRO*, ALGUNOS  
CAMBIOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD DE  
PARKINSON”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

OSVALDO IBÁÑEZ SANDOVAL

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ



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.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres*

*Agustina Sandoval Méndez y Miguel Ibáñez López*

*A mi amiga y compañera*

*Leticia Maldonado P.*

*A mi hijo*

*Gabriel Ibáñez Maldonado (Gabo)*

*A cada uno de mis hermanos*

*Miguel Ángel, Luis Gonzalo, Lilia Ruth, José Oscar, Araceli y*

*Ricardo*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Bargas Díaz le agradezco el apoyo incondicional y su excelente dirección en la presente tesis, así como su confianza y amistad. Gracias.

A la Dra. Elvira Galarraga y al Dr. Stefan Mihailescu M, quienes formaron parte de mi comité tutorial, agradezco sus comentarios y sugerencias durante la realización del presente trabajo.

A los sinodales: Dr. Jorge Aceves Ruíz, Dr. José Bargas Díaz, Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, Dra. María Magdalena Giordano Loyola, Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar, Dr. Stefan Mihailescu M y al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez por sus críticas y comentarios que enriquecieron aún más al presente trabajo.

A los viejos, o no tan viejos compañeros: Jaime Napoleón, Tamara, Fernando, Ramiro y Humberto, por su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio BL103: Ernesto, Luis Carrillo, Azucena, Aleph, Janet, Itze, Nicolas y José de Jesús, y a los del laboratorio BL 101: Fatuel, Eden, Gisell, Bianca; Miriam y Juanito por su apoyo y amistad durante todo el tiempo que permanecí en el laboratorio.

Al Físico Antonio Laville por su ayuda técnica y al Biólogo Dagoberto Tapia por su asesoría, en la realización de histoquímicas e inmunocitoquímicas, que se muestran en el presente trabajo.

A todos aquellos compañeros, con los que inicié esta aventura: Adán, Juan Luis, Enrique, Absalom, Ma. del Carmen, Jazmín, Adriana, Jesús, Damián y Mónica.

A mis amigos y compañeros del CINVESTAV-IPN: Vicente Hernández, Verónica, Arturo, Valentina, Héctor y Lidia.

A Joaquín Sergio Zepeda Hernández y familia, por todo su apoyo, amistad y sobre todo, por ser tan buen camarada.

A mi hermana Araceli Ibáñez, quien a lo largo de esta aventura me ha soportado.

Al viejito (José Pedro Miguel Ojeda), quién me ayudo a descifrar las matemáticas.

A Ernesto Mendoza D. (Neto), por su apoyo, confianza y por todas aquellas cervezas compartidas.

A mis dos nuevos compañeros de vivienda: Juan y Victoria por compartir su espacio.

A Sara Noguera, Zenaida Martínez, Angélica Téllez, Ana Ordaz, Pablo y a muchas otras personas que me brindaron su ayuda durante mi estancia en el IFC-UNAM

Y finalmente, a todos aquellos amigos y compañeros que conocí durante mi estancia en México D. F.: Luz, Mine, Juan, Lupita L, Lupita B, Gabriel, Carmen; Jazmín, Javier, Luis G, Salvador, Carmen, Juanito y Evaristo.

# Índice general

<b>CAPITULO 1</b>	1
Resumen	1
<b>CAPITULO 2</b>	6
Introducción	6
<b>CAPITULO 3</b>	12
Antecedentes	12
3.1    Ganglios basales	12
3.1.1    La vía subtálamo-nigral	16
3.1.2    Núcleo subtalámico	16
3.1.3    Sustancia negra reticular	18
3.2    La dopamina y sus receptores	25
<b>CAPITULO 4</b>	31
Hipótesis y objetivos	31
<b>CAPITULO 5</b>	34
Métodos	34
5.1    Preparación de las rebanadas	34
5.2    Estimulación	36
5.3    Sistema de registro	38
5.3.1    Pipetas	38
5.3.2    Registro electrofisiológico	38

5.4	Análisis y presentación de datos	39
5.5	Identificación de las neuronas de la sustancia negra reticular	44
5.6	Histoquímica de las neuronas registradas	45
5.7	Inmunocitoquímica: <i>doble y triple marcado</i>	46
5.8	Fármacos	47
<b>CAPITULO 6</b>		49
Resultados ( <i>parte 1</i> )		49
6.1	La conexión subtálamo-nigral	49
6.2	La activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D1 facilita la vía subtálamo-nigral	54
6.3	La activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D2 inhibe la vía subtálamo-nigral	58
6.4	Análisis de la amplitud media vs la varianza de las EPSCs	58
6.5	Los receptores dopaminérgicos presinápticos exhiben actividad constitutiva	63
<b>CAPITULO 7</b>		66
Discusión de la parte presináptica		66
<b>CAPITULO 8</b>		73
Resultados ( <i>parte 2</i> )		73
8.1	Actividad espontánea de las neuronas GABAérgicas de proyección de la sustancia negra reticular	76
8.2	La sobreexcitación de las neuronas de la sustancia negra reticular favorece el modo de disparo en ráfagas	78

8.3	La depresión de la inhibición sobre las neuronas de la sustancia negra reticular favorece el modo de disparo en ráfagas	81
8.4	Mecanismos iónicos del modo de disparo en ráfagas	83
8.5	Participación de los canales catiónicos activados por hiperpolarización (HCN) en la generación del modo de disparo en ráfagas	89
8.6	Participación de los canales de potasio activados por calcio (BK y SK) en la oscilación en ráfagas rítmicas	92
<b>CAPITULO 9</b>		98
	Discusión de la parte postsináptica	98
<b>CAPITULO 10</b>		102
	Conclusiones generales	102
	Referencias	104
	Apéndice ( <i>Articulo</i> )	

## Abreviaturas

AADC	DOPA descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
A / D	analógico / digital
AMPA / kainato	alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato / kainato
AMPC	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
BSA	albúmina sérica bovina
CF	corteza frontal
CPGs	<i>central pattern generators</i> en inglés
EPSCs	<i>excitatory post-synaptic currents</i> en inglés
CS	colículo superior
DOPA	dihidroxifenilalanina
FR	formación reticular
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GB	ganglios basales
GP / GPe	globo pálido / globo pálido externo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxido de hidrogeno
HP	postpotencial hiperpolarizante
KHz	Kilo hertz
KPBS	solución salina amortiguada de fosfatos de potasio
M $\Omega$	mega ohmios

ME	médula espinal
mM	milimoles / litro
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ms	milisegundo
mV	milivoltio
NA	apertura numérica
NEp / GPi	núcleo entopeduncular / globo pálido interno
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPP	núcleo pedúnculo pontino
NSt	neostriado
NST	núcleo subtalámico
OD / ID	diámetro externo / diámetro interno
PA	potencial de acción
PBS	solución salina amortiguada de fosfatos
PV	parvalbúmina
RPP	razón de pulsos pareados
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa-trascricpción inversa
SNc	sustancia negra compacta
SNC	sistema nervioso central
SNr	sustancia negra reticular
TBS	solución salina Tris-amortiguada

TC	tallo cerebral
TH	tirosina hidroxilasa
ZCPN	zona de conductancia con pendiente negativa
μm	micrómetro
μM	micromoles / litro

# Capítulo 1

## Resumen

### ***Aspectos presinápticos.***

En registros electrofisiológicos de corrientes postsinápticas excitadoras, se exploraron los efectos de activar a los receptores dopaminérgicos de las clases D1 y D2, localizados en las proyecciones del núcleo subtalámico (NST) que inervan a la sustancia negra reticular (SNr). Se utilizaron rebanadas de cerebro de rata y para el registro electrofisiológico se usó la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula entera. Las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs; *excitatory post-synaptic currents*), provocadas por la estimulación del NST y registradas en las neuronas GABAérgicas de la SNr en presencia de bicuculina, fueron bloqueadas con CNQX y D-AP-5 al final de cada experimento. La acción del SKF-38393, un agonista dopaminérgico selectivo para los receptores de la familia D1, fue la de incrementar la amplitud de las EPSCs en aproximadamente un 30%, mientras que el agonista de los receptores de la clase D2, el quinpirole, las redujo en aproximadamente un 25%. Estas acciones, claramente opuestas, fueron bloqueadas por sus antagonistas selectivos: SCH 23390 para los receptores de la clase D1, y sulpiride para los receptores de la clase D2, respectivamente. Ambos efectos fueron acompañados por cambios en la proporción de las respuestas sinápticas (facilitación o depresión) a estímulos pareados; indicando que el sitio de acción de estos receptores es presináptico. La localización de estos receptores a nivel presináptico fue confirmada por el análisis "amplitud-varianza". Los efectos de ambos agonistas: SKF-38393 y quinpirole, pudieron observarse registrando una misma neurona postsináptica. Cuando se aplicaron solos, los antagonistas sulpiride y SCH 23390 incrementaron y redujeron, respectivamente, las EPSCs, haciendo pensar que los receptores están activos constitutivamente debido a los niveles de dopamina endógena en la preparación. Los datos demuestran que la dopamina controla, a nivel presináptico, la vía glutamatérgica subtalamo-nigral.

**Aspectos postsinápticos.**

Junto con las neuronas del núcleo entopeduncular (NEp) o globo pálido interno (GPi), las neuronas GABAérgicas de proyección de la sustancia negra reticular son las neuronas “de salida” de los ganglios basales. Llevan el resultado del procesamiento de los ganglios basales a los circuitos tálamo-corticales responsables de los movimientos voluntarios. Existen dos modelos que explican el funcionamiento normal y patológico de los ganglios basales: en primer lugar, está el modelo de “tasa de disparo” (*rate model*) que predice que estas neuronas de salida estarán sobreexcitadas en la enfermedad de Parkinson (EP), lo que da lugar a la hipocinesia, por exceso de inhibición de los circuitos tálamo-corticales. En segundo lugar está el modelo “oscilatorio” que predice que estas neuronas no aumentan su tasa de disparo durante la EP si no que adquieren un modo de disparo oscilatorio en forma de ráfagas. Ambos modelos son actualmente incompatibles. En el presente trabajo, nos propusimos simular las sinapsis predichas por el modelo de tasa de disparo para observar qué sucedía con el patrón de disparo de las neuronas de la SNr. En condiciones normales, las neuronas de salida presentaron actividad espontánea y regular de potenciales de acción (PAs). En ~11% de las mismas exhibieron disparo oscilatorio en forma de ráfagas. Cuando simulamos las condiciones sinápticas de la EP en las neuronas de la SNr: a) exceso de excitación al añadir NMDA, o b) supresión de la inhibición añadiendo bicuculina, se favoreció el disparo oscilatorio en forma de ráfagas en las neuronas de salida. Analizando el mecanismo iónico que pudiera explicar el modo oscilatorio de disparo encontramos que el agonista glutamatérgico NMDA genera o facilita la aparición de una región de conductancia con pendiente negativa (CPN) con tres cruces en el eje del voltaje en la curva I-V. Tanto el disparo oscilatorio como la región de CPN sólo se redujeron parcialmente al bloquear los canales de sodio con TTX o los canales de calcio de alto umbral de activación con calcicludina. Sin embargo, concentraciones bajas de NiCl<sub>2</sub>, usadas para bloquear selectivamente a los canales de calcio tipo T (subunidad  $\alpha$ 1H o Ca<sub>v</sub>3.2), abolieron el modo oscilatorio de estas neuronas, sugiriendo que esta es la corriente que funciona como paso limitante para generar este patrón temporal de

disparo. Utilizando técnicas de triple marcado comprobamos la presencia de estos canales en estas neuronas. Al utilizar fármacos específicos para manipular a los canales catiónicos activados por hiperpolarización (HCN), así como los canales de potasio activados por calcio, mostramos que estos canales participan en modular la frecuencia del modo oscilatorio de disparo. Estos resultados permiten congeniar ambos modelos, tasa de disparo y oscilatorio, puesto que al mimetizar las condiciones predichas por el modelo de tasa de disparo fueron suficientes para que se generara el disparo oscilatorio.

## **Abstract**

### ***Presynaptic aspects.***

Electrophysiological recording of excitatory post-synaptic currents, we explored the actions resulting from the activation of D1-class and D2-class dopamine receptors located on the subthalamic nucleus (NST) projections that innervate the substantia nigra pars reticulata (SNr). Whole-cell patch-clamp recordings on neurons from rat brain slices were used to obtain excitatory post-synaptic currents (EPSCs) evoked by field stimulation at the NST while recording from postsynaptic GABAergic projection neurons in the SNr. These EPSCs could be blocked by CNQX and D-AP-5 in the presence of bicuculline. The D1-class dopamine receptor agonist, SKF-38393, enhanced the amplitude of EPSCs by about 30%, whereas the D2-class receptor agonist quinpirole reduced them by about 25%. These actions were blocked by the selective antagonists, SCH 23390 for D1-class receptors, and sulpiride, for D2-class receptors, respectively. Changes in EPSCs amplitude were accompanied by changes in the amplitude ratio of the synaptic events in response to a pair of stimuli; suggesting a presynaptic site of action. The presynaptic location of these receptors was further confirmed by “variance-mean” analysis. The effects of both agonists could be observed on the same postsynaptic neuron. When applied alone, the antagonists sulpiride and SCH 23390 enhanced and reduced, respectively, the evoked EPSCs, suggesting that these receptors are constitutively active due to endogenous dopamine levels in the preparation. The data demonstrates that dopamine may control the glutamatergic subthalamo-nigral pathway presynaptically.

### ***Postsynaptic aspects.***

Together with the neurons from the entopeduncularis nucleus (NEp) or internal globus pallidus (GPi), the GABAergic projection neurons of the substantia nigra pars reticulata (SNr) are the “output” neurons of the basal ganglia. They convey the results of basal ganglia processing to the thalamo-cortical circuits responsible for voluntary motor control. There are two models that explain both the normal and

pathological performance of the basal ganglia: on the first place there is the *rate model*, which predicts that SNr neurons should be overexcited during Parkinson's disease (PD), giving rise to hypokinesia, due to the excess of inhibition delivered to the thalamo-cortical circuits. On the second place, there is the *oscillatory model* which predicts that SNr neurons do not increase their firing rate during PD but instead change their firing pattern to an oscillatory bursting mode. These models are now incompatible. In the present work we tried to simulate the synaptic conditions predicted by the rate model on SNr neurons to observe what happens to their firing pattern. In control conditions, output neurons exhibit regular spontaneous activity. About ~11% of these neurons also exhibit an oscillatory bursting mode. When the synaptic conditions of PD are simulated on SNr neurons: a) an excess of excitation, or b) a suppression of inhibition, it was observed that output neurons favored the oscillatory bursting mode. We analyzed the ionic mechanisms that may explain the oscillatory bursting mode. It was found that the glutamatergic agonist, NMDA, either generated or facilitated the appearance of a negative slope conductance region with three crossing points in the voltage axis in the current-voltage relationship. Both the oscillatory firing pattern and the negative slope conductance region were partially reduced after the blockage of sodium channels with TTX or the blockage of high voltage activated (HVA) calcium channels with calcicludine. Nevertheless, low concentrations of NiCl<sub>2</sub>, commonly used to selectively block T-type channels ( $\alpha 1H$  or Ca<sub>v</sub>3.2), abolished the oscillatory firing pattern, suggesting that this current works as the limiting step to generate this firing mode. Immunocytochemical triple labeling techniques demonstrated the presence of these channels in SNr neurons. The use of selective antagonists allowed us to manipulate the hyperpolarizing activated cation currents (HCN) as well as the calcium activated potassium currents. It was found that these channels participate in modulating the frequency of the oscillatory firing pattern. These results allow both the rate and the oscillatory to go along, because the mimicry of the synaptic conditions predicted by the rate model were enough to generate an oscillatory firing mode in SNr neurons.

## Capítulo 2

### Introducción

Los ganglios basales forman un conjunto de núcleos subcorticales involucrados en la generación y control de las funciones motoras, cognitivas y emocionales. El nombre de los núcleos varía según la especie. En los roedores, los núcleos que los forman son: el neostriado o caudo-putamen (NSt: *neostriatum*), el globo pálido (GP: *globos pallidus* o *pallidum*), que en los felinos y primates corresponde al globo pálido externo (GPe), el núcleo subtalámico (STN: *subthalamic nucleus* en inglés), el núcleo entopeduncular (NEp: *nucleus entopeduncularis*), que en los felinos y primates corresponde al globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra que se subdivide en dos porciones: reticular (SNr: *substantia nigra reticularis*) y compacta (SNc: *substantia nigra compacta*).

La participación de los ganglios basales en el control del movimiento es una idea que data de principios del siglo pasado. Wilson (1928), describió una enfermedad que se caracterizaba por rigidez muscular, temblor y debilidad que fue asociada con cambios patológicos en el hígado y los ganglios basales (enfermedad hepato-lenticular de Wilson). Como la mayoría de los signos motores estaban asociados con daños en el tracto cortico-espinal o piramidal y este daño no era obvio en este padecimiento, Wilson postuló que la anomalía motora era debida a un daño en un sistema motor extrapiramidal, sugiriendo a los ganglios basales como los principales constituyentes de este sistema. Ahora se ha comprobado que los ganglios basales proyectan tanto a los núcleos motores del tallo cerebral, a los núcleos pedúnculo pontino y el tectum, dando origen a vías extrapiramidales, como a las asas corticobasales, que retornan a las cortezas motoras y premotoras a través del tálamo, y que directamente activan la vía piramidal mediante los circuitos motores tálamo-corticales.

El papel funcional de los ganglios basales (GB) en el movimiento se puso de manifiesto primero por estudios anatomopatológicos y luego, muy lentamente, clínicos y experimentales que siempre han adolecido de los paradigmas correctos para poner de manifiesto el papel de cada componente de los GB en la generación del movimiento.

Los estudios clínicos y anatomopatológicos mostraron correlación entre lesiones de algunos núcleos de los ganglios basales y desórdenes del movimiento como son la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, los balismos, el síndrome de Tourette, los tics, las distonias, las atetosis, etc. Así por ejemplo, la participación del núcleo subtalámico en el control motor se ha mostrado en diversos estudios (Bergman et al., 1990; Bergman et al., 1994). Su lesión provoca balismos y su lesión quirúrgica o su inactivación mejora los signos del parkinsonismo. De la actividad espontánea de sus neuronas depende la frecuencia de disparo de las neuronas del globo pálido y de los núcleos de salida de los ganglios basales: el núcleo entopeduncular y la sustancia negra reticular (Robledo y Féger, 1990). Por lo que el núcleo subtalámico, excitador, controla la actividad de estos núcleos inhibidores, estableciendo así la magnitud de la inhibición que los ganglios basales ejercen hacia los circuitos cortico-talámicos que controlan los movimientos. El núcleo subtalámico es por tanto parte de la llamada “vía indirecta”, pues su excitación dirigida hacia los núcleos de salida se equilibra con la acción inhibitoria hacia estos mismos núcleos que proviene de la “vía directa” estriónigral (ver Fig.1) (Albin et al., 1989).

La liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas depende no sólo de la actividad neuronal, sino también de regulaciones presinápticas debidas a receptores localizados en las mismas terminales nerviosas. Estos pueden ser activados por el mismo neurotransmisor liberado (autoreceptor) ó por transmisores moduladores (e.g., la dopamina) liberados de otras fibras nerviosas (receptores presinápticos heterólogos o heterorreceptores). La presencia de receptores dopaminérgicos en el subtálamo (Baufreton et al., 2003; Bouthenet et al., 1991;

Flores et al., 1999; Mansour et al., 1992), sugiere que la liberación de glutamato de las terminales de sus neuronas glutamatérgicas que inervan a los núcleos de salida podría ser regulada por la dopamina (Rosales et al., 1997) a nivel presináptico.

La dopamina modula presinápticamente diversas conexiones entre las neuronas de los ganglios basales (Floran et al., 1990; Guzmán et al., 2003; Radnikow y Misgeld, 1998). Debido a estos antecedentes, uno de los intereses de la presente tesis fue el determinar si la vía glutamatérgica excitadora subtalamo-nigral es modulada por la dopamina a través de la activación de receptores presinápticos. Parte de los resultados están incluidos en mi trabajo de tesis de Maestría, donde determinamos la participación de los receptores a dopamina de la clase D2 (Ibáñez-Sandoval, 2003). En el presente trabajo doctoral este trabajo se continuó observando la participación de los receptores de la clase D1.

Por otro lado, la salida de los ganglios basales no sólo inerva los circuitos tálamo-corticales encargados de los movimientos, sino también proyecta hacia núcleos del tallo cerebral (Takakusaki et al., 2004) que están relacionados con el tono muscular y la locomoción (Mori, 1987; Rossignol, 1996; Takakusaki et al., 2004). Fundamentalmente, la salida de los ganglios basales a través de la sustancia negra reticular participa en el control del tono muscular, el movimiento de los músculos del cuello y de los ojos (nistagmo, “sacudidas” o “saccades”), el movimiento de la mandíbula y del comienzo de la marcha (Nishimuta et al., 2002; Salamone et al., 1998; Takakusaki et al., 2003).

Las neuronas GABAérgicas de la sustancia negra reticular, así como las del núcleo entopeduncular, presentan actividad espontánea tónica, por lo que estas neuronas inhiben de manera constante a todos sus núcleos blancos: el tálamo, y por lo tanto a los circuitos tálamo-corticales implicados en los movimientos voluntarios y aprendidos, y los núcleos del tallo cerebral, implicados en los reflejos que controlan el tono muscular, el equilibrio y la postura. Se piensa que la

actividad de la SNr da como resultado un nivel de inhibición sobre los movimientos voluntarios (hipocinesia), así como un nivel de tono muscular, pues las lesiones a nivel de puente producen rigidez debido a la supresión de esta actividad inhibidora tónica. La inhibición sobre los movimientos voluntarios puede ser a su vez inhibida por la vía estrijo-nigral, o “directa” GABAérgica, provocando lo que se conoce como desinhibición de los movimientos. También puede ser aumentada por la excitación subtalámica que sobreactiva a la SNr. Así, entre ambas vías se regula la magnitud de la inhibición que los ganglios basales ejercen sobre los circuitos tálamo-corticales (Albin et al., 1989). Este modelo de funcionamiento de los GB ha prevalecido por los últimos 20 años y se conoce como *rate model*, o modelo de “tasa de disparo”, pues depende de las cadenas sinápticas de excitación (NST: núcleo subtalámico que excita a la SNr: NST→SNr) o inhibición (NSt: neostriado que inhibe a la SNr: NSt→SNr) que se predice aumentan o disminuyen, respectivamente, la tasa de disparo de las neuronas de la SNr.

El modelo de la enfermedad de Parkinson que se basa en el de tasa de disparo, propone que la salida inhibidora de los ganglios basales está desregulada pues se pierde el balance entre las vías “directa” (estrijo-nigral o inhibidora: NSt→SNr) e “indirecta” (subtálamo-nigral o excitadora: NST→SNr) (ver Figs.1 y 8). En estas condiciones, la tasa de disparo de potenciales de acción de las neuronas GABAérgicas de la SNr aumenta, provocando la hiperinhibición de los circuitos tálamo-corticales del movimiento. El problema con ello, es que esto no se observa. Lo que se observa es que, durante el parkinsonismo experimental o en pacientes con enfermedad de Parkinson, las neuronas de la SNr se enganchan para generar una actividad hipersincrónica de tipo oscilatorio (en ráfagas o *bursts*) (Nambu, 2005; Takakusaki et al., 2004a; Wichmann et al., 2001; Wichmann y DeLong, 2003), lo cual no puede ser explicado por el *rate model*. Esto hizo que emergiera un modelo alternativo para explicar la enfermedad de Parkinson: el llamado modelo oscilatorio (*oscillatory model*) (Hutchison et al., 2004). Este modelo postula que, de alguna manera, la ausencia de dopamina libera el funcionamiento de marcapasos intrínsecos en el GPe, el NST, el GPI y la SNr que forman algo

parecido a los *central pattern generators* (CPGs o centros generadores de patrones temporales de disparo) en la médula espinal (Brownstone et al., 1994; Guertin y Hounsgaard, 1998; Gordon y Whelan, 2006; Grillner, 2003; Kiehn, 2006; Wallén y Grillner, 1987). Estos CPGs enganchan todo el circuito de los GB en oscilaciones que impiden reclutar neuronas para ejecutar las tareas motoras voluntarias pues producen rigidez y temblor incoercibles. De manera alternativa, otros estudios postulan que también en la corteza aparecen CPGs patológicos y que son estos los más importantes (Bevan y Wilson, 1999; Bevan et al., 2002; Mahon et al., 2006). Ambos modelos, el de tasa de disparo y el oscilatorio, son actualmente incompatibles e irreductibles el uno con el otro. El presente trabajo de tesis es un intento de acercarlos.

La pregunta experimental que planteamos resolver para acercar ambos modelos es: si imitáramos, *in vitro*, los cambios fisiopatológicos postulados por el modelo de tasa de disparo, esto es, un exceso de la entrada excitadora del NST sobre las neuronas de la SNr (sobreactivación de la vía indirecta), y/o una disminución de la entrada inhibitoria del NST (depresión de la vía indirecta), ¿qué patrones temporales de disparo encontraremos en las neuronas de la SNr? ¿Será que esto baste para liberar el CPG nigral o subtálamo-nigral y aparezca el disparo oscilatorio en ráfagas? Si la respuesta fuera afirmativa, podríamos congeniar ambos modelos, pues los cambios fisiopatológicos propuestos por el modelo de tasa de disparo serían los directamente responsables de liberar el CPG patológico del modelo oscilatorio.

La actividad en ráfagas, sincrónica y rítmica, que presentan algunas neuronas, se manifiesta de manera fisiológica durante ciertas conductas motoras tales como masticar, caminar, correr, nadar, etc. (Gordon y Whelan, 2006; Kiehn, 2006; Schnitzler y Gross, 2005). El caso es que en sujetos normales, este tipo de conductas pueden comenzarse, detenerse, o cambiar, de una conducta o tarea a la otra, con relativa facilidad. Es más, grupos de neuronas pueden estar dedicados a una tarea, e.g., caminar, mientras otras neuronas se dedican a otra, e.g., mover

las manos, y aun otras se encargan de mantener el tono muscular adecuado. Estas capacidades motoras son las que se pierden en la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades de los GB.

La actividad en ráfagas, sincrónica y rítmica, puede ser inducida *in vitro* en preparaciones aisladas, por ejemplo, en las motoneuronas de la medula espinal de la lamprea, la tortuga o el gato. Esto sugiere que la red neuronal que genera estas conductas está contenida en forma de módulos autosuficientes, i. e., que tienen todos los elementos para generar dicha actividad en pequeños pedazos de tejido aislado. De hecho, la teoría modular del sistema nervioso postula que el sistema es simplemente la interacción de muchos de estos módulos (Hubel y Wiesel, 1979; Mountcastle, 1997; Mountcastle, 2003).

Una manera de inducir actividad eléctrica oscilatoria en tejido neural aislado *in vitro* es mediante la adición de NMDA (agonista glutamatérgico) al baño de superfusión, acompañándolo o no, de la estimulación de campo en algún otro segmento de la médula espinal o en alguna raíz dorsal. Se piensa (Gordon y Whelan, 2006), que el NMDA suplanta las entradas tónicas excitadoras (*tonic excitatory drive*) que mandan las motoneuronas del tallo cerebral. Debido a que esta maniobra genera el ritmo de la locomoción, al protocolo experimental se le conoce como de *locomoción ficticia*.

En el presente trabajo nos preguntamos si es este el mecanismo que usan las neuronas de los núcleos de salida de los GB para participar en el control de diversos procesos motores estereotipados como la locomoción, el nado, la masticación, etc. En este caso, la fuente de la entrada excitadora sería el subtálamo. Así, postularíamos, no sólo que ambos modelos pueden congeniar, sino que podríamos también proponer que las oscilaciones patológicas son tan sólo una exageración de mecanismos ya presentes de manera fisiológica. Es por esto que este estudio se realiza con tejido de animales normales.

## Capítulo 3

### Antecedentes

#### 3.1 Ganglios basales

En los roedores los ganglios basales (GB) incluyen al *neostriado* (NSt), al *núcleo subtalámico* (NST), al *núcleo entopeduncular* (NEp), al *globo pálido* (GP), a la *substantia nigra reticularis* (SNr) y a la *sustancia nigra compacta* (SNc). El *estriado* y el *núcleo subtalámico* reciben proyecciones excitadoras glutamatérgicas provenientes de la *corteza cerebral* y forman los dos núcleos de entrada a los ganglios basales (Albin et al., 1989; Smith et al., 1998). La salida de los ganglios basales, es a través del NEp y de la SNr (ver Fig.1) que en conjunto se denominan “los núcleos de salida” (SNr/NEp) (Fig. 1). Esta salida es inhibitoria y proyecta al tálamo y al tallo cerebral (Albin et al., 1989; Borraud et al., 2002; Mink, 1996; Smith et al., 1998; Takakusaki et al., 2004).

A partir de datos anatómicos, el modelo más utilizado en los últimos 20 años sobre el funcionamiento de los GB es el modelo de “tasa de disparo” (*rate model*) donde la salida del neostriado llega a los núcleos de salida mediante dos vías: 1) la “vía directa” o estrio-nigral que va del NSt a los núcleos de salida, NSt→(SNr/NEp) y que es inhibitoria (Fig. 1), y 2) la “vía indirecta”, que también se origina en el NSt pero hace relevos en el GP y el NST para terminar en los mismo núcleos: NSt→GP→NST→(SNr/NEp) (Albin et al., 1989; Smith et al., 1998). En el caso de la vía indirecta, la última sinapsis, dada por la vía que va del subtálamo a los núcleos de salida (NST→SNr/NEp), es excitadora.

De esta forma, las vías directa e indirecta ejercen influencias inhibitorias y excitadoras sobre SNr/NEp, respectivamente. Del balance de ambas depende la

salida hacia los circuitos cortico-talámicos que dan origen a los movimientos voluntarios.

Ambas vías tienen su origen en el NSt, pero se encuentran constituidas por dos poblaciones neuronales distintas. La población que da origen a la vía directa esta constituida por neuronas espinosas medianas de proyección GABAérgicas que sintetizan dinorfina y sustancia P. Esta población expresa abundantes receptores dopaminérgicos de la clase D1 (Gerfen et al., 1995; Kita y Kitai, 1988; Le Moine et al., 1990; Yoshida y Precht, 1971). Estas neuronas inhiben directamente, de ahí el nombre, el disparo tónico de los núcleos de salida (SNr/NEp) que son también inhibidores. Lo que da origen a una doble inhibición en serie. Cuando el NSt se activa se inhiben los núcleos de salida (SNr/NEp) lo que desinhibe (“deja actuar” o facilita) a los circuitos tálamo-corticales de los movimientos.

La población que da origen a la vía indirecta está constituida por neuronas espinosas medianas de proyección GABAérgicas que sintetizan encefalinas (Albin et al., 1989; Kita y Kitai, 1988). Poseen abundantes receptores de la clase D2 (Bouthenet et al., 1991; Gerfen et al., 1990; Gerfen et al., 1995; Waszczak et al., 1998). Estas neuronas inhiben a las neuronas inhibitoras del GP. Así es que la doble inhibición se ejerce sobre el NST. Que en caso de ser “desinhibido” o liberado de la inhibición tónica del GP, excita a SNr/NEp (Fig.1). En esta tesis nos interesa estudiar la vía subtálamo-nigral (NST→NSr) excitadora, último relevo de la vía indirecta.

La visión de las dos vías ha recibido respaldos y refutaciones. En todo caso, ha recibido numerosas enmiendas, a saber:

1) el NST proyecta de vuelta al GP formando un circuito recíprocamente conectado entre neuronas inhibitoras (GP) y excitadoras (NST) (Bevan et al., 2002; Plenz y Kitai, 1999) (Fig. 1) que da origen a un “Generador Central de

Patrones Temporales de Disparo” (*Central Pattern Generator*) que en condiciones fisiológicas generaría el disparo rítmico en algunas neuronas para realizar actos motores estereotipados como la locomoción o la masticación, pero que en condiciones patológicas generaría temblor y rigidez, de acuerdo a un segundo modelo en boga para explicar el funcionamiento de los GB y la enfermedad de Parkinson denominado el “modelo oscilatorio” (*oscillatory model*) (Bergman et al., 1994; Bevan et al., 2002; Hutchison et al., 2004; Plenz y Kitai, 1999; Ruskin et al., 1999, 2003; Walters et al., 2007).

2) El NST recibe entradas excitadoras directas de la corteza (Cx), dando lugar a una segunda “vía directa”: Cx→NST→SNr/NEp. Acción excitadora que muestra que el balance excitador/inhibidor sobre los núcleos de salida está dado por la competencia entre las actividades del NSt y el NST (Fig. 1). Pero mientras el NST tiene pocas neuronas, cada una de ellas dispara tónicamente e inerva a muchas neuronas de SNr/NEp; los comandos corticales sólo cambian su tasa de disparo. En contraste, el NSt es silente, sólo dispara cuando hay un comando cortical.

3) El GP da una fuerte proyección inhibitoria a SNr/NEp, dando origen a una segunda “vía indirecta” inhibitoria (Fig. 1). ¿Cuál de todas estas vías predomina y en que circunstancias? No se sabe.

4) Aunque la mayor parte de la dopamina cerebral se halla en el NSt (Prensa y Parent, 2001), ya no se piensa que éste sea el único blanco de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Se han acumulado evidencias de que colaterales axónicas de neuronas dopaminérgicas, así como receptores a dopamina, están presentes en otros núcleos de los GB tales como el GP, el NST y los núcleos de salida (Augood et al., 2000; Brown et al., 1979; Hassani et al., 1997; Prensa y Parent, 2001) (Fig. 1). Así, la acción dopaminérgica no puede verse ya como el resultado de la segregación de dos clases de receptor en dos únicas vías.

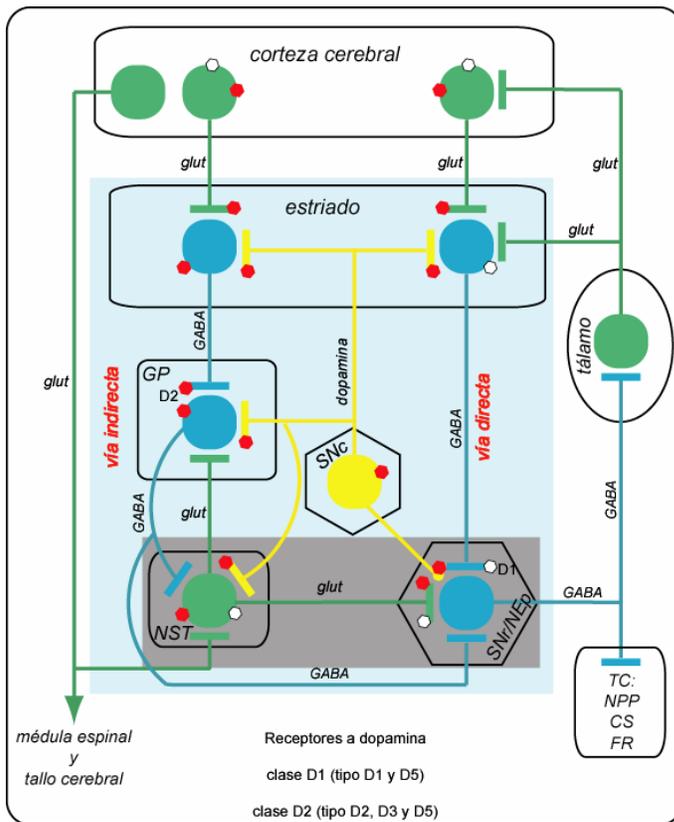


Figura 1. **Esquema actualizado de la organización anatómico-funcional de los ganglios basales.** El estriado (NSt) recibe la proyección excitadora glutamatergica cortical (Cx) y a su vez manda proyecciones a los núcleos de salida: la sustancia negra reticular (SNr) y el núcleo entopeduncular (NEp) (SNr/NEp en el esquema), a través de: una vía directa GABAérgica (NSt→SNr/Nep) y otra indirecta que tiene como relevos al globo pálido (GP) y al núcleo subtalámico (NST) (NSt→GP→NST→SNr/NEp). En azul las vías GABAérgicas y en verde las glutamatergicas. Los núcleos de salida (SNr/NEp) envían su proyección GABAérgica a los núcleos talámicos. Los núcleos talámicos proyectan a las

cortezas premotora y motora con las que tienen conexiones recíprocas (no se muestran) que constituyen circuitos de excitación recurrente (o reverberantes) denominados circuitos tálamo-corticales encargados de ejecutar y sostener movimientos voluntarios y aprendidos. El balance entre la inhibición de la vía directa (NSt→SNr/NEp) y la excitación de la vía indirecta (NST→SNr/NEp) decide la influencia de los GB sobre los movimientos. Otras vías descubiertas posteriormente son: STN↔GP, Cx→STN y GP→SNr/NEp. La información motora procesada en la corteza y el tálamo también regresa al NST a través de proyecciones glutamatergicas, así que los circuitos completos que comienzan y regresan a la corteza a través de los ganglios basales se denominan **asas cortico-basales**. Una vez procesados, los comandos motores de Cx se dirigen a las motoneuronas (vía piramidal), o bien desde SNr/NEp se envían proyecciones a núcleos mesencefálicos (núcleo pedúnculo pontino, **NPP**; colículo superior, **CS**; y formación reticular, **FR**) del TC que dan origen a vías descendentes encargadas de regular tono muscular, postura y equilibrio (vía extra-piramidal). Núcleos que componen a los GB (marco azul claro). Por último, las neuronas dopaminérgicas de la SNc (amarillas) inervan varios núcleos de los GB. Receptores dopaminérgicos de ambas clases, también se encuentran en varios de estos núcleos.

