



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**PLASTICIDAD EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA
GABAÉRGICA EN EL NEOESTRIADO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
FATUEL TECUAPETLA AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 mi Madre:
Maria Edvina Elvira Aguilar Aguilar

A mi Abuelo:
Crisoforo Aguilar Pérez

A mis Hermanos:
Hector Arenas Aguilar
Nohemí Arenas Aguilar

A toda mi Familia, con especial cariño a

Yazmín Ramiro Cortés

Agradecimientos

A nuestra máxima casa de estudios,
La Universidad Nacional Autónoma de México

Al la Dra. Elvira Galarraga Palacio y al Dr. José Bargas Díaz, por la orientación y apoyo invaluable recibido en el desarrollo de esta tesis y en mi formación académica.

Al Dr. Benjamín Floran Garduño, por su disponibilidad y comentarios en el desarrollo de este proyecto.

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

A Jaime Napoleón Guzmán.

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

Al Ing. Luis Carrillo Reíd, por los programas realizados para que se pudiera llevar a cabo esta tesis.

A todas las personas que en algún momento me tendieron una mano.

Índice

Abreviaciones	<i>i</i>
Resumen	<i>ii</i>
Summary	<i>iii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Plasticidad sináptica	1
1.2 Ganglios basales	3
1.3 Via directa e indirecta	4
1.4 El neostriado	7
1.5 Neuronas del neostriado	7
1.6 Neurona espinosa mediana de proyección	8
1.7 Las interneuronas del neostriado	12
1.7.1 Interneurona gigante Colinérgica	12
1.7.2 Las interneuronas GABAérgicas	14
1.8 Microcircuito gabaérgico en el neostriado	18
1.8.1 Inhibición <i>feedback</i>	20
1.8.2 Inhibición <i>feedforward</i>	21
1.8.3 Inhibición <i>feedforward</i> vs. Inhibición <i>feedback</i>	21
1.9 La dopamina y sus receptores en el neostriado	24
1.9.1 Farmacología de los receptores dopaminérgicos	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivos particulares	32

4. HIPÓTESIS	33
5. METODOS	36
5.1 Obtención de rebanadas cerebrales	35
5.2 Registro electrofisiológico	35
5.3 Registros poblacionales	36
5.4 Registro unitarios	37
5.5 Análisis	38
5.6 Fármacos	44
5.7 Inmunohistoquímica	44
6. RESULTADOS	46
6.1 Apartado I: Las diferentes entradas inhibitorias a la neurona espinosa mediana pueden ser aisladas con estimulación de campo [Se anexa portada del primer artículo: Tecuapetla et al., 2005 (Anexo A)].	47
6.1.1 Distintas poblaciones de terminales GABAérgicas sobre las Neuronas Espinosas Medianas (NEMs)	48
6.1.2 Canales de calcio presinápticos	52
6.2 Apartado II: Reorganización de los canales de calcio que regulan la liberación de transmisor durante el desarrollo. Su modulación por receptores dopaminérgicos de la clase D ₂ [Se anexa portada del segundo artículo: Salgado et al., 2005 (Anexo B)].	58
6.2.1 Reorganización de los canales de calcio que controlan la liberación en la sinapsis que interconectan a las NEMs	58
6.2.2 La modulación dopaminérgica también se modifica durante el desarrollo	60

6.3 Apartado III: Modulación dopaminérgica de la plasticidad sináptica de corto plazo en las sinapsis inhibitorias del neostriado [Se anexa el resumen del tercer artículo enviado a su publicación (Anexo C)]	66
6.3.1 Inhibición sobre las NEMs	66
6.3.2 Plasticidad sináptica de corto plazo de las sinapsis inhibitorias que hacen contacto con las NEMs	72
6.3.3 Modulación dopaminérgica de la STD entre NEMs	76
6.3.4 Modulación dopaminérgica de la sinapsis entre interneuronas Fast spiking y NEMs	83
7. DISCUSIÓN	86
Bibliografía	100
Apéndice A	122
Apéndice B	123
Apéndice C	124

Abreviaciones

CV:	Coeficiente de variación
DPP:	Depresión sináptica en la tasa de pulsos pareados ($IPSC_1 > IPSC_2$)
FPP:	Facilitación en la tasa de pulsos pareados
FS:	Interneurona GABAérgica de disparo rápido proviene de “ <i>Fast spiking</i> ”
FS→NEM:	Conexión sináptica funcional de la interneurona GABAérgica de disparo rápido (“ <i>Fast spiking</i> ”) sobre la neurona espinosa mediana
GB:	Ganglios basales
GP→NEM:	Conexión sináptica poblacional de neuronas espinosas medianas sobre una neurona espinosa mediana
GPe:	Segmento externo del globo pálido en los primates. En rata equivale al globo pálido
GPi:	Segmento interno del globo pálido en los primates. En rata equivale al núcleo entopeduncular.
I-A:	Curva función intensidad de la estimulación vs amplitud de la respuesta provocada
IPSC:	Corriente postsinápticas inhibitoria proviene de “ <i>inhibitory post synaptic current</i> ”
IPSP:	Potencial postsináptico inhibitorio proviene de “ <i>inhibitory post synaptic potencial</i> ”
LTS:	Interneurona GABAérgica neocortical que presenta espigas de bajo umbral (“ <i>Low threshold spike</i> ”)
NEM:	Neurona espinosa mediana de proyección del neocórtex
NEM→NEM:	Conexión sináptica unitaria entre neuronas espinosas medianas
NE:	Neocórtex
NST:	Núcleo subtalámico
PD14:	Día postnatal 14
PD40:	Día postnatal 40
Prw:	Probabilidad promedio de los sitios de liberación
Qw:	Tamaño del cuanto promedio de los sitios de liberación
SN:	Sustancia negra
SNC:	Sustancia negra compacta
SNr:	Sustancia negra reticulada
STD:	Depresión sináptica de corto plazo, proviene de “short term depression”
STP:	Plasticidad sináptica de corto plazo, proviene de “short term plasticity”
TPP:	Tasa de pulsos pareados

Resumen

La inhibición lateral entre las neuronas espinosas medianas del neostriado (*NEMs*) provee al circuito de los ganglios basales de propiedades para el control de los movimientos voluntarios. La desregulación de la inervación dopaminérgica que recibe el neostriado colapsa este control desembocando en los síntomas de la enfermedad de Parkinson.