### **3.1.1 La vía subtálamo-nigral**

La vía subtálamo-nigral, último relevo de la vía indirecta, esta constituida por el NST y la SNr. Esta vía es de naturaleza excitadora glutamatérgica (Fig.1). En condiciones patológicas (como en la enfermedad de Parkinson) se nota un aumento en la actividad rítmica de las neuronas del NST. Lo que facilita el disparo de las neuronas de los núcleos de salida (SNr/NEp). El exceso en la actividad de salida da como resultado una inhibición de los circuitos cortico-talámicos encargados del movimiento dando como resultado la hipocinesia (ver Fig.8) (Bergman et al., 1994; Levy et al., 2000).

### **3.1.2 Núcleo subtalámico**

El NST, constituido por neuronas glutamatérgicas de proyección (Chang et al., 1983; Kita et al., 1983a; Nakanishi et al., 1987) tiene una aferencia de la Cx (Canteras et al., 1990) excitadora y glutamatérgica (Fujimoto y Kita, 1993). Recibe una importante entrada de naturaleza inhibitoria tónica que se origina en el GP y que usa al GABA como transmisor (Kita et al., 1983b). Recibe además una proyección glutamatérgica proveniente del núcleo parafascicular del tálamo (Féger et al., 1994; Mouroux et al., 1995).

Diversos estudios (Chang et al., 1984; Hammond y Yelnik, 1983; Hazrati y Parent, 1992; Kita et al., 1983a; 1983b; Kita y Kitai, 1987) han mostrado en la rata que el NST proyecta al globo pálido (GP), al núcleo entopeduncular (NEp) y a la sustancia negra reticular (SNr), a través de axones que se bifurcan, proporcionando colaterales a todos estos núcleos (Fig. 2), de tal manera que una misma neurona ejerce su influencia en paralelo sobre varios núcleos. Debido a las conductancias iónicas intrínsecas de sus neuronas, estas exhiben actividad espontánea de tipo marcapaso. Esta actividad proporciona una entrada excitadora tónica que determina en gran medida el disparo de las neuronas de los núcleos blanco: GP, NEp y SNr (Robledo y Féger, 1990). Así, el NST controla tónicamente la actividad de los núcleos de salida de los ganglios basales.

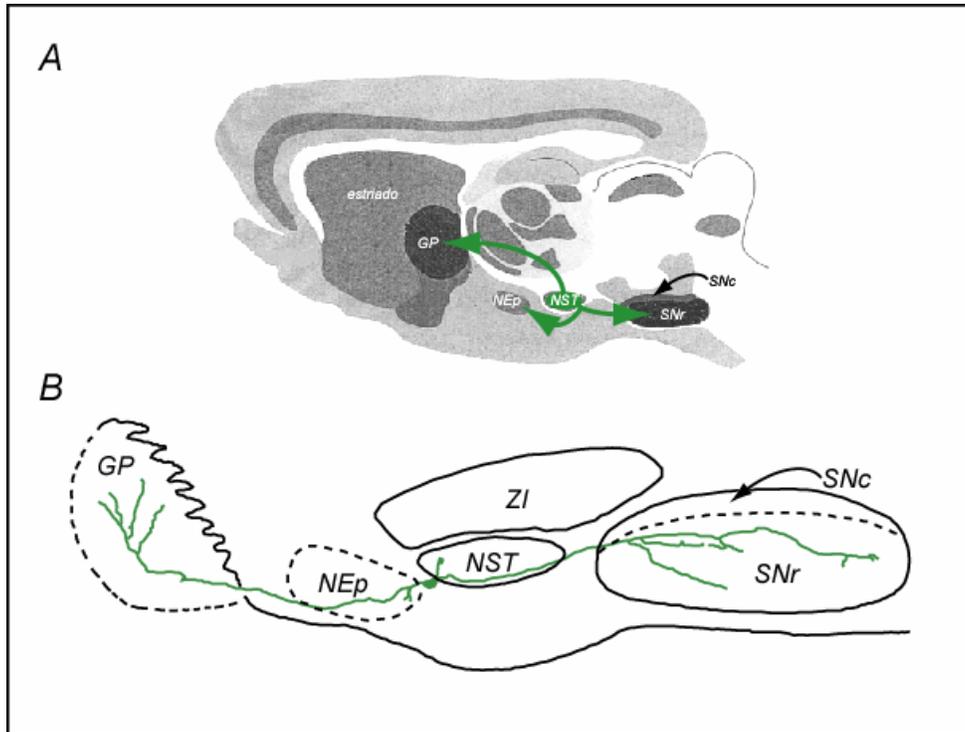


Figura 2. **El núcleo subtalámico proyecta a varios núcleos de los ganglios basales.** A) esquema de un corte sagital del cerebro de rata, donde se muestra a los núcleos que componen a los ganglios basales en esta especie (estriado: NST, globo pálido: GP, núcleo entopeduncular: NEp, núcleo subtalámico: NST, sustancia negra reticular: SNr y compacta: SNc). Obsérvese que el NST (en verde) proyecta hacia el GP, NEp y a la SNr (estos dos últimos, son los núcleos de salida de los ganglios basales). B) después del registro electrofisiológico intracelular de las neuronas del NST, se marcó a la neurona (en verde) y posteriormente se dibujaron las proyecciones de la misma con ayuda de una cámara lúcida. La misma neurona del NST manda proyecciones al GP, NEp y a la SNr. Ilustración tomada de Kita et al., 1983a.

El aumento en la actividad rítmica de las neuronas del NST, es lo que provoca la facilitación de las neuronas de los núcleos de salida (SNr/NEp) que a su vez inhiben a los circuitos cortico-talámicos del movimiento, su actividad genera hipocinesia (ver Fig.8) (Bergman et al., 1994; Levy et al., 2000). Por ésto se han usado ablaciones y lesiones del NST (Bergman et al., 1990), así como la reducción de su actividad mediante la estimulación de alta frecuencia (Benazzouz et al., 2000; Limousin et al., 1998; Pralong et al., 2002; Windels et al., 2003), para intentar revertir la hipocinesia de la enfermedad de Parkinson.

El NST recibe proyecciones de la SNc inmuno-reactivas a tirosina hidroxilasa (TH; enzima limitante en la síntesis de la dopamina) (Augood et al., 2000; Brown et al., 1979; Hassani et al., 1997; Prensa y Parent, 2001). También se ha detectado, en las neuronas del NST, la presencia de RNAm que codifica para los receptores dopaminérgicos (ver Fig. 3; D1, D2, D3 y D5) (Baufreton et al., 2003; Bouthenet et al., 1991; Flores et al., 1999; Mansour et al., 1992). Estos hallazgos sugieren que la dopamina puede ejercer una influencia sobre la actividad de las neuronas del NST (Hassani et al., 1996; 1997; Hassani y Féger, 1999; Kreiss et al., 1996; Ni et al., 2001; Zhu et al., 2002). Así, Baufreton y colaboradores (2003), mostraron que la dopamina facilita el disparo de las neuronas del NST incrementando la duración de un tren de potenciales de acción en respuesta a un estímulo. Este efecto parece ser mediado por un receptor de la clase D1, probablemente por el receptor tipo D5 (Fig.3). Por último, se ha sugerido que los receptores dopaminérgicos expresados por las neuronas del NST no sólo actúan en la membrana postsináptica somatodendrítica si no que también puedan ser transportados a las terminales sinápticas como sucede en otras sinapsis (Aiso et al., 1987) y así controlar la liberación del neurotransmisor en las proyecciones que llegan a los núcleos de salida y el GP (ver Fig.3). Esta es una de las hipótesis que tratamos de demostrar en esta tesis. Un reporte previo (Ibáñez-Sandoval, 2003 tesis de Maestría), mostró la participación de los receptores de la clase D2 sobre la transmisión subtálamo-nigral. En la presente tesis agregamos la participación de los receptores D1 (los Resultados de ambas están publicados. Ver trabajo adjunto Ibáñez-Sandoval et al., 2006)

### 3.1.3 Sustancia negra reticular

El blanco de la proyección del NST es la SNr. Las neuronas de la SNr proyectan a los circuitos cortico-talámicos que controlan los movimientos y a los núcleos del tallo cerebral tales como el *núcleo pedúnculo pontino*, **NPP**; el *colículo superior*, **CS**; y la *formación reticular*, **FR** (Jiang et al., 2003; Smeets et al., 2000; Takakusaki et al., 2004; Tsumori et al., 2002) (ver Fig.1). La SNr ejerce una

inhibición tónica sobre sus blancos, de forma que un movimiento significa “escaparse” de dicha inhibición, lo que se logra cuando la vía directa (NST→NSr) inhibe sus neuronas (Fig. 1).

Sus neuronas son GABAérgicas de proyección, la mayoría de las cuales es inmunoreactiva a la proteína quelante de calcio parvalbúmina (PV). Las neuronas de la SNr expresan las conductancias iónicas intrínsecas que las habilitan para generar un disparo tónico o de marcapaso. Esto produce la inhibición tónica sobre los circuitos cortico-talámicos de los movimientos (Fig. 1).

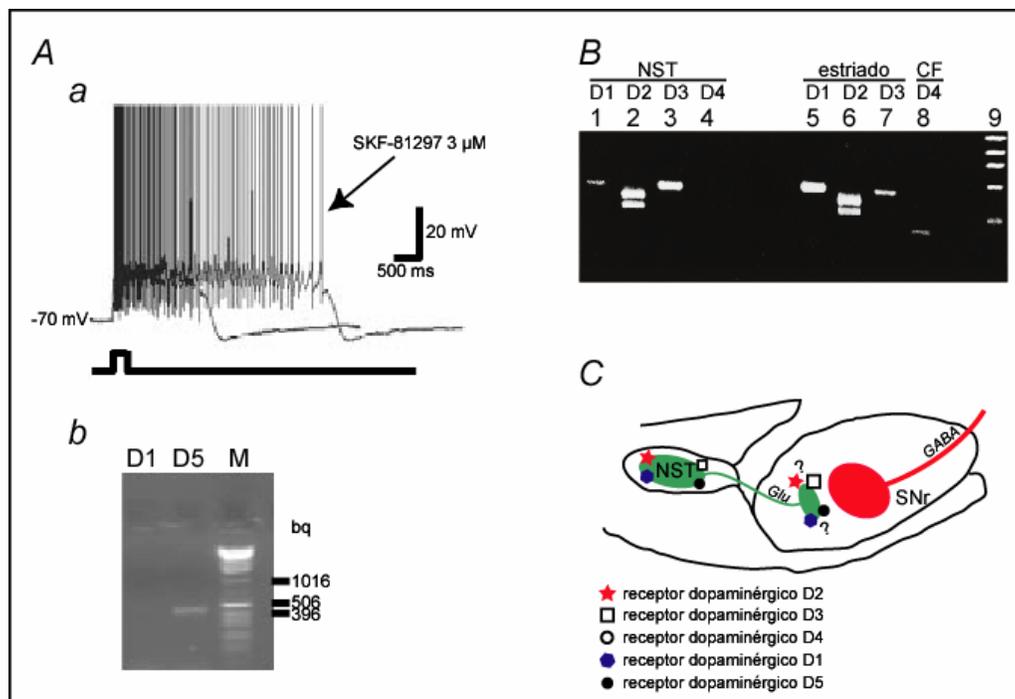


Figura 3. **Acción dopaminérgica sobre las neuronas del NST.** Aa) El agonista dopaminérgico (SKF 81297), selectivo para receptores de la clase D1, aumenta la meseta despolarizante de calcio y el disparo en una neurona del núcleo subtalámico. Ab) Productos de scRT-PCR: RNAm que codifica para el receptor dopaminérgico D5 (clase D1) en una neurona del NST. B) productos de RT-PCR que indican la presencia de RNAm para los receptores D1, D2 y D3 en el NST y la corteza frontal (CF). C) esquema que muestra la vía subtálamo-nigral y la posible ubicación de los receptores dopaminérgicos presinápticos en esta vía. Modificado de Baufreton et al., 2003 (Aa y Ab) y Flores et al., 1999 (B).

Las neuronas del NSt de la vía directa (Chevalier y Deniau, 1990; Smith y Bolam, 1989) y las del GP (Fig. 1) producen inhibición sobre la SNr (Bevan et al., 1996), la cual converge con la excitación del núcleo subtalámico (Albin et al., 1989; Hammond and Yelnik., 1983; Kita y Kitai, 1987; Nakanishi et al., 1987, Bevan et al., 1994a; 1994b; Shink et al., 1996) (Fig.1). La aferencia que llega del NSt a la SNr conserva la organización topográfica de la aferencia cortical que llega al NSt (Deniau et al., 1996; Mailly et al., 2001; Mailly et al., 2003). Las neuronas de la SNr proyectan a los circuitos tálamo-corticales (Benazzouz et al., 2000; François et al., 2002; Kha et al., 2001; Tsumori et al., 2002) encargados de producir los movimientos voluntarios (Tsumori et al., 2002). La salida cortical motora hacia la médula espinal en el primate puede proyectar en una pequeña proporción hacia motoneuronas encargadas de los movimientos de las manos y los dedos. El modelo oscilatorio de la enfermedad de Parkinson postula que la SNr genera la salida de un CPG (*central pattern generator*) patológico que presenta oscilaciones en forma de ráfagas rítmicas que al influir sobre los circuitos cortico-talámicos producen el temblor en reposo (Bergman et al., 1994). Las ratas parkinsonianas presentan temblor en sus mandíbulas (Salamone et al., 1998). La SNr también proyecta al tallo cerebral donde están los núcleos que generan los movimientos involuntarios, posturales, del equilibrio y el tono muscular (Mori, 1987; Rossignol, 1996; Takakusaki et al., 2004). La salida hacia el CS esta relacionada con el movimiento del cuello y de los ojos - nistagmo (Jiang et al., 2003). Al perderse la salida inhibitoria de la SNr sobre la FR, se generaría rigidez.

El signo que indica que una neurona posee actividad intrínseca de marcapaso, es una zona de conductancia con pendiente negativa (ZCPN) en la relación corriente voltaje (curva I-V) realizada en fijación de voltaje. La ZCPN es producida generalmente por corrientes entrantes sostenidas acompañadas por alguna de las conductancias catiónicas de tipo marcapaso (HCN o  $I_h$ ) (Fig. 4c) (Hsiao et al., 1998; Lee y Heckman, 1998). Cuando la ZCPN está presente en las neuronas, las señales sinápticas pueden producir potenciales en meseta de larga duración y disparo en ráfagas sobrepuesto a estas. Estas respuestas superan en

mucho la duración de la entrada sináptica que lo origina. Los receptores sinápticos encargados en generar mesetas son los del tipo NMDA propios de muchas sinapsis excitadoras, como la subtálamo-nigral (Guertin y Hounsgaard, 1998; Hell et al., 1996; Lo y Mize, 2000) (ver Fig.4b). La activación del receptor NMDA también puede generar propiedades marcapaso en neuronas que no la tenían (marcapaso condicional) (Vergara et al., 2003) o amplificar el comportamiento biestable del potencial de membrana en neuronas que son marcapasos constitutivos (Beurrier et al., 1998; Hsiao et al., 1998; Russo y Hounsgaard, 1994). La consecuencia principal de la ZCPN es la inducción de oscilaciones espontáneas en el potencial de membrana generando disparo en ráfagas rítmicas (Guertin y Hounsgaard, 1998; Hsiao et al., 1998; Russo y Hounsgaard, 1994).

Las oscilaciones rítmicas en el potencial de membrana que presentan algunas neuronas pueden registrarse en las motoneuronas o las raíces ventrales durante la locomoción (Brownstone et al., 1994; Gordon y Whelan, 2006; Guertin y Hounsgaard, 1998; Grillner, 2003; Hsiao et al., 1998; Kiehn, 2006; Wallén y Grillner, 1987), alternándose las motoneuronas que inervan flexores y extensores, lado derecho e izquierdo, de manera estereotipada. Por otro lado, el mantenimiento de estados despolarizados prolongados puede observarse en los músculos antigravitatorios durante el mantenimiento de la postura en los mamíferos (Kiehn y Eken, 1998).

La actividad oscilatoria observada durante la marcha (o la masticación, el nado, la deglución, etc.) puede ser inducida *in vitro*, en preparaciones de médula espinal aislada (o de tallo cerebral) de varias especies (lamprea, tortugas, cobayos, ratas, ratones, etc.), para lo cual basta adicionar NMDA al baño de superfusión. Es sorprendente la similitud entre el ritmo que se obtiene *in vivo* con el animal caminando y el que se obtiene *in vitro*, ya sin músculos y vías descendentes (Gordon y Whelan, 2006; Guertin y Hounsgaard, 1998; Kiehn, 2006). Se piensa que la acción del NMDA es la de sustituir la entrada excitadora tónica que los circuitos de la médula espinal tienen *in vivo*, tales como las vías

descendientes vestíbulo y retículo espinales (Gordon y Whelan, 2006). Esto basta para echar a andar a los CPGs (módulos autosuficientes) encargados de estas tareas motoras.

Debido a que el ritmo obtenido de las motoneuronas *in vitro* es muy similar al obtenido *in vivo*, pero sin la activación muscular correspondiente, al protocolo que lo produce se le ha denominado de *locomoción ficticia* (Alford et al., 2003, Arshavsky, 2003; Bertrand y Cazalets, 1999; Cazalets et al., 1995; Grillner, 2003; Gordon y Whelan, 2006; Guertin y Hounsgaard, 1998; 1998a; 2006; Hochman et al. 1994; Kiehn, 2006; Tell y Jean, 1993; Vergara et al., 2003; Wallén y Grillner, 1987). Cuando además de NMDA se agrega serotonina (5HT), dopamina, noradrenalina u otro transmisor modulador, o sus agonistas para activar, además de los receptores sinápticos ionotrópicos, los receptores acoplados a proteínas G (metabotrópicos), la locomoción ficticia puede ser modulada en frecuencia, duración de las fases de despolarización, intensidad, etc. (Alford et al., 2003; Gordon y Whelan, 2006; Guertin y Hounsgaard, 1998; Hsiao et al., 1998). Mediante métodos de fluorescencia e imágenes, registros de fijación de voltaje y el uso de ratones transgénicos, se ha logrado identificar muchas de las neuronas que forman parte de los CPGs que generan los ritmos (Gordon y Whelan, 2006; Kiehn, 2006).

Una hipótesis sostiene que los generadores centrales de patrones temporales de disparo o *central pattern generators* (CPG) (Alford et al., 2003; Gordon y Whelan, 2006; Grillner y Zangger, 1984; Kiehn, 2006; Rossignol et al., 2006) pueden sostener actividad oscilatoria por mucho tiempo sin necesidad de entradas aferentes. Muchos circuitos telencefálicos generan actividad oscilatoria espontánea *in vitro* en forma de ráfagas, al aplicárseles el protocolo de locomoción ficticia (Beurrier et al., 1998; O'Donnell, 2003; Tseng y O'Donnell, 2004; Tseng et al., 2006; Vergara et al., 2003 y la presente tesis – ver más adelante). Algunos de los núcleos de los ganglios basales, presenta actividad oscilatoria espontánea *in*

*vitro* aun sin aplicársele ningún fármaco (Bevan et al., 2002; Cossart et al., 2005; Sanchez-Vives y McCormick, 2000; Vergara et al., 2003; Yuste et al., 2005).

Las neuronas GABAérgicas de la SNr, *in vitro*, presentan actividad espontánea, sobretodo de tipo tónico (Atherton y Bevan, 2005; Richards et al., 1997; Yanovsky et al., 2005). Esta actividad es muy similar a la hallada *in vivo* (Góngora-Alfaro et al., 1997; Hajós, y Greenfield, 1994; Yuan et al., 2004). Pero además, estas neuronas pueden presentar oscilaciones en el potencial de membrana y disparo en ráfagas, pues las neuronas de la SNr están involucradas en el control de diversas conductas estereotipadas tales como la masticación, movimientos del cuello y de los ojos, nistagmo, locomoción y tono muscular, entre otros (Jiang et al., 2003; Salamone et al., 1998; Takakusaki et al., 2003; 2004) (Fig.4a).

En condiciones patológicas, el circuito GP-NST-SNr presenta actividad oscilatoria en ráfagas a una frecuencia de 10 – 25 Hz (Bergman et al., 1994; Bevan et al., 2002; Plenz y Kitai, 1999). El modelo oscilatorio de la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson postula que esta actividad se torna patológica cuando un número exagerado de neuronas se enganchan a la oscilación sin quedar neuronas disponibles para realizar los movimientos voluntarios (Bevan et al., 2002; Bergman et al., 1994; Galarraga et al 1987; Hutchison et al., 2004; Kreiss et al., 1996; Levy et al., 2000; Magill et al., 2001; Salamone et al., 1998; Tang et al., 2001). El modelo de tasa de disparo (Albin et al., 1989; Mink, 1996; Smith et al., 1998) (Figs. 1 y 5) y el modelo oscilatorio para explicar la enfermedad de Parkinson son actualmente incompatibles. El modelo de tasa de disparo postula que esta enfermedad es el resultado del desbalance entre las vías directa e indirecta que proyectan a los núcleos de salida (SNr/NEp) (Fig. 5). Así, la vía indirecta estaría sobreexcitada haciendo que la conexión subtálamo nigral produzca una exagerada facilitación de SNr/NEp lo que se traduciría en una sobreinhibición de los circuitos tálamo-corticales de los movimientos, dando lugar a la hipocinesia. El problema es que los registros en monos y en pacientes parkinsonianos no

muestran tal sobreexcitación en los núcleos de salida. Lo que muestran es disparo rítmico en ráfagas, de ahí que el modelo oscilatorio postule que es la aparición de los *central pattern generators* patológicos la causa del temblor, la rigidez y la hipocinesia. En la presente tesis pusimos a prueba ambos modelos, pues reproducimos, *in vitro*, los cambios predichos por el modelo tasa de disparo (sobreexcitación de la vía indirecta e inhibición de la directa), y estudiamos cuál de los patrones de disparo predichos por estos modelos, aparecía en las neuronas de salida (SNr).

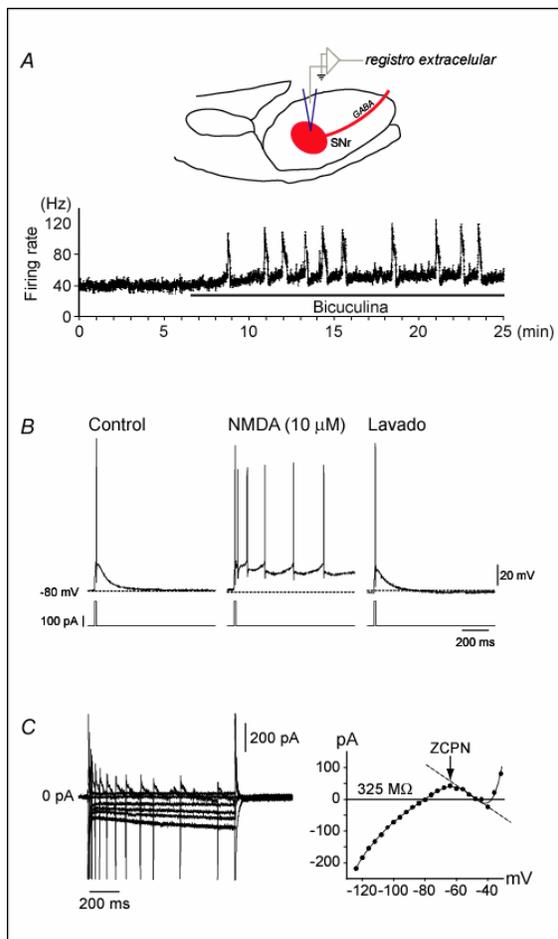


Figura 4. **Registro extracelular e intracelular de neuronas GABAérgicas de la sustancia negra reticular en ratón y rata.** A: Se muestra el curso temporal de la frecuencia de disparo de una neurona GABAérgica de la SNr del ratón. La adición de 10 μM de bicuculina, un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub> (barra negra), produce oscilaciones en la frecuencia de disparo (Yuan et al., 2004). B: Un pulso breve de corriente despolarizante que sólo produce una espiga en condición control (izquierda), induce una meseta despolarizante con disparo repetitivo en presencia de 10 μM de NMDA (en medio). El efecto es reversible (derecha). C: trazos de corriente ante comandos de voltaje despolarizantes e hiperpolarizantes (izquierda) y la relación I-V que de ellos se obtiene (derecha). Nótese que la curva I-V muestra una zona de conductancia con pendiente negativa (ZCPN), lo que sugiere que las neuronas de la SNr poseen propiedades oscilatorias intrínsecas para poder ser marcapasos endógenos (Ibáñez-Sandoval et al., 2006).

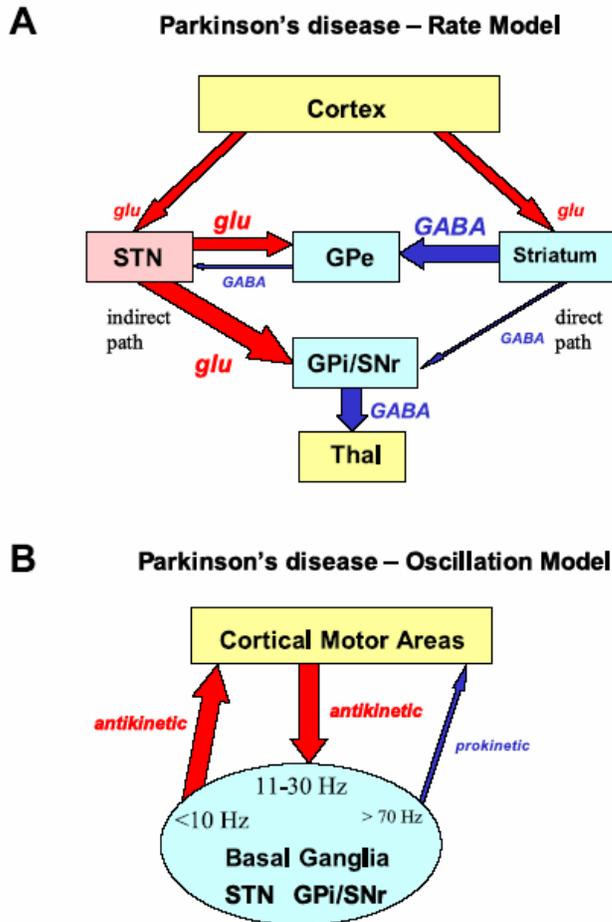


Figura 5. **Modelos fisiopatológicos de la enfermedad de Parkinson.** **A.** Modelo de tasa de disparo (rate model). El exceso de actividad de la vía indirecta (flecha roja gruesa excitadora que emerge del subtálamo: STN) y la reducción en la actividad de la vía directa (flecha azul delgada inhibidora que emerge del NST: Striatum) predice una sobreexcitación de los núcleos de salida (GPi/SNr: flecha azul gruesa) lo que sobreinhibe a los circuitos tálamo-corticales de los movimientos. Esta actividad aumentada de las neuronas de la SNr y el GPi no se observa, ni en monos ni en pacientes parkinsonianos. **B.** Modelo oscilatorio. La ausencia de dopamina produce (no se explica como) la aparición de CPGs patológicos que dan lugar a oscilaciones neuronales antikinéticas

(flechas rojas de Cx a los GB y viceversa). Estos CPGs enganchan a la población neuronal que se vuelve incapaz de responder a comandos motores caracterizados por altas frecuencias (gamma) (flecha delgada). Este disparo sí se encuentra en los pacientes pero no se sabe como se genera. Actualmente, ambos modelos son incompatibles. Tomado de Hutchison et al (2004).

## 3.2 La dopamina y sus receptores

La dopamina es una catecolamina como la adrenalina y la noradrenalina, que al interactuar con sus receptores acoplados a proteínas G, activan a diversas cascadas de señalización (Hedin et al., 1993; Missale et al., 1998; Savarese et al., 1992). Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales (7TM) que están acoplados a proteínas G (GCRs) (Fig. 6B). Actualmente se sabe que hay dos clases o familias (Fig. 1) de estos receptores: D1 y D2 (Missale et al., 1998). Cada clase está compuesta de diversos subtipos con base en su homología. La clase D1 esta constituida por los

subtipos D1 y D5 (Monsma Jr et al., 1990; Tiberi et al., 1991), los cuales activan a la adenilil ciclasa a través de proteínas  $G\alpha(s/olf)$  estimulando la formación de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (Kebabian y Calne, 1979). La clase D2 está constituida por el subtipo D2 con dos isoformas D2L y D2S (Giros et al., 1989; Monsma Jr et al., 1989), el subtipo D3 (Sokoloff et al., 1990) y el subtipo D4 (Van Tol et al., 1991). Estos receptores inactivan a la adenilil ciclasa mediante proteínas  $G\alpha i/o$  disminuyendo así la formación de AMPc (Kebabian y Calne, 1979). Sin embargo, muchas otras vías de señalización se conocen para ambas clases de receptor (Brami-Cherrier et al., 2002; Hernández-López et al., 2000; Lee et al., 2004; Neve et al., 2004; Nishi et al., 1997; Trantham-Davidson, et al., 2004), por lo que sus efectos pueden ser de corto, mediano y largo plazo, cambiando la manera en que las neuronas disparan y responden a las entradas sinápticas cuando las cadenas de señalización modifican el accionar de los canales iónicos (Florezco et al., 2001; Hernández-López et al., 1997; Hernández-López et al., 2000; Tseng y O'Donnell, 2004).

Los procesos psicofísicos que la dopamina modula son muchos, tales como la actividad motriz, la sensación de recompensa, la atención a estímulos sorprendidos (*salient* o relevantes), las emociones y los procesos cognoscitivos, en particular la memoria de trabajo (Castner et al., 2004; Castner y Goldman-Rakic, 2004; Goldman-Rakic et al., 2004; Missale et al., 1998; Rao et al., 2000; Sawaguchi y Goldman-Rakic, 1991; Wang et al., 2004).

La dopamina se sintetiza a partir del aminoácido tirosina. La enzima *tirosina hidroxilasa* (TH), hidroxila a la tirosina dando lugar a la *dihidroxifenilalanina* (DOPA). La DOPA es descarboxilada en una reacción catalizada por la *DOPA descarboxilasa de aminoácidos aromáticos* (AADC, por sus siglas en inglés; ver Cooper et al., 1996) para formar a la dopamina (Fig.6A).

La enfermedad de Parkinson aparece cuando hay disminución en la secreción de dopamina. Los estados sicóticos como la esquizofrenia se han

correlacionado con un exceso o disfunción en las acciones dopaminérgicas (Hornykiewicz, 1973; Meltzer y Stahl, 1976; Sandor, 1993). Pero muchos otros síndromes motores, psiquiátricos y neuroendocrinos, incluyendo la obesidad y el síndrome metabólico, han sido relacionados con disfunciones en las acciones dopaminérgicas (Egan y Weinberger, 1997; Fremeau et al., 1991; Kahn et al., 1994; Missale et al., 1998).

La participación de la dopamina en el control del movimiento se infiere a partir de datos clínicos o experimentales donde existe o se produce una lesión de la SNc (Albin et al., 1989; Hornykiewicz, 1973; Smith y Kieval., 2000). Esto ha demostrado su importancia en el funcionamiento de los ganglios basales y las cortezas premotoras que contienen la mayor parte de sus receptores en el cerebro (Fremeau et al., 1991; Goldman-Rakic et al., 2000; Lidow et al., 1991; Rogozinska y Skangiel-Kramska, 2005). También ha dejado claro su importancia en el procesamiento y la generación de las conductas motoras (Albin et al., 1989; Bergman et al., 1994; Crocker, 1997; Obeso et al., 2000; Smith et al., 1998; Smith y Kieval, 2000; Takakusaki et al., 2004). Sin embargo, a pesar de la abundante información bioquímica y molecular, así como la plétora de síndromes motores ocasionados por su ausencia, el encontrar claros correlatos fisiológicos a nivel celular (e. g., disparo neuronal, corrientes iónicas y sinápticas) y de circuitos (vg., disparo neuronal mientras los animales ejecutan tareas motoras) ha demostrado ser una tarea muy difícil. Sólo recientemente se han obtenido datos electrofisiológicos sobre las acciones de la dopamina a nivel celular (Hernández-López et al., 2000) y de circuitos (Gao y Goldman-Rakic, 2001; 2003; Wang et al., 2004). Esto es, la interfase fisiológica entre la bioquímica y la conducta es virtualmente nula. En esta tesis postulamos que sólo explicando las acciones de la dopamina o sus agonistas sobre el disparo celular o los eventos sinápticos podremos generar modelos que liguen la biología celular y la señalización de estos receptores con la conducta y la fisiología de sistemas.

Ya se mencionó que el NST no es el único núcleo de los ganglios basales cuyas neuronas poseen receptores dopaminérgicos y reciben aferentes de la SNc. El NST y el GP (Smith y Kieval., 2000) también reciben aferentes dopaminérgicas y poseen receptores. Parte de la distribución conocida de los receptores dopaminérgicos dentro de los GB se muestra en la figuras 1 y 7.

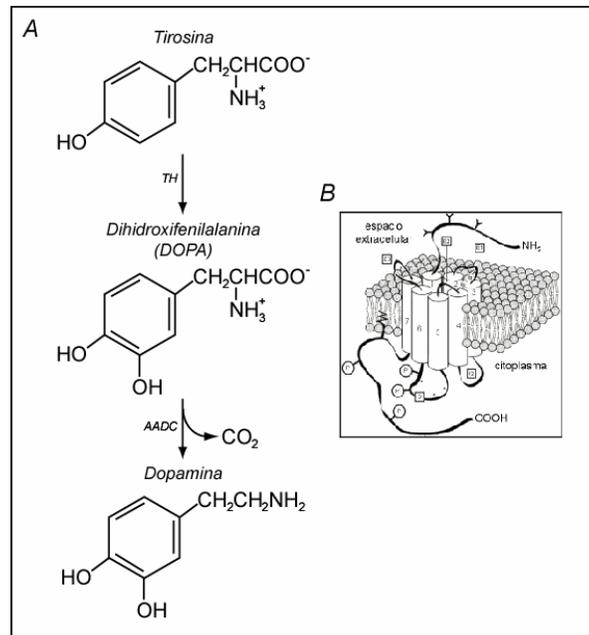
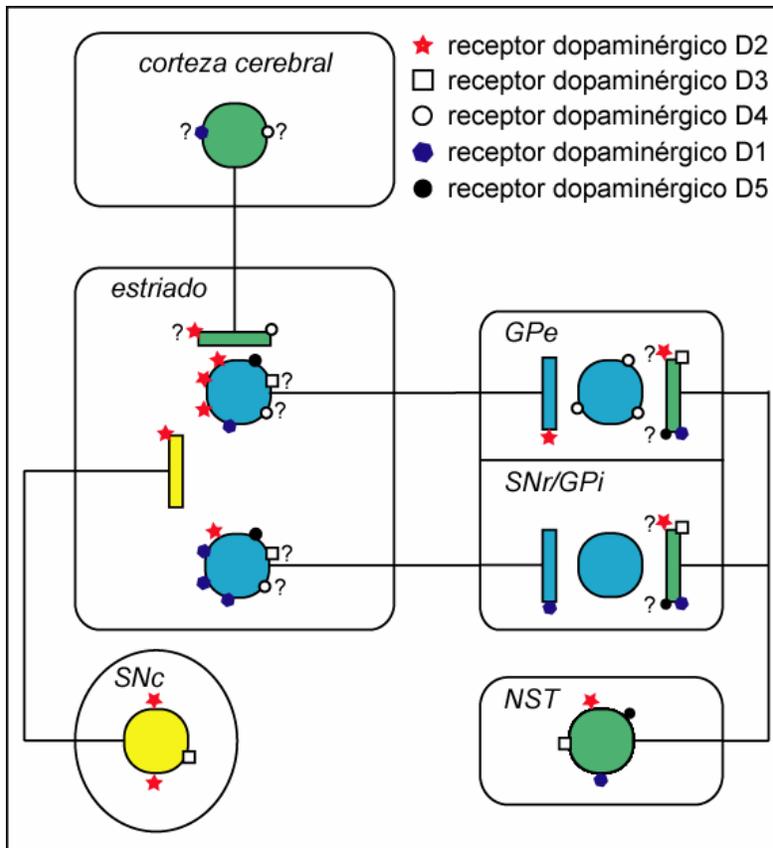


Figura 6. **Biosíntesis de la dopamina a partir del aminoácido tirosina (ver texto).** A: En neuronas que usan a la dopamina como neurotransmisor, la descarboxilación de DOPA a dopamina es el paso final en la síntesis del transmisor. B: Estructura del receptor a dopamina. Se muestran el carboxilo (COOH) y el amino (NH<sub>2</sub>) terminales, los sitios de fosforilación (P), los dominios transmembranales 1-7 y las asas intracelulares (I2 y I3) y extracelulares (E1, E2, E3). Ilustración tomada de Missale et al., 1998.