En esta tesis se muestra como el sistema dopaminérgico regula la plasticidad de corto plazo (*STP*) de las sinapsis encargadas de llevar a cabo la inhibición lateral (entre las *NEMs*). La *STP* determina las capacidades computacionales de las sinapsis, por ejemplo, permitiéndoles transmitir información acerca de la frecuencia de disparo en la presinapsis y/o regulando el nivel basal de la conexión.

Aislando la inhibición lateral entre *NEMs* de manera unitaria y poblacional se observó que la activación de receptores dopaminérgicos modula la *STP* de esta conexión. Un agonista de receptores a dopamina de la clase D₁ (SKF 81297) incrementó la depresión de corto plazo (*STD*), mientras que un agonista de la clase D₂ (quinelorane) la decrementó. El mecanismo subyacente fue la redistribución de la eficacia sináptica (modulando la probabilidad de liberación sin afectar el estado estacionario de la conexión). Por el contrario los receptores dopaminérgicos no modularon la *STD* del otro origen de inhibición sobre las *NEMs*: la interneurona “*fast spiking*” o de disparo rápido.

Esta tesis plantea acciones novedosas de la dopamina en el microcircuito del neostriado: 1) Controla la *STD* de la inhibición entre *NEMs* y 2) ajusta el balance entre las diferentes fuentes de inhibición. Teóricamente, los receptores de la clase D₁ promoverán una mayor sensibilidad temporal a cambios repentinos, mientras que los receptores de la clase D₂ mantienen las propiedades basales de la inhibición.

Summary

Lateral inhibition between medium spiny neurons (*MSNs*) in the neostriatum supplies the basal ganglia circuit with neuronal mechanisms for the control of voluntary movements. The dysregulation of the dopaminergic innervation to the neostriatum functionally collapses this control inducing the devastating signs of Parkinson's disease.

Here it is shown how the dopaminergic system regulates short term plasticity (*STP*) of the synapses participating the lateral inhibition (between *MSNs*). The *STP* determines the computational capabilities of synapses, for example, allowing them to transmit information about the presynaptic firing rate and/or modulating the basal properties of the connection.

Isolating unitary and population synaptic connection between *MSNs* (lateral inhibition) the modulation of *STP* by activation of dopamine receptors was observed. A D₁-class agonist (SKF 81297) enhances the short term depression (*STD*) whereas a D₂-class agonist (quinelorane) decreases it; most probably via synaptic redistribution (setting the release probability without changing the stationary state of the connection). In contrast presynaptic dopaminergic receptors did not the *STD* between fast spiking interneurons and *MSNs* (another source of inhibition on the *MSNs*).

Thus, this thesis provides a novel explanation of dopamine actions at the neostriatal microcircuit level: 1) the control of *STD* between lateral connections of output neurons and 2) the reorganization of the balance between different forms of inhibitory transmission. Theoretically, D₁ receptors would promote a sensitive responsive state for temporal precision (dynamic component) whereas D₂ receptors would sense background activity (static component).

INTRODUCCIÓN

1.1 LA PLASTICIDAD SINÁPTICA

La sinapsis es el sitio de comunicación entre neuronas. Hay dos tipos: químicas y eléctricas. Ambas constituyen conexiones especializadas involucradas en transmitir información de una neurona (presinapsis) a otra (postsinapsis). La fuerza de una conexión sináptica es modificada adaptativamente en respuesta a la actividad. A esta adaptación en la fuerza sináptica la conocemos como plasticidad sináptica (Abbott y Nelson, 2000; Thomson, 2000a; 2000b; Zuker y Regehr, 2002; Abbott y Regehr, 2004).

La fuerza sináptica química depende de la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Tsodyks y Markram, 1997; Thomson, 2000a; Rosov et al., 2001; Zuker y Regehr, 2002), que a su vez depende, de la dinámica del calcio en la terminal sináptica (Rosov et al., 2001; Zucker y Regehr, 2002; Rusakov y Fine, 2003; Felmy et al., 2003; Bollmann y Sakman, 2005; Xu y Wu, 2005). La dinámica del calcio en la presinapsis puede ser modificada por receptores presinápticos (Schuman y Madison, 1991; Shibuki y Okada, 1991; Wilson y Nicoll, 2001, Kreitzer y Regehr, 2001; Brenowitz y Regehr, 2005; Namiki et al., 2005), sistemas de modulación distribuida (e.g., dopamina, acetilcolina; Brenowitz et al., 1998; Guzmán et al., 2003; Salgado et al., 2005), la misma neurona presináptica (Borst y Sakmann, 1998; Geiger y Jonas, 2000; Parnas et al., 2000), o la neurona postsináptica mediante transmisores químicos retrógrados (Wilson y Nicoll, 2001; Kreitzer y Regehr, 2001; Brenowitz y Regehr, 2005; Namiki et al., 2005). Las modificaciones de la probabilidad de liberación modifican la fuerza sináptica en

forma dinámica, de manera que los pesos sinápticos de una red neuronal cambian continuamente (Zucker y Regehr, 2002). En consecuencia, los receptores presinápticos funcionan como sensores, continuamente regulando las propiedades de un microcircuito (Wilson y Nicoll, 2001).