**Figura 7. Localización de los receptores a dopamina en los ganglios basales.**

Este diagrama muestra la localización de los cinco subtipos de receptor a dopamina en diversos núcleos de los ganglios basales según estudios de hibridación *in situ*, RT-PCR e inmunocitoquímica. Las interrogantes para los receptores D2 en las terminales *cortico-estriatal* y D2, D3, D1 y D5 para las terminales *subtálamo-palidal* y *subtálamo-nigral* indica que su presencia aún es controvertida. Los círculos en

verde y sus proyecciones son de naturaleza glutamatergica, mientras que los azules son de tipo GABAérgico. El círculo y su proyección en amarillo muestra la vía dopaminérgica. Las abreviaturas son las mismas que se definieron anteriormente en el texto. Augood et al., 2000; Baufreton et al., 2003; Bouthenet et al., 1991; Choi et al., 1995; Defagot et al., 1997; Flores et al., 1999; Fremeau et al., 1991; Gehlert et al., 1992; Giros et al., 1989; Mansour et al., 1992; Matsumoto et al., 1996; Mrzljak et al., 1996; Rivera et al., 2002; Sokoloff et al., 1990.

En el presente trabajo de tesis estudiamos las propiedades de oscilación y de disparo de las neuronas de la SNr aplicando el protocolo de locomoción ficticia el cual simularía el exceso de excitación de la vía indirecta, que postula el modelo tasa de disparo. La hipótesis es que ésto ocasionaría, agudamente, en tejido normal, una actividad oscilatoria en las neuronas de la SNr. Con esto proponemos el primer acercamiento entre el modelo, de tasa de disparo y el oscilatorio.

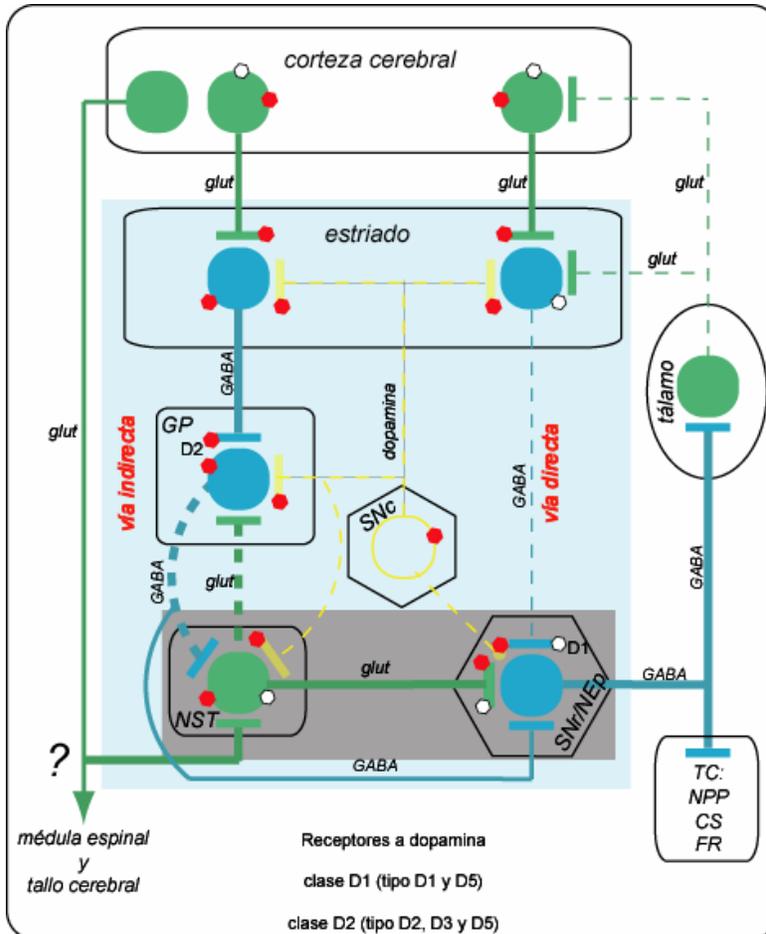


Figura 8. Modelo de tasa de disparo (*rate model*) para explicar la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson debida a una disminución de dopamina. El decremento de dopamina en los GB produce un incremento en la inhibición sobre el GP a través de las neuronas que componen la *vía indirecta*, que estarían hiperexcitables por la ausencia de la dopamina, que actuando sobre el receptor D2, controlaba de manera negativa la excitabilidad de estas neuronas en situación control. A su vez, el NST desinhibido por la falta de actividad del GP produce un incremento en la salida excitadora sobre los núcleos de salida (SNr/NEp). Por otro lado, el decremento de dopamina, que al activar los receptores D1 facilita en situación control a las neuronas de la vía directa, dejaría a las neuronas de esta vía hipoexcitables (línea delgada), lo que aumentaría aun más la actividad de los núcleos de salida (SNr/NEp) que ya no serían inhibidos. Los problemas que tiene este modelo al contrastarlo con los nuevos datos experimentales se explican en el texto. Sólo mencionaremos que ni la actividad el GP se ve disminuída ni la de la SNr se ve aumentada. Lo que se observa es un aumento de la actividad oscilatoria en ambos núcleos así como en el NST.

## **Capítulo 4**

### **Hipótesis**

- 1.- Las clases de receptor a dopamina D1 y D2 controlan, la transmisión glutamatérgica subtálamo-nigral a nivel presináptico.
  
2. La inducción de los cambios fisiopatológicos propuestos por el modelo de tasa de disparo de la enfermedad de Parkinson ocasionará que las neuronas de la sustancia negra reticular generen disparo oscilatorio en ráfagas, tal y como propone el modelo oscilatorio de la misma enfermedad.

## **Objetivos**

1. Mediante técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas, mostrar que en nuestra preparación se conserva la vía glutamatérgica *subtálamo-nigral*. Identificar a las neuronas de proyección de la SNr mediante la demostración de la presencia de parvalbúmina en las mismas.
2. Determinar la naturaleza glutamatérgica de la transmisión subtálamo-nigral.
3. Explorar el efecto de la activación de receptores dopaminérgicos D1 y D2 sobre la transmisión glutamatérgica subtálamo-nigral.

### Metas.

- a) registrar corrientes postsinápticas de tipo excitador en las neuronas GABAérgicas de la *sustantia nigra pars reticulata* por estimulación del núcleo subtalámico.
  - b) explorar el efecto del agonista de cada uno de los receptores de la clase D1 y D2 sobre las corrientes sinápticas excitadoras.
4. Explorar si la modulación en la transmisión glutamatérgica se ejerce a nivel presináptico.

### Metas.

- a) registrar corrientes postsinápticas de tipo excitador en condiciones control y en presencia del agonista dopaminérgico (D1/D2) empleando el paradigma de los pulsos pareados.
- b) empleando el análisis de varianza, comprobar que el control que ejercen los agonistas dopaminérgicos se lleva a cabo nivel presináptico.

5. Determinar si la dopamina endógena activa los receptores D1 y D2 de las terminales subtálamo-nigrales.
6. Explorar si el control que ejerce la dopamina a través de sus receptores D1 y D2 se lleva a cabo en una misma célula.
7. Mostrar si el aumento de la actividad excitadora sobre las neuronas de la SNr, utilizando un protocolo similar al usado para generar locomoción ficticia en médula espinal (adicionando NMDA a la solución de registro), es capaz de inducir oscilaciones en el potencial de membrana, así como disparo en ráfagas, en las neuronas de la SNr.
8. Mostrar si la reducción en la inhibición de las neuronas de la SNr es capaz de inducir oscilaciones en el potencial de membrana y disparo en ráfagas en las neuronas de la SNr.
9. En caso de poder inducir las oscilaciones en el potencial de membrana así como disparo en ráfagas en las neuronas de la SNr, determinar qué conductancias iónicas son fundamentales para generar dicho patrón de disparo de las neuronas GABAérgicas de la SNr.

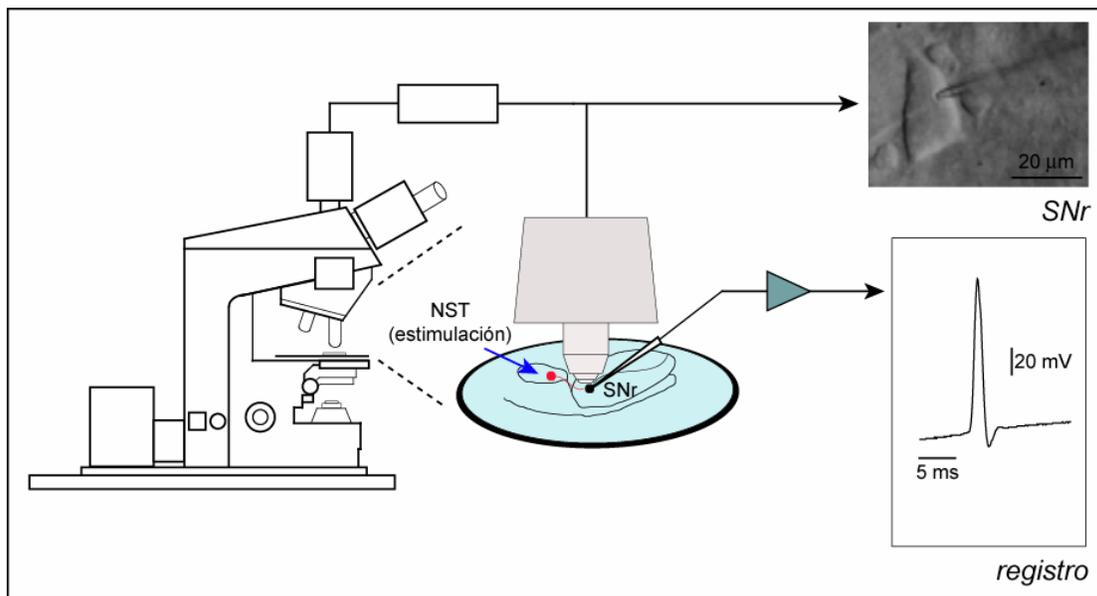
## Capítulo 5

### Métodos

#### 5.1 Preparación del tejido cerebral para el registro electrofisiológico *in vitro*

Los registros de corrientes sinápticas en neuronas de la sustancia negra reticular fueron realizados en rebanadas de cerebro de rata de 14 a 18 días de edad. Para la obtención de las rebanadas, se anestesian las ratas y se perfunden intracardiamente con fluido cerebroespinal artificial cuya composición se muestra en la tabla 1. Durante la perfusión y la obtención de las rebanadas, el cloruro de sodio se sustituye por cloruro de colina (solución baja en sodio) para mejorar la viabilidad celular (Guzmán et al., 2003). Después de la decapitación, el cerebro se disecciona inmediatamente y se sumerge en fluido cerebroespinal artificial (CSF) frío. Posteriormente se separan ambos hemisferios realizando un corte sobre la línea media. Usando como base la parte media de cada uno de los hemisferios, se colocan en un vibratomo (Pelco 101 Series 1000; Pelco, St. Louis, MO) en una orientación rostro-caudal para obtener rebanadas sagitales de 250-300  $\mu\text{m}$  de espesor. Las rebanadas que se emplean (cuatro en condiciones óptimas) contienen al núcleo subtalámico (NST) y a la sustancia negra reticular (SNr). Las rebanadas seleccionadas visualmente se transfieren a un recipiente con CSF normal. La solución se mantiene en burbujeo constantemente con una mezcla gaseosa ( $\text{O}_2$ : 95%,  $\text{CO}_2$ : 5%) durante un período de una a dos horas antes del registro electrofisiológico. Las rebanadas se transfieren a una cámara de registro (volumen = 1.5 ml) fija a la platina de un microscopio (Eclipse, Nikon). Las rebanadas reciben un flujo constante de CSF normal (ver tabla 1) a una velocidad de 2 a 2.5 mililitros por minuto con burbujeo constante. Para provocar eventos sinápticos excitadores se coloca, con ayuda de un objetivo 10X (NA 0.3), un electrodo de estimulación bipolar concéntrico (50  $\mu\text{m}$  de diámetro en la punta) en

el NST (la elección de la zona de estimulación se describe más adelante). Posteriormente, se selecciona la zona de registro en la SNr utilizando un objetivo de inmersión en agua (40X / NA 0.75). Mediante la técnica de videomicroscopia infrarroja (Stuart et al., 1993) se seleccionan las neuronas a registrar. La punta del electrodo de registro se sitúa en el soma de la neurona, para la realización del registro electrofisiológico con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa, descrita más adelante (Fig. 9).



**Figura 9. Esquema de la disposición experimental empleada para la obtención de los registros electrofisiológicos.** A la izquierda se muestra el microscopio, en el centro una amplificación de la disposición experimental donde se muestra a los dos núcleos de interés: núcleo subtalámico (NST) y sustancia negra reticular (SNr). El electrodo de estimulación se posicionó dentro del NST y la respuesta sináptica fue registrada en el soma de una neurona GABAérgica de la SNr. A la derecha, la visualización de una neurona de la SNr empleando la técnica de videomicroscopia infrarroja. Abajo a la derecha, un registro de un potencial de acción típico de las neuronas GABAérgicas del mismo núcleo.

**Tabla 1.** Composición del fluido cerebroespinal artificial (CSF) y de la solución interna empleados en los registros electrofisiológicos (concentración en mM)

	<i>bajo sodio</i>	<i>CSF</i>	<i>*Interna</i>
Colina-Cl	124.0	-	-
NaCl	-	124.0	10
KCl	2.5	2.5	-
MgCl <sub>2</sub>	1.3	1.3	2.0
NaHCO <sub>3</sub>	26.0	26.0	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2	1.2	-
CaCl <sub>2</sub>	2.4	2.4	1.0
D-glucosa	10.0	10.0	-
KSO <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-	-	120.0
HEPES	-	-	10.0
EGTA/KOH	-	-	10.0

\*ATP-Mg<sup>2+</sup> (2 mM) y GTP (0.3 mM), se añadieron a la solución interna inmediatamente antes de cada experimento.

## 5.2 Estimulación

La vía subtálamo-nigral ha sido descrita en trabajos previos (Hammond et al., 1983; Nakanishi et al., 1987; Kita y Kitai, 1987). Es de naturaleza excitadora y monosináptica. Las terminales de las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico ejercen una acción excitadora sobre las neuronas GABAérgicas de la sustancia negra reticular.

La estimulación se realizó con un electrodo bipolar concéntrico de platino (FHC Inc., Bowdoinham, ME; de 50  $\mu$ m en la punta y de 1 K $\Omega$  de resistencia) colocándose en la zona del núcleo subtalámico que mostró proyecciones axónicas hacia la SNr, la cual fue determinada con los experimentos de marcado anterógrado descritos más adelante (ver Fig. 12; "S"). Se utiliza un generador de pulsos (Digitimer DS2). Los pulsos son aplicados a una frecuencia de 0.1 Hz, sincronizando la estimulación y el registro a través de un estimulador adicional (Digitimer D4030). El registro de las corrientes sinápticas excitadoras se realiza en

presencia de 10  $\mu\text{M}$  de bicuculina para bloquear los componentes contaminantes de tipo inhibidor GABAérgico. En estas condiciones, la probabilidad de encontrar la conexión entre las aferentes presinápticas del NST y una célula postsináptica (SNr) se incrementó al ~50%. Para confirmar la naturaleza excitadora del evento sináptico, al finalizar cada experimento se añaden los antagonistas de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos a AMPA/kainato (10  $\mu\text{M}$  de CNQX) y a NMDA (50  $\mu\text{M}$  de AP-5). El potencial de mantenimiento en todos los experimentos fue de -80 mV.

El sitio de estimulación fue determinado de la siguiente manera: Cuando se posicionó el electrodo de estimulación fuera del NST no se provoca ningún evento sináptico en las neuronas GABAérgicas de la SNr. Sin embargo, cuando el electrodo de estimulación se posiciona dentro del subtálamo (NST) se puede provocar respuestas sinápticas en las neuronas de la SNr. No obstante, la probabilidad de tener la conexión entre la zona que estimulamos y la que registramos es muy baja (~12%). Por ello, recurrimos a marcar la vía con biocitina (Sigma-Aldrich, St Louis MO; 2% disuelta en solución salina fisiológica) (Vergara et al., 2003). Para esto, una pipeta con biocitina se posiciona dentro del núcleo subtalámico (NST) durante dos horas, en una rebanada cerebral viva y perfundida con CSF. Después, la pipeta se retira y la rebanada permanece perfundida con CSF por otras 6 horas. Posteriormente, las rebanadas cerebrales son fijadas por inmersión en una solución que contiene 4% de paraformaldehído y 1% de ácido pícrico durante toda la noche a 4°C. Después de fijadas, las rebanadas se lavan con una solución salina amortiguada de fosfatos de potasio (KPBS) durante 10 minutos por tres veces. Esto quita el exceso de fijador. Al terminar de lavarse, las rebanadas se incluyen en agar al 7% y posteriormente se colocan en un vibratomo para obtener rebanadas de 60  $\mu\text{m}$  de espesor en presencia de KPBS. Luego, las rebanadas se incuban en PBS que contiene 0.5% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 minutos para suprimir la actividad endógena de la peroxidasa. Acto seguido, las rebanadas se lavan y se incuban en una solución salina TRIS-amortiguada (TBS) que contiene tritón X-100 y el complejo avidina-peroxidasa (1:100; Vector, Burlingham, CA,

USA.) por 4 horas a temperatura ambiente. Una vez lavadas con PBS, el tejido se hace reaccionar con 0.05% de 3,3'- tetrahidrocloruro de diaminobencidina y 0.003% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en TBS. Por último, el tejido se monta en portaobjetos gelatinizados para su inspección bajo el microscopio.

## 5.3 Sistema de registro

### 5.3.1 Pipetas

Las corrientes sinápticas fueron registradas empleando la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa ("*whole cell*"; Hamill et al., 1981; Marty y Neher, 1995). Para ello utilizamos pipetas de borosilicato de 1.65/1.1 mm (OD/ID; WPI Sarasota, FL) estiradas (Sutter Instrument Corp. Novato, CA), con resistencias d.c. de 3-5 M $\Omega$  después de pulir y llenas con la solución interna (ver tabla 1).

### 5.3.2 Registro electrofisiológico

El registro de las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs) en la modalidad de fijación de voltaje se realiza de acuerdo al siguiente procedimiento: la señal registrada por la pipeta se pasa a un amplificador Axopatch 200B (Axon Ins., Foster City, CA) con amplificación 10X y se filtra a 2 KHz (filtro pasa bajos) para luego ser digitalizada a una frecuencia de adquisición de 10 KHz mediante una interface AT-MIO-6040E y una tarjeta DAQ (NI-DAQ; National Instruments, Austin TX). Para la adquisición de las señales electrofisiológicas se usa un programa desarrollado en el laboratorio en el ambiente LabVIEW (National Instruments, Austin TX). La tarjeta NI-DAQ se usa para guardar los datos en archivos binarios en el disco duro de la computadora para su análisis posterior. La señal se monitorea tanto en la pantalla de un osciloscopio (Tektronix TDS 3012) como en la computadora (PC).

## **5.4 Análisis y presentación de datos**

Los registros de las corrientes sinápticas almacenados en la computadora se analizan con ayuda de los programas CLAMPFIT (Axon Instruments) y Microcal Origin 7. Se reporta la amplitud al pico de las corrientes sinápticas (media  $\pm$  error estándar; E. S.), las cuales se emplean para graficar el curso temporal del efecto de los fármacos empleados. En las gráficas, cada punto del curso temporal es el promedio de seis eventos. Los trazos son representativos de uno de estos promedios.

Para evaluar la modulación presináptica utilizamos el protocolo de pulsos pareados que consiste en la aplicación de dos estímulos de la misma intensidad separados por un breve intervalo de tiempo (50 ms) y aplicados cada 10 segundos (0.1 Hz). Este protocolo tiene su fundamento en la “teoría del calcio residual” (Katz y Miledi, 1968; Zucker, 2002) que postula que el calcio que entra a las terminales sinápticas tarda en amortiguarse más que el intervalo de tiempo entre los dos estímulos (50 ms en el presente caso). Así, parte del calcio que entra durante el primer estímulo se suma al calcio que entra durante el segundo estímulo, por lo que el segundo estímulo cuenta con más calcio para la liberación.

Ahora bien, la mayor parte de las terminales sinápticas del cerebro poseen uno o dos sitios activos, cada uno con unas cuantas vesículas para ser liberadas (1-20) (Edwards et al., 1990; Gersdorff y Matthews, 1999). Cada terminal posee una determinada probabilidad de liberar esas vesículas: entre cero (terminal silente) y cerca de uno (alta probabilidad de liberación). Si las terminales estimuladas poseen baja a moderada probabilidad de liberación, sólo unas cuantas vesículas serán liberadas con el primer estímulo. El calcio incrementado durante el segundo estímulo aumentará entonces la probabilidad de liberación y por lo tanto más vesículas serán liberadas y la segunda respuesta será mayor. A esto se le llama “facilitación sináptica”, y lo que indica es que las terminales poseen de baja a moderada probabilidad de liberación cuando se las estimula por primera vez. Pero si las terminales poseen desde un principio alta probabilidad de

liberación, la entrada de calcio durante el primer estímulo liberará la mayor parte de las vesículas disponibles. La respuesta al primer estímulo será casi la máxima. Así, cuando el segundo estímulo suma su calcio al que queda del primero no habrá tantas vesículas para liberar. De esta manera la segunda respuesta será menor que la primera. A esto se le llama “depresión sináptica” e indica que las terminales poseen alta probabilidad de liberar el neurotransmisor cuando reciben el primer estímulo. Por lo tanto, aunque el par de estímulos que se proporcionen sean iguales, no necesariamente ambas respuestas serán iguales. Esto es, la proporción entre ambas respuestas, la segunda y la primera ( $S_2/S_1$ ), no siempre será igual a uno y su valor dependerá de la probabilidad inicial de liberar neurotransmisor. Baja probabilidad de liberar se relaciona con la facilitación sináptica y alta probabilidad con depresión sináptica. En caso de que las respuestas sinápticas fueran modificadas por un cambio mediado por un receptor postsináptico, e.g.; cambio en el número de receptores, cambio en la resistencia de entrada de la neurona, ambas respuestas tendrían que verse afectadas de la misma manera pues se producen en el mismo sitio y por los mismos receptores, y por lo tanto, la proporción  $S_2/S_1$ , o “tasa de pulsos pareados”, no debería de cambiar. La única manera de modificar  $S_2/S_1$  es mediante un cambio en la probabilidad de liberación. Un cambio en la probabilidad de liberación sólo puede estar mediado por un receptor presináptico mediante un proceso que afecte la maquinaria de liberación. Esto es fácil de corroborar modificando la concentración de calcio externo. Es bien sabido que la liberación del neurotransmisor contenido en vesículas sinápticas es dependiente de la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje. Una disminución en la concentración de calcio externo produce una disminución en la probabilidad de liberación y por tanto produce facilitación sináptica respecto del control y viceversa, un incremento en el calcio externo aumenta la probabilidad de liberación, lo que producirá mayor depresión sináptica que en el control.

De acuerdo con esto, si un neurotransmisor modulador, como la dopamina, controla la maquinaria de liberación a nivel presináptico, debería de modificar la

tasa S2/S1. Una manera de hacerlo sería a través de modificar la entrada de calcio durante la llegada de los potenciales de acción a las terminales sinápticas. En caso de que la dopamina inhibiera la transmisión disminuyendo la entrada de calcio a la terminal, nosotros observaríamos una mayor facilitación sináptica. Por otro lado, si la dopamina facilitara la transmisión sináptica obtendríamos una depresión sináptica.

Para evaluar el efecto de fármacos agonistas (e.g., selectivos a los receptores de las clases de receptores dopaminérgicos D1 y D2) se analizan entonces los cambios en la tasa o razón de pulsos pareados (*RPP*). Para medirla, las amplitudes se obtienen del promedio de 25 trazos para cada una de las condiciones una vez alcanzado el estado estable, en control, y una vez que el fármaco ha alcanzado el equilibrio (la concentración deseada en el baño).

Otra metodología independiente para demostrar que un cambio en la respuesta sináptica es de origen presináptico es el “Análisis de la Varianza” de las respuestas sinápticas desarrollado por Clements y Silver (2000). Para este análisis usamos trenes de estímulos. Cada tren de estímulos constó de 10 estímulos dados a 25 Hz (el intervalo entre los estímulos del tren fue de 40 ms). Se dieron entre 80 y 120 trenes en distintos experimentos, aplicando un tren cada 10 segundos (0.1 Hz). Esto se hizo en condiciones control y en presencia de los agonistas moduladores. Si se grafica en las abscisas la amplitud promedio de cada respuesta del tren contra (ordenadas) la varianza de la respuesta, el resultado es una parábola, pues es fácil de ver que si la probabilidad de liberación es muy baja (cercana a cero), la amplitud de la respuesta será pequeña y la varianza también, pues muy pocos botones o sitios de liberación estarán liberando. En contraste, si la probabilidad de liberación es muy alta (cercana a uno), la amplitud será grande pero la varianza será pequeña, pues todos los botones liberarán casi sin fallar. Esto es, en los dos extremos de amplitud habrá varianzas pequeñas. En las amplitudes intermedias, sin embargo, habrá todo un rango de varianzas posibles debido a que si la probabilidad de liberación es

cercana, digamos, a 0.5, en cada estímulo unos botones liberarán y otros no, lo que hace que la varianza en la amplitud de la respuesta sea muy grande. Con las diez respuestas del tren se aspira entonces a tener puntos suficientes para ajustar una parábola o parte de ella, pues la gráfica de amplitud contra varianza de las respuestas se ajusta a una función teórica derivada de la estadística de la forma (Eq. 1):

$$y = Ax - Bx^2$$

Los datos se ajustaron con ayuda del algoritmo de Marquard (ver Fig. 18 de los resultados). El parámetro  $A$  indica la pendiente inicial de la parábola, mientras que  $B$  es un parámetro relacionado con el ancho de la parábola. Del ajuste se puede, en teoría, determinar la amplitud cuántica o cuanto sináptico promedio con la siguiente ecuación (Eq. 2):

$$Q_w = A / (1 + CV^2)$$

donde  $CV$  es el coeficiente de variación de la amplitud de la IPSC. Esto quiere decir que la amplitud del cuanto sináptico depende de la pendiente de la parábola. Por lo tanto, esta no debe de cambiar de manera significativa si el cambio se debe a mecanismos presinápticos, y por lo contrario, debe de cambiar, si la modulación es de origen postsináptico. También podemos aproximarnos al número de sitios de liberación ( $N$ ) y a la probabilidad de liberación ( $P$ ) asumiendo una distribución binomial), empleando las siguientes ecuaciones (Eq. 3 y 4):

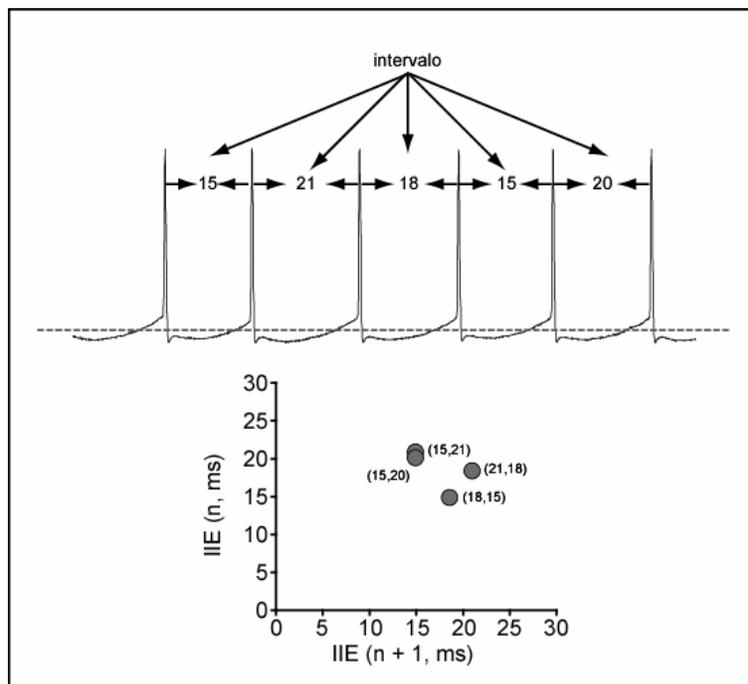
$$N = 1 / B$$

$$P = x (B / A)(1 + CV^2)$$

Lo que quiere decir que  $N$  depende del ancho de la parábola, que es de esperarse pues define el intervalo de amplitudes entre la menor y la mayor respuesta. Acaso el parámetro más problemático con este método es  $P$ , pues depende de ambos parámetros y asume una  $P$  promedio entre todos los botones o sitios de liberación (supuesto de la distribución binomial de donde se derivan las anteriores ecuaciones) lo cual podría no ser realista en numerosas situaciones experimentales.

Para cada neurona postsináptica se realizaron curvas de corriente contra voltaje (I-V) tanto en fijación de voltaje como en fijación de corriente con un promedio de ~150 puntos en el estado estable. De este modo obtuvimos la relación corriente vs voltaje para asegurarnos que la resistencia de entrada, y la participación global de las corrientes iónicas, en el voltaje de mantenimiento en el que se registraban las respuestas sinápticas, se mantenían estables. Estas curvas I-V también resultaron de utilidad para clasificar a las neuronas postsinápticas (dopaminérgicas y GABAérgicas).

Del lado postsináptico nos interesó el mecanismo de disparo de las neuronas de la SNr. Además de ilustrar su disparo en función del tiempo antes y después de los cambios farmacológicos, graficamos el intervalo entre espigas subsiguientes, tanto para los potenciales de acción entre ráfagas como intra ráfagas. A estas graficas se les conoce como diagramas de Poincaré (Fig. 10).

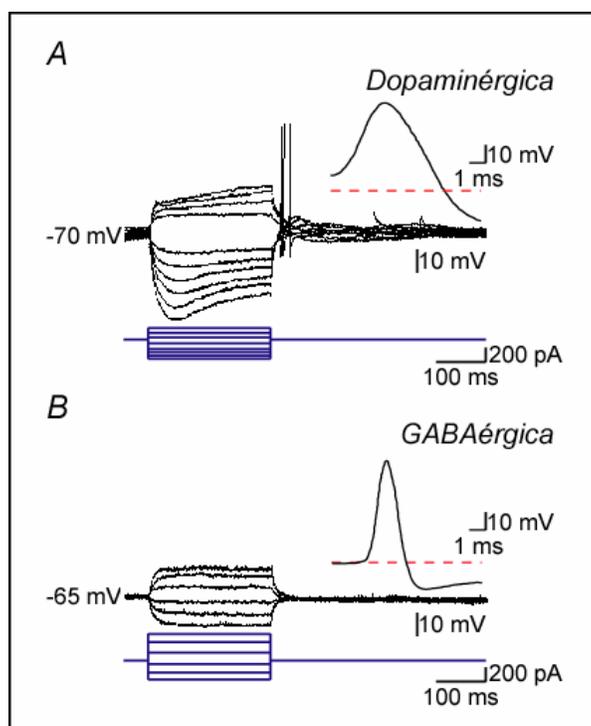


**Figura 10. Construcción de un diagrama de Poincaré.** Se obtienen los intervalos entre espigas y se grafican contra el intervalo anterior. De esta manera, se muestra la regularidad del disparo.

## 5.5 Identificación de las neuronas de la sustancia negra reticular

Las neuronas que componen a la SNr son GABAérgicas y proyectan a los circuitos cortico-talámicos que controlan los movimientos y a los núcleos del tallo cerebral tales como el *núcleo pedúnculo pontino*, **NPP**; el *colículo superior*, **CS**; y la *formación reticular*, **FR** (Jiang et al., 2003; Smeets et al., 2000; Takakusaki et al., 2004; Tsumori et al., 2002) (ver Fig.1). La mayoría contiene parvalbúmina (Gerfen et al., 1985; González-Hernández y Rodríguez; 2000; Hontanilla et al., 1997; Parent et al., 1996; Rajakumar et al., 1994). Sin embargo, un porcentaje (~24%) de las neuronas que componen a la SNr son neuronas dopaminérgicas, que no contienen parvalbúmina (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997; González-Hernández y Rodríguez; 2000; Rohrbacher et al., 2000). Por lo tanto, en nuestro trabajo fue necesario distinguir a las neuronas dopaminérgicas (que proyectan al estriado) de las neuronas GABAérgicas (que proyectan a los núcleos premotores del tálamo y del tallo cerebral) y que constituyen la vía de salida de los ganglios basales. Esta identificación se hizo tanto por técnicas electrofisiológicas (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997; Rohrbacher et al., 2000) como inmunocitoquímicas.

Como se muestra en la figura 11 ante pulsos hiperpolarizantes de corriente, las neuronas dopaminérgicas presentan una deflexión en el voltaje (denominada rectificación anómala) que es mucho menor en las neuronas GABAérgicas. Además, la duración del potencial de acción de las neuronas dopaminérgicas es mayor que el de las GABAérgicas (Fig. 11B y 11D). De esta manera se identificó a las neuronas GABAérgicas de la SNr, únicas que se estudiaron en la presente tesis. Aunado a esto, las neuronas fueron marcadas intracelularmente con biocitina durante el registro electrofisiológico, y luego, mediante el doble marcado, se confirmó si presentaban inmunoreactividad para la parvalbúmina (ver métodos de inmunocitoquímica).



**Figura 11. Identificación electrofisiológica, mediante fijación de corriente, de las neuronas GABAérgicas de la sustancia negra reticular.** En A se muestra la respuesta de una neurona dopaminérgica ante la aplicación de pulsos de corriente. Obsérvese que en respuesta a la hiperpolarización el voltaje muestra una clara deflexión que las neuronas GABAérgicas no presentan (B) o si la presentan es de mucho menor amplitud. La duración del potencial de acción de las neuronas dopaminérgicas es mayor que en las neuronas GABAérgicas (compárense ambos insertos). Ver Richards et al., (1997).

## 5.6 Histoquímica de las neuronas registradas

Para la identificación morfológica de las neuronas registradas durante el experimento, se suplementa la solución interna de registro con 0.2% de biocitina (Sigma-Aldrich, St Louis, USA; Horikawa y Armstrong, 1988). Las rebanadas que contienen neuronas cargadas con biocitina se fijan en una solución de 4% de paraformaldehído y 1% de ácido pícrico durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavan con una solución salina amortiguada de fosfato de potasio (KPBS) durante 10 minutos, tres veces, para quitar el exceso de fijador. Al terminarse de lavar, las rebanadas se incluyen en agar al 7% y posteriormente se

cortan en un vibratomo obteniéndose rebanadas de 80  $\mu\text{m}$  de espesor en presencia de KPBS. Después de obtener las rebanadas se incuban en PBS que contiene 0.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 minutos para suprimir la actividad endógena de la peroxidasa. Después se lavan y se incuban en una solución salina TRIS-amortiguada (TBS) que contiene tritón X-100 y el complejo avidina-peroxidasa (1:100; Vector, Burlingham, CA, USA.) que se fija, con alta afinidad, a la biotina liberada intracelularmente por la biocitina al incubarse por 4 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las rebanadas con PBS se hacen reaccionar con 0.05% de tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina y 0.003% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en TBS. Esto produce el marcado celular, equivalente a la tinción de Golgi y que permite observar la morfología somatodendrítica al montarlas en portaobjetos gelatinizados e inspeccionarlas bajo el microscopio. Con ayuda de una cámara lúcida se reconstruyeron algunas de las neuronas registradas, y en muchos casos, se pudo seguir su axón fuera de la SNr (ver Fig. 14 de resultados), demostrando que se trataba de neuronas de proyección.

## **5.7 Inmunocitoquímica: *doble y triple marcado***

Algunas rebanadas que contenían neuronas registradas y cargadas con biocitina fueron procesadas de forma similar a las anteriores, excepto que se obtuvieron rebanadas de 40  $\mu\text{m}$  de espesor en presencia de KPBS. Para la visualización de las neuronas, las rebanadas se incubaron con avidina conjugada a Cy3 – en lugar de peroxidasa (1:200 disuelta en PBS, Zymed Laboratories, San Francisco CA, USA). Esto revelaba a las neuronas registradas. Posteriormente, las rebanadas se incubaban durante 30 minutos con albúmina sérica bovina al 1% (BSA) para bloquear sitios inespecíficos. A lo que seguía una incubación durante 36 horas con un anticuerpo monoclonal primario, extraído de ratón, contra parvalbúmina (PV; 1:2000, Sigma-Aldrich, St Louis, USA, disuelto en PBS conteniendo 0.25% de tritón X-100). Después, las rebanadas fueron lavadas con PBS durante 10 minutos por tres veces e incubadas durante 1 hora con un anticuerpo secundario, anti-ratón, extraído de cabra, y conjugado con Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA, USA). De esta manera, las neuronas marcadas

con biocitina (Cy3), y que además expresaban parvalbúmina (Cy5) (GABAérgicas de la SNr), presentaban doble marcado. Las rebanadas fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia de marca vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA. USA). Luego se observaron con un microscopio confocal (Bio-Rab Microscience UK). Cuando se necesitó triple marcado, para confirmar la presencia de la subunidad  $\alpha_{1H}$  de los canales de calcio tipo T en neuronas registradas, llenadas con biocitina (Cy3) y GABAérgicas (Cy5), se desmontaban de su portaobjetos, se bloqueaban los sitios inespecíficos con 1 % de BSA durante 30 minutos y se incubaban una vez más con otro anticuerpo, policlonal extraído de cabra, contra la subunidad  $\alpha_{1H}$  del canal durante 36 horas (1:100, Santa Cruz, California. USA, disuelto en PBS conteniendo 0.25% de tritón X-100). Las rebanadas se lavaban con PBS durante 10 minutos por tres veces y se incubaban con un anticuerpo secundario, anti-cabra, conjugado con fluoresceína (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA. USA). Después de tres lavados de 10 minutos cada uno, las rebanadas se montaban y visualizaban al microscopio.