En el neostriado (*NE*), el neurotransmisor modulador dopamina presenta las más altas concentraciones basales de todo el sistema nervioso central. Su ausencia colapsa funcionalmente a los ganglios basales (*GB*), induciendo los síntomas de la enfermedad de Parkinson (Hornykiewicz, 1973; Wooten, 1990; Albin et al., 1995; Wichmann, 2003).

En este trabajo de Tesis nos preguntamos si la dopamina regula la plasticidad sináptica de corto plazo (*STP*) en las sinapsis GABAérgicas del *NE*. Algunas acciones pre y postsinápticas de la dopamina ya han sido descritas electrofisiológicamente a nivel celular (e.g., Guzmán et al., 2003; Hernández-López et al., 1997; Hernández-López et al., 2000; Nicola et al., 2004). Sin embargo, una acción global con un impacto potencial a nivel del microcircuito¹ no ha sido documentada aún. La presente Tesis muestra que la *STP* entre neuronas espinosas medianas (*NEMs*) puede ser regulada por la dopamina. En esta modulación participan los receptores de ambas clases, D_1 y D_2 . En contraste, la *STP* en la conexión entre las interneuronas y la *NEM*, no es modulada por la dopamina. Por lo que planteamos que la dopamina puede modular una función global del microcircuito capaz de re-arreglar el balance entre diferentes formas de

¹ Microcircuito: es el número mínimo de neuronas que interaccionando entre sí, son capaces de generar colectivamente una salida funcional (Silberberg et al., 2005).

inhibición, además de modular diferencialmente las propiedades computacionales de la inhibición (Silberberg et al., 2004; Richardson et al., 2005).

1.2 GANGLIOS BASALES

Los GB son un conjunto de núcleos subcorticales altamente interconectados, que abarcan el telencéfalo, el diencefalo y el mesencéfalo de los mamíferos, aves y reptiles. La división dorsal de los GB consiste del *neostriado* (NE, que incluye a los núcleos *caudado* y *putamen*), el *globo pálido* (GPe, segmento externo del globo pálido en los primates), el núcleo *entopeduncular* (EP o GPi, segmento interno del globo pálido en los primates), el núcleo *subtalámico* (NST), y la *sustancia nigra* (SN, que comprende a la *pars compacta* y *pars reticulata*: SNc y SNr, respectivamente) (Bolam et al., 2000) (Figura 1).

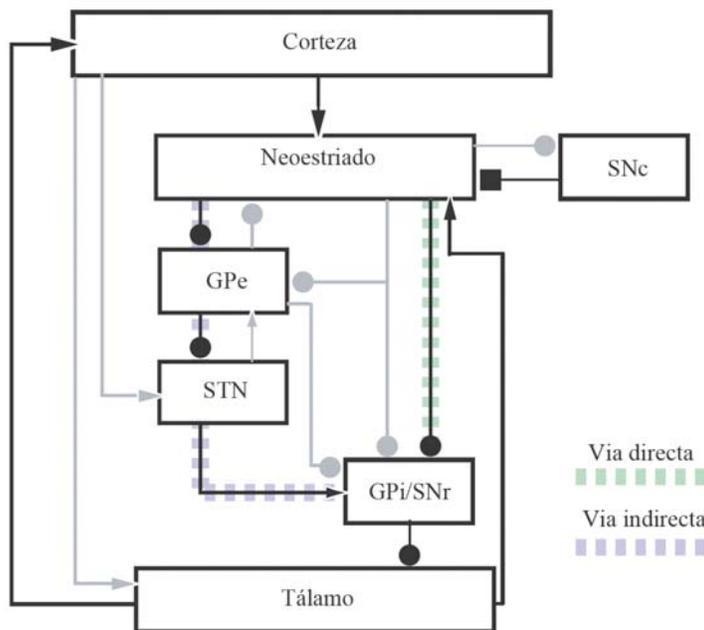


Figura 1. Esquema simplificado que ilustra la organización anatómica y funcional de los ganglios basales. En negro se ilustra el modelo inicial propuesto por Albin-DeLong para explicar el funcionamiento de los GB. En gris se ilustran las modificaciones actuales. SNc: Sustancia nigra compacta. GPe: globo pálido externo, NST: Núcleo subtalámico GPi: Globo pálido interno, SNr: sustancia nigra reticular. Las sinapsis glutamatergicas están representadas con flechas, las sinapsis GABAérgicas con círculos y la sinapsis dopaminérgica con un cuadro. Modificado de Bolam et al., 2000 y Bar-Dag et al., 2003.

La mayor entrada sináptica a los *GB* proviene de la corteza cerebral que inerva al *NE* y al *NST* (Gerfen y Wilson, 1996). La información corticoestriatal es procesada dentro del *NE* e integrada junto con información de otras aferencias a los *GB* (e.g. *núcleo intralaminar del tálamo, amígdala, hipocampo, rafe dorsal*; ver Bolam et al., 2000). La “información procesada” es transmitida a los núcleos de salida de los *GB* (el *GPI* y la *SNr*) (Carter y Fibiger, 1978; Somogyi et al., 1979; Moriizumi et al., 1987; Bolam y Smith, 1992; Bevan et al., 1994; Shink y Smith, 1995; Williams y Faull, 1985; Smith y Bolam, 1991; Bolam et al., 1993). Estos a su vez influyen el comportamiento (movimientos voluntarios) por medio de sus proyecciones hacia el tálamo y su regreso a la corteza motora o premotora, o a la región subcortical premotora, incluyendo el *colículo superior* y la *formación reticular* (Fig. 1) (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Bolam y Bennett, 1995; Gerfen y Wilson, 1996; Smith et al., 1998; Bolam et al., 2000; Bar-Gad et al., 2003; Graybiel, 2005).

1.3 VÍAS DIRECTA E INDIRECTA

En el modelo propuesto por Albin et al (1989) y DeLong et al (1990), la información cortical es transmitida a través de los *GB* por medio de dos vías: la directa y la indirecta (ver también: Gerfen y Wilson, 1996; Shink et al., 1996). En la vía directa la información corticoestriatal es transmitida directamente del *NE* a los núcleos de salida (*GPI* y *SNr*, Moriizumi et al., 1987; Bolam y Smith, 1992; Bevan et al., 1994; Shink y Smith, 1995). En la vía indirecta la información cortical es transmitida del *NE* a los núcleos de salida a través de una red de interconexiones

entre el *GPe* y el *NE* (ver Fig. 1; Chang et al., 1981; Totterdell et al., 1984; Smith et al., 1990; Bevan et al., 1994; Bevan y Bolam, 1995; Shink y Smith, 1995; Shink et al., 1996).

En el modelo de los *GB* llamado de “tasa de disparo” (“*rate model*”), el comportamiento asociado a los *GB* depende de la salida de los mismos vista como un complejo de patrones espaciotemporales de incrementos y decrementos en el disparo de las neuronas de los núcleos de salida (ver Figura 2) (Chevalier y Deniau, 1990; Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Hikosaka et al., 2000). Las neuronas neostriatales de proyección son GABAérgicas y silentes bajo condiciones basales de alerta (Wilson, 1993; Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997). Las neuronas de los núcleos de salida de los *GB*, también son de naturaleza GABAérgica, sin embargo, estas últimas disparan todo el tiempo potenciales de acción (muy probablemente por la entrada tónica excitadora proveniente del *NST* (Nakanishi et al., 1987; Bevan y Wilson, 1999). Esto inhibe tónicamente a sus núcleos blanco: los circuitos recíprocos tálamo corticales encargados de la ejecución de los movimientos voluntarios o las regiones premotoras subcorticales, el *colículo superior* y la *formación reticular*. Cuando el sistema es activado por el disparo de neuronas corticoestriatales glutamatérgicas, las neuronas neostriatales disparan potenciales de acción (Wilson, 1993; Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997). Las neuronas de la vía directa inhiben la salida tónica de los *GB*. Esta reducción en el disparo de las neuronas de la *SNr* y el *GPI* transforma la inhibición en desinhibición funcional de los circuitos motores arriba mencionados (ver Fig. 2). Esto es, los *GB* “dejan salir” los movimientos. En

contraste, las neuronas de la vía indirecta inhiben a las neuronas del *GPe*, también GABAérgicas y tónicas. Lo cual puede incrementar el disparo de las neuronas de salida de los *GB* por dos mecanismos: 1) desinhibir a las neuronas del *NE* lo que incrementa la excitación en las neuronas de la *SNr* y *GPI* y 2) la inhibición en el *GPe* tiene un efecto desinhibidor sobre las neuronas de la *SNr* y *GPI*. Esto inhibe a los núcleos motores blanco e inhibe los movimientos. Se ha propuesto que esta acción de la vía indirecta (incrementar el disparo de las neuronas en la *SNr* y *GPI*; ver Fig. 2) actúa atenuando o terminando los movimientos asociados a los *GB* o suprimiendo la secuencia de movimientos no deseados (Mink y Thach, 1993). Si se alternan, ambas vías explican las secuencias (programas) de activación de músculos agonistas y antagonistas que dan origen a cualquier movimiento.

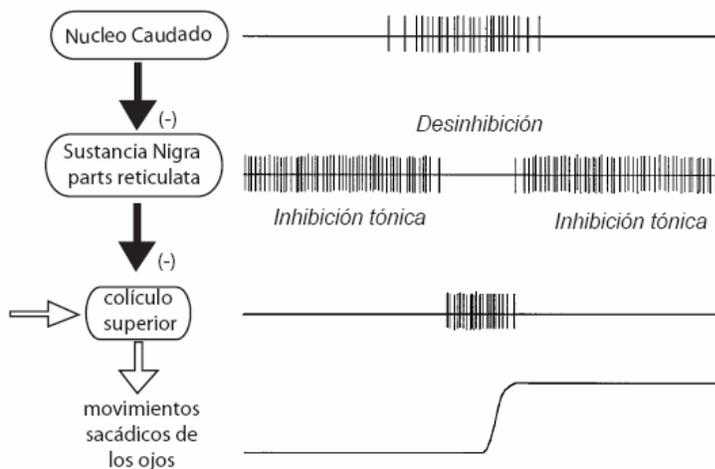


Figura 2. La desinhibición es un mecanismo clave en el control que ejercen los ganglios basales sobre los movimientos, como por ejemplo, los movimientos del nistagmo oculomotor (*saccades* o sacudidas). Las neuronas de la sustancia nigra parts reticulata (*SNr*) inhiben tónicamente a las neuronas del colículo superior (*CS*), previniendo los movimientos involuntarios de los ojos. La actividad fásica de las neuronas de salida del núcleo caudado (provocada por la entrada cortical) interrumpe la inhibición tónica de la *SNr* sobre el *CS*, conduciendo a que un movimiento en sacudida ocurra (Tomado de Hikosaka et al., 2000).