## **5.8 Fármacos**

Los fármacos se obtuvieron de: Sigma-Aldrich, Alomone labs. y TOCRIS. Se preparaban en soluciones madre diluyéndolos en agua (a excepción del CNQX que se disolvía en DMSO), y se mantenían en refrigeración (4 a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente, se adicionaban a la solución salina de registro, durante el experimento, y a la concentración deseada.

**Tabla 2. Lista de los fármacos empleados y la concentración utilizada.**

<i>Fármaco</i>	<i>Acción</i>	<i>Concentración (<math>\mu\text{M}</math>)</i>
quinpirole	Agonista D2 / D3 / D4	1.0
sulpiride	Antagonista D2 / D3	1.0
bicuculina	Antagonista del receptor GABA <sub>A</sub>	10.0
CNQX	Antagonista del receptor AMPA/kainato	10.0
AP-5	Antagonista del receptor NMDA	50.0
NMDA	Agonista del receptor NMDA	10.0
ZD7288	Bloqueador de los canales HCN	50.0
calcicludina	Bloqueador inespecífico de los canales de Ca <sup>2+</sup> HVA	0.05
NiCl <sub>2</sub>	Bloqueador de los canales de Ca <sup>2+</sup> LVA	40 - 80.0
TTX	Bloqueador de los canales de sodio	1.0
apamina	Bloqueador canales de potasio activados por calcio SK	0.2 – 0.3
TEA-Cl	Bloqueador de los canales de potasio activados por calcio BK	500

## Capítulo 6

### Resultados

(parte 1)

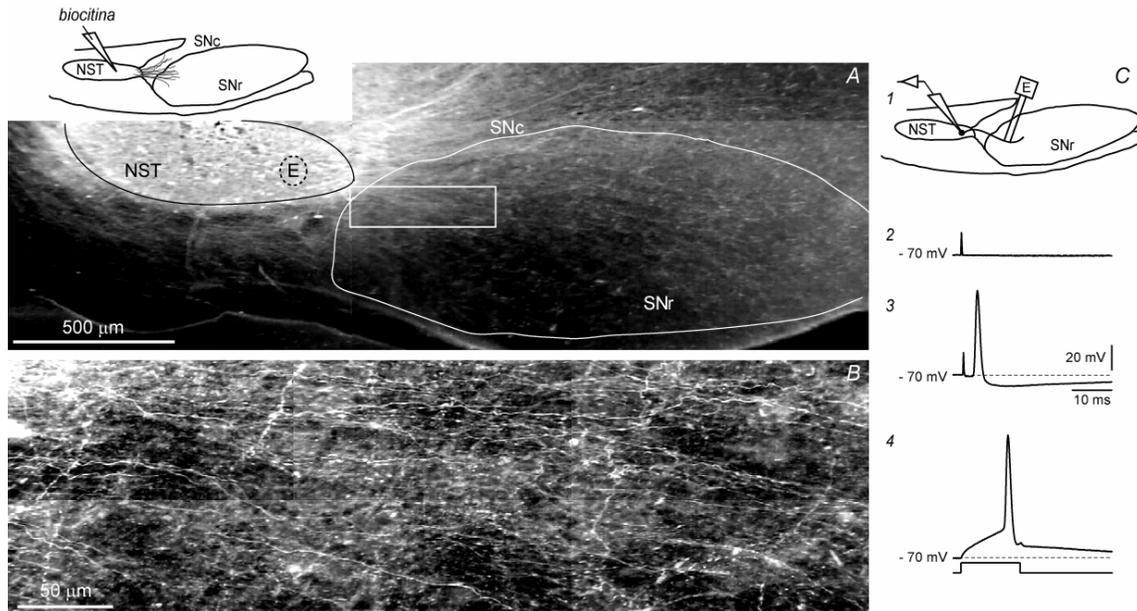
#### 6.1 La conexión subtálamo-nigral.

Como se describió anteriormente (ver métodos), la presencia de la conexión subtálamo-nigral en nuestra preparación se demostró después de teñir, mediante transporte anterógrado de biocitina, fibras provenientes del NST que se adentraban en la SNr (Fig. 12, A y B). En el lugar donde estas fibras eran abundantes, de acuerdo al marcado con biocitina, se estimulaba mientras se registraban neuronas del NST (ver Fig. 12, 1C). Con esta disposición experimental, y con intensidad umbral, provocamos potenciales de acción antidrómicos en las neuronas del NST en el 50% de los casos (Fig. 12, 2C y 3C). De esta manera pudimos verificar la integridad de la vía mediante ambos métodos, anatómicos y fisiológicos.

En su mayoría, las neuronas subtalámicas que proyectan a la SNr estaban localizadas en la parte posterior del NST (ver Fig. 12A “E”). La prueba de que los potenciales registrados eran antidrómicos es que podían ser provocados en ausencia de respuestas sinápticas; además de que no hay ninguna descripción de una vía nigro-subtalámica. Así, los potenciales de acción provocados mediante la inyección de corriente en el soma de neuronas del NST (Fig. 12, 4C), colisionaban con los potenciales antidrómicos (datos no mostrados).

Una vez verificada la integridad de la vía mediante los métodos arriba descritos, estimulamos el sitio preciso donde se registraban los potenciales antidrómicos de las neuronas del NST. Al mismo tiempo registrábamos en neuronas de la SNr. La estimulación ortodrómica de la vía provocaba respuestas (corrientes) postsinápticas excitadoras (EPSCs) en las neuronas de la SNr, en el

50% de los casos (ver métodos). Cualquier lugar fuera de este sitio tenía una menor probabilidad de provocar una respuesta sináptica en las neuronas de la SNr (Fig. 12A “E”). Fuera del NST esta probabilidad se reducía a cero. Así, tenemos una razonable evidencia de que el estímulo de campo dentro del NST, en la zona indicada de la rebanada sagital del cerebro de la rata (Fig. 12A “E”), es la fuente de los EPSCs registrados en presencia de bicuculina (10  $\mu$ M).



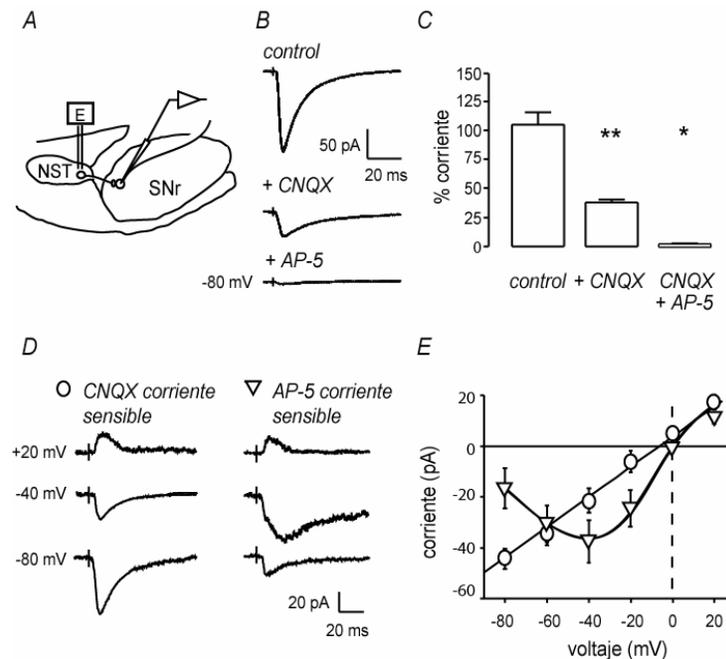
**Figura 12. Fibras de la vía subtálamo-nigral.** A: La rebanada sagital muestra el núcleo subtalámico (NST) a la izquierda, y la sustancia negra reticular a la derecha (SNr). El inserto en la parte superior izquierda, muestra un esquema de la inyección de biocitina dentro del NST. Después de la histoquímica (imagen negativa), pueden observarse numerosas fibras que salen del NST y proyectan hacia la sustancia negra compacta (SNc) y la SNr. B: La ampliación del recuadro en A muestra una región abundante en fibras de proyección subtálamo-nigral. Aquí se estimula para el experimento ilustrado en C. C: En (1) se ilustra la disposición experimental del estímulo de campo en la SNr mientras se registran neuronas en el NST. El estímulo umbral no provoca potenciales de acción o sinápticos en el 50% de los casos (2). Pero en el 50% de los casos sí se provocan potenciales de acción (3), que como acontecen sin estímulo sináptico subyacente (1), se consideran antidrómicos. En las neuronas del NST pueden también provocarse potenciales de acción de manera directa (4) que colisionan (no se muestra) con los estímulos antidrómicos.

En la figura 13 se ilustran eventos sinápticos provocados por la estimulación de la conexión subtálamo-nigral. En presencia de 10  $\mu$ M de bicuculina (Fig. 13B, control), el estímulo de campo dentro del NST (Fig. 13A) provocó eventos sinápticos en forma de corrientes entrantes en las neuronas de la SNr (Fig. 13B). La EPSC subumbral fue reducida, pero no totalmente bloqueada, por CNQX (10  $\mu$ M) a -80 mV (Fig. 13B, +CNQX). La adición subsiguiente de AP-5 (50  $\mu$ M) terminó de bloquear el evento sináptico (Fig. 13B, +AP-5). Esto quiere decir que la corriente sináptica tiene componentes AMPA y NMDA a -80 mV. El antagonista del receptor AMPA (CNQX), redujo la amplitud de la EPSC un 61% (media  $\pm$  E.S.), de  $102 \pm 12$  a  $40 \pm 2$  pA (Fig. 12C; n = 8; \* \*P <0.001; ANOVA no paramétrica – Friedman- con prueba post hoc Student-Newman-Keuls). La adición de AP-5 a la solución de registro en presencia de CNQX terminó de bloquear el componente sináptico ( $6 \pm 2$  pA; Fig. 12C; n = 8; \*P <0.01; Friedman con prueba post hoc Student-Newman-Keuls), lo que sugiere que un tercio de la corriente es mediada por la activación de los receptores a NMDA (Fig. 13C).

Si los componentes sinápticos bloqueados con los antagonistas a receptores AMPA y NMDA, son aislados mediante substracción digital (Fig. 13D, ver componentes sensibles a CNQX y AP-5), podemos construir la relación corriente-voltaje (gráfica I-V) para cada uno, utilizando diferentes potenciales de mantenimiento (Fig. 13E). El componente NMDA muestra un aumento (conductancia con pendiente negativa) durante la despolarización, alcanzando su amplitud máxima cerca de -40 mV (Fig. 13, D y E, X); lo que exhibe su dependencia del voltaje y su influencia para alcanzar el umbral de disparo que en estas células es alrededor de -45 a -50 mV (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997). En contraste, la corriente mediada por los receptores AMPA disminuye con la despolarización y tiene un comportamiento lineal (Fig. 13, D y E, -).

En la figura 14 se ilustran los dos tipos de neuronas que pueden ser registradas en la SNr (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997; Rohrbacher et al., 2000). El primer tipo (n = 24/114; Fig. 14, A y C) presenta una fuerte

rectificación que depende de tiempo y voltaje (Fig. 14A, a y c), no dispara a altas frecuencias ante pulsos de corriente despolarizante (ver más adelante), y tiene una gran rectificación saliente (Fig. 14d), incluyendo una corriente saliente rápida inicial y transitoria. Sumado a todo ello, sus potenciales de acción duran:  $2.3 \pm 0.1$  ms ( $n = 24$ ) medidos a la mitad de la amplitud máxima (Fig. 14Ca). Note que la gráfica I-V de estas neuronas NO exhibe una región de conductancia con pendiente negativa (Fig. 14Ad).



**Figura 13. Componentes AMPA y NMDA de las corrientes sinápticas de la vía subtalamo-nigral.** A: Esquema experimental: en una rebanada sagital, el estímulo de campo se realizó en el NST posterior mientras se registraban neuronas de la SNr (modalidad de fijación de voltaje, configuración de célula completa). B: Corriente postsináptica (EPSC) registrada en una neurona de la SNr. El trazo control (B, control) se provocó en presencia de  $10 \mu\text{M}$  de bicuculina. Al añadir  $10 \mu\text{M}$  de CNQX (B, trazo intermedio +CNQX) se redujo la EPSC, y al añadir  $50 \mu\text{M}$  de AP-5 (B, trazo inferior +AP-5) se terminó de bloquear la EPSC resistente a CNQX. El potencial de mantenimiento fue de  $-80 \text{ mV}$ . C: El histograma resume los resultados de la muestra experimental. El CNQX bloquea más del 60% (\*\* $P < 0.001$ ) de la EPSC mientras que el AP-5 termina de bloquearla: suprimiendo más del 35% (\* $P < 0.01$ ). D: componentes sensibles a CNQX y AP-5 de la EPSC obtenidos mediante substracción digital a diferentes potenciales de mantenimiento (trazos representativos). E: Las relaciones corriente-voltaje (gráfica I-V) de los componentes de la EPSC: AMPA = círculos vacíos (media  $\pm$  E.S.M.) y NMDA = triángulos vacíos. Note la linealidad del componente AMPA y la dependencia de voltaje del componente NMDA.

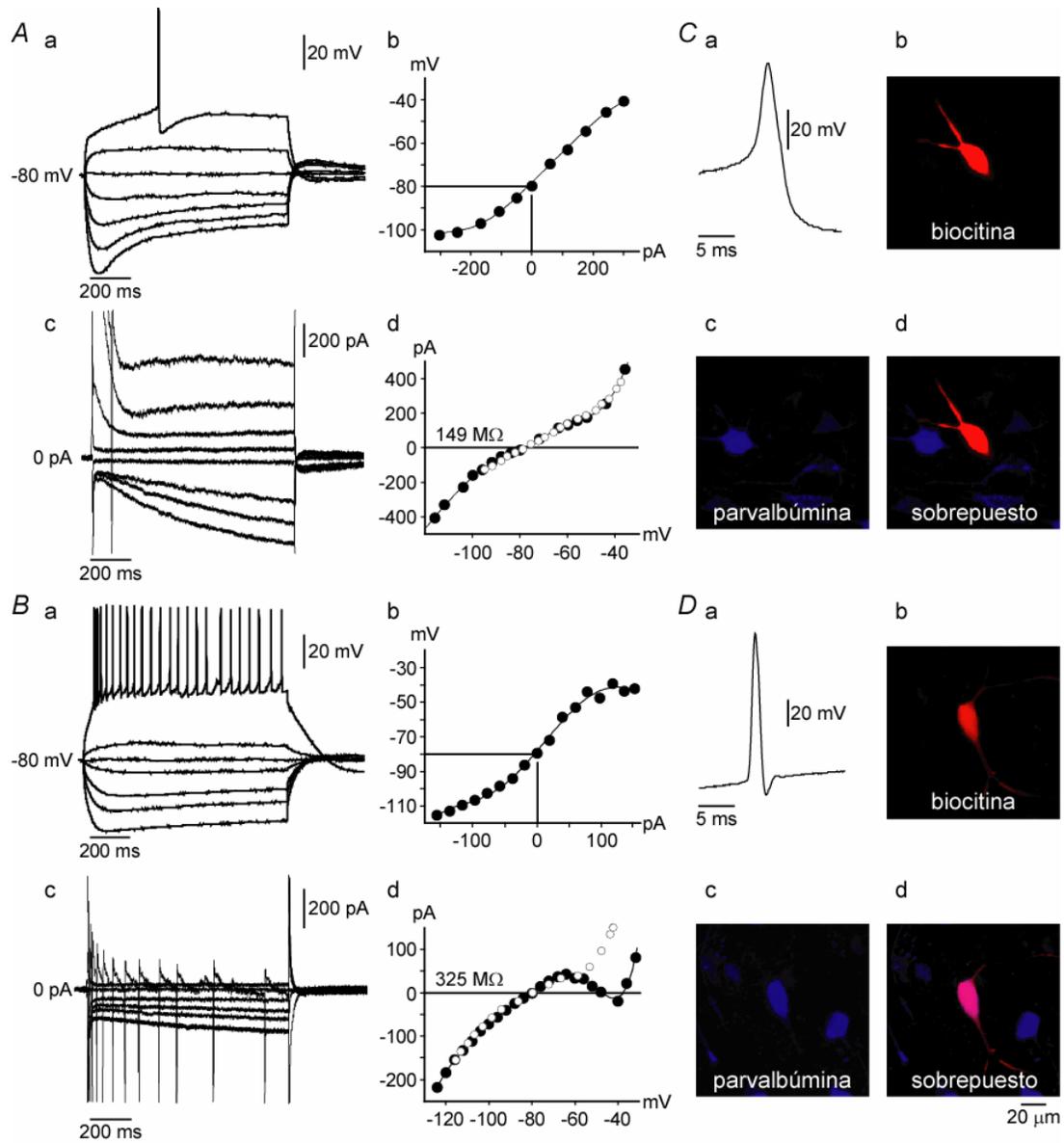
El segundo tipo de neurona más frecuentemente registrada,  $n = 90/114$ , puede disparar a altas frecuencias ante pulsos de corriente despolarizante (Fig. 14Ba), exhibe una rectificación anómala lenta dependiente de tiempo y voltaje (Fig. 14B, a y d), una rectificación saliente muy pequeña (Fig. 14Bc), y potenciales de acción mucho más breves que las del otro tipo (Fig. 14Da):  $0.73 \pm 0.01$  ms medidos a la amplitud media ( $n = 40$ ;  $P < 0.001$ , comparando a ambos tipos de neuronas con la prueba  $U$  de Mann-Whitney). Este tipo neuronal exhibe, de manera frecuente, una región de conductancia con pendiente negativa en su relación I-V (Fig. 14Bd); como se ve con la función obtenida de los registros de fijación de voltaje. El 60% de este tipo de neuronas fue inmunoreactiva a los anticuerpos contra parvalbúmina (Fig. 14D), mientras que las neuronas del primer tipo nunca lo fueron (Fig. 14C).

Se ha mostrado que las células positivas a parvalbúmina de la SNr contienen GAD67 y son neuronas GABAérgicas de proyección (Gerfen et al., 1985; González-Hernández y Rodríguez, 2000; Hontanilla et al., 1997; Parent et al., 1996; Rajakumar et al., 1994). Estos datos sugieren entonces que la mayoría de las neuronas registradas fueron GABAérgicas de proyección de la SNr. Por otro lado, estudios previos (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997; Rohrbacher et al., 2000), sugieren que el primer tipo de neuronas probablemente es dopaminérgica, aunque estén presentes en la SNr y no en la SNc. Finalmente, éstos dos tipos de neurona no difirieron significativamente en sus potenciales de membrana medidos entre el umbral de disparo y la amplitud máxima del intervalo entre espigas durante el disparo espontáneo:  $-55 \pm 5$  vs  $-58 \pm 2$  mV; para las neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas, respectivamente. La resistencia de entrada promedio de una muestra de neuronas fue de  $R_N = 169 \pm 14$  M $\Omega$  ( $n = 5$ ) para las neuronas dopaminérgicas y  $365 \pm 20$  M $\Omega$  ( $n = 10$ ) para las neuronas GABAérgicas, medida mediante la derivada de la función I-V a corriente zero ( $P < 0.002$ ,  $U$  de Mann-Whitney). En el presente trabajo, nosotros sólo nos referiremos a la respuesta sináptica registrada en el tipo más abundante de las neuronas de la SNr, es decir, las neuronas GABAérgicas. Algunas de ellas fueron reconstruidas

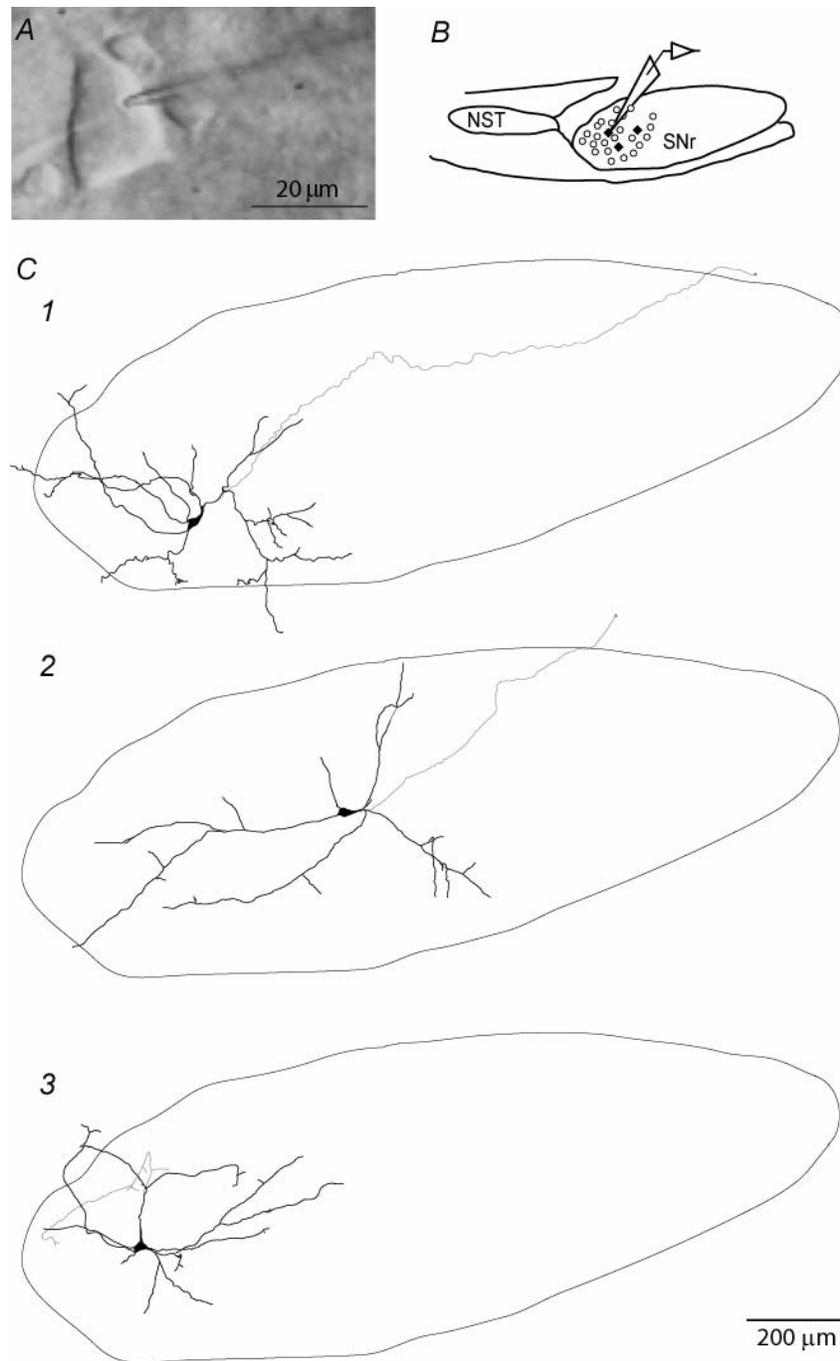
con ayuda de una cámara lúcida, y tres neuronas representativas se ilustran en la figura 15. El soma de las neuronas de la SNr (Fig. 15A, B) presentó inmunoreactividad a la parvalbúmina, exhibiendo formas triangulares o fusiformes bajo la videomicroscopia infrarroja, con un diámetro mayor de 18 a 22  $\mu\text{m}$ . Después de la reconstrucción (Fig. 15C), generalmente mostraban de cuatro a seis dendritas principales que se extendían rostrocaudalmente como se ve en una rebanada sagital. Se pudieron observar ramificaciones secundarias de las dendritas y del axón (Fig. 15C, en gris neuritas). En algunos casos, el axón pudo seguirse fuera de las fronteras de la SNr, lo que aunado a la inmunoreactividad a la parvalbúmina, reafirmaba la hipótesis de que eran las neuronas de proyección de la SNr: la proyección de los ganglios basales hacia el tálamo y el tallo cerebral.

## **6.2 La activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D1 facilita la vía subtálamo-nigral.**

La activación de receptores de la clase D1 con su agonista selectivo, SKF-38393 (1  $\mu\text{M}$ ; concentración saturante), aumenta de manera reversible la amplitud al pico de la EPSC en aproximadamente 30%, de  $106 \pm 17$  a  $140 \pm 23$  pA (Fig. 16A, B;  $n = 10$ ;  $P < 0.005$ ; prueba  $T$  de Wilcoxon). En presencia del antagonista del receptor tipo D1, SCH 23390 (1  $\mu\text{M}$ ), el SKF-38393 no hizo efecto ( $n = 4$ ; datos no mostrados; ver también Fig. 19), indicando que esta acción es específica. El efecto del agonista clase D1 fue acompañado por una disminución del 15% en la proporción de pulsos pareados (RPP) de  $1.3 \pm 0.08$  a  $1.1 \pm 0.09$ , mostrando que la primera respuesta incrementó más que la segunda (Fig. 16C, D;  $n = 8$ ;  $P < 0.02$ ;  $T$  de Wilcoxon). Los trazos sobrepuestos en la figura 16C demuestran que ni la forma ni la caída de la EPSC fue afectada durante la acción del SKF-38393 (1  $\mu\text{M}$ ). Asimismo, la resistencia de entrada en la configuración de célula-entera ( $R_N$ ) tampoco fue afectada. Por consiguiente, los experimentos sugieren que la acción de los receptores dopaminérgicos de la clase D1 ocurre a nivel presináptico, en las terminales subtálamo-nigrales, favoreciendo la transmisión glutamatérgica entre el NST y la SNr.



**Figura 14. Las dos clases de neurona registradas en la sustancia negra reticular.** A: Ejemplo representativo de la clase minoritaria. En *a* muestra una deflexión en el voltaje ante pulsos hiperpolarizantes de corriente. En *b* la relación corriente-voltaje (curva I-V) realizada en el modo de fijación de corriente no es lineal. En *c* los trazos de corriente después de comandos de voltaje hiperpolarizantes y despolarizantes. En *d* curvas I-V de los trazos de fijación de voltaje (círculos llenos) mostrando ambas rectificaciones: entrante y saliente. Los círculos vacíos representan la sobreposición de la curva I-V tomada en fijación de corriente (*b*) con los ejes invertidos. Esta sobreposición no sólo muestra el acuerdo entre las dos técnicas de registro sino que también habla de que la compensación de la resistencia en serie (fijación de voltaje) y la del puente (fijación de corriente), fueron correctas. B: Ejemplo representativo del tipo mayoritario de neuronas: En *a* nótese una débil (compárese con A) y más lenta deflexión (rectificación entrante) provocada por los pulsos hiperpolarizantes, note el disparo de alta frecuencia ante pulsos despolarizantes. En *b* la relación corriente-voltaje (curva I-V) medida en el modo de fijación de corriente no es lineal. En *c* los trazos de corriente después de comandos de voltaje hiperpolarizantes y despolarizantes muestran rectificación entrante dependiente de voltaje y tiempo y muy poca rectificación saliente comparada con la neurona ilustrada en A. La rectificación entrante también es menor comparada con la de la célula en A. En *d* la curva I-V en fijación de voltaje (círculos llenos) muestra una región de conductancia con pendiente negativa con dos cruces adicionales en el eje de la corriente sugestivos de la capacidad de generar bi-estabilidad en el potencial de membrana. Los círculos vacíos representan la curva I-V en fijación de corriente (*b*) sobrepuesta con los ejes invertidos. Hay total acuerdo entre las dos técnicas de registro. C: Las neuronas del tipo minoritario fueron inmunonegativas para parvalbúmina y presentaron potenciales de acción más duraderos. En *a* potencial de acción representativo de estas neuronas, en *b* neurona teñida con la técnica de la biocitina, en *c*, se ve que esta neurona no contiene parvalbúmina, en *d* la sobreposición de *b* y *c*. D: El tipo mayoritario de neuronas presentó inmunoreactividad a parvalbúmina presentando potenciales de acción más breves. En *a* potencial de acción, en *b* neurona teñida con la técnica de la biocitina, en *c*, neurona inmunoreactiva a parvalbúmina, en *d* la sobreposición de *b* y *c* muestra que la neurona llena con biocitina es inmunoreactiva a parvalbúmina.



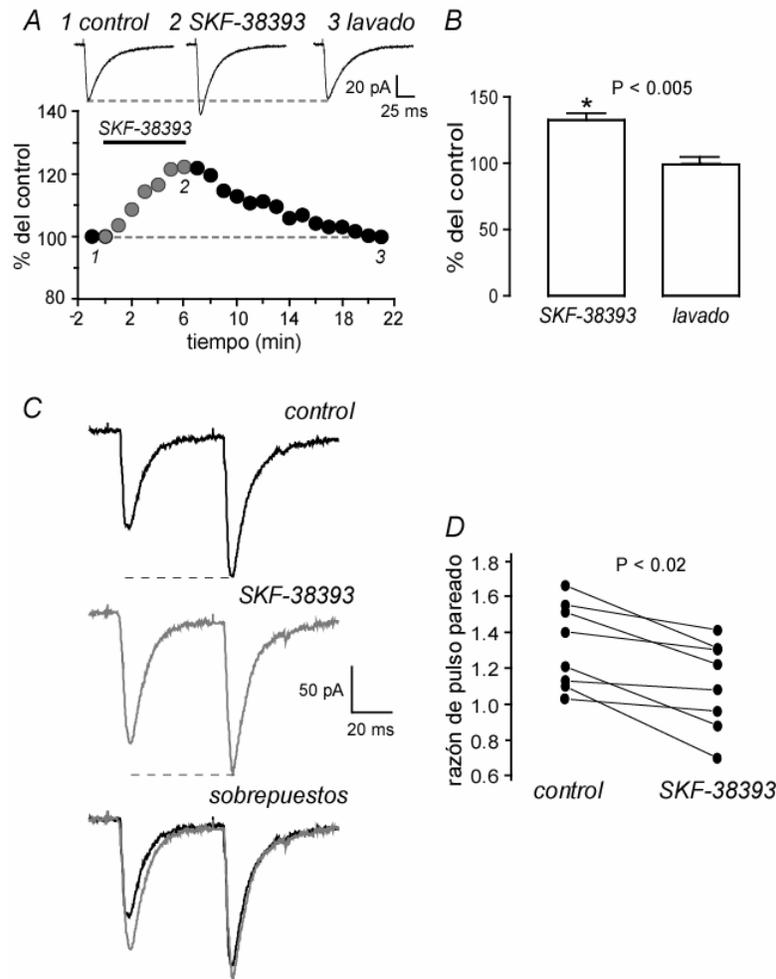
**Figura 15. Morfología del tipo de neuronas comúnmente registrado en la SNr.** A: Soma neuronal visto con videomicroscopía infrarroja en la SNr. Se ve la punta de la pipeta de registro. B: Zona dónde fueron registradas las neuronas. C: Ejemplos de reconstrucción neuronal. Note que los axones de las neuronas 1 y 2 pueden seguirse fuera de los bordes de la SNr.

### **6.3 La activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D2 inhibe la vía subtálamo-nigral**

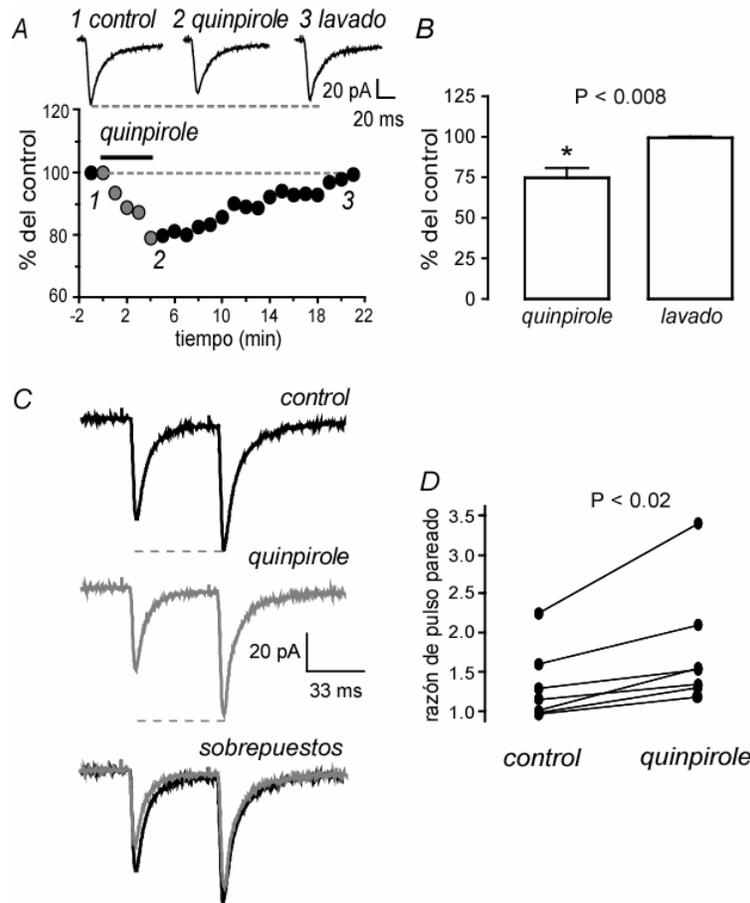
La activación de receptores de la clase D2 con el agonista específico, quinpirole (1  $\mu\text{M}$ ; concentración saturante), disminuye de manera reversible la amplitud de la EPSC en un 25%. La amplitud cae de  $89 \pm 17$  en el control a  $67 \pm 9$  pA después del agonista (Fig. 17A, B;  $n = 9$ ;  $P < 0.008$ ;  $T$  de Wilcoxon). En presencia del antagonista selectivo del receptor clase D2, sulpiride (1  $\mu\text{M}$ ), el quinpirole no mostró efecto ( $n = 5$ ; datos no mostrados; ver también Fig. 19); indicando una acción específica. El efecto del agonista clase D2 fue acompañado por un aumento de un 38% en la RPP (Fig. 17C, D;  $n = 7$ ;  $P < 0.02$ ;  $T$  de Wilcoxon). Los trazos sobrepuestos en la figura 17C no demuestra un cambio en la forma ni en la velocidad de caída de la EPSC durante la acción del quinpirole (1  $\mu\text{M}$ ). La  $R_N$ , no se vio afectada. Los experimentos sugieren que la acción de los receptores de la clase D2 ocurre a nivel presináptico, en las terminales subtálamo-nigrales, disminuyendo la transmisión glutamatérgica entre el NST y la SNr.

### **6.4 Análisis de la amplitud media vs la varianza de las EPSCs.**

Se provocaron y registraron trenes de EPSCs en neuronas de la SNr mientras se estimulaba en el NST (ver métodos). Las figuras 18, A y E ilustran un tren de estímulos a 25 Hz en la condición control, ilustrando la dinámica de corto plazo de esta conexión: la depresión sináptica. Se usaron las respuestas del tren de EPSCs para realizar el análisis de sus amplitudes promedio y de sus varianzas (ver métodos; también Koos et al., 2004) para confirmar de manera independiente que la acción dopaminérgica ocurre a nivel presináptico (Clements y Silver, 2000). El agonista del receptor de la clase D1, el SKF-38393 (1  $\mu\text{M}$ ), favorece más la depresión sináptica debido a un incremento de amplitud en la parte inicial del tren (compare la Fig. 18, A-C). En contraste, el agonista de los receptores de la clase D2, quinpirole (1  $\mu\text{M}$ ), reduce la depresión de corto plazo por un decremento en la amplitud de las EPSCs iniciales (compare la Fig. 18, E-G).



**Figura 16.** La activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D1 facilita la transmisión glutamatérgica subtálamo-nigral. A: Curso temporal de la acción de 1  $\mu$ M de SKF-38393, agonista del receptor clase D1, sobre la amplitud de la EPSC provocada. La barra negra indica el tiempo de aplicación del agonista y los trazos son registros representativos tomados a los tiempos indicados por los números. B: Histograma que resume los resultados de la muestra experimental: el agonista de los receptores clase D1 produce un aumento significativo en la EPSC. C: Respuestas ante pulsos pareados en condición control y en presencia de 1  $\mu$ M SKF-38393 (trazo gris en medio). El trazo de abajo muestra la sobreposición. No hay ningún cambio en el curso temporal de la EPSC durante la aplicación del agonista. D: El cambio en la proporción entre las respuestas a los pulsos pareados (EPSC2/EPSC1) siempre presentó una disminución en la facilitación sináptica.