No obstante que el modelo de las vía directa e indirecta tiene que ser revisado bajo los descubrimientos de los últimos años [e.g. Levesque y Parent, (2005) mostraron que axones de neuronas de proyección del *NE* pertenecientes a

ambas vías dejan abundantes colaterales en casi todos los núcleos de los *GB*; contrarrestando la segregación de ambas vías], actualmente, aún es aceptado que las *NEMs* están segregadas en dos poblaciones conformando dos vías que ejercen efectos opuestos sobre los movimientos (Albin et al., 1995; Wichmann y DeLong, 1996, 1998, 2003, Graybiel, 2005; Grillner et al., 2005).

1.4 EL NEOESTRIADO

El *NE* es el núcleo más grande de los *GB*, constituye el principal sitio de entradas sinápticas a los mismos y es determinante en la adquisición, control y selección de un amplio rango de comportamientos y procesos cognitivos (Wilson, 2004; Grillner et al., 2005). La patofisiología del microcircuito del *NE* constituye el sustrato de afecciones tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la adicción a las drogas, el síndrome de Tourette (Wichmann y DeLong, 2003). La neurona principal implicada es la *NEM*, que al ser la neurona de proyección, ejerce el control global sobre los otros núcleos de los *GB*, y en consecuencia, sobre el control y la selección de los movimientos voluntarios (Nicola et al., 2000; Wichmann y DeLong, 2003; Grillner et al., 2005) (ver Fig.1).

1.5 LAS NEURONAS DEL NEOESTRIADO

La clasificación actual de las neuronas estriatales se basa en la correlación de fenotipos tales como los péptidos y receptores que expresa cada neurona y sus propiedades electrofisiológicas (Kubota et al., 1993; Miles et al., 1996; Parra et al.,

1998; Paulsen y Moser, 1998; Gupta et al., 2000; Klausberger et al., 2003; Tepper y Plenz, 2004; Butt et al., 2005; Dumitriu et al., 2007). De acuerdo a lo anterior se han identificado al menos seis tipos neuronales dentro del *NE* (DiFiglia y Carey, 1986; Kaguagushi et al., 1995; Bennet y Wilson, 2000; Tepper y Bolam, 2004; Tepper y Plenz, 2004). Cinco son neuronas locales o interneuronas y la neurona espinosa mediana de proyección (*NEM*) que como ya se mencionó está subdivida en dos subpoblaciones.

1.6 NEURONA ESPINOSA MEDIANA DE PROYECCIÓN

Las neuronas de proyección o neuronas espinosas medianas (*NEMs*) constituyen el mayor porcentaje de células dentro del *NE* (77 % en los primates y 95 % en las ratas) (Graveland y DiFiglia, 1985). Se caracterizan por: 1) ser de naturaleza GABAérgica (Fisher et al., 1986; Penny et al., 1986; Smith et al., 1987; Kita y Kitai, 1988), 2) presentar un diámetro somático de 10-20 μm , el cual da origen a 3-5 dendritas primarias, que se ramifican hasta llegar a 25-30 dendritas terminales (Kemp y Powell, 1971; DiFiglia et al., 1976; Wilson y Groves, 1980; Chang et al., 1982), 3) sus dendritas presentan una alta densidad de espinas (mismas que contribuyen a la mayor parte de la superficie total de la célula; Wilson, 1990), 4) el árbol dendrítico de una *NEM* abarca un volumen esférico de 300 a 500 μm (Wilson, 1990), 5) el axón principal de las *NEMs* se distribuye ampliamente dentro del *NE* dejando abundantes colaterales axónicas antes de salir hacia otros núcleos de los *GB* (ver Figura 3) (Kemp y Powell, 1971; DiFiglia et al., 1976; Kitai et al., 1976; Preston et al., 1980; Park et al., 1980; Wilson y Groves,

1980; Somogyi et al., 1981; Chang et al., 1981, Chang et al., 1982; Bishop et al., 1982; Groves, 1983; Aronin et al., 1986; Bolam y Izzo, 1988; Kawaguchi et al., 1989, Kawaguchi et al., 1990;), 6) pueden contener sustancia P, encefalina o dinorfinas (Vincent et al., 1982; Bolam et al., 1983b; Haber y Nauta, 1983; Izzo et al., 1987; Alheid y Heimer, 1988) y la expresión de estos neuropeptidos esta relacionada con los núcleos a los que proyectan. La población de *NEMs* de la vía directa contiene sustancia P y dinorfinas además de expresar preferentemente el receptor a dopamina de la clase D₁ (Gerfen y Young, 1988; Gerfen et al., 1990). Mientras que las neuronas de la vía indirecta contienen encefalinas y preferentemente expresan el receptor a dopamina de la clase D₂ (Gerfen y Young, 1988; Gerfen et al., 1990). Sin embargo, existen reportes de co-localización tanto de los neuropéptidos mencionados (Penny et al., 1986; Besson et al., 1990; Wang et al., 2006) como de los receptores a dopamina (e.g. Gerfen et al., 1990; Meador-Woodruff et al., 1991; Ariano et al., 1992; Lester et al., 1993; Surmeier et al., 1992, 1993, 1996; Aizman et al., 2000; Lee et al., 2006; Deng et al., 2006).