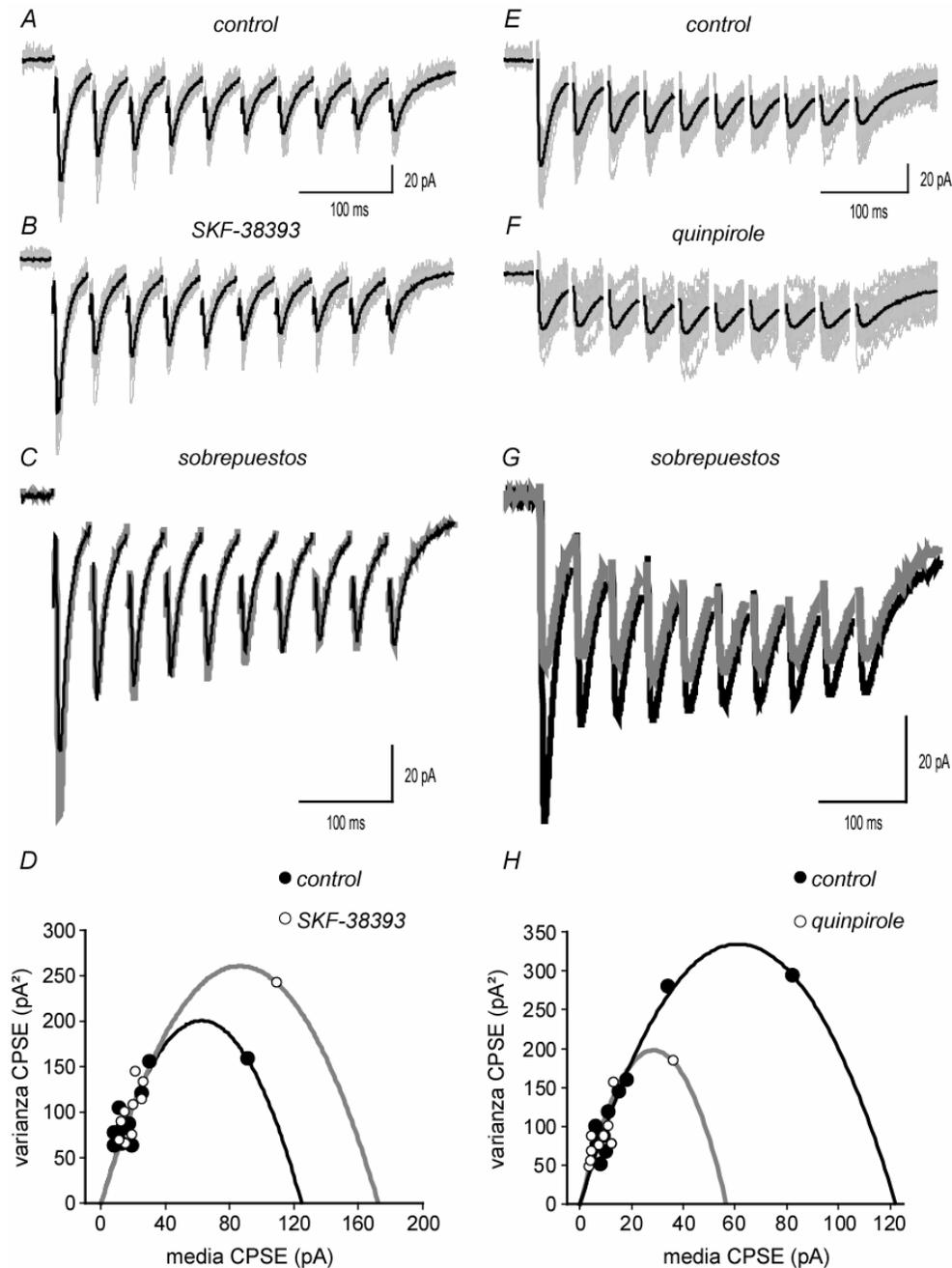


**Figura 17.** La activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D2 deprime la transmisión glutamatergica subtálamo-nigral. Curso temporal de la acción de 1  $\mu\text{M}$  de quinpirole, agonista de la clase de receptores D2, sobre la amplitud de la EPSC provocada. La barra negra indica el tiempo de aplicación del agonista y los trazos representativos están tomados del curso temporal como indican los números. B: Histograma que resume los resultados de la muestra experimental: el agonista del receptor de la clase D2 produce una disminución significativa en la amplitud de la EPSC. C: Respuestas ante los pulsos apareados en control y en la presencia de 1  $\mu\text{M}$  de quinpirole (trazo gris en medio). El trazo de abajo muestra la sobreposición. No hay ningún cambio en el curso temporal de la EPSC durante la aplicación del agonista. D: El cambio en la proporción entre las respuestas a los pulsos apareados (EPSC2/EPSC1) siempre presentó aumento en la facilitación sináptica.

La gráfica de la amplitud media vs la varianza en condiciones control (círculos llenos) y en presencia del agonista (círculos vacíos) muestra que la mayoría de los puntos se concentra en la parte inicial de la gráfica. El ajuste de la ecuación teórica (ver ecuación 1 en los métodos; Fig. 18, D y H; control = línea negra; con agonista dopaminérgico = línea gris) muestra que la pendiente inicial de la curva, determinada por el parámetro  $A$  (Eq. 1), no es significativamente diferente. Entonces, la amplitud cuántica,  $Q_W$  (Clements y Silver, 2000), no varió (Eq. 2): entre 5 y 9 pA ( $n = 4$ ). Esta amplitud cuántica es similar a la reportada en otras sinapsis glutamatérgicas del cerebro (Bolshakov y Siegelbaum, 1995; Paulsen y Heggelund, 1994). Por ejemplo, en el experimento mostrado en la figura 18D, el  $Q_W$  fue de  $6 \pm 0.6$  para el control y de  $6 \pm 0.5$  pA en presencia de SKF-38393, respectivamente. En la figura 18H, el  $Q_W$  fue de  $9 \pm 0.6$  para el control y  $9 \pm 2$  pA en presencia de quinpirole, respectivamente. No obstante, observe que el ancho de las parábolas teóricas ajustadas a los datos, determinado el parámetro  $B$  (Eq. 1), fue significativamente diferente para los datos obtenidos de las mismas neuronas en condiciones control y en presencia de los agonistas, como se muestra en las figuras 18 D y H. Cuando determinamos el número aproximado de sitios de liberación (Eq. 3), el agonista de la clase D1 produjo un aumento de  $N$ , de  $19 \pm 3$  a  $29 \pm 4$  (Fig. 18D;  $P < 0.01$ ;  $t$  Student, para el parámetro  $B$ ), y el agonista de la clase D2 produjo una disminución de  $N$ , de  $11 \pm 3$  a  $4 \pm 1$  (Fig. 18H;  $P < 0.01$ ;  $t$  Student, para el parámetro  $B$ ). Por lo tanto, se concluye que los cambios significativos ocurren en el parámetro presináptico  $N$  sin verse afectado el parámetro postsináptico  $Q_W$ . Esto quiere decir que la acción dopaminérgica es la de aumentar o disminuir el número de botones (sitios) sinápticos que participan en la liberación de transmisor, lo que explicaría las acciones facilitadoras (D1) e inhibitoras (D2), respectivamente.

Sin embargo, este método no fue tan bueno para detectar cambios en la probabilidad de liberación, que requiere de ambos parámetros  $A$  y  $B$  (Eq. 3) (Clemens y Silver, 2000). Así, en presencia del agonista clase D1 la  $P$  cambió de  $0.22 \pm 0.1$  a  $0.17 \pm 0.1$ , y en presencia del agonista clase D2 cambió de  $0.22 \pm$

0.05 a  $0.29 \pm 0.05$ . Ninguna de estas diferencias fue significativa. Pensamos que esto se debe a que el modelo supone una  $P$  promedio siguiendo una distribución binomial. Acaso, estas terminales posean muy diversos valores de  $P$ , y al obtener el promedio no se ve un cambio. Sin embargo, para la finalidad del presente trabajo, este confirma que el control dopaminérgico sobre la transmisión subtálamo-nigral ocurre a nivel presináptico.

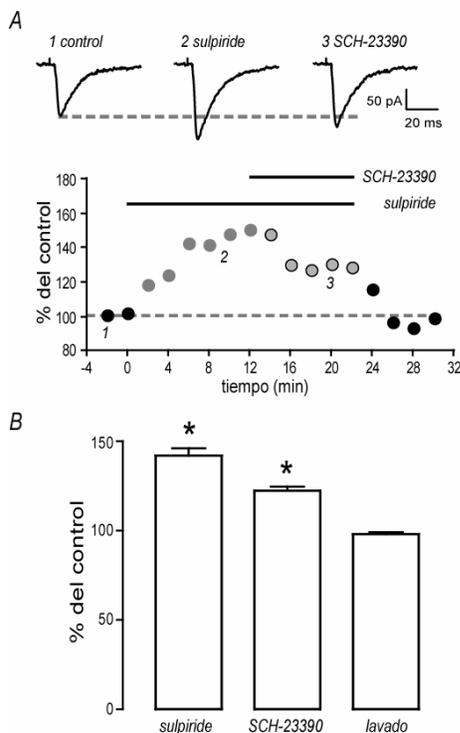


**Figura 18. Análisis varianza-amplitud de la EPSC subtálamo-nigral.** A y E: Un tren de diez estímulos a 25 Hz provoca EPSCs que exhiben depresión de corto plazo en dos diferentes neuronas registradas en condiciones control. Los trazos negros representan el promedio de 85 (A) y 105 (E) trazos consecutivos. Los trazos grises son trazos individuales que ilustran la variación cuántica de las amplitudes. B y F: repetición del experimento en presencia de 1  $\mu$ M SKF-38393 (90 trazos en B) o 1  $\mu$ M de quinpirole (120 trazos en F). Los colores de los trazos son como en A. Note aumento de la depresión de corto plazo después del agonista de clase D1 y la disminución de la depresión de corto plazo después del agonista de la clase D2 se sobreponen. D y H: curvas varianza-amplitud obtenidas de los registros en A, B, E y F. Círculos llenos para las condiciones control y vacíos para la acción de los agonistas. Los ajustes de las curvas teóricas (Eq. 1 en métodos) se representan en negro para los datos control y en gris para las acciones dopaminérgicas. Note que en ninguno de los casos se nota un cambio significativo en las pendientes iniciales de las curvas. Lo que cambia es el ancho de las mismas: aumenta para la acción D1 y disminuye para la acción D2.

## 6.5 Los receptores dopaminérgicos presinápticos exhiben actividad constitutiva.

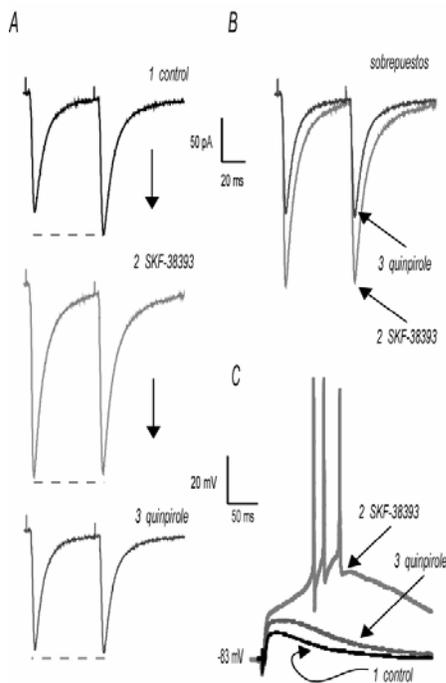
Las neuronas del NST poseen actividad tónica manifestada por un disparo espontáneo de tipo marcapaso más o menos regular en condiciones control (Beurrier et al., 1999; Bevan y Wilson, 1999). Esta actividad podría conducir a un nivel de excitación basal de las neuronas de la SNr y de la SNc que dependería de la frecuencia de disparo de las neuronas del NST. La activación continua de las neuronas dopaminérgicas en la SNr o en la SNc (Iribe et al., 1999; Kanazawa et al., 1977) puede llevar a una liberación tónica de dopamina en la SNr (Falkenburger et al., 2001; Mintz et al., 1986; Richards et al., 1997; Rohrbacher et al., 2000; Rosales et al., 1994, 1997). Entonces, si hay niveles tónicos de dopamina en el intersticio, habría que explorar si los receptores a dopamina están siendo tónicamente activados. Esto se realizó administrando antagonistas de los receptores dopaminérgicos. La figura 19A ilustra que el antagonista clase D2, sulpiride (1  $\mu$ M), incrementa por sí solo la amplitud de la EPSC en un 44% al pasar de  $101 \pm 9$  a  $146 \pm 13$  pA (Fig. 19, A y B;  $n = 9$ ;  $P < 0.01$ , prueba de Friedman con prueba post hoc Student-Newman-Keuls). Como si se estuviera bloqueando una acción tónica inhibitoria del receptor clase D2. Si de manera secuencial, y sin lavar

el antagonista clase D2, se agrega ahora el antagonista clase D1, SCH 23390 (1  $\mu$ M; antagonista D1), la amplitud de la EPSC se ve reducida un 15% al pasar de  $146 \pm 13$  a  $124 \pm 12$  pA (Fig. 19, A y B;  $n = 9$ ;  $P < 0.01$ , Friedman con Student-Newman-Keuls post hoc para la comparación entre muestras en presencia de sulpiride y sulpiride + SCH 23390). Como si ahora se bloqueara una acción tónica del receptor D1. Note que en presencia de ambos antagonistas la amplitud de la EPSC es mayor que en la condición control (Fig. 19A3); sugiriendo que la acción tónica del receptor D2 predomina en esta condición. Todos estos efectos fueron reversibles. Los experimentos sugieren que la transmisión subtálamo-nigral está continuamente controlada por la dopamina liberada por las neuronas dopaminérgicas vecinas. Estos resultados también muestran que, las terminales que hacen sinapsis sobre una misma neurona de la SNr pueden tener ambas clases de receptor, D1 y D2.



**Figura 19. Actividad constitutiva de los receptores dopaminérgicos presinápticos.** A: Curso temporal de las acciones secuenciales de los antagonistas de las clases D2, sulpiride (1  $\mu$ M), y D1, SCH 23390 (1  $\mu$ M) sobre la amplitud de la EPSC. Los trazos superiores ilustran registros obtenidos a diferentes momentos del curso temporal. B: Histograma que resume los experimentos de una muestra experimental (\* $P < 0.01$ ).

También se agregaron de manera secuencial los agonistas de las clases D1 y D2 para observar sus acciones sobre la RPP. En el ejemplo de la figura 20 se observa que el agonista D1, SKF-38393 (1  $\mu$ M), cambió la tasa de las respuestas a los pulsos pareados de facilitación sináptica en la condición control (Fig. 20A; arriba) a depresión sináptica durante la acción D1 (Fig. 20A; en medio). La adición subsiguiente de quinpirole (1  $\mu$ M), en la presencia continua de SKF 38393, redujo de nueva cuenta los eventos sinápticos así como la depresión sináptica (Fig. 20A; abajo). Esto es, ambos agonistas pueden actuar simultáneamente modulando la probabilidad de liberación. Un experimento similar se realizó con fijación de corriente para observar si estas acciones pueden influir en el disparo neuronal. Note que la acción D1 cambia la amplitud del potencial sináptico de sub a supraumbral provocando tres disparos, mientras que la acción D2 subsiguiente regresa la respuesta a niveles subumbrales (Fig. 20C). Estos es, la dopamina controla las conexiones sinápticas subtálamo-nigrales, controlando la salida de los ganglios basales.



**Figura 20. Los receptores de las clases D1 y D2 situados en las terminales *subtálamo-nigrales* controlan la salida de las neuronas nigrales SNr. A:** Respuestas a un par de estímulos: la facilitación sináptica control (1) se convierte en depresión sináptica después de adicionar 1  $\mu$ M de SKF-38393 (2). Esta depresión se pierde después de añadir 1  $\mu$ M de quinpirole (3). B: Sobreposición de los trazos en A2 y 3. C: En fijación de corriente la activación del receptor D1 transformó el evento sináptico de sub (1) a supraumbral (2). La adición subsiguiente de quinpirole regresó el evento a ser subumbral (3).

## Capítulo 7

### Discusión de la parte presináptica

Los resultados muestran que la dopamina en la sustancia negra reticular controla la excitación glutamatérgica proveniente del núcleo subtálmico a nivel presináptico. Esto lo hace a través de receptores de las clases D1 (D1 y/o D5) y D2 (D2, D3 y/o D4). Los receptores de la clase D1 facilitan la transmisión sináptica excitadora subtálamo-nigral, mientras que los receptores de la clase D2 la reducen. Fisiológicamente, ambos receptores pueden estar activados de manera simultánea, predominando uno o el otro, dependiendo de la concentración de dopamina en el espacio extracelular. De manera interesante, una parte importante de la acción excitadora que ejerce el núcleo subtálmico sobre la sustancia negra reticular es mediada a través de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA. Además, las neuronas de la sustancia negra reticular exhiben una región de conductancia con pendiente negativa en su relación corriente - voltaje (I-V). La unión de ambos factores sugiere que estas neuronas poseen la capacidad intrínseca para disparar tónicamente (tienen corrientes de marcapaso) por lo que bastaría un incremento ligero en la excitación para que esta capacidad se exprese, generando quizá, una gran variedad de patrones temporales de disparo. Estos primeros hallazgos de la primera parte de la tesis nos llevaron a tratar de confirmar dichas hipótesis, por lo que fuimos a demostrar que, de hecho, la adición del agonista glutamatérgico NMDA, basta para que las neuronas de la SNr cambien su patrón temporal de disparo de uno tónico a otro oscilatorio en forma de ráfagas; ver capítulo 8.

## **Control dopaminérgico de la vía subtálamo-nigral a nivel presináptico.**

Para una descripción más completa de estos Resultados véase el trabajo publicado adjunto: Ibáñez-Sandoval et al. (2006).

Trabajos previos han mostrado que el protocolo de pulsos pareados es un método confiable para demostrar que una modulación de la transmisión sináptica acontece a nivel presináptico (e. g., Dunwiddie y Haas, 1985; ver Kamiya y Zucker, 1994; Zucker, 1999). Por ejemplo, este protocolo ha demostrado que el sitio de acción de los receptores a dopamina de las clases D1 y D2 es a nivel presináptico en varios núcleos de los ganglios basales tales como: a) las sinapsis que interconectan a las neuronas de proyección del estriado mediante sus colaterales axónicas locales (Guzmán et al., 2003; Salgado et al., 2005), b) la entrada sináptica a las interneuronas colinérgicas del estriado (Pisani et al., 2000; Momiyama y Koga, 2001), c) la transmisión excitadora que llega a las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (Koga y Momiyama, 2000), o d) la transmisión inhibitoria estriado-nigral (Radnikow y Misgeld, 1998) o estriado-palidal (Cooper y Stanford, 2001).

En muchos casos, se han usado protocolos adicionales al de los pulsos pareados para demostrar la modulación presináptica, tales como: a) el análisis de la frecuencia de los eventos cuánticos y/o espontáneos de la transmisión GABAérgica estriado-palidal (Cooper y Standford, 2001), b) métodos de biología molecular, usando ratones KO y lesionando con 6-OH-dopamina, c) métodos de fluorescencia en la transmisión cortico-estriatal (Bamford et al. 2004; Tang et al., 2001), etc. En el presente trabajo, decidimos emplear, además de los pulsos pareados, el análisis “varianza-amplitud” propuesto por Clements y Silver (2000). Encontramos que ambos protocolos coinciden en demostrar un sitio presináptico para los receptores dopaminérgicos.

Nuestros resultados mostraron que la activación de receptores a dopamina del tipo D1 facilitan, mientras que la activación de receptores del tipo D2 deprimen, la transmisión sináptica excitadora subtálamo-nigral sobre las neuronas GABAérgicas de la SNr.

Este resultado contrasta con el encontrado en las terminales glutamatérgicas corticales que sólo presentan receptores de la clase D2 (Bamford et al., 2004; Cepeda et al., 2001; Flores-Hernández et al., 1997; Hernández-Echeagaray et al., 1998; Tang., 2001) y enseña que la distribución de los receptores a dopamina es selectiva, pues no todas las terminales excitadoras poseen ambas clases de receptor.

Las terminales de las colaterales axónicas que interconectan a las neuronas de proyección del neostriado también pueden poseer ambas clases de receptor a dopamina (Guzmán et al., 2003). Sin embargo, es probable que en ese caso los receptores estén segregados en diferentes terminales: los de la clase D2 en las terminales de las neuronas que componen la “vía indirecta” (o estrio-palidal que se continua con la vía pálido-subtálamo-nigral; de ahí el nombre de indirecta), y los de la clase D1, en las terminales de las neuronas que componen la “vía directa” (estrio-nigral) (Gerfen et al., 1990). No sabemos si exista segregación en el caso de las terminales subtálamo-nigrales, último paso de la vía indirecta, lo que tendría que investigarse más adelante (e. g., utilizando EPSCs provocadas con estimulación mínima).

En el presente trabajo nos limitamos a demostrar que la misma neurona postsináptica recibe contactos de aferentes con cualquiera de las dos clases de receptor, resultado semejante al obtenido en las neuronas del neostriado (Guzmán et al., 2003). Sin embargo, a diferencia de las neuronas de proyección del neostriado, está comprobado que muchas neuronas del subtálamo sí poseen ambas clases de receptor a dopamina (D1 y D2) (Baufreton et al., 2003; Ciliax et

al., 2000; Flores et al., 1999; Hurd et al., 2001; Khan et al., 2000; Svenningsson y Le Moine, 2002).

### **Importancia fisiológica.**

Aunque es bien sabido que el núcleo subtalámico (NST) es la principal entrada excitadora de las neuronas de proyección de la SNr (Bevan et al., 1994a, 1994b; Iribe et al., 1999; Kita y Kitai, 1987; Robledo y Feger, 1990), no podemos descartar otras aferentes excitadoras provenientes, por ejemplo, del tallo cerebral.

Se ha mostrado que la estimulación del núcleo subtalámico aumenta la liberación de dopamina en la SNr (Falkenburger et al., 2001; Johnson et al., 1992; Mintz et al., 1986; Rosales et al., 1994, 1997). Esto se debe a que el subtálamo también excita a las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Iribe et al., 1999; Kanazawa et al., 1976; Smith y Grace, 1992) y que estas últimas liberan dopamina de sus dendritas situadas en la SNr (Cheramy et al., 1981; Falkenburger et al., 2001; Geffen et al., 1976), además de que, como mostramos en la primera parte de esta tesis, hay neuronas dopaminérgicas localizadas en la misma SNr. La dopamina liberada en la SNr puede, a su vez, activar receptores presinápticos de las vías subtálamo-nigral (este trabajo) y estrio-nigral (Florán et al., 1990; Radnikow y Misgeld, 1998). Así esta dopamina controlaría, la actividad de las neuronas de la SNr, pues controla sus entradas aferentes.

Se sabe que las neuronas de la SNr pueden controlar el disparo de las neuronas de la SNc (Tepper et al., 1995). Por lo tanto, estamos ante una compleja red de interconexiones que forman la base de un circuito que regula la salida de los ganglios basales. Las neuronas dopaminérgicas disparan tónicamente a baja frecuencia dando una liberación basal de dopamina más bien baja, lo que favorecería la activación de los receptores de la clase D2. Pero ante ciertos estímulos relevantes o salientes, las neuronas de la SNc pueden disparar en ráfagas o aumentar ligeramente su frecuencia de disparo (Pucak y Grace, 1994;

Romo y Schultz, 1985; Toan y Schultz, 1985). Esto aumentaría los niveles de dopamina, lo que favorecería la activación de los receptores de la clase D1. Estos cambios determinarían cuáles receptores presinápticos se activarían de manera preferencial.

La presencia de los receptores de la clase D1 en las aferentes subtálamo-nigrales puede explicar algunos datos contradictorios en la literatura. Así, la aplicación iontóforética del agonista de la clase D1 (SKF-38393) dentro de la SNr, incrementa el disparo de las neuronas de la SNr (Martin y Waszczak, 1994), sugiriendo que la acción del receptor de la clase D1 en la vía subtálamo-nigral predomina en esta situación (vía indirecta). Sin embargo, es sabido que si el SKF-38393 es administrado por vía sistémica, se reprime el disparo de las neuronas de la SNr (Weick et al., 1990), sugiriendo una predominancia del receptor de la clase D1 de la vía estriónigral (vía directa) (Floran et al., 1990; Hernández-López et al., 1997; Radnikow y Misgeld, 1998). Es más, los efectos inhibidores de la administración sistémica del agonista D1 en el disparo de las neuronas de la SNr pueden ser potenciados por una co-administración del agonista D2 (Weick y Walters, 1987a, b). Nuestros resultados muestran que esta acción sinérgica puede resultar de la inhibición simultánea de la entrada subtálamo-nigral (vía indirecta) debido a la activación de sus receptores de la clase D2.

Por otro lado, se ha sugerido que los receptores de la clase D1 presentes en las terminales subtálamo-nigrales (vía indirecta) son tal vez del tipo D5 (Baufreton et al., 2003; Ciliax et al., 2000; Khan., 2000; Svenningsson y Le Moine, 2002). En concordancia con esto, se ha reportado que los receptores de tipo D5 tienen un efecto opuesto al de los receptores de tipo D1 en la locomoción. Los D5 reprimen los movimientos (Dziewczapolski et al., 1998) mientras los D1 los estimulan. La acción de los agonistas de la clase D1 en las neuronas del NST es la de facilitar un patrón de disparo en ráfagas de potenciales de acción (Baufreton et al., 2003). Esta acción conduciría a un incremento en el disparo de las neuronas de la SNr, lo que inhibiría los movimientos.

## **La contribución de los receptores de tipo NMDA en la excitación de la SNr mediada por la vía subtálamo-nigral.**

En estos experimentos estimulamos la vía subtálamo-nigral con un electrodo en el NST mientras registramos en neuronas de la SNr (ver Material y Métodos). Es de llamar la atención que el bloqueo de los receptores AMPA/kainato con CNQX no bloquea completamente la EPSC provocada a -80 mV en las neuronas de la SNr. En otras palabras, en estas neuronas no se necesita despolarizar mucho para tener activos a los receptores NMDA (ver Maccaferri y Dingledine, 2002), en contraste con otras sinapsis (Bonci y Malenka, 1999; Kita, 1996; Koga y Momiyama, 2000; Zhu et al., 2004). La administración subsiguiente del antagonista de los receptores NMDA, el AP-5, es capaz de bloquear toda la EPSC que no es bloqueada por el CNQX. Esta particularidad, aunada a la presencia de una región de conductancia con pendiente negativa en la relación I-V, nos hizo pensar que estas neuronas deben de ser propensas a oscilar ante entradas excitadoras mínimas, además de mantener un disparo tónico (Beurrier et al., 1999). También nos hizo recordar que en muchos circuitos, basta agregar una concentración fisiológica del agonista NMDA, para generar disparo espontáneo, en ráfagas rítmicas, e.g., la locomoción ficticia (Bertrand y Cazalets, 1999; Enomoto et al., 2002; Guertin y Hounsgaard, 1998; 1998a; 2006; Jean, 2001; Kiehn, 2006; Johnson et al., 1994; Tell y Jean, 1993; Vergara et al., 2003; Wallén y Grillner, 1987).

En uno de los modelos más utilizados para explicar la fisiología de la enfermedad de Parkinson, se dice que ocurre una sobreactivación de la vía indirecta (cuyo último paso es la vía subtálamo-nigral) y una represión de la vía directa (estrio-nigral). Se nos ocurrió que podríamos simular estos cambios en el tejido normal (SNr), *in vitro*, utilizando al agonista NMDA para mimetizar la sobreactivación de la vía indirecta, y bicuculina para mimetizar la represión de la vía directa. Si nuestra hipótesis que postula una propensión a oscilar en las neuronas de la SNr es cierta, entonces deberíamos de observar las oscilaciones

de manera aguda, en el tejido normal, con cualquiera de las dos maniobras. Nótese que si esto es así, estaríamos ante la aparición de un generador central patológico, como postula el modelo de las oscilaciones de la enfermedad de Parkinson.

## Capítulo 8

### Resultados

(parte 2)

Si la primera parte de los resultados versa sobre la modulación presináptica de la vía subtálamo-nigral, la segunda parte de los resultados constituye un estudio experimental sobre la regulación postsináptica de la misma vía. Se trata de un análisis de los patrones temporales de disparo en las neuronas de la SNr.

Junto con el GPi (NEp), la SNr es el principal núcleo de salida de los ganglios basales en los mamíferos (Albin et al., 1989; Mink, 1996; Smith et al., 1998; Boraud et al., 2002; Takakusaki et al., 2004). Se compone de neuronas GABAérgicas de proyección y la mayoría de éstas es inmunoreactiva a parvalbúmina (Gerfen et al., 1985; González-Hernández y Rodríguez, 2000; Hontanilla et al., 1997; Parent et al., 1996; Rajakumar et al., 1994). Estas neuronas proyectan la mayor parte de sus axones al tálamo, a los llamados núcleos premotores del mismo, que establecen conexiones recíprocas con las áreas premotoras y motoras de la corteza cerebral. Esta es la principal proyección que manda el resultado de los procesamientos ocurridos en los ganglios basales, hacia las áreas corticales que controlan los movimientos voluntarios (inicio de la vía piramidal) (Albin et al., 1989; Bolam et al., 2000; Mengual et al., 1999; Mink, 1996; Obeso et al., 2002; Smith et al., 1998). Pero además, las neuronas de la SNr proyectan a diversos núcleos mesencefálicos tales como: los *núcleos pedúnculo pontinos*, **NPP**; el *colículo superior*, **CS**; y la *formación reticular*, **FR** (Jiang et al., 2003; Smeets et al., 2000; Takakusaki et al., 2004; Tsumori et al., 2002), lo que indica que los ganglios basales también ejercen control sobre los reflejos involuntarios que regulan el tono muscular y la postura (vía extrapiramidal). Así, otro de los signos cardinales del fallo en los ganglios basales, como por ejemplo en la enfermedad de Parkinson, es la rigidez muscular.

La actividad de las neuronas de la SNr se correlaciona con los movimientos de los músculos del cuello, cara y ojos (Jiang et al., 2003; Takakusaki et al., 2004) así como con el tono muscular y el equilibrio (Mori, 1987; Rossignol, 1996; Takakusaki et al., 2004). Aunque la mayoría de las fibras de la vía piramidal se dirige a las interneuronas de la médula espinal, una minoría de fibras en el primate tiene conexiones directas con las motoneuronas de manos y dedos. En consecuencia, una de las manifestaciones de la enfermedad de Parkinson es el temblor en reposo de manos y dedos (Bergman et al., 1994). En las ratas con enfermedad de Parkinson el temblor se presenta en las mandíbulas (Salamone et al., 1998).

En la frontera del conocimiento actual sobre los ganglios basales existen dos modelos que intentan describir su funcionamiento normal y patológico (ver Discusión). Ambos modelos postulan a la SNr como núcleo de salida. Uno de ellos es el modelo conocido como de “tasa de disparo” (*rate model*) (Albin et al., 1989; Mink, 1996; Obeso et al., 2000, 2002; Smith et al., 1998) y otro es el modelo llamado “oscilatorio” (*oscillatory model*), que trata de explicar por qué, en la enfermedad de Parkinson, varios de los ganglios basales presentan oscilaciones rítmicas en el disparo de sus neuronas (Bergman et al., 1994; Bevan et al., 2002; Hutchison et al., 2004; Plenz y Kitai, 1999; Ruskin et al., 1999, 2003; Walters et al., 2007).

Por razones que se discutirán más adelante (ver capítulo 9), ambos modelos son, actualmente, incompatibles. Además, postulan hipótesis muy diferentes acerca de lo que debería ser el comportamiento eléctrico de las neuronas de la SNr en condiciones patológicas, como por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson. Si tomamos el caso del *modelo de tasa de disparo*, este postula que las neuronas de la SNr deben de estar sobreexcitadas por una acción disminuida de la vía estriónigral inhibitoria, llamada también “directa”, y una sobreactivación de la vía subtálamo-nigral excitadora, sinapsis final de la llamada vía “indirecta”. La sobreexcitación de las neuronas de salida de la SNr

llevaría a un exceso de inhibición en la salida de los ganglios basales hacia los circuitos tálamo-corticales promotores o del movimiento (Albin et al., 1989; Mink, 1996; Obeso et al., 2002; Smith et al., 1998), y por lo tanto, se explicaría la acinesia. A su vez, la rigidez se explica por las acciones de las neuronas de la SNr en los núcleos del tallo, como por ejemplo, la formación reticular pontina. Sin embargo, este modelo no explica el temblor en reposo. Este es explicado por el *modelo oscilatorio*. En contraste con el modelo anterior, este modelo no predice una sobreactividad de las neuronas de la SNr. Lo que sí predice es un disparo oscilatorio en ráfagas con frecuencias alrededor de la banda  $\theta$  (4-12 Hz), debido a la expresión de actividad de los *central pattern generators* temporales de disparo (CPGSs) (Brown, 2006; Hutchinson et al., 2004; Ruskin et al., 1999, 2003).

Debido a estos antecedentes conflictivos, nos interesamos en los mecanismos que generan los patrones temporales de disparo que las neuronas de la SNr exhiben o pueden exhibir bajo ciertas condiciones experimentales. ¿Cuál de los dos modelos es el correcto? ¿Se podrá hacer que congenien?

Así, decidimos realizar los siguientes experimentos: 1) mimetizar, *in vitro*, las condiciones que el modelo de tasa de disparo postula para las aferentes de las vías directa e indirecta que llegan a la SNr. Esto es, inducir una sobreexcitación de la “vía indirecta” y/o una disminución de la “directa”. En cuyo caso, tratamos de observar cual es el efecto que estas manipulaciones tienen sobre el disparo de las neuronas de la SNr. 2) En caso de que el patrón temporal de disparo se modificara, tratamos de descubrir cuáles son los mecanismos iónicos que subyacen a ese disparo.

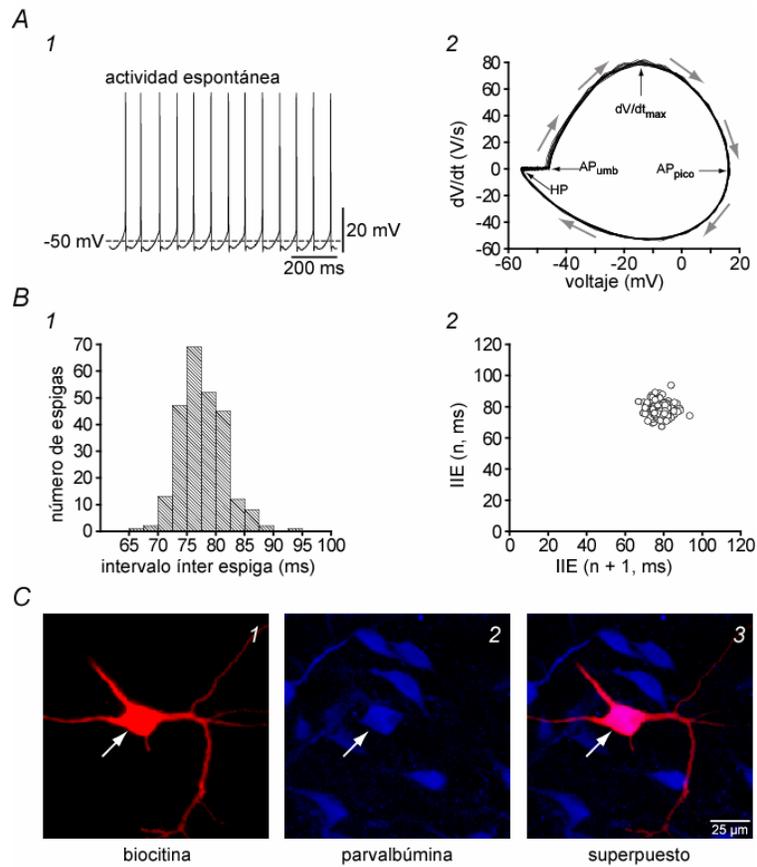
## 8.1 Actividad espontánea de las neuronas GABAérgicas de proyección de la sustancia negra reticular.

El 90 % ( $n = 70$ ) de las neuronas GABAérgicas de proyección de la sustancia negra reticular registradas *in vitro*, exhiben disparo espontáneo de potenciales de acción cuando se registran en la modalidad de fijación de corriente y en rebanadas sagitales del cerebro de rata (Fig. 21, 1A; ver también: Atherton y Bevan, 2005; Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997). La frecuencia basal del disparo espontáneo fue de  $10 \pm 2$  Hz con un umbral de disparo de  $-46 \pm 0.5$  mV (Fig. 21, 2A). La duración de los potenciales de acción fue de  $0.87 \pm 0.02$  ms ( $n = 35$ ) medida a la amplitud media. El disparo espontáneo fue de carácter tónico y regular, como se muestra en el histograma de los intervalos entre las espigas (Fig. 21, 1B), así como en el diagrama de Poincaré para los mismos intervalos (Fig. 21, 2B). El coeficiente de variación fue de  $0.11 \pm 0.01$ , lo que indica bastante regularidad.

El 65% de estas neuronas (Fig. 21C) fueron inmunoreactivas contra parvalbúmina (Gerfen et al., 1985; González-Hernández y Rodríguez, 2000; Hontanilla et al., 1997; Parent et al., 1996; Rajakumar et al., 1994), mostrando que son GABAérgicas de proyección.

El 11% de las neuronas registradas presentaron transiciones espontáneas en su potencial de membrana. Estas transiciones eran en sentido hiperpolarizante y se acompañaban de un cambio en el patrón temporal de disparo que pasaba de ser de tónico a ráfagas (*bursts*). La neurona podía residir por varios minutos en cualquiera de estos dos modos de disparo (Fig. 22A). La frecuencia media del disparo de los PAs intra-ráfagas de  $12 \pm 0.9$  Hz (rango: de  $2.5 \pm 0.2$  a  $34 \pm 5$  Hz). La frecuencia de las ráfagas (entre-ráfagas) fue de  $0.07 \pm 0.01$  Hz. Las curvas I-V (Fig. 22, 2B) tomadas en fijación de voltaje (Fig. 22, 1B) muestran que estas neuronas poseen una zona de conductancia con pendiente negativa (ZCPN) con tres cruces en el eje del voltaje así como rectificación entrante dependiente de voltaje. Esto explica el disparo espontáneo y en ráfagas, también llamado

biestable, en el cual el potencial de membrana reside en uno de dos potenciales de membrana: un estado hiperpolarizado, inactivo, o “*down state*”, y un estado despolarizado, activo, o “*up state*” (Hsiao et al., 1998; Schiller y Schiller, 2001; Vergara et al., 2003).