La mayoría de las entradas excitadoras a las *NEMs* proviene de todas las áreas de la corteza cerebral, la línea media y los núcleos intralaminares del tálamo (Buchwald et al., 1973; Kitai et al., 1976; Spencer, 1976; Kocsis et al., 1977; Wilson, 1986; Kawaguchi et al., 1989; Tepper y Plenz, 2004). Estas sinapsis utilizan el aminoácido glutamato como neurotransmisor (Divac et al., 1977; McGeer et al., 1977; Reubi y Cuenod, 1979; Godukhin et al., 1980; Hassler et al., 1982; Bennet y Wilson, 2000). En la cabeza de las espinas dendríticas se reciben la mayoría de los contactos sinápticos excitadores corticoestriatales (~90%)

(Bennet y Wilson, 2000). Las *NEMs* también reciben entradas sinápticas de la interneurona colinérgica, y entradas inhibitoras de las interneuronas locales GABAérgicas (tanto las inmunopositivas a parvalbúmina como a somatostatina o *calretinina*; ver más adelante). Pero la mayoría de sus entradas inhibitoras provienen de otras *NEMs* pues estas neuronas de proyección se inervan entre ellas antes de que su axón deje el *NS*. Las *NEMs* son el blanco principal de las aferentes dopaminérgicas provenientes del cerebro medio (*sustancia nigra pars compacta*) (Tepper y Plenz, 2004), además de recibir una considerable entrada serotoninérgica proveniente del núcleo del *rafe dorsal* (Wilson, 2004).

Estudios conductuales realizados en monos y ratas han demostrado que las neuronas neostriatales (presumiblemente *NEMs*), aumentan de manera fásica su patrón de disparo durante la realización de movimientos voluntarios, así como durante la presentación de pistas sensoriales que indican al animal el momento de realizar una conducta (revisado en Wilson, 1993; Kiyatkin y Rebec, 1996; Cepeda y Levine, 1998; Nicola et al., 2000). En animales anestesiados, cuando las *NEMs* presentan potenciales de acción lo hacen en un patrón característico de actividad espontánea (Fig 3D; Stern et al., 1998), contrario al patrón irregular de disparo que presentan en animales no anestesiados (Fig 3C; Mahon et al., 2006). Registros intracelulares de *NEMs* realizados en ratas inmovilizadas y anestesiadas localmente (Wilson y Groves, 1981) o con uretano (Wilson, 1993) muestran que el potencial de membrana de las *NEMs* fluctúa entre dos niveles, uno relativamente hiperpolarizado alrededor de -80 mV al que se le denomina “*down state*” y otro relativamente despolarizado de alrededor de -50 mV cercano al potencial umbral

de disparo de estas células (~ -40 mV) llamado “*up state*” (Figura 3D). Las transiciones entre los dos estados parecen ser consecuencia de la sincronización de las entradas corticales y/o talámicas que interactúan con propiedades intrínsecas de las *NEMs* (Gerfen y Wilson, 1996; Stern et al., 1998; Vergara, 2003; Plenz, 2003; Mahon et al., 2006). Sin embargo, en un trabajo reciente en animales no anestesiados (Mahon et al., 2006) se muestra que la transición del estado hiperpolarizado al depolarizado sólo se hace evidente cuando el animal pasa del estado de vigilia al de sueño de ondas lentas “*slow wave sleep*”, mostrando una ausencia de transiciones cuando el animal está despierto. No obstante, se pueden observar ráfagas de potenciales de acción en registros *in vivo* cuando el animal realiza un movimiento (Fig. 3).

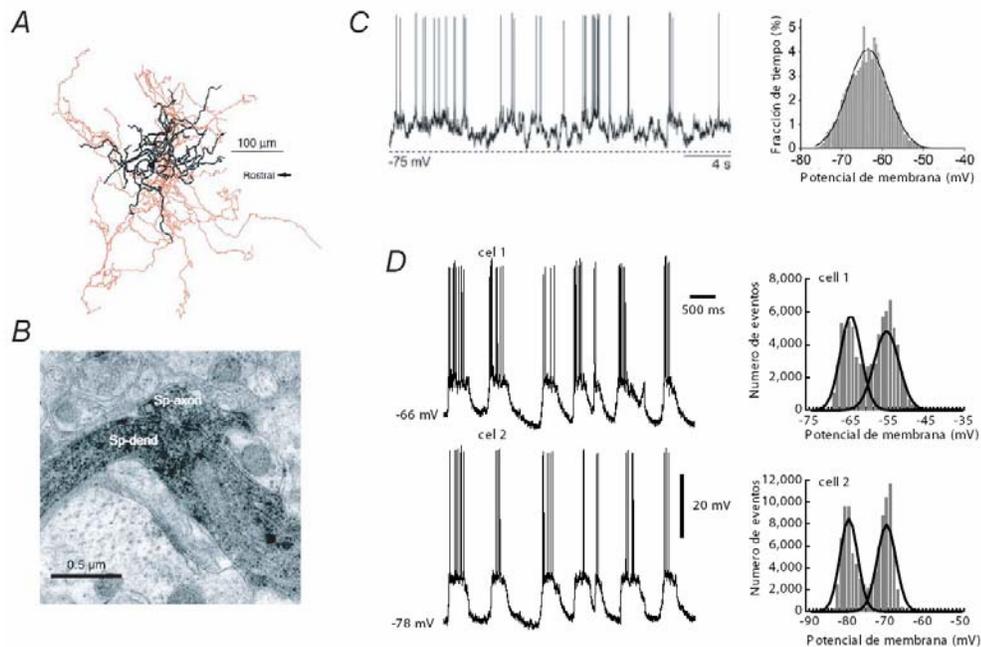


Figura 3. Morfología y fisiología de la neurona espinosa mediana de proyección (*NEM*) **A.** Reconstrucción de una *NEM* de rata adulta marcada con biocitina *in vivo*. En rojo aparece el axón y en negro la arborización dendrítica. Note la ramificación del axón antes de salir del *NE*. **B.** Micrografía de una sinapsis simétrica entre dos *NEMs* marcadas intracelularmente con peroxidasa de rábano. Abreviaciones: Sp-axón, terminales axónicas de una *NEM* marcada intracelularmente; Sp-dend, dendrita de una segunda *NEM* también marcada. **C.** Registro intracelular de una *NEM* *in vivo* sin anestesia (izquierda), a la derecha se muestra la distribución del potencial de membrana. **D.** Un par de *NEMs* registradas *in vivo* en animal anestesiado. Note la sincronización en la oscilación del potencial de membrana. A y B son tomadas de Tepper et al., 2004, C de Mahon et al., 2006 y D de Stern et al., 1998.

1.7 LAS INTERNEURONAS DEL NEOESTRIADO

Las interneuronas neostriatales conforman entre el 5% y el 23 % del total de células neostriatales en ratas y en primates, respectivamente. Son neuronas con pocas espinas dendríticas en comparación con las *NEMs* (Bennet y Wilson, 2000). Se han clasificado cuatro tipos principales. El primero es de naturaleza colinérgica (Armstrong et al., 1983; Levey et al., 1983; Bolam et al., 1984; Phelps et al., 1985; Graybiel et al., 1986; DiFiglia, 1987). Los otros tres son de naturaleza GABAérgica (Ribak et al., 1979; Bolam et al., 1983, Bolam et al., 1985; Oertel y Mugnaini, 1984; Kita y Kitai, 1988). Los tres tipos de interneuronas GABAérgicas son: (i) las interneuronas que contienen parvalbúmina (Gerfen et al., 1985; Cowan et al., 1990; Kita et al., 1990; Kawaguchi et al., 1995), (ii) las interneuronas que contienen somatostatina y neuropéptido Y, así como la enzima *NADPH*-diaforasa y la óxido nítrico sintasa (Vincent et al., 1983; Chesselet y Graybiel 1986; Sandell et al., 1986; Smith y Parent 1986; Mizukawa et al., 1988; Kawaguchi et al., 1995) y las (iii) interneuronas que contienen calretinina (Kawaguchi et al., 1995; Tepper y Bolam, 2004).

1.7.1. La interneurona gigante colinérgica

Existen dos poblaciones de interneuronas gigantes identificadas en el *NE*. Una de las cuales corresponde a neuronas inmunopositivas para acetil-colin transferasa. La otra es una variedad de las interneurona GABAérgica inmunopositiva a parvalbúmina (ver interneuronas GABAérgicas) (Tepper y Plenz, 2004). La interneurona gigante colinérgica es la más abundante del *NE*. Constituyen del 0.3 al 2% de las neuronas del *NE* en la rata (Kawaguchi et al., 1995; Rymar et al., 2004). Su soma mide entre 20 y 50 μm de diámetro. Estas

interneuronas constituyen la única fuente de acetilcolina en el *NE* (McGeer y McGeer, 1993), único núcleo del telencéfalo que no recibe aferencias colinérgicas del septum, núcleos basales o tallo cerebral. El *NE* posee “su propia” *ACh*.

Estas neuronas emiten de 2-4 dendritas primarias que dan origen a dendritas de orden superior que se expanden varios milímetros. El axón de la interneurona colinérgica se origina en las dendritas proximales y se ramifica repetidamente formando una densa arborización que puede abarcar un área o volumen mucho mayor que el ocupado por las dendritas (Bennet y Wilson, 2000) (Figura 4).

La interneurona colinérgica realiza contactos sinápticos sobre las *NEMs* además de inervar a las interneuronas GABAérgicas inmunopositivas a parvalbúmina (Koós y Tepper, 2002). Las entradas excitadoras a la interneurona colinérgica se originan predominantemente del tálamo (Bolam y Bennett, 1995). También recibe entradas GABAérgicas. Estas son moduladas presinápticamente por receptores a dopamina de la clase D_2 (Momiya, 2003). Recibe entradas dopaminérgicas de la *SNc* (Bennet y Wilson, 2000).

Esta interneurona exhibe un potencial de acción lento (en comparación con el resto de las neuronas neostriatales) y un prominente postpotencial hiperpolarizante debido a la presencia de conductancias de potasio activadas por calcio y por voltaje (Wilson, 2004). También exhibe una prominente conductancia activada por hiperpolarización (I_h) así como una conductancia persistente de *Na* (I_{NaP}). La interacción de estas conductancias las hace disparar espontáneamente en ausencia de cualquier entrada sináptica, aunque a veces lo hacen en forma de

ráfagas rítmicas (Bennet y Wilson, 1999). Comparada con la *NEM*, la interneurona colinérgica presenta un potencial de membrana en reposo más despolarizado (-60 a -55 mV).

1.7.2 Las interneuronas GABAérgicas

i) Las interneuronas que contienen parvalbúmina.

A partir del estudio estereológico de estas interneuronas en rata, se calcula que poco menos del 1 % de la población neuronal del *NE* corresponde a neuronas inmunopositivas a parvalbúmina (Rymar et al., 2004). Existe un gradiente medio-lateral en la distribución de axones y terminales positivos a parvalbúmina, sugiriendo que estas células pueden estar más relacionadas con funciones en el *NE* lateral que en el medial (Bolam y Bennett, 1995). Existe heterogeneidad entre las interneuronas inmunopositivas a parvalbúmina. Se han reportado interneuronas inmunopositivas a parvalbúmina con somas de entre 12 hasta 100 μm de diámetro, siendo un grupo el que oscila entre 50 y 100 μm de diámetro. Presentan dendritas poco ramificadas, generalmente lisas y sin espinas, que en algunos casos presentan varicosidades (Tepper y Plenz, 2004). Las interneuronas inmunopositivas a parvalbúmina más grandes (soma > 50 μm) exhiben una arborización dendrítica el doble del volumen que el de las interneuronas inmunopositivas a parvalbúmina más pequeñas (soma < 50 μm) (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi et al., 1995; Koós y Tepper, 1999) ¿Corresponderán a las canastas grandes y pequeñas de la corteza y del hipocampo? Muchas neuronas del tipo canasta son inmunopositivas a parvalbúmina en estos núcleos, y también se dividen en grandes y pequeñas (Kawaguchi y Kubota 1997; 1998; Gupta et al.,

2000; Toledo-Rodriguez et al., 2004). En el *NE* la arborización axonal de estas interneuronas es sumamente densa y en la mayoría de los casos alcanza un volumen mucho mayor que el de su arborización dendrítica (ver Figura 4) (Koós y Tepper, 1999).