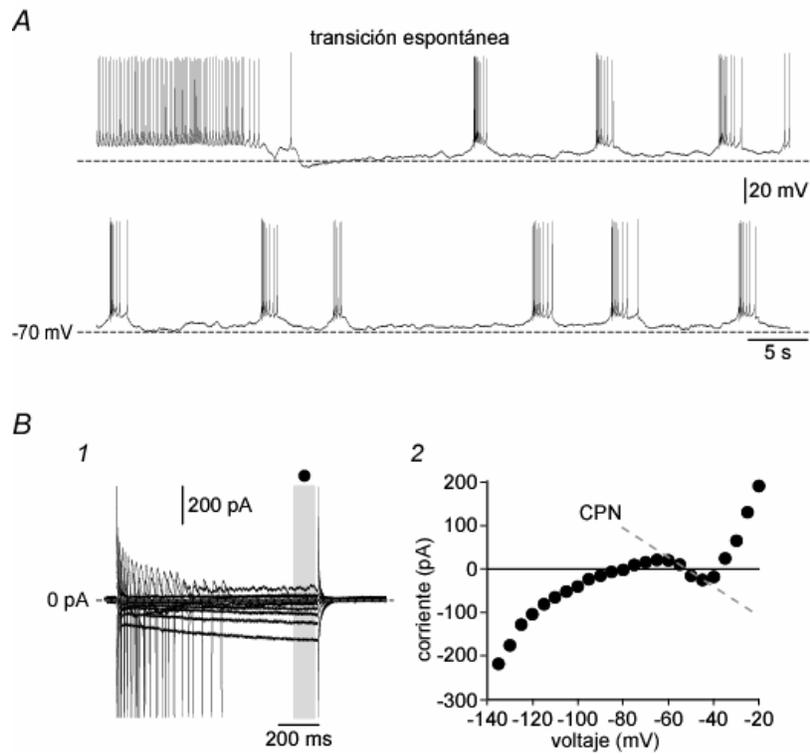


**Figura 21. Actividad espontánea de las neuronas de la sustancia negra reticular.** A: Trazo de voltaje que muestra la actividad espontánea (1). En (2) el diagrama de fase muestra el cambio del potencial de membrana ( $dV/dt$ ) contra el mismo potencial de membrana (HP; postpotencial hiperpolarizante, PA<sub>umb</sub>; umbral del disparo,  $dV/dt_{max}$ ; tasa máxima de subida del PA, y PA<sub>pico</sub>; es el valor máximo del PA). B: El histograma de los intervalos entre-espigas en (1) es monomodal. Del mismo modo, la regularidad de estos intervalos es manifiesta cuando se grafican unos contra los subsiguientes (2). C: Inmunicitoquímica de una neurona llenada con biocitina (1) e inmunopositiva a parvalbúmina (2). La superposición se muestra en 3.

Sin embargo, muchas neuronas registradas no presentaron ZCPN en su curva I-V, mientras que en otras la ZCPN no presentaba los cruces en el eje del voltaje que dan las propiedades biestables. Por lo tanto la pregunta original se convirtió en la siguiente: si aumentamos el nivel de excitabilidad, mimetizando la sobreactividad de la vía indirecta postulada para la enfermedad de Parkinson, ¿qué le sucede a la ZCPN de la curva I-V?, ¿se favorecerá la biestabilidad? Este parece ser el caso (ver Fig. 23, 2B).

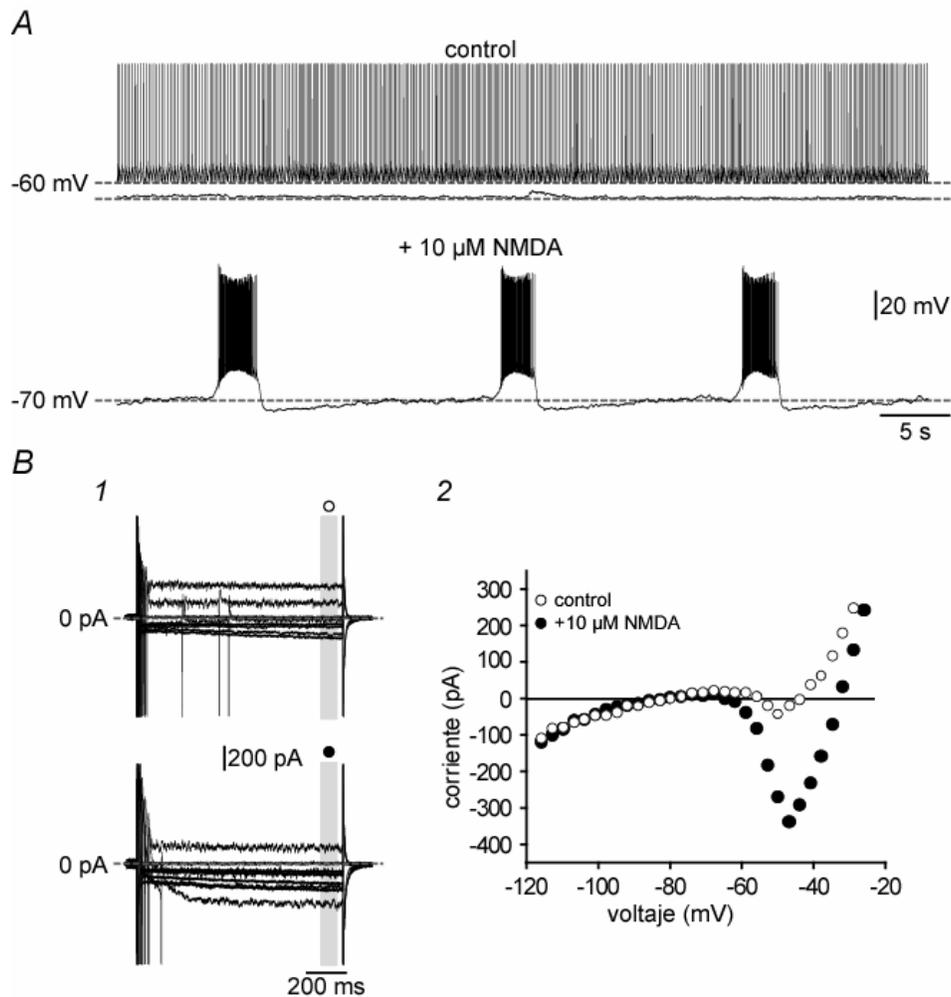
## **8.2 La sobreexcitación de las neuronas de la sustancia negra reticular favorece el modo de disparo en ráfagas.**

Al mimetizar la sobreexcitación de la vía indirecta con NMDA (vía subtálamo-nigral) facilitó el disparo en ráfagas (Fig. 23). Este resultado era, en parte, esperado, pues la adición del agonista glutamatérgico NMDA en el medio de superfusión es el componente de un protocolo ampliamente utilizado en otros circuitos para producir los así llamados estados de “locomoción ficticia”, “nado ficticio”, “deglución ficticia”, etc. (Bertrand y Cazalets, 1999; Enomoto et al., 2002; Guertin y Hounsgaard, 1998; 1998a; 2006; Kiehn, 2006; Jean, 2001; Johnson et al., 1994; Tell y Jean, 1993; Vergara et al., 2003; Wallén y Grillner, 1987). De esta manera, al administrar 10  $\mu$ M de NMDA (agonista de los receptores a glutamato tipo NMDA) a la solución de registro para producir sobreactivación de las neuronas de la SNr, se favoreció también la ZCPN y los cruces en el eje del voltaje facilitando el modo de disparo oscilatorio en ráfagas (Fig. 23). He aquí entonces la primera evidencia experimental directa de que *ambos modelos, el de tasa de disparo y el oscilatorio, pueden congeniar*. La sobreactividad de la vía indirecta hizo ambas cosas: 1) aumentó la frecuencia de disparo intra ráfagas a una media de  $23 \pm 2$  Hz (rango: de  $8 \pm 2$  Hz a  $52 \pm 4$  Hz), lo que fue significativo ( $n = 15$ ;  $P < 0.05$ , comparando a las neuronas que oscilan de manera espontánea con las que oscilan después de NMDA; prueba  $U$  de Mann-Whitney) y 2) sorpresivamente, la frecuencia entre las ráfagas no cambió significativamente:  $0.08 \pm 0.01$  Hz.



**Figura 22. Cambios espontáneos en el patrón temporal de disparo en las neuronas de la SNr.** A: Obsérvese como el disparo espontáneo tónico sufre una transición espontánea hacia el disparo en ráfagas después de una ligera hiperpolarización. B: Se ilustran las corrientes (1) en respuesta a comandos de voltaje hiper y despolarizantes. En (2) se muestra la curva I-V obtenida de los trazos en (1). Obsérvese la ZCPN con los tres cruces en el eje del voltaje indicativos de propiedades biestables endógenas.

También observamos que al mimetizar la sobre-excitación de la vía indirecta mediante el agonista glutamatérgico facilitó la aparición de ráfagas más robustas, aun si se partía de un potencial de membrana en el que el disparo espontáneo estaba abolido (-70 mV).



**Figura 23.** La sobreexcitación de las neuronas de la SNr favorece el modo de disparo en ráfagas y la zona de conductancia con pendiente negativa (ZCPN) en la curva I-V. A: Trazo de voltaje que muestra la actividad espontánea (trazo superior), que a un potencial ligeramente hiperpolarizado (-70 mV) se abole el disparo espontáneo (control), sin embargo, este se induce de nuevo, pero en el modo de disparo en ráfagas al aplicar el agonista glutamatérgico NMDA (10  $\mu$ M). B: En (1) se muestra corrientes en respuesta a comandos de voltaje hiper y despolarizantes. Los símbolos indican donde se tomaron los valores para obtener la curva I-V. Las curvas I-V en (2) muestra el control (círculos vacíos) y después de aumentar la excitabilidad con NMDA (círculos llenos) el agonista glutamatérgico incrementa de la ZCPN (ver Schiller y Schiller, 2001).

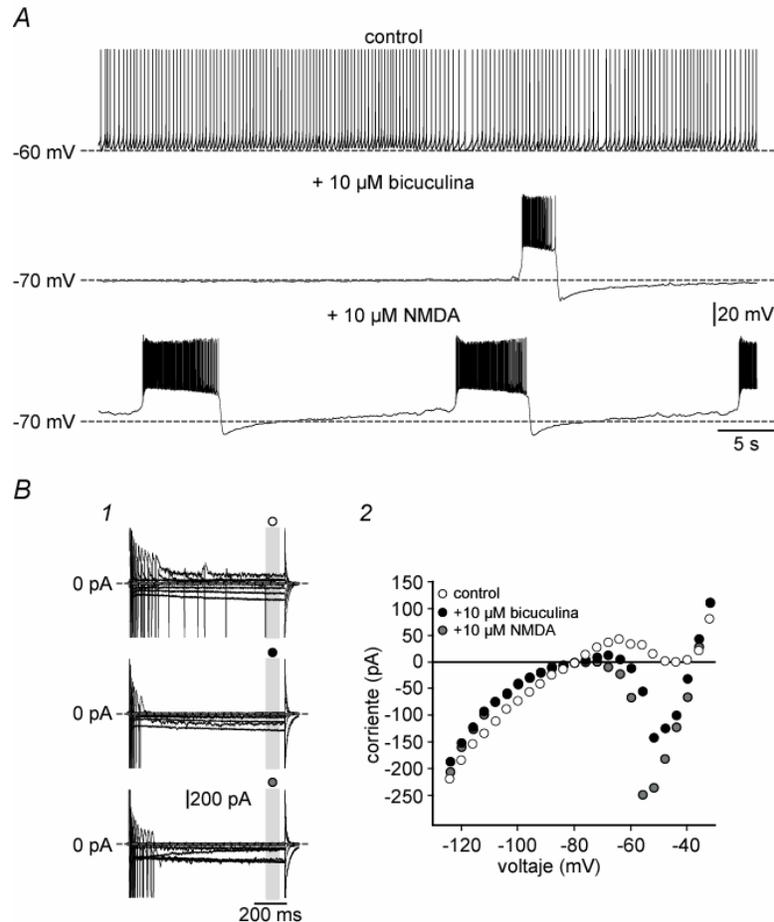
### **8.3 La depresión de la inhibición sobre las neuronas de la sustancia negra reticular favorece el modo de disparo en ráfagas.**

La figura 24 muestra que la depresión en la entrada inhibitoria sobre las neuronas de la SNr (añadiendo 10  $\mu$ M de bicuculina al baño), realizada para mimetizar la disminución en la fuerza de la vía directa postulada para la enfermedad de Parkinson, también facilitó el disparo en el modo de ráfagas (Fig. 24A), así como la ZCPN y los cruces en el eje del voltaje. En esta condición, mimetizamos la sobreexcitación de la vía indirecta y da como resultado que el disparo en ráfagas sea más robusto (Fig. 24A) y en el mismo sentido, la ZCPN incrementa aún más (Fig. 24B). Esto es, los dos postulados fisiopatológicos del modelo tasa de disparo para explicar la enfermedad de Parkinson, la sobreexcitación y la disminución en la inhibición, llevan a la misma consecuencia: la generación de un patrón temporal de disparo en ráfagas o de disparo oscilatorio, que es lo que predice el modelo de las oscilaciones y que explica en parte el temblor en reposo.

En resumen, los resultados sugieren que ambos modelos, el de tasa de disparo y el oscilatorio pueden congeniar, pues precisamente los postulados del modelo de tasa de disparo: la sobreexcitación producto del aumento de actividad de la vía subtálamo-nigral, última sinapsis de la vía indirecta, y la depresión de la inhibición, o de la vía directa, conllevan a un ligero pero significativo aumento en la actividad de las neuronas de salida, y más importante, a la generación de un patrón temporal de disparo oscilatorio o en ráfagas, que es lo que predice el modelo oscilatorio.

En vista de estos resultados, los siguientes experimentos se hicieron con el objetivo de empezar a desentrañar cuáles son los mecanismos iónicos del disparo en ráfagas, pues podría suceder que este disparo, presente en los núcleos de salida del paciente parkinsoniano (Bergman et al., 1994; Bevan y Wilson, 1999; Cassidy et al., 2002), posea un mecanismo de generación potencialmente alterable modificando algunas conductancia iónicas intrínsecas a las neuronas de

salida. Esto abriría nuevas estrategias terapéuticas. Actualmente este disparo es modificado sólo con procedimientos quirúrgicos, tales como la estimulación profunda de alta frecuencia (Benazzouz et al., 2000; Degos et al., 2005; Levy et al., 2000; Limousin et al., 1998; Maurice et al., 2003; Pralong et al., 2002; Windels et al., 2003).



**Figura 24. La depresión de la entrada inhibitoria hacia las neuronas de la SNr favorece el disparo en ráfagas, así como la ZCPN en la I-V.** A: Trazo de voltaje que muestra el disparo espontáneo tónico (control). A un potencial ligeramente hiperpolarizado (-70 mV), el disparo en ráfagas es favorecido al aplicar el antagonista GABAérgico bicuculina (10 μM), sin embargo, el disparo oscilatorio y en ráfagas se robustece si aplicamos en esta condición el agonista glutamatérgico NMDA (10 μM). B: En (1) corrientes en respuesta a comandos de voltaje hiper y despolarizantes. Los símbolos indican donde se tomaron los valores para obtener la curva I-V. Las curvas I-V en control (círculos vacíos), después de bloquear la entrada inhibitoria con bicuculina (círculos llenos) muestra un incremento en la ZCPN (2), que se ve favorecida aún más luego de incrementar la excitabilidad con NMDA (círculos grises) (ver Schiller y Schiller, 2001 y Yuan et al., 2004).

## 8.4 Mecanismos iónicos del modo de disparo en ráfagas.

Decidimos utilizar el protocolo de sobreexcitación de las neuronas de la SNr con el agonista glutamatérgico NMDA para reproducir de manera consistente y robusta el modo de disparo en ráfagas y así estudiar sus mecanismos iónicos. Este protocolo se ha utilizado en los circuitos de otros sistemas para inducir ritmicidad autónoma (en ausencia de estimulación) y disparo oscilatorio en ráfagas en los centros generadores de patrones temporales de disparo (CPGs= *central pattern generators*) de la médula espinal, el tallo cerebral, el NST, la SNc, el estriado y la corteza cerebral (Bertrand y Cazalets, 1999; Enomoto et al., 2002; Guertin y Hounsgaard, 1998; 1998a; 2006; Jean, 2001; Johnson et al., 1994; Kiehn, 2006; Paladini et al., 1999; Tell y Jean, 1993; Tseng y O'Donnell, 2004; Tseng et al., 2006; Vergara et al., 2003).

En presencia de NMDA (10  $\mu$ M) en la superfusión, y después de la estimulación de campo en el NST (ver métodos), se logra un aumento en la excitación de las neuronas de la SNr caracterizado por la aparición del modo de disparo en ráfagas y el incremento de la ZCPN de la curva I-V (Figs. 25, 2A y 24, 1B). En estas condiciones añadimos a la superfusión tetrodotoxina (TTX; 1  $\mu$ M) para observar la contribución de las corrientes de sodio en estas oscilaciones. La TTX bloqueó los PAs rápidos pero dejó al descubierto unas oscilaciones lentas del potencial de membrana, en forma de mesetas despolarizantes, que parecen subyacer a las ráfagas. Estas mesetas exhibían una menor frecuencia que la de las ráfagas mismas, pero presentaban regularidad tanto en su frecuencia como en su amplitud (Fig. 25, 3A), así como un postpotencial hiperpolarizante de gran magnitud y duración entre meseta y meseta (Beurrier et al., 1999; Guertin y Hounsgaard, 1998a; Hsiao et al., 1998). La TTX disminuyó la amplitud de la ZCPN en la curva I-V en un  $11 \pm 1$  % (Fig. 25, 2B), sugiriendo la participación de corrientes persistentes de sodio en la composición de las mesetas y por lo tanto, de las ráfagas.

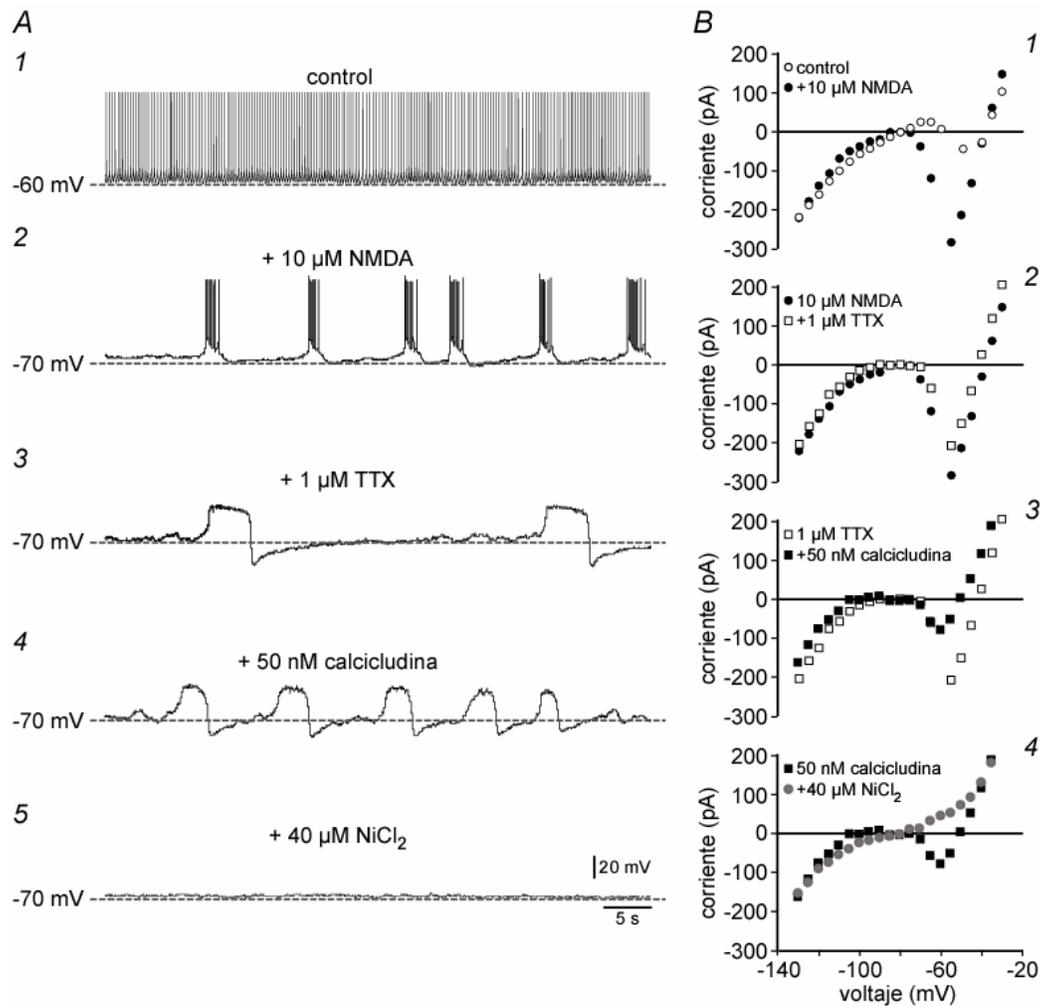
En vista de que las oscilaciones que subyacen al disparo en ráfagas fueron resistentes a la TTX, utilizamos el bloqueador de los canales de calcio de alto umbral de activación, calcicludina (50 nM o concentración saturante), en la presencia continua de 10  $\mu$ M de NMDA + 1  $\mu$ M TTX. La calcicludina bloquea todos los canales de calcio del tipo HVA, tales como los L, N, P/Q y R (Kochegarov, 2003; Nishio et al., 1999; Schweitz et al., 1994; Stotz et al., 2000). La acción de la calcicludina fue la de reducir la duración de las mesetas, así como la magnitud del postpotencial entre las mismas, lo que parece aumentar su frecuencia (Fig. 25, 4A). La curva I-V en presencia de calcicludina mostró una disminución en la amplitud de la ZCPN de un  $51 \pm 3.4\%$  ( $n = 6$ ;  $P < 0.01$ ;  $T$  de Wilcoxon; Fig. 25, 3B). Esto sugiere que las corrientes de calcio de alto umbral de activación (HVA) participan en la composición de la meseta que subyace a las ráfagas. Sin embargo, como las mesetas siguen apareciendo llegamos a la conclusión que ni los canales de calcio HVA, ni los canales de sodio, son la causa de su generación, si no que simplemente forman parte de ellas después de que otra conductancia iónica las ha generado.

Para saber si los canales de calcio de bajo umbral de activación (LVA o canales T) eran la causa de generación de las mesetas que subyacen al disparo en ráfagas, añadimos 40  $\mu$ M de  $\text{NiCl}_2$ , a la superfusión (en presencia continua de TTX, NMDA y calcicludina). En estas condiciones, las mesetas fueron abolidas ( $n = 6$ ; Fig. 25, 5A) perdiendo la neurona su capacidad de oscilar espontáneamente. No sólo eso, la ZCPN de la curva I-V desapareció por completo quedando una curva I-V con un solo cruce en el eje del voltaje (Fig. 25, 4B). Cabe mencionar que el mibefradil, un bloqueador de los canales de calcio tipo T (Martín et al., 2000) tuvo los mismos efectos que el níquel (datos no mostrados).

Este resultado sugiere que el modo de disparo en ráfagas que presentan las neuronas de la SNr tiene un mecanismo complejo: la oscilación se genera por la activación de una conductancia de calcio de tipo T, pero es sostenida y prolongada por conductancias de calcio HVA y, en menor grado, por

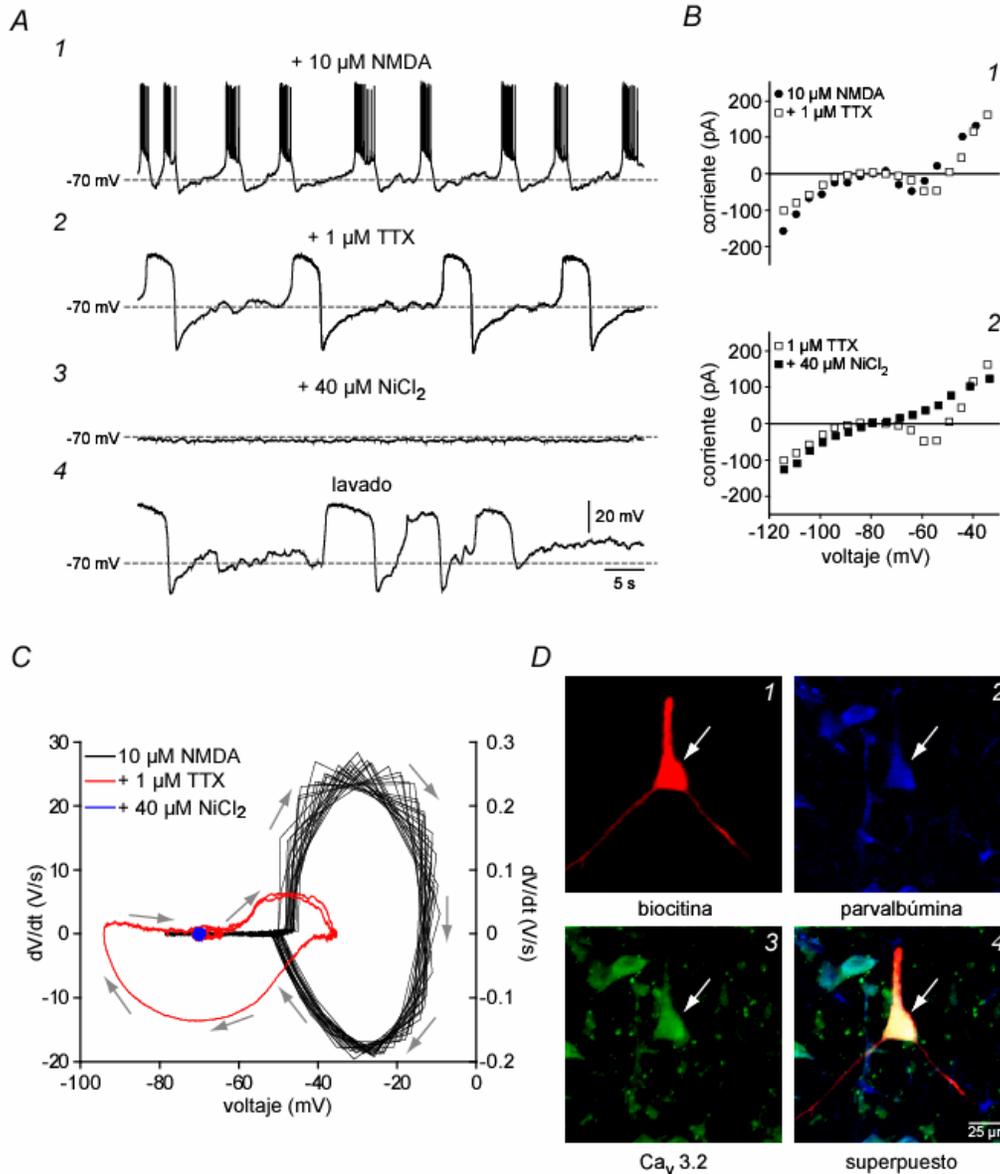
conductancias de sodio. Por último, sobre las mesetas (*up state*) se disparan las ráfagas de espigas de sodio en condiciones fisiológicas.

Reportes previos sugieren que algunas de las neuronas de la SNr, expresan la subunidad  $\alpha 1H$  (Talley et al., 1999) de los canales de calcio tipo T. Se ha mostrado también que esta subunidad (Lee et al., 1999) es más susceptible al bloqueo por  $Ni^{2+}$  ( $\sim 12 \mu M$ ), que las subunidades  $\alpha 1G$  y  $\alpha 1I$ . Las concentraciones relativamente bajas de  $NiCl_2$  empleadas en el presente trabajo ( $40 \mu M$ ) para bloquear las oscilaciones nos permitieron hipotetizar que al menos un porcentaje de las neuronas GABAérgicas de la SNr deben de expresar la subunidad  $\alpha 1H$  de los canales de calcio tipo T. Para demostrar que efectivamente las neuronas que presentan disparo en ráfagas y mesetas de calcio poseen la subunidad  $\alpha 1H$  de los canales de calcio tipo T, realizamos experimentos de inmunocitoquímica (triple marcado; ver métodos). Por último, si de verdad el canal de calcio tipo T es el paso limitante para producir el disparo en ráfagas, entonces, estas deberían abolirse bloqueando exclusivamente dicho canal sin tener que bloquear primero los canales HVA. Este experimento se ilustra en la figura 26.



**Figura 25.** Mecanismo iónico del modo de disparo en ráfagas A: En (1) se observa el disparo tónico en condiciones control, en (2) se observa el disparo en ráfagas después de agregar 10  $\mu\text{M}$  al medio de superfusión y estimular en el NST, en (3) se muestra que la adición de 1  $\mu\text{M}$  de TTX en presencia de NMDA bloquea los potenciales de acción pero no así las mesetas subyacentes a las ráfagas, en (4) se muestra que la adición subsiguiente de 50 nM de calcicludina para bloquear los canales de calcio HVA reduce el tamaño y duración de las mesetas pero no las bloquea, en (5) se muestra que las mesetas se bloquean completamente cuando se adicionan 40  $\mu\text{M}$  de NiCl<sub>2</sub> para bloquear los canales de calcio LVA (el mismo efecto tuvo el mibefradil). B: curvas I-V en fijación de voltaje para cada una de las condiciones: el control (1) ya exhibe una ZCPN (círculos vacíos), la cual aumenta cuando se adiciona el NMDA (círculos llenos), en (2) la ZCPN se reduce ligeramente al añadir 1  $\mu\text{M}$  de TTX (cuadrados vacíos). La adición de 50 nM de calcicludina (cuadrados llenos) en (3) indica que alrededor de un 50% de la ZCPN depende de canales de calcio HVA. La ZCPN es totalmente abolida después de 40  $\mu\text{M}$  NiCl<sub>2</sub> (4).

Se observa de nuevo el disparo en modo de ráfagas después de añadir NMDA (10  $\mu$ M) y como las mesetas que subyacen a las ráfagas permanecen después de añadir TTX y bloquear las espigas de sodio (Figs. 26, 1A y 2A). Si ahora aplicamos 40  $\mu$ M de NiCl<sub>2</sub> de manera directa, las mesetas que aparecen en forma oscilatoria se abolen por completo al igual que la ZCPN de la curva I-V (Figs. 26, 3A y 2B). La Fig. 26, 4A muestra además que el bloqueo de los canales T es reversible. La figura 26C también enseña que el diagrama de fase del disparo en ráfagas difiere del mostrado para el disparo tónico (Fig. 21, 2A), pues el de este último sólo presentaba una órbita cerrada, mientras que el disparo en ráfagas presenta dos órbitas entrelazadas (en negro y rojo), la trayectoria que corre por los valores más negativos en el eje del voltaje es la que corresponde a las mesetas despolarizantes que subyacen a las ráfagas. Esto muestra que la dinámica del disparo es diferente en cada uno de los modos, tónico o ráfagas, pues aparte de las conductancias presentes en el modo tónico, el modo en ráfagas posee otras más. Una de estas conductancias está representada por el canal de calcio tipo T tal y como se demuestra por inmunocitoquímica (Fig. 26D). De 11 neuronas que presentaron bloqueo de las mesetas despolarizantes con el NiCl<sub>2</sub>, 10 de ellas (91%) fueron inmunoreactivas a los anticuerpos contra la subunidad  $\alpha$ 1H de los canales de calcio tipo T (Fig. 26, 3D).



**Figura 26. Los canales de tipo T son esenciales para generar las mesetas despolarizantes.**

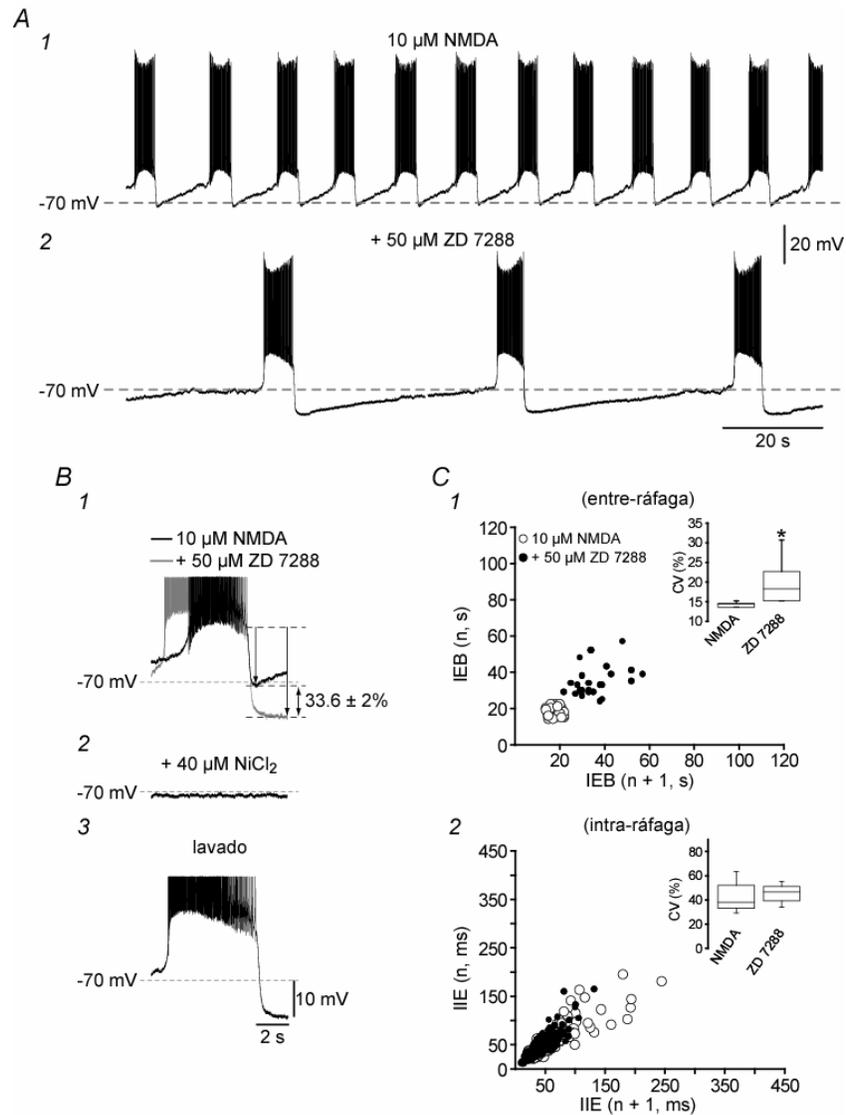
A: En (1) se muestra el disparo en ráfagas en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de NMDA, en (2) se bloquean los PAs con TTX para dejar al descubierto las mesetas de calcio, en (3) se demuestra que basta la adición de 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$  para bloquear todo rastro de las mesetas y la ZCPN en las curvas I-V (B). C: El diagrama de fase del disparo en ráfagas muestra dos orbitas intersectadas, la órbita de la izquierda representa la oscilación de las mesetas cálcicas y la de la derecha el disparo de potenciales de acción durante las mismas, que no difiere de la mostrada en la figura 21, 2A. Note las diferentes escalas para ambas órbitas. D: Inmunicitoquímica de una neurona llena con biocitina (1), que es parvalbúmina-positiva (2), y que mostró inmunoreactividad a la subunidad  $\alpha 1\text{H}$  ( $\text{Ca}_v3.2$ ) de los canales de calcio tipo T (3). La superposición (4) muestra que la misma neurona posee los tres marcadores.

Las diferentes escalas utilizadas para mostrar la intersección entre las dos órbitas características del disparo en ráfagas se deben a la diferente amplitud relativa entre ambos eventos: la órbita correspondiente a las mesetas ocupa el intervalo sub-umbral del potencial de membrana. Pero su intersección indica que una genera a la otra, esto es, las conductancias que generan las mesetas llevan al potencial de membrana a la zona del umbral de disparo para generar un tren de espigas. Claramente hay dos atractores entrelazados, cada uno está generado por un conjunto distinto de conductancias iónicas. Obsérvese además que la órbita correspondiente a las mesetas alcanza potenciales muy negativos ( $< -90$  mV). ¿Cómo es entonces que regresa a la zona de activación de los canales T ( $\approx -65$  mV)? ¿Cómo es que se alcanzan valores tan negativos? Para contestar estas preguntas se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

### **8.5 Participación de canales catiónicos activados por hiperpolarización (HCN) en la generación del modo de disparo en ráfagas.**

Puede observarse que el disparo en ráfagas, en presencia de NMDA, es bastante regular a  $0.06 \pm 0.004$  Hz dando origen a una oscilación rítmica (intervalos regulares) caracterizada por posthiperpolarizaciones inmediatamente después de cada ráfaga seguidas de un regreso estereotipado a la zona de activación de los canales T. Estos intervalos estereotipados hacen pensar en un potencial de marcapaso. Los potenciales de marcapaso son generalmente generados por los canales HCN. La frecuencia de los PAs sobre las mesetas (intra-ráfagas) es de  $28 \pm 1$  Hz (rango: de  $6.1 \pm 0.9$  a  $45.4 \pm 0.7$  Hz) (Fig. 27, 1A). La participación de canales catiónicos activados por hiperpolarización (HCN) se infiere al adicionar  $50 \mu\text{M}$  de ZD 7288, bloqueador de los canales HCN (Fig. 27, 2A). Esta maniobra aumenta significativamente el intervalo entre las ráfagas a  $0.03 \pm 0.003$  Hz ( $P < 0.01$ ;  $T$  de Wilcoxon). En contraste, la amplitud de la posthiperpolarización después de cada ráfaga (Fig. 27B) aumenta significativamente en su amplitud (Fig. 27, 1B): un  $34 \pm 2\%$  (de  $18 \pm 0.2$  mV a  $24 \pm 0.3$  mV;  $P < 0.0001$ ;  $T$  de Wilcoxon), lo que explica en parte la disminución de la frecuencia, pues si el

intervalo representa la interacción entre una corriente entrante (acarreada por los canales HCN) y una corriente saliente, esta última se queda sin oposición, como también puede apreciarse en el diagrama de Poincaré (Fig.27, 1C) y el aumento en el coeficiente de variación ( $P < 0.05$ ;  $T$  de Wilcoxon). En contraste, la frecuencia media de los PAs en las ráfagas aumento a  $35 \pm 0.5$  Hz (rango de  $6 \pm 1$  a  $91 \pm 2$  Hz) ( $P < 0.05$ ;  $T$  de Wilcoxon); que también se aprecia en el correspondiente diagrama de Poincaré (Fig. 27, 2C). Por último, la adición de ZD 7288 también incremento la duración de las ráfagas de  $3.7 \pm 0.23$  s a  $5.3 \pm 0.3$  s ( $P < 0.001$ ;  $T$  de Wilcoxon). Sin embargo, la figura 27, 2B muestra otra vez que el paso limitante para generar este patrón temporal de disparo es el canal de calcio de tipo T, pues al añadir  $40 \mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$  el disparo se abole por completo. Estos resultados sugieren que los canales HCN ayudan a determinar la frecuencia de las ráfagas y que es la activación secuencial de los canales HCN y T el que determina su regularidad rítmica, esto es, las propiedades intrínsecas de las neuronas de la SNr las hacen exhibir propiedades de marcapasos celulares.



**Figura 27. Participación de canales catiónicos activados por hiperpolarización en la generación del modo de disparo en ráfagas.** A: En (1) se ilustra la regularidad que se puede alcanzar durante el disparo en ráfagas inducido por la adición de NMDA. En (2) se enseña que el bloqueador de las corrientes de tipo HCN, ZD 7288 (50  $\mu$ M), incrementa significativamente el intervalo entre las ráfagas (disminuye su frecuencia). B: Se superponen dos ráfagas, antes (negro) y después (gris) de aplicar ZD 7288. Obsérvese en (1) que después de aplicar ZD7288 aumenta la amplitud de la posthiperpolarización que sigue a una ráfaga y también aumenta la duración de cada ráfaga. En (2) se ilustra que el NiCl<sub>2</sub> sigue siendo capaz de bloquear las ráfagas y que su acción es reversible (3). C: El diagrama de Poincaré en (1) enseña que ZD 7288 incrementa el intervalo entre las ráfagas así como su coeficiente de variación. Sin embargo, (2) muestra que la frecuencia de las espigas durante las ráfagas (intra-ráfagas) tiene una tendencia a ser mayor.

Sin embargo, queda por saber cuál es la corriente saliente que genera la posthiperpolarización después de cada ráfaga y que interacciona con la corriente HCN para generar el disparo oscilatorio y rítmico.

## **8.6 Participación de los canales de potasio activados por calcio (BK y SK) en la oscilación en ráfagas rítmicas.**

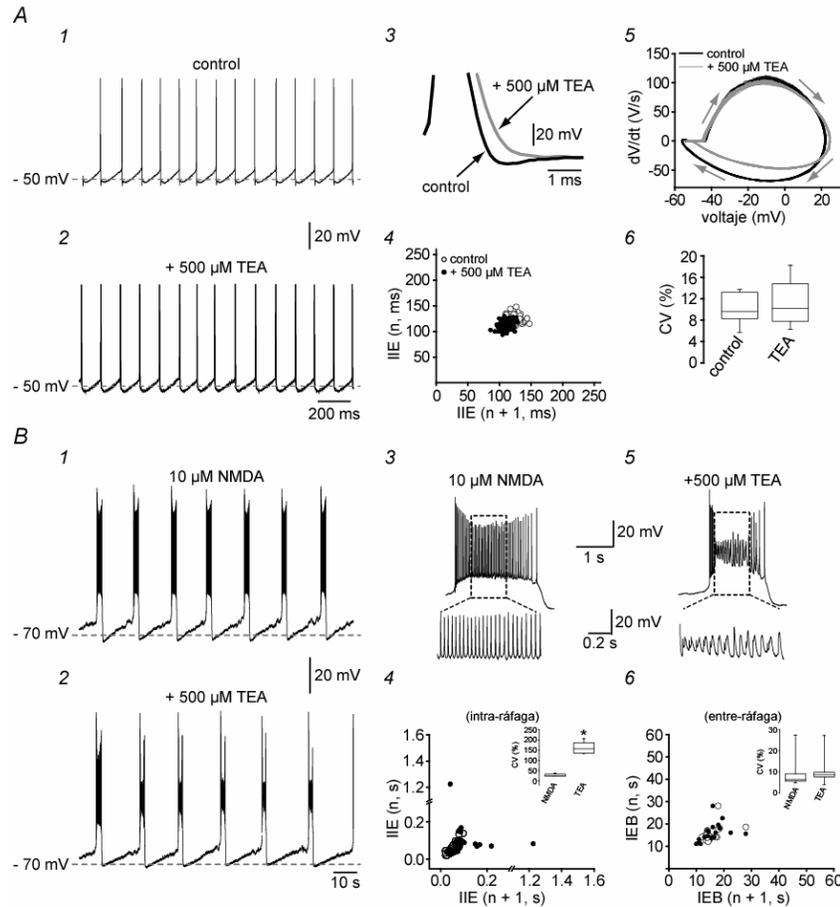
¿Cuál será la corriente saliente que al interaccionar con los canales HCN genera el intervalo entre ráfaga y ráfaga? Las conductancias más comúnmente asociadas con el cumplimiento de este papel en otras neuronas son las conductancias de potasio activadas por calcio (Faber y Sah, 2002; Greffrath et al., 2004; Sah, 1996; Vergara et al., 1998; Womack y Khodakhah, 2004), de los tipos BK y SK, por lo que fueron las primeras en estudiarse.

El tetraetilamonio a dosis sub-milimolares bloquea las conductancias de tipo BK (Faber and Sah, 2002; Kang et al., 1996; Sah, 1996; Vergara et al., 1998), por lo que se utilizó a concentraciones de 500  $\mu\text{M}$  para inferir la participación de estos canales en el disparo oscilatorio en ráfagas (Fig. 28). Analizamos los efectos del TEA en los dos modos de disparo: tónico y en ráfagas. Básicamente, los únicos parámetros que fueron afectados por el TEA fueron la tasa de repolarización del potencial de acción y su continuación, la fase rápida o inicial del postpotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue a un PA. Esto se vio reflejado por un aumento en la duración de los PAs, de  $0.83 \pm 0.02$  a  $1.16 \pm 0.02$  ms (Fig. 28, 3A;  $n = 20$ ;  $** *P < 0.0001$ ;  $T$  de Wilcoxon). Ni la frecuencia de disparo ( $9.3 \pm 1.7$  Hz en control vs.  $9.4 \pm 1.3$  Hz después de TEA) (NS), ni los intervalos entre las espigas, ni su coeficiente de variación fueron afectados de manera significativa, lo que nos lleva a concluir que los canales BK tiene su principal función en la generación de los PAs, y no en la estructura temporal del patrón de disparo.

La participación de los canales BK en la generación de disparo en ráfagas se muestra en la figura 28B. Este disparo se generó adicionando 10  $\mu\text{M}$  de NMDA. Una vez obtenida la oscilación en ráfagas se agregó 500  $\mu\text{M}$  de TEA (Fig. 28, 2B).

Este procedimiento tuvo un efecto pequeño pero significativo sobre la frecuencia de las ráfagas de  $24 \pm 0.4$  Hz (rango:  $10 \pm 1$  -  $46 \pm 2$  Hz) a  $16 \pm 0.3$  Hz (rango:  $1 \pm 0.05$  Hz -  $34 \pm 3$  Hz) ( $P < 0.05$ ;  $T$  de Wilcoxon). Pero el mayor efecto siguió siendo sobre la repolarización de los PAs que al ser generados desde un potencial más despolarizado ya no alcanzan a regenerarse y se van inactivando (el aumento en la repolarización aumenta el periodo refractario) (cf., Figs. 28, 3B y 5B). Esto incapacita a la neurona a mantener el disparo de alta frecuencia durante la ráfaga pues los canales de sodio no alcanzan a recuperarse de la inactivación. También la duración de las ráfagas sufrió una pequeña disminución, de  $2.55 \pm 0.06$  s a  $1.63 \pm 0.07$  s ( $P < 0.01$ ;  $T$  de Wilcoxon). Sin embargo, ni el intervalo entre las ráfagas ni su coeficiente de variación (Fig. 28, 6B, inserto) mostraron cambios significativos.

Las iberiotoxina, bloqueador selectivo de los canales BK tuvo los mismos efectos del TEA (no se muestra) ( $n = 5$ ), lo que nos lleva a concluir que durante el patrón temporal de disparo en el modo oscilatorio de ráfagas no hay una participación preponderante de los canales BK, así es que la corriente saliente que interacciona con los canales HCN ha de estar generada por otro tipo de canales.



**Figura 28. Participación de los canales de potasio activados por calcio de tipo BK en los modos de disparo tónico y en ráfagas.** A: En (1) se muestra la actividad espontánea tónica y en (2) se muestra la misma actividad después de administrar 500  $\mu$ M de TEA. El TEA produjo pocos cambios en el disparo tónico, como por ejemplo, una reducción en la fase rápida e inicial del postpotencial hiperpolarizante (PPH), lo cual se confirma en (3), donde puede verse, con una base de tiempo más rápida, que el TEA retarda la repolarización del potencial de acción. El diagrama de Poincaré en (4) muestra que los intervalos entre las espigas son sólo ligeramente diferentes después de TEA, mientras que el diagrama de fase en (5) confirma que la función más afectada es la repolarización del PA seguida de la primera fase del PPH. El coeficiente de variación del disparo se compara en (6) y muestra una mayor dispersión pero sin diferencias significativas en los valores medios. B: la comparación de (1) y (2) ilustra que el TEA tampoco afectó la estructura temporal del disparo en ráfagas (ver también 4 y 6). Este modo de disparo se generó adicionando 10  $\mu$ M de NMDA a la superfusión, para después añadir 500  $\mu$ M de TEA. De nuevo, el principal efecto fue el bloqueo de la repolarización de los PAs. Sin embargo, como los PAs durante una ráfaga se generan a potenciales más despolarizados, esto llevó a una mayor inactivación de los potenciales de acción (cf., 3 y 5).

La participación de los canales de tipo SK fue inferida con la ayuda de su bloqueador específico, el péptido apamina (200 nM). También en este caso estudiamos por separado las acciones de la apamina sobre el disparo tónico (Fig. 29A) y sobre el disparo en ráfagas (Fig. 29B). Sobre el disparo tónico la apamina produjo un aumento en la frecuencia de disparo (Fig. 29, 2A) de  $42 \pm 4 \%$  acompañado de una disminución en la amplitud del PPH lento que participa en la generación del intervalo entre las espigas (Figs. 29A, 3 y 4). Con el tiempo, al incremento en la frecuencia siguió una despolarización paulatina del potencial de membrana y el bloqueó del disparo de los PAs (datos no mostrados). Estos datos sugieren que la corriente saliente acarreada por los canales SK es importante para regular el patrón temporal de disparo en estas neuronas. El diagrama de Poincaré para los intervalos entre las espigas (Fig. 29, 5A) muestra que aunque los intervalos se mantienen regulares hay un desplazamiento de la moda en presencia de apamina. La apamina (200 nM) también cambia la trayectoria de las espigas en el diagrama de fase (Fig. 29, 6A, línea gris) pero sin alterar su morfología básica.

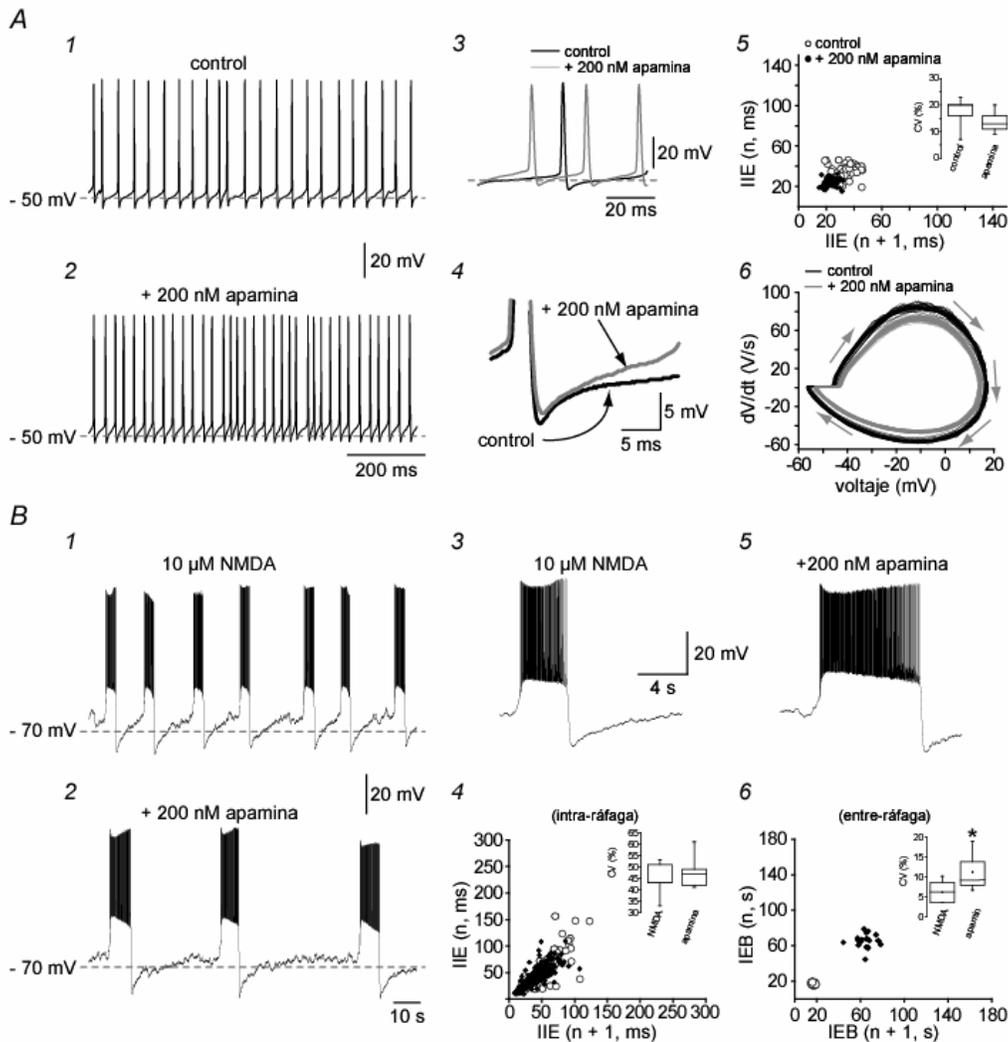
La figura 29B muestra que la apamina también cambia la estructura temporal del disparo en ráfagas así como la duración de las mismas ráfagas. La de las ráfagas se incrementó de  $4 \pm 0.04$  s a  $7.4 \pm 0.3$  s ( $P < 0.01$ ;  $T$  de Wilcoxon); un  $86 \pm 8\%$ . La frecuencia de las ráfagas disminuyó de  $0.06 \pm 0.002$  Hz a  $0.016 \pm 0.0005$  Hz ( $P < 0.0001$ ;  $T$  Wilcoxon). (Figs 29B 1, 2 y 6). Mientras que la frecuencia de los PAs durante las ráfagas cambió de  $33.2 \pm 0.5$  Hz (rango:  $15.6 \pm 0.5$ - $52 \pm 2$  Hz) a  $45.2 \pm 1.1$  Hz (rango:  $16 \pm 1.2$ - $98 \pm 3$  Hz) ( $P < 0.05$ ;  $T$  de Wilcoxon).

Note que mientras el diagrama de Poincaré del intervalo entre las espigas simplemente se esparce hacia intervalos mayores, en el caso de los intervalos entre las ráfagas claramente se observan dos nubes de puntos separadas (Figs. 29B, 4 y 6). El coeficiente de variación no mostró cambios significativos en ninguno de los casos (Figs. 29B, 4 y 6; ver insertos). Los datos nos permiten

concluir que los canales SK sí participan en la regulación de la estructura temporal del disparo en ráfagas.

¿Por qué disminuye la frecuencia de las ráfagas y aumenta la del disparo tónico de PAs o la de PAs al interior de las ráfagas? ¿No deberían aumentar todas las frecuencias? La respuesta parece estar en el aumento en la duración de las ráfagas debido a la apamina. En primer lugar esto implica a los canales SK en la terminación y repolarización de las mesetas que subyacen a las ráfagas. Pues si la activación de los canales SK sólo dependiera del calcio que entra con las espigas, una mayor frecuencia debería implicar mayor entrada de calcio y más canales SK activados. Ahora bien, como los canales SK están bloqueados las mesetas no se repolarizan con la misma entrada de calcio si no que necesitan durar más para poder activar a los canales SK, sugiriendo que el bloqueo por apamina puede ser desplazado y depende de cuánto calcio hay en el interior celular.

En resumen, aunque los canales SK y HCN parecen modular la duración de los intervalos entre las ráfagas y regular la frecuencia de este modo de disparo, ninguno de estos canales parece ser indispensable para que este modo de disparo se presente. El único canal que constituye un componente indispensable de este modo de disparo parece ser el T. Las implicaciones potenciales de este hallazgo para la terapéutica de la enfermedad de Parkinson se mencionan en la discusión.



**Figura 29. Participación de los canales de potasio activados por calcio de tipo SK en el disparo tónico y en ráfagas.** A: Se muestra que la actividad tónica (1) incrementa su frecuencia después de de 200 nM de apamina (2). El PPH disminuye en presencia de apamina (3, 4), acortando el intervalo entre las espigas (5; apamina, círculos llenos; control, círculos vacíos). El acortamiento de la duración de los intervalos no conllevó un cambio en el coeficiente de variación (5; inserto). El diagrama de fase (6) muestra una reducción en el área de la órbita pero no un cambio en la estructura de la misma, lo que sólo sugiere PAs más pequeños cuando aumenta la frecuencia, de acuerdo a la reducción de la corriente saliente y la menor amplitud del PPH. B: En contraste con el disparo tónico, el disparo oscilatorio en ráfagas (1) muestra una reducción en la frecuencia (10  $\mu$ M de NMDA), lo que conllevó a un incremento en la duración de los intervalos entre las ráfagas (6) sin afectar el coeficiente de variación. Como era de esperarse por las acciones sobre el disparo tónico, la frecuencia de disparo durante las ráfagas aumenta (4) así como la duración de cada ráfaga (cf., 3 y 5).

## Capítulo 9

### Discusión de la parte postsináptica

Los resultados muestran que con cualquiera de las maniobras postuladas por el modelo de tasa de disparo para explicar la enfermedad de Parkinson: la sobreactivación de la vía indirecta, o la reducción de actividad de la vía directa, las neuronas GABAérgicas de proyección de la sustancia negra reticular quedan habilitadas para presentar actividad espontánea de tipo oscilatorio, muchas veces rítmico, en forma de ráfagas. Este disparo es el predicho por el modelo oscilatorio de la enfermedad de Parkinson, con lo que hemos logrado un acercamiento entre el modelo de tasa de disparo (*rate model*) y el modelo oscilatorio (*oscillatory model*), que se pensaban eran incompatibles. Esta tesis muestra, entonces, que no lo son: los cambios predichos por el modelo de tasa de disparo producen CPGs patológicos. Lo mismo sucedió al agregar bicuculina, para mimetizar la reducción en la actividad de la vía directa.

Añadir NMDA a la solución de registro, protocolo común para producir, por ejemplo, locomoción ficticia en la médula espinal, y muchos otros comportamientos oscilatorios en diferentes núcleos del sistema nervioso central (Bertrand and Cazalets, 1999; Enomoto et al., 2002; Guertin and Hounsgaard, 1998; 1998a; 2006; Kiehn, 2006; Jean, 2001; Johnson et al., 1994; Tell and Jean, 1993; Vergara et al., 2003; Wallén and Grillner, 1987), fue la maniobra usada para mimetizar la sobreactivación de la vía indirecta. Resultó una maniobra importante para generar el disparo en ráfagas. No es que en condiciones normales no se presentasen oscilaciones en el disparo, pues es común ver transiciones entre el disparo espontáneo tónico y el disparo en ráfagas en la situación control, lo que ha de ser fisiológico cuando la SNr es requerida para realizar algún movimiento estereotipado o rítmico como la masticación, si no que al ser sobreexcitadas, las neuronas de la SNr expresan estas oscilaciones de manera mucho más robusta y

rítmica. Además, el disparo intra-ráfagas, y la zona con pendiente negativa de la relación I-V también aumentaron.

Los canales catiónicos activados por hiperpolarización (HCN) y los canales de calcio de tipo T, resultaron ser esenciales en la generación del patrón de disparo. Mientras que los canales de calcio de alto umbral de activación son responsables de fijar la duración de las mesetas despolarizantes que subyacen al disparo en ráfagas de potenciales de acción principalmente de sodio. El influjo de calcio durante cada potencial de acción y durante la meseta despolarizante favoreció la activación de canales de potasio activados por calcio de las clases BK y SK. Los canales BK participan en la repolarización de los potenciales de acción y en la generación de la primera parte del postpotencial hiperpolarizante que fija el intervalo entre las espigas, mientras que los canales SK participan en la generación del resto de este intervalo.

Con base en las acciones de la TTX, el  $\text{NiCl}_2$  (40  $\mu\text{M}$ ) y el mibefradil (1  $\mu\text{M}$ ) (Heady et al., 2001; Martin et al., 2000), así como la calcicludina (Kochegarov, 2003; Nishio et al., 1999; Schweitz et al., 1994; Stotz et al., 2000), revelamos que en la región de conductancia con pendiente negativa participan varias corrientes entrantes: sodio, canales de calcio de bajo umbral de activación (T) y canales de calcio de alto umbral de activación. Esta región se ve aumentada por el NMDA (Guertin y Hounsgaard, 1998a; 1998b; 2006; Hsiao et al., 1998). Sin embargo, la conductancia que se activa a voltajes más negativos y responsable de las oscilaciones subumbrales es el canal de calcio tipo T. Ahora bien, se ha mostrado (Lee et al., 1999; Yunker, 2003) que bajas concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$  (40  $\mu\text{M}$ ) bloquean preferentemente a los canales de calcio tipo T que presentan la subunidad  $\alpha 1\text{H}$ . Con técnicas inmuocitoquímicas demostramos la presencia de la subunidad  $\alpha 1\text{H}$  en las neuronas GABAérgicas de la SNr (Talley et al., 1999). Podemos concluir con ésto que los canales de calcio tipo T participan en la activación de las oscilaciones en meseta, mientras que los canales de calcio de alto umbral participan en el mantenimiento y la duración de las mesetas.

Los canales HCN se pusieron en evidencia por la rectificación entrante en la región más hiperpolarizada de la relación I-V y la acción del antagonista selectivo de estos canales, el ZD 7288 (50  $\mu$ M) (Day et al., 2005; Robinson y Siegelbaum, 2003), que disminuyó drásticamente la frecuencia de las ráfagas aumentando el coeficiente de variación de este disparo. También incrementó la hiperpolarización que sigue a las ráfagas. Lo cual es lógico: bloquear una corriente entrante catiónica (HCN) deja sin oposición una saliente (SK). Sin embargo, los canales HCN no son fundamentales para la generación de la ráfaga como lo son los canales de calcio tipo T.

La demostración de la participación de los canales activados por calcio se realizó utilizando bloqueadores selectivos a las concentraciones usadas: apamina (200 nM) para los SK (Atherton and Bevan, 2005; Yanovsky et al., 2005) y TEA (500  $\mu$ M) para los BK (Faber and Sah, 2002; Sah, 1996). Claramente, el bloqueo de los canales SK aumentó la frecuencia de disparo.

Sin embargo, estos canales no son los únicos que estarían participando en la hiperpolarización que sigue a las ráfagas. Se necesita mayor investigación para saber qué otros canales participan.

### **Importancia fisiológica**

La actividad tónica de potenciales de acción y las transiciones espontáneas de esta actividad hacia disparos en ráfagas pueden estar relacionados con el papel de las neuronas de la SNr en diferentes tareas o programas motores (Gulley et al., 2002; Jiang et al., 2003; Koch et al., 2000; Salamone et al., 1998; Takakusaki et al., 2003, 2004; Yuan et al., 2004). El que el NMDA facilite estas transiciones puede implicar el papel del NST en provocarlas, y refuerza la idea de que la inducción de CPGs motores debida al NMDA no es algo particular de la médula espinal o el tallo cerebral (O'Donnell, 2003; Tseng y O'Donnell, 2004; Tseng et al., 2006; Vergara et al., 2003), sino un mecanismo general propio de muchos circuitos cerebrales, incluyendo los telencefálicos (Vergara et al., 2003). Cambios

en la magnitud del balance sináptico que recibe un núcleo (inhibición / excitación), favorece estas oscilaciones (Salamone et al., 1998; Yuan et al., 2004), teniendo una repercusión obvia en la conducta motora (Salamone et al., 1998; Takakusaki et al., 2003, 2004).

Cuando estos cambios en el balance sináptico se convierten en patológicos, como predice el modelo de tasa de disparo en la enfermedad de Parkinson, encontramos que las oscilaciones se vuelven robustas, rítmicas y las ráfagas muy prolongadas (Albin et al., 1989; Smith et al., 1998; Obeso et al., 2000; Bevan et al., 2002; Magill et al., 2001; Plenz y Kitai, 1999; Schnitzler y Gross, 2005). Este cambio de actividad se ha relacionado con el temblor en reposo y la rigidez que se presenta en dicha enfermedad (Bergman et al., 1994; Obeso et al., 2000; Plenz y Kitai, 1999; Schnitzler y Gross, 2005; Bevan et al., 2002; Brown et al., 2001; Raz et al., 2000), esto es, el CPG se ha adueñado del circuito, ya no deja a las neuronas dividirse las tareas, y todas quedan enganchadas sin poder hacer otra cosa como predice el modelo oscilatorio. Hemos “conciliado” a ambos modelos.

## Capítulo 10

### Conclusiones generales

1.- La activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D1 incrementan la transmisión glutamatérgica subtálamo-nigral, mientras que la activación de los de la clase D2 la disminuyen.

2.- El control de dicha transmisión glutamatérgica, por la activación de los receptores D1 y D2 se lleva acabo a nivel presináptico.

3.- El efecto de la activación de los receptores D1 es antagónico al control que ejercen los receptores D2.

4.- Las entradas excitadoras que llegan a la misma neurona GABAérgica de la SNr pueden poseer ambos receptores. Sin embargo no sabemos si ambos tipos de receptores se puedan encontrar en una misma terminal sináptica.

5.- Las neuronas GABAérgicas de proyección de la SNr pueden presentar transiciones espontáneas en su potencial de membrana y disparo en ráfagas.

6.- Las neuronas GABAérgicas de la SNr, presentaron actividad oscilatoria rítmica y disparos en ráfaga, al mimetizar la sobreactivación de la vía indirecta empleando un protocolo similar al de locomoción ficticia. Del mismo modo, esto se observó al bloquear la entrada inhibitoria de la vía directa con bicuculina. Ambos cambios propuestos por el modelo de tasa de disparo (*rate model*).

En conclusión, la dopamina puede afectar la salida de los ganglios basales, modulando no solo las entradas GABAérgicas del estriado, también a las entradas glutamatérgicas del núcleo subtalámico. Estos efectos pueden ayudar a entender la acción de la dopamina en el control motor y una mejor comprensión en los cambios durante un déficit en el movimiento, como en la enfermedad de

Parkinson. Por otro lado, conciliamos a los modelos que explican la enfermedad de Parkinson: el de tasa de disparo y el oscilatorio, mostrando en la presente tesis que ambos modelos no son excluyentes sino incluyentes.

## Referencias

**Aiso, M., Potter, W. Z. and Saavedra, J. M.** Axonal transport of dopamine D1 receptors in the brain. *Brian Res* 426 (1987) 392-396.

**Albin, R. L., Young, A. B. and Penney J. B.** The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosci.* 12 (1989) 366-375.

**Alford, S., Schwartz, E. and Di Prisco, G. V.** The pharmacology of vertebrate spinal central pattern Generators. *The Neuroscientist* 9 (2003) 217-228.

**Arshavsky Y. I.** Cellular and network properties in the functioning of the nervous system: from central pattern generators to cognition. *Brain Res. Brain Res Rev* 41 (2003) 229-267.

**Atherton, J. F. and Bevan, M. D.** Ionic mechanisms underlying autonomous action potential generation in the somata and dendrites of GABAergic substantia nigra pars reticulata neurons *in vitro*. *J Neurosci* 25 (2005) 8272-8281.

**Augood, S. J., Hollingsworth, Z. R., Standaert, D. G., Emson, P. C. and Penney, Jr, J. B.** Localization of dopaminergic markers in the human subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 421 (2000) 247-255.

**Bamford, N. S., Robinson, S., Palmiter, R. D., Joyce, J. A., Morre, C. and Meshul, C. K.** Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J Neurosci* 24 (2004) 9541–9552.

**Baufreton, J., Garret, M., Rivera, A., de la Calle, A., Gonon, F., Dufy, B., Bioulac, B. and Taupignon, A.** D5 (Not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *J. Neurosci* 23 (2003) 816-825.

**Benazzouz, A., Gao, D. M., Ni, Z. G., Piallat, B., Bouali-Benazzouz, R. and Benabid, A. L.** Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on the neuronal activities of the substantia nigra pars reticulata and ventrolateral nucleus of the thalamus in the rat. *Neuroscience* 99 (2000) 289-295.

**Bergman, H., Wichmann, T. and DeLong, M. R.** Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249 (1990) 1436-1438.

**Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B. and DeLong, M. R.** The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72 (1994) 507-520.

- Bertrand, S. and Cazalets, J. R.** Regulation by glycine,  $Mg^{2+}$  and polyamines of the N-methyl-D-aspartate-induced locomotion in the neonatal rat spinal cord *in vitro*. *Neuroscience* 94 (1999) 1199-1206.
- Beurrier, C., Congar, P., Bioulac, B. and Hammond C.** Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode. *J Neurosci* 19 (1999) 599-609.
- Bevan, M. D., Bolam, J. P. and Crossman, A. R.** Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 6 (1994a) 320-334.
- Bevan, M. D., Crossman, A. R. and Bolam, J. P.** Neurons projecting from the entopeduncular nucleus to the thalamus receive convergent synaptic inputs from the subthalamic nucleus and the neostriatum in the rat. *Brain Res* 659 (1994b) 99-109.
- Bevan, M. D., Smith, A. D. and Bolam J. P.** The substantia nigra as a site of synaptic integration of functionally diverse information arising from the ventral pallidum and the globus pallidus in the rat. *Neuroscience* 75 (1996) 5-12.
- Bevan, M. D. and Wilson, C. J.** Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci* 19 (1999) 7617-7628.
- Bevan, M. D., Magill, P. J., Terman, D., Bolam, J. P. and Wilson, C. J.** Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends in Neurosci* 25 (2002) 525-531.
- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A. C. and Bevan, M. D.** Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (2000) 527-542.
- Bolshakov, V. Y. and Siegelbaum, S. A.** Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science* 269 (1995) 1730– 1734.
- Bonci, A. and Malenka, R. C.** Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 19 (1999) 3723-3730.
- Boraud, T., Bezard, E., Bioulac, B. and Gross, C. E.** From single extracellular unit recording in experimental and human Parkinsonism to the development of a functional concept of the role played by the basal ganglia in motor control. *Progress in Neurobiol* 66 (2002) 265-283.
- Bouthenet, Marie-Louise., Souil, E., Martres, Marie-Pascale., Sokoloff, P., Giros, B. and Schwartz, Jean-Charles.** Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using *in situ*

hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brian Res* 564 (1991) 203-219.

**Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Garcia, M., Pages, C., Hipskind, R. A. and Caboche, J.** Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci* 22 (2002) 8911-8921.

**Brown, L. L., Makman, M. H., Wolfson, L. I., Dvorkin, B., Warner, C. and Katzman, R.** A direct role of dopamine in the rat subthalamic nucleus and an adjacent intrapeduncular area. *Science* 206 (1979) 1416-1418.

**Brown, P., Oliviero, A., Mazzone, P., Insola, A., Tonali, P. and Lázaro, V. D.** Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *J Neurosci* 21 (2001) 1033-1038.

**Brown, P.** Bad oscillations in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 70 (2006) 27-30.

**Brownstone, R. M., Gossard, J. P. and Hultborn, H.** Voltage-dependent excitation of motoneurons from spinal locomotor centres in the cat. *Exp Brain Res* 102 (1994) 34-44.

**Canteras, N. S., Shammah-Lagnado, S. J., Silva, B. A. and Ricardo, J. A.** Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res* 513 (1990) 43-59.

**Cassidy, M., Mazzone, P., Oliviero, A., Insola, A., Tonali, P., Lazzaro, V. D. and Brown, P.** Movement-related changes in synchronization in the human basal ganglia. *Brain* 125 (2002) 1235-1246.

**Castner, S. A. and Goldman-Rakic, P. S.** Enhancement of working memory in aged monkeys by a sensitizing regimen of dopamine D1 receptor stimulation. *J Neurosci* 24 (2004) 1446-1450.

**Castner, S. A., Goldman-Rakic, P. S. and Williams, G. V.** Animal models of working memory: insights for targeting cognitive dysfunction in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 174 (2004) 111-125.

**Cazalets, J. R., Borde, M. and Clarac, F.** Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *J Neurosci* 15 (1995) 4943-4951.

**Cepeda, C., Hurst, R. S., Altemus, K. L., Flores-Hernandez, J., Calvert, J., Jokel, E. S., Grandy, D. K., Low, M. J., Rubinstein, M., Ariano, M. A. and Levine, M.S.** Facilitated glutamatergic transmission in the striatum of D2 dopamine receptor-deficient mice. *J Neurophysiol* 85 (2001) 659-670.

- Chang, H. T., Kita, H. and Kitai S. T.** The fine structure of the rat subthalamic nucleus: An electron microscopic study. *J Comp Neurol* 221 (1983) 113-123.
- Chang, H. T., Kita, H. and Kitai S. T.** The ultrastructural morphology of the subthalamic-nigral axon terminals intracellularly labeled with horseradish peroxidase. *Brain Res* 299 (1984) 182-185.
- Cheramy, A., Leviel, V. and Glowinski, J.** Dendritic release of dopamine the substantia nigra. *Nature* 289 (1981) 537-542.
- Chevalier, G. and Deniau, J. M.** Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends in Neurosci* 13 (1990) 277-280.
- Choi, S. W., Machida, C. A. and Ronnekleiv, O. K.** Distribution of dopamine D1, D2, and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. *Mol Brain Res* 31 (1995) 86-94.
- Ciliax, B. J., Nash, N., Heilman, C., Sunahara, R., Hartney, A., Tiberi, M., Rye, D. B., Caron, M. G., Niznik, H. B. and Levey, A. I.** Dopamine D5 receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse* 37 (2000) 125-145, 2000.
- Clements, J. D. and Silver, R. A.** Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends in Neurosci* 23 (2000) 105-113.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E. and Roth, R. H.** The biochemical basis of neuropharmacology. 7<sup>th</sup> Ed. *Oxford Univ. Press, New York* (1996).
- Cooper, J. A. and Stanford, I. M.** Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA<sub>A</sub> IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41 (2001) 62-71.
- Cossart, R., Ikegaya, Y. and Yuste, R.** Calcium imaging of cortical networks dynamics. *Cell Calcium* 37 (2005) 451-457.
- Crocker, A. D.** The regulation of motor control: An evaluation of the role of dopamine receptors in the substantia nigra. *Rev in Neurosci* 8 (1997) 55-76.
- Day, M., Carr, D. B., Ulrich, S., Ilijic, E., Tkatch, T. and Surmeier, D. J.** Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir<sub>2</sub>, and K<sub>leak</sub> channels. *J Neurosci* 21 (2005) 8776-8787.
- Defagot, M. C., Malchiodi, E. L., Villar, M. J. and Antonelli, M. C.** Distribution of D4 dopamine receptor in the rat brain with sequence-specific antibodies. *Mol Brain Res* 45 (1997) 1-12.

- Degos, B., Deniau, J. M., Thierry, A. M., Glowinski, J., Pezard, L. and Maurice, N.** Neuroleptic-induced catalepsy: Electrophysiological mechanisms of functional recovery induced by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25 (2005) 7687-7696.
- Deniau, J. M., Menetrey, A. and Charpier, S.** The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *J Neurosci* 73 (1996) 761-781.
- Dunwiddie, T. V. and Haas, H. L.** Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol* 369 (1985) 365-377.
- Dziewczapolski, G., Menalled, L. B., Garcia, M. C., Mora, M. A., Gershanik, O. S. and Rubinstein, M.** Opposite roles of D1 and D5 dopamine receptors in locomotion revealed by selective antisense oligonucleotides. *Neuroreport* 1 (1998) 1-5.
- Edwards, F. A., Konnerth, A. and Sakmann, B.** Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: A patch clamp study. *J Physiol (Lond)* 430 (1990) 213-249.
- Egan, M. F. and Weinberger, D. R.** Neurobiology of schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 7 (1997) 701-707.
- Enomoto, E., Kogo, M., Koizumi, K., Ishihama, K. and Yamanishi, T.** Localization of premotoneurons for an NMDA-induced repetitive rhythmical activity to TMNs. *Neuroreport* 13 (2002) 2303-2307.
- Faber, E. S. and Sah, P.** Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. *J Neurosci* 22:5 (2002) 1618-1628.
- Falkenburger, B. H., Barstow, K. L. and Mintz, I. M.** Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293 (2001) 2465-2470.
- Féger, J., Bevan, M. and Crossman, A. R.** The projections from the parafascicular thalamic nucleus to the subthalamic nucleus and the striatum arise from separate neuronal populations: a comparison with the corticostriatal and corticosubthalamic efferents in a retrograde fluorescent double-labelling study. *Neuroscience* 60 (1994) 125-132.
- Floran, B., Aceves, J., Sierra, A. and Martinez-Fong D.** Activation of D<sub>1</sub> dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 116 (1990) 136-140.
- Flores-Hernandez, J., Galarraga, E. and Bargas, J.** Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse* 25 (1997) 185-195.

- Flores, G., Liang, J. J., Sierra, A., Martínez-Fong, D., Quirión, R., Aceves, J. and Srivastava, L. K.** Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience* 91 (1999) 549-556.
- Florezco, S. B., Blaha, C. D., Yang, C. R. and Phillips, A. G.** Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: cellular mechanisms of input selection. *J Neurosci* 21 (2001) 2851-2860.
- François, C., Tande, D., Yelnik, J. and Hirsch, E. C.** Distribution and morphology of nigral axons projecting to the Thalamus in primates. *J Comp Neurol* 447 (2002) 249-260.
- Fremeau, Jr. R. T., Duncan, G. E., Fornaretto, Maria-Gioia., Dearry, A., Gingrich, J. A., Breese, G. R. and Caron, M. G.** Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 3772-3776.
- Fujimoto, K. and Kita, H.** Response characteristics of subthalamic neurons to the stimulation of the sensorimotor cortex in the rat. *Brain Res* 609 (1993) 185-192.
- Galarraga, E., Bargas, J., Martinez-Fong, D. and Aceves, J.** Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neurosci Lett* 81 (1987) 351-355.
- Gao, W. J. and Goldman-Rakic, P. S.** Presynaptic regulation of recurrent excitation by D1 receptors in prefrontal circuits. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 295-300.
- Gao, W. J. and Goldman-Rakic, P. S.** Selective modulation of excitatory and inhibitory microcircuits by dopamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) 2836-2841.
- Geffen, L. B., Jessell, T. M., Cuello, A. C. and Inversen, L. L.** Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature* 260 (1976) 258-260.
- Gehlert, D. R., Gackenheim, S. L., Seeman, P. and Schaus, J.** Autoradiographic localization of [3H] quinpirole binding to dopamine D2 and D3 receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol* 211 (1992) 189-194.
- Gerfen, C. R., Baimbridge, K. G. and Miller, J. J.** The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (1985) 8780-8784.

- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, Jr., F. J. and Sibley, D. R.** D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250 (1990) 1429-1432.
- Gerfen, C. R., Keefe, K. A. and Gauda, E. B.** D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1 and D2-dopamine receptor on separate populations of neurons results in potentiated early gene response in D1 containing neurons. *J Neurosci* 15 (1995) 8167-8176.
- Gersdorff, H. and Matthews, G.** Electrophysiology of synaptic vesicle cycling. *Annu Rev Physiol* 61 (1999) 725-752.
- Giros, B., Sokoloff, P., Martres, Marie-Pascale., Riou, Jean-Francois., Emorine, L. J. and Schwartz, Jean-Charles.** Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342 (1989) 923-926.
- Greffrath, W., Magerl, W., Disque-Kaiser, U., Martin, E., Reuss, S. and Boehmer, G.** Contribution of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels to hyperpolarizing after-potentials and discharge pattern in rat supraoptic neurons. *J Neuroendocrinol* 16 (2004) 577-588.
- Grillner, S. and Zangger, P.** The effect of dorsal root transection on the efferent motor pattern in the cat's hindlimb during locomotion. *Acta Physiol Scand* 120 (1984) 393-405.
- Grillner, S.** The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev* 4 (2003) 573-586.
- Goldman-Rakic, P. S., Muly III, E. C. and Williams, G. V.** D1 receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res Rev* 31 (2000) 295–301.
- Goldman-Rakic, P. S., Castner, S. A., Svensson, T. H., Siever, L. J., Williams, G. V.** Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 174 (2004) 3-16.
- Góngora-Alfaro, J. L., Hernandez-Lopez, S., Flores-Hernandez, J. and Galárraga, E.** Firing frequency modulation of substantia nigra reticulata neurons by 5-hydroxytryptamine. *Neurosci Res* 29 (1997) 225-231.
- Gonzalez-Hernandez, T. and Rodríguez, M.** Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol* 421 (2000) 107-135.
- Gordon, I. T. and Whelan, P. J.** Deciphering the organization and modulation of spinal locomotor central pattern generators. *J Exp Biol* 209 (2006) 2007-2014.

**Guertin, P. A. and Hounsgaard, J.** Chemical and electrical stimulation induce rhythmic motor activity in an in vitro preparation of the spinal cord from adult turtles. *Neurosci Lett* 245 (1998) 5-8.

**Guertin, P. A. and Hounsgaard, J.** NMDA-induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles. *J Neurophysiol* 80 (1998a) 3380-3382.

**Guertin, P. A. and Hounsgaard, J.** Conditional intrinsic voltage oscillations in mature vertebrate neurons undergo specific changes in culture. *J Neurophysiol* 95 (2006) 2024-2027.

**Gulley, J. M., Kosobud, A. E. K. and Rebec, G. V.** Behavior-related modulation of substantia nigra pars reticulata neurons in rats performing a conditioned reinforcement task. *Neuroscience* 111 (2002) 337-349.

**Guzmán, J. N., Hernández, A., Galarraga, E., Tapia, D., Laville, A., Vergara, R., Aceves, J. and Bargas J.** Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci* 23 (2003) 8931-8940.

**Hajós, M. and Greenfield, S. A.** Synaptic connections between pars compacta and pars reticulata neurones: electrophysiological evidence for functional modules within the substantia nigra. *Brain Res* 660 (1994) 216-224.

**Hamill, O., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.** Improved patch-clamp techniques for high-resolutive currents recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüger Arch* 391 (1981) 85-100.

**Hammond, C. and Yelnik, J.** Intracellular labelling of rat subthalamic neurones with horseradish peroxidase: computer analysis of dendrites and characterization of axon arborization. *Neuroscience* 8 (1983) 781-790.

**Hassani, O. K., Mouroux, M. and Féger, J.** Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience* 72 (1996) 105-115.

**Hassani, Oum-Kaltoum., François, C., Yelnik, J. and Féger, J.** Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 749 (1997) 88-94.

**Hassani, O. -K. and Féger, J.** Effects of intrasubthalamic injection of dopamine receptor agonists on subthalamic neurons in normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats: an electrophysiological and c-fos study. *Neuroscience* 92 (1999) 533-543.

- Hazrati, Lili-Naz. and Parent, A.** Convergence of subthalamic and striatal efferents at pallidal level in primates: an anterograde double-labeling study with biocytin and PHA-L. *Brain Res* 569 (1992) 336-340.
- Heady, T. N., Gomora, J. C. Macdonald, T. L. and Perez-Reyes E.** Molecular pharmacology of T-type  $Ca^{2+}$  channels. *J Pharmacol* 85 (2001) 339-350.
- Hedin, K. E., Duerson, K. and Clapham, D. E.** Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell Signal* 5 (1993) 505-518.
- Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Breeze, L. J., Wang, K. K., Chavkin, C. and Catterall, W. A.** N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 3362-3367.
- Hernandez-Echeagaray, E., Galarraga, E. and Bargas J.** 3- $\alpha$ -Chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology* 37 (1998) 1493-1502.
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A. and Galárraga, E.**  $D_1$  receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type  $Ca^{2+}$  conductance. *J Neurosci* 17 (1997) 3334-3342.
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galárraga, E., Bargas, J., Hamm, H. and Surmeier, D. J.**  $D_2$  dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-Type  $Ca^{2+}$  currents and excitability via a novel  $PLC\beta_1$ - $IP_3$ -calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20 (2000) 8987-8995.
- Hochman, S., Jordan, L. M. and MacDonald, J. F.** N-Methyl-D-Aspartate receptor-mediated voltage oscillations in neurons surrounding the central canal in slices of rat spinal cord. *J Neurophysiol* 72 (1994) 567-577.
- Hontanilla, B., Perent, A. and Gimenez-Amaya, J. M.** Parvalbumin and calbindin D-28k in the entopeduncular nucleus, subthalamic nucleus, and substantia nigra of the rat as revealed by double-immunohistochemical methods. *Synapse* 25 (1997) 359-367.
- Horikawa, K. and Armstrong, W. E.** A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25 (1988) 1-11.
- Hornykiewicz, O.** Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications. *Br Med Bull* 29 (1973) 172-178.

- Hsiao, C., del Negro, C. A., Trueblood, P. R. and Chandler, S. H.** Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* 79 (1998) 2847-2856.
- Hubel, D. H. and Wiesel, T. N.** Brain mechanisms of vision. *Sci Am.* 241 (1979) 150-162.
- Hurd, Y. L., Suzuki, M. and Sedvall, G. C.** D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *J Chem Neuroanat* 22 (2001) 127-137.
- Hutchison, W. D., Dostrovsky, J. O., Walters, J. R., Courtemanche, R., Boraud, T., Goldberg, J. and Brown, P.** Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci* 24 (2004) 9240-9243. Review
- Ibañez-Sandoval, O.** Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (2003).
- Ibañez-Sandoval, O., Hernández, A., Florán, B., Galárraga, E., Tapia, D., Valdiosera, R., Erlij, D., Aceves, J. and Bargas, J.** Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors. *J Neurophysiol* 95 (2006) 1800-1811.
- Iribe, Y., Moore, K., Pang, K. C. and Tepper, J. M.** Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro. *J Neurophysiol* 82 (1999) 925-933.
- Jean, A.** Brain stem control of swallowing neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev* 81 (2001) 929-969.
- Jiang, H., Stein, B. E. and McHaffie, J. G.** Opposing basal ganglia processes shape midbrain visuomotor activity bilaterally. *Nature* 423 (2003) 982-986.
- Johnson, S. W., Seutin, V. and North, R. A.** Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump. *Science* 258 (1992) 665-667.
- Johnson, S. M., Smith, J. C., Funk, G. D. and Feldman, J. L.** Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol* 72 (1994) 2598-2608.
- Kahn, R. S., Harvey, P. D., Davidson, M., Keefe, R. S., Apter, S., Neale, J. M., Mohs, R. C. and Davis, K. L.** Neuropsychological correlates of central monoamine function in chronic schizophrenia: relationship between CSF metabolites and cognitive function. *Schizophr Res* 11 (1994) 217-224.
- Kamiya, H. and Zucker, R. S.** Residual Ca<sup>2+</sup> and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371 (1994) 603-606.

**Kang, J., Huguenard, J. R. and Prince, D. A.** Development of BK channels in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 76 (1996) 188-198.

**Kanazawa, I., Marshall, G. R. and Kelly, J. S.** Afferents to the rat substantia nigra studied with horseradish peroxidase, with special reference to fibers from the subthalamic nucleus. *Brain Res* 115 (1976) 485-491.

**Kanazawa, I., Emson, P. C. and Emson, A. C.** Evidence for the existence of substance P-containing fibers in the striato-nigral and pallido-nigral pathways in rat brain. *Brain Res.* 119 (1977) 447-453.

**Katz, B. and Miledi, R.** The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195 (1968) 481-492.

**Kebabian, J. W. and Calne, D. B.** Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277 (1979) 93-96.

**Kha, H. T., Finkelstein, D. I., Tomas, D., Drago, J., Pow, D. V. and Horne, M. K.** Projections from the substantia nigra pars reticulata to the motor Thalamus of the rat: single axon reconstructions and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 440 (2001) 20-30.

**Khan, Z. U., Gutierrez, A., Martin, R., Penafiel, A., Rivera, A. and De La Calle, A.** Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100 (2000) 689-699.

**Kiehn, O. and Eken, T.** Functional role of plateau potentials in vertebrate motor neurons. *Curr Opin Neurobiol* 8 (1998) 746-752.

**Kiehn, O.** Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu. Rev. Neurosci* 29 (2006) 279-306.

**Kita, H., Chang, H. T. and Kitai, S. T.** The morphology of intracellularly labeled rat subthalamic neurons: a light microscopic analysis. *J Comp Neurol* 215 (1983a) 245-257.

**Kita, H., Chang, H. T. and Kitai, S. T.** Pallidal inputs to subthalamus: intracellular analysis. *Brain Res* 264 (1983b) 255-265.

**Kita, H. and Kitai, S. T.** Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol* 260 (1987) 435-452.

**Kita, H. and Kitai, S. T.** Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res* 447:2 (1988) 346-352.

**Kita, H.** Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neuroscience* 70 (1996) 925-940.

- Koch, M., Fendt, M. and Kretschmer, B. D.** Role of the substantia nigra pars reticulata in sensorimotor gating, measured by prepulse inhibition of startle in rats. *Behav Brain Res* 117 (2000) 153-162.
- Kochegarov, A. A.** Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. *Cell Calcium* 33 (2003) 145-162.
- Koga, E. and Momiyama, T.** Presynaptic dopamine D2-like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurons. *J Physiol (Lond)* 523 (2000) 163-173.
- Koos, T., Tepper, J. M. and Wilson, C. J.** Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24 (2004) 7916-7922.
- Kreiss, D. S., Anderson, L. A. and Walters, J. R.** Apomorphine and dopamine D1 receptor agonists increase the firing rates of subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience* 72 (1996) 863-876.
- Lee, J. H., Gomora, J. C., Cribbs, L. L. and Perez-Reyes, E.** Nickel block of three cloned T-type calcium channels: Low concentrations selectively block  $\alpha 1H$ . *Biophys J* 77 (1999) 3034-3042.
- Lee, R. H. and Heckman.** Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic in persistent inward currents. *J Neurophysiol* 80 (1998) 583-593.
- Lee, S. P., So, C. H., Rashid, A. J., Varghese, G., Cheng, R., Lanca, A. J., O'Dowd, B. F. and George, S. R.** Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* 279 (2004) 35671-35678.
- Le Moine, C., Normand, E., Guitteny, A. F., Fouque, B., Teoule, R. and Bloch, B.** Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 230-234.
- Levy, R., Hutchison, W. D., Lozano, A. M. and Dostrovsky, J. O.** High-frequency synchronization of neuronal activity in the subthalamic nucleus of parkinsonian patients with limb tremor. *J Neurosci* 20 (2000) 7766-7775.
- Lidow, M. S., Goldman-Rakic, P. S., Gallager, D. W. and Rakic, P.** Distribution of dopaminergic receptors in the primate cerebral cortex: quantitative autoradiographic analysis using [3H]raclopride, [3H]spiperone and [3H]SCH23390. *Neuroscience* 40 (1991) 657-671.

- Limousin, P., Krack, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Ardouin, C., Hoffmann, D. and Benabid A. L.** Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinsons disease. *N Engl J Med* 339 (1998) 1105-1111.
- Lo, F. S. and Mize, R. R.** Synaptic regulation of L-type Ca(2+) channel activity and long-term depression during refinement of the retinocollicular pathway in developing rodent superior colliculus. *J Neurosci* 20 (2000) RC58
- Maccaferri, G. and Dingledine, R.** Control of feedforward dendritic inhibition by NMDA receptor-dependent spike timing in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 22 (2002) 5462-5472.
- Magill, P. J., Bolam, J. P. and Bevan, M. D.** Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106 (2001) 313-330.
- Mahon, S., Vautrelle, N., Pezard, L., Slaght, S. J., Deniau, J. M., Chouvet, G. and Charpier, S.** Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep-wake cycle. *J Neurosci* 26 (2006) 12587-12595.
- Mailly, P., Charpier, S., Mahon, S., Menetrey, A., Thierry, A. M., Glowinski, J. and Deniau, J. M.** Dendritic arborizations of the rat substantia nigra pars reticulata neurons: spatial organization and relation to the lamellar compartmentation of striato-nigral projections. *J Neurosci* 21:17 (2001) 6874-6888.
- Mailly, P., Charpier, S., Menetrey, A. and Deniau, J. M.** Three-dimensional organization of the recurrent axon collateral network of the substantia nigra pars reticulata neurons in the rat. *J Neurosci* 23:12 (2003) 5247-5257.
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J. H., Zhou, Q., Civelli, O., Akil, H. and Watson, S. J.** A comparison of D1 receptor binding and mRNA in the brain using receptor autoradiographic and *in situ* hybridization techniques. *Neuroscience* 46 (1992) 959-971.
- Martin, L. P. and Waszczak, B. L.** D1 agonist-induced excitation of substantia nigra pars reticulata neurons: mediation by D1 receptors on striatonigral terminals via a pertussis toxin-sensitive coupling pathway. *J Neurosci* 14 (1994) 4494-4506.
- Martin, R. L., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E. and Hanck, D. A.** Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1 (2000) 302-308.
- Marty, A. and Neher, E.** *Single-Channels Recording*. 2nd ed. Plenum Press. New York and London (1995). Chapter 2. pag. 31-52.

- Matsumoto, M., Hidaka, K., Tada, S., Tasaki, Y. and Yamaguchi, T.** Low levels of mRNA for dopamine D4 receptor in human cerebral cortex and striatum. *J Neurochem* 66:3 (1996) 915-919.
- Maurice, N., Thierry, A. M., Glowinski, J. and Deniau, J. M.** Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 23 (2003) 9929-9936.
- Meltzer, H. Y. and Stahl, S. M.** The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull* 2 (1976) 19-76.
- Mengual, E., Heras, S., Erro, E., Lanciego, J. L. and Jiménez-Amaya, J. M.** Thalamic interaction between the input and the output systems of the basal ganglia. *J Chem Neuroanat* 16 (1999) 187-200.
- Mintz, I., Hammond, C., Guibert, B. and Leviel, V.** Stimulation of the subthalamic nucleus enhances the release of dopamine in the rat substantia nigra. *Brain Res* 376 (1986) 406-408.
- Mink, J. W.** The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Progress in Neurobiol* 50 (1996) 381-425.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. and Caron, M. G.** Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78 (1998) 189-225.
- Momiyama, T. and Koga, E.** Dopamine D<sub>2</sub>-like receptors selectively block N-type Ca<sup>2+</sup> channels to reduce GABA release onto rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol* 33 (2001) 479-492.
- Monsma Jr, F. J., McVittie, L. D., Gerfen, C. R., Mahan, L. C. and Sibley, D. R.** Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342 (1989) 926-929.
- Monsma Jr, F. J., Mahan, L. C., McVittie, L. D. and Gerfen, C. R.** Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 6723-6727.
- Mori, S.** Integration of posture and locomotion in acute decerebrate cats and in awake, free moving cats. *Progress in Neurobiol* 28 (1987) 161-196.
- Mountcastle, V. B.** The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (1997) 701-722.
- Mountcastle, V. B.** Introduction. Computation in cortical columns. *Cereb Cortex* 13 (2003) 2-4.
- Mouroux, M., Hassani, O. -K. and Féger, J.** Electrophysiological study of the excitatory parafascicular projection to the subthalamic nucleus and evidence for ipsi- and contralateral controls. *Neuroscience* 67 (1995) 399-407.

- Mrzljak, L., Bergson, C., Pappy, M., Huff, R., Levenson, R. and Goldman-Rakic, P. S.** Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381 (1996) 245-248.
- Nakanishi, H., Kita, H. and Kitai, S. T.** Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an *in vitro* slice preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation. *Brain Res* 437 (1987) 45-55.
- Nambu, A.** A new approach to understand the pathophysiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 252 (2005) [Suppl 4] IV/1-IV/4.
- Neve, K. A., Seamans, J. K. and Trantham-Davidson, H.** Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 24 (2004) 165-205.
- Ni, Z., Bouali-Benazzouz, R., Gao, D., Benabid, A-L. and Benazzouz, A.** Intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine induces changes in the firing rate and pattern of subthalamic nucleus neurons in the rat. *Synapse* 40 (2001) 145-153.
- Nishi, A., Snyder, G. L. and Greengard, P.** Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17 (1997) 8147-8155.
- Nishimuta, K., Sasamoto, K. and Ninomiya, Y.** Neural activities in the substantia nigra modulated by stimulation of the orofacial motor cortex and rhythmical jaw movements in the rat. *Neuroscience* 113 (2002) 915-923.
- Nishio, H., Katoh, E., Yamazaki, T., Inui, T., Nishiuchi, Y. and Kimura, T.** Structure-activity relationships of calcicludine and dantrolene, homologous peptides acting on different targets, calcium and potassium channels. *Biochem and Biophys Res* 262 (1999) 319-321.
- Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Rodríguez, M., Lanciego, J. L., Artieda, J., Gonzalo, N. and Olanow, C. W.** Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends in Neurosci* 23 (2000) S8-S19.
- Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Rodríguez, M., Arbizu, J. and Giménez-Amaya, J. M.** The basal ganglia and disorders of movement: Pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci* (2002) 51-55.
- O'Donnell, P.** Dopamine gating of forebrain neural ensembles. *Eur J Neurosci* 17 (2003) 429-435.
- Paladini, C. A., Iribe, Y. and Tepper, J. M.** GABA<sub>A</sub> receptor stimulation blocks NMDA-induced bursting of dopaminergic neurons in vitro by decreasing input resistance. *Brain Res* 832 (1999) 145-151.

**Parent, A., Fortin, M., Cote, P. Y. and Cicchetti, F.** Calcium-binding proteins in primate basal ganglia. *Neurosci Res* 25 (1996) 309-334.

**Paulsen, O. and Heggelund, P.** The quantal size at retinogeniculate synapses determined from spontaneous and evoked EPSCs in guinea-pig thalamic slices. *J Physiol* 480 (1994) 505-511.

**Pisani, A., Bonsi, P., Centonze, D., Calabresi, P. and Bernardi, G.** Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20 (2000) 1–6.

**Prensa, L. and Parent, A.** The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci* 21 (2001) 7247-7260.

**Plenz, D. and Kitai, S. T.** A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* 400 (1999) 677-681.

**Pralong, E., Ghika, J., Temperli, P., Pollo, C., Vingerhoets, F. and Villemure, J-G.** Electrophysiological localization of the subthalamic nucleus in parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 325 (2002) 144-146.

**Pucak, M. L. and Grace, A. A.** Regulation of substantia nigra dopamine neurons. *Crit Rev Neurobiol* 9 (1994) 67-89.

**Rajakumar, N., Elisevich, K. and Flumerfelt, B. A.** Parvalbumin-containing GABAergic neurons in the basal ganglia output system of the rat. *J Comp Neurol* 350 (1994) 324-336.

**Radnikow, G. and Misgeld, U.** Dopamine D<sub>1</sub> receptors facilitate GABA<sub>A</sub> synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 18 (1998) 2009-2016.

**Rao, S. G., Williams, G. V. and Goldman-Rakic, P. S.** Destruction and creation of spatial tuning by disinhibition: GABA<sub>A</sub> blockade of prefrontal cortical neurons engaged by working memory. *J Neurosci* 20 (2000) 485– 494.

**Raz, A., Vaadia, E. and Bergman, H.** Firing patterns and correlations of spontaneous discharge of pallidal neurons in the normal and the tremulous 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine vervet model of Parkinsonism. *J Neurosci* 20 (2000) 8559-8571.

**Richards, C. D., Shiroyama, T. and Kitai, S. T.** Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the *substantia nigra* of the rat. *Neuroscience* 80 (1997) 545-557.

- Rivera, A., Cuéllar, B., Girón, F. J., Grandy, D. K., de la Calle, A. and Moratalla, R. Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matriz compartments of the striatum. *J Neurochem* 80 (2002) 219-229.
- Robinson, R. B. and Siegelbaum, S. A. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 65 (2003) 453-480.
- Robledo, P. and Féger, J. Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data. *Brain Res.* 518 (1990) 47-54.
- Rogozinska, K., Skangiel-Kramska, J. D1 dopamine receptors distribution following photothrombotic stroke in rat cerebral cortex. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 65 (2005) 167-172.
- Rohrbacher, J., Ichinohe, N. and Kitai, S. T. Electrophysiological characteristics of *substantia nigra* neurons in organotypic cultures: spontaneous and evoked activities. *Neuroscience* 97 (2000) 703-714.
- Romo, R. and Schultz, W. Prolonged changes in dopaminergic terminal excitability and short changes in dopaminergic neuron discharge rate after short peripheral stimulation in monkey. *Neurosci Lett* 62 (1985) 335-340.
- Rosales, M. G., Flores, G., Hernandez, S., Martinez-Fong, D. and Aceves, J. Activation of subthalamic neurons produces NMDA receptor-mediated dendritic dopamine release in substantia nigra pars reticulata: a microdialysis study in the rat. *Brain Res* 645 (1994) 335-337.
- Rosales, M. G., Martínez-Fong, D., Morales, R., Nuñez, A., Flores, G., Góngora-Alfaro, J. L., Floran, B. and Aceves, J. Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in *pars reticulata* of the rat *substantia nigra*: a microdialysis study. *Neuroscience* 80 (1997) 803-810.
- Rossignol, S. Neural control of stereotypic limb movements, New York, *Oxford University Press* (1996).
- Rossignol, S., Dubuc, R. and Gossard, J. P. Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev* 86 (2006) 89-154.
- Ruskin, D. N., Bergstrom, D. A. and Walters, J. R. Multisecond oscillations in firing rate in the globus pallidus: synergistic modulation by D1 and D2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 290 (1999)1493-501.
- Ruskin, D. N., Bergstrom, D. A., Tierney, P. L. and Walters, J. R. Correlated multisecond oscillations in firing rate in the basal ganglia: Modulation by dopamine and the subthalamic nucleus. *Neuroscience* 117(2003)427-38.

- Russo, R. E. and Hounsgaard, J.** Short-term plasticity in turtle dorsal horn neurons mediated by L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Neuroscience* 61 (1994) 191-197.
- Sah, P.**  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  currents in neurones: types, physiological roles and modulations. *Trends Neurosci* 19 (1996) 150-154.
- Sawaguchi, T. and Goldman-Rakic, P. S.** D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* 251 (1991) 947-950.
- Salamone, J. D., Mayorga, A. J., Trevitt, J. T., Cousins, M. S., Conlan, A. and Nawab, A.** Tremulous jaw movements in rats: A model of parkinsonian tremor. *Progress in Neurobiol* 56 (1998) 591-611.
- Salgado, H., Tecuapetla, F., Perez-Rosello, T., Perez-Burgos, A., Perez-Garci, E., Galarraga, E. and Vargas, J.** A reconfiguration of  $Ca_v2$   $Ca^{2+}$  channels current and its dopaminergic  $D_2$  modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 94: 3771-3787, 2005.
- Sanchez-Vives, M. V. and McCormick, D. A.** Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3 (2000) 1027-1034.
- Sandor, P.** Gilles de la Tourette syndrome: a neuropsychiatric disorder. *J Psychosom Res* 37 (1993) 211-226.
- Savarese, T. M. and Fraser, C. M.** In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* 283 (1992) 1-19.
- Schiller, J. and Schiller, Y.** NMDA receptor-mediated dendritic spikes and coincident signal amplification. *Curr Opin Neurobiol* 11 (2001) 343-348.
- Schnitzler, A. and Gross, J.** Normal and pathological oscillatory communication in the brain. *Nature Rev.* 6 (2005) 285-295.
- Schweitz, H., Heurteaux, C., Bois, P., Moinier, D., Romey, G. and Lazdunski, M.** Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold  $Ca^{2+}$  channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 878-882.
- Shink, E., Bevan, M. D., Bolam, J. P. and Smith, Y.** The subthalamic nucleus and the external pallidum: Two tightly interconnected structures that control the output of the basal ganglia in the monkey. *Neuroscience* 73 (1996) 335-357.
- Smeets, W. J. A. J., Marín, O. and González, A.** Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *J Anat* 196 (2000) 501-517.

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

**Smith, Y. and Bolam, J. P.** Neurons of the sustancia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res* 493 (1989) 160-167.

**Smith, I. D. and Grace, A. A.** Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity. *Synapse* 12 (1992) 287-303.

**Smith, Y. and Kieval, J. Z.** Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in Neurosci* 23 (2000) S28-S33.

**Sokoloff, P., Giros, B., Martres, Marie-Pascale., Bouthenet, Marie-Louise. and Schwartz, Jean-Charles.** Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347 (1990) 146-151.

**Stotz, S. C., Spaetgens, R. L. and Zamponi, G. W.** Block of voltage-dependent calcium channel by the green Mamba toxin calcicludine. *J Membrane Biol* 174 (2000) 157-165.

**Stuart, G. J., Dodt, H. -U. and Sakmann, B.** Path-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Eur J Physiol* (1993) 511-518.

**Svenningsson, P. and Le Moine, C.** Dopamine D1/5 receptor stimulation induces c-fos expression in the subthalamic nucleus: possible involvement of local D5 receptors. *Eur J Neurosci* 15 (2002) 133-142.

**Takakusaki, K., Habaguchi, T., Ohtinata-Sugimoto, J., Saitoh, K. and Saka-moto, T.** Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion; A new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience* 119 (2003) 293-308.

**Takakusaki, K., Saitoh, K., Harada, H. and Kashiwayanagi, M.** Role of basal ganglia-brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neuroscience Res* 50 (2004) 137-151.

**Takakusaki, K., Saitoh, K., Harada, H., Okumura, T. and Sakamoto, T.** Evidence for a role of basal ganglia in the regulation of rapid eye movement sleep by electrical and chemical stimulation for the pedunclopontine tegmental nucleus and the substantia nigra pars reticulata in decerebrate cats. *Neurosciencie* 124 (2004a) 207-220.

**Talley, E. M., Cribbs, L. L., Lee, J. H., Daud, A., Perez-Reyes, E. and Bayliss, D. A.** Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19 (1999) 1895-1911.

- Tang, K., Low, M. J., Grandy, D. K. and Lovinger, D. M.** Dopamine-dependent synaptic plasticity in striatum during in vivo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 1255-1260.
- Tell, F. and Jean, A.** Ionic basis for endogenous rhythmic patterns induced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors in neurons of the nucleus tractus solitarii. *J Neurophysiol* 70 (1993) 2379-2390.
- Tepper, J. M., Martin, L. P. and Anderson, D. R.** GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition of rat substantia nigra dopaminergic neurons by pars reticulata projection neurons. *J Neurosci* 15 (1995) 3092-3103.
- Tiberi, M., Jarvie, K. R., Silvia, C., Falardeau, P., Gingrich, N. G., Bertrand, L., Yang-Feng, T. L. and Fremeau Jr, R. T.** Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: Differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 7491-7495.
- Toan, D. L. and Schultz, W.** Responses of rat pallidum cells to cortex stimulation and effects of altered dopaminergic activity. *Neuroscience* 15 (1985) 683-694.
- Trantham-Davidson, H., Neely, L. C., Lavin, A. and Seamans, J. K.** Mechanisms underlying differential D1 versus D2 dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci* 24 (2004) 10652-10659.
- Tseng, K. Y. and O'Donnell, P.** Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D<sub>1</sub>-NMDA co-activation. *Cereb Cortex* (2004) 1-9.
- Tseng, K. Y., Snyder-Keller, A. and O'Donnell, P.** Dopaminergic modulation of striatal plateau depolarizations in corticostriatal organotypic cocultures. *Psychopharmacology* (Berl) 2006 [Epub ahead of print].
- Tsumori, T., Yokota, S., Ono, K. and Yasui, Y.** Synaptic organization of GABAergic projection from the substantia nigra pars reticulata and the reticular thalamic nucleus to the parafascicular thalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 957 (2002) 231-241.
- Van Tol, H. H. M., Bunzow, J. R., Guan, Hong-Chang., Sunahara, R. K. Seeman, P., Niznik, H. B. and Civelli, O.** Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350 (1991) 610-619.
- Vergara, C., LaTorre, R., Marrion, N. V. and Ademan, J. P.** Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8 (1998) 321-329

**Vergara, R., Rick, C., Henández-López, S., Laville, J. A., Guzmán, J. N., Galárraga, E., Surmeier, D. J. and Bargas J.** Spontaneous voltaje oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol* 553 (2003) 169-182.

**Wallén, P. and Grillner, S.** N-methyl-D-aspartate receptor-induced, inherent oscillatory activity in neurons active during fictive locomotion in the lamprey. *J Neurosci* 7 (1987) 2745-2755.

**Walters, J. R., Hu, D., Itoga, C. A., Parr-Brownlie, L. C. and Bergstrom, D. A.** Phase relationships support a role for coordinated activity in the indirect pathway in organizing slow oscillations in basal ganglia output after loss of dopamine. *Neuroscience* 144 (2007) 762-776.

**Wang, M., Vijayraghavan, S. and Goldman-Rakic, P. S.** Selective D2 receptor actions on the functional circuitry of working memory. *Science* 303 (2004) 853-856.

**Waszczak, B., Martin, L. P. Greif, G. J. and Freedman, J. E.** Expression of a dopamine D2 receptor-activated K<sup>+</sup> channel on identified striatopallidal and striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 11440-11444.

**Weick, B. G. and Walters, J. R.** D-1 dopamine receptor stimulation potentiates neurophysiological effects of bromocriptine in rats with lesions of the nigrostriatal dopamine pathway. *Neuropharmacology* 26 (1987a) 641-644.

**Weick, B. G. and Walters, J. R.** Effects of D1 and D2 dopamine receptor stimulation on the activity of substantia nigra pars reticulata neurons in 6-hydroxydopamine lesioned rats: D1/D2 coactivation induces potentiated responses. *Brain Res* 405 (1987b) 234-246.

**Weick, B. G., Engber, T. M., Susel, Z., Chase, T. N. and Walters, J. R.** Responses of substantia nigra pars reticulata neurons to GABA and SKF 38393 in 6-hydroxydopamine-lesioned rats are differentially affected by continuous and intermittent levodopa administration. *Brain Res* 523 (1990) 16-22.

**Wichmann, T., Kliem, M. A. and DeLong, M. R.** Antiparkinsonian and behavioral effects of inactivation of the substantia nigra pars reticulata in hemiparkinsonian primates. *Exp Neurology* 167 (2001) 410-424.

**Wichmann, T. and DeLong, M. R.** Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 991 (2003) 199-213.

**Wilson, S. A. K.** *Modern problems in neurology.* Arnold, London. 1928.

**Windels, F., Bruet, N., Poupard, A., Feuerstein, C., Bertrand, A. and Savasta, M.** Influence of the frequency parameter on extracellular glutamate and -aminobutyric acid in substantia nigra and

globus pallidus during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats. *J Neurosci Res* 72 (2003) 259-267.

**Womack, M. D. and Khodakhah, K.** Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 24 (2004) 3511-3521.

**Yanovsky, Y., Zhang, W. and Misgeld, U.** Two pathways for the activation of small-conductance potassium channels in neurons of substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 136 (2005) 1027-1036.

**Yoshida, Y. and Precht, W.** Monosynaptic inhibition of neurons of the substantia nigra by caudato-nigral fibers. *Brain Res* 32 (1971) 225-228.

**Yuan, H., Yamada, K. and Inagaki, N.** Multiminute oscillations in mouse substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *Neurosci Lett* 355 (2004) 136-140.

**Yunker, A. M.** Modulation and pharmacology of low voltage-activated ("T-Type") calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:6 (2003) 577-598.

**Yuste, R. MacLean, J. N., Smith, J. and Lansner, A.** The cortex as a central pattern generator. *Nat Rev Neurosci* 6 (2005) 477-483.

**Zucker, R. S.** Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 9 (1999) 305-315.

**Zucker, R. S. and Regehr, W. G.** Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64 (2002) 355-405.

**Zhu, Z., Bartol, M., Shen, K. and Johnson, S. W.** Excitatory effects of dopamine on subthalamic nucleus neurons: in vitro study of rats pretreated with 6-hydroxydopamine and levodopa. *Brain Res* 945 (2002) 31-40.

**Zhu, Z. T., Munhall, A., Shen, K. Z. and Johnson, S. W.** Calcium-dependent subthreshold oscillations determine bursting activity induced by N-methyl-D-aspartate in rat subthalamic neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 19 (2004) 1296-1304.