Las interneuronas inmunopositivas a parvalbúmina hacen contactos sinápticos sobre los somas y las dendritas proximales de las *NEMs* (Kubota y Kawaguchi, 2000). Sus axones conforman “canastas” peri-celulares alrededor de las *NEMs* lo que favorece la visión de que equivalen a las canastas corticales e hipocampales (Koós y Tepper, 1999; Kubota y Kawaguchi, 2000). Reciben una inervación excitadora de la neocorteza así como entradas GABAérgicas de *NEMs*. También son invadas por una subpoblación de neuronas GABAérgicas provenientes del globo pálido (vía pálido→estriatal) (Bolam y Bennett, 1995; Bevan et al., 1998; Kita y Kita, 2001). Por último, reciben sinapsis de la interneurona colinérgica (Bolam y Bennett, 1995; Kawaguchi et al., 1995; Koós y Tepper, 1999).

La interneurona inmunopositiva a parvalbúmina presenta un fenotipo electrofisiológico compartido por interneuronas inmunopositivas a parvalbúmina de otras regiones del cerebro incluyendo las canastas de la neocorteza y el hipocampo (“*basket cells*”). Debido a este fenotipo se les llama “*fast spiking*” (*FS*) o de “disparo rápido”. Consiste en presentar una alta frecuencia de disparo (hasta 300 Hz). Las interneuronas *FS* presentan potenciales de acción estrechos, una relación corriente-voltaje (curva I-V) relativamente lineal (en comparación con las *NEMs*), y pueden disparar en ráfagas de potenciales de acción con poca o

ninguna adaptación (Koós y Tepper, 1999; Tepper y Plenz, 2004). Esta neurona puede presentar disparo espontáneo registrada *in vivo* (Kita, 1993). Sin embargo, el disparo espontáneo en ráfagas es observado rara vez, aún en cultivos organotípicos de *corteza-neoestriado-sustancia nigra* donde las interneuronas *FS* están activas espontáneamente y las *NEMs* presentan oscilaciones de voltaje (Plenz y Kitai, 1998). Sin embargo, es posible inducir disparo en ráfagas bajo ciertas condiciones (ver apéndice A). Las interneuronas *FS* presentan un potencial de membrana en reposo hiperpolarizado y alejado del umbral de disparo (~ -80 mV). Otra característica de estas interneuronas es que están acopladas eléctricamente por medio de uniones comunicantes (Kita et al., 1990; Koós y Tepper, 1999) lo que permite un control global sobre las neuronas del *NE* (Nisenbaum y Berger, 1992; Berke et al., 2004; Mallet et al., 2005).

ii) Las interneuronas que contienen somatostatina, neuropeptido Y y *NADPH-d*

Una segunda población de interneuronas GABAérgicas neoestriatales comprende neuronas sin espinas que expresan somatostatina, óxido nítrico sintasa, neuropeptido Y, *NADPH*-diaforasa y *GABA*. Estas neuronas constituyen poco menos del 1 % del total de la población neuronal del *NE* (Rymar et al., 2004). Sus dendritas son menos ramificadas que las interneuronas inmunopositivas a parvalbúmina además de ser más lisas. La arborización axonal de la interneurona inmunopositiva a somatostatina generalmente se extiende un poco más allá de su arborización dendrítica.

Estas neuronas reciben entradas monosinápticas excitadoras de la neocorteza y del tálamo, al igual que las interneuronas inmunopositivas a parvalbúmina, también reciben entradas GABAérgicas del globo pálido (Bolam y Bennett, 1995). También recibe sinapsis asimétricas inmunopositivas a tirosina hidroxilasa o acetil-colin transferasa (Bolam y Bennett, 1995; Kawaguchi et al., 1995).

Las interneuronas inmunopositivas a somatostatina presentan un potencial de membrana en reposo relativamente despolarizado (~ -56 mV), y una resistencia de entrada significativamente más alta que la de las *NEMs* y las interneuronas inmunopositivas a parvalbúmina (Fig. 4). La característica electrofisiológica principal de estas neuronas es la presencia de espigas de calcio de bajo umbral (o LTS que proviene de “*low threshold spikes*”) y una despolarización persistente sensible a cobalto que puede ser evidente ante el cese de pulsos hiperpolarizantes (“*off-rebound excitation*”). Por lo que algunos autores las refieren como interneuronas *LTS* o persistentes-LTS (Kawaguchi, 1993; Koós y Tepper, 1999).

lii) Las interneuronas que contienen calretenina.

Constituyen la tercera clase así como la menos caracterizada. No tienen espinas y contienen una proteína amortiguadora de calcio llamada calretinina. Posee pocas ramificaciones dendríticas y son relativamente escasas en la parte caudal del *NE* (Bennet y Bolam, 1993). Su población abarca el 0.5 % de la población total del *NE* (Rymar et al., 2004). No hay reportes de registros

electrofisiológicos de una interneurona inmunopositiva a calretenina por lo tanto su fenotipo electrofisiológico permanece desconocido (Tepper y Bolam, 2004).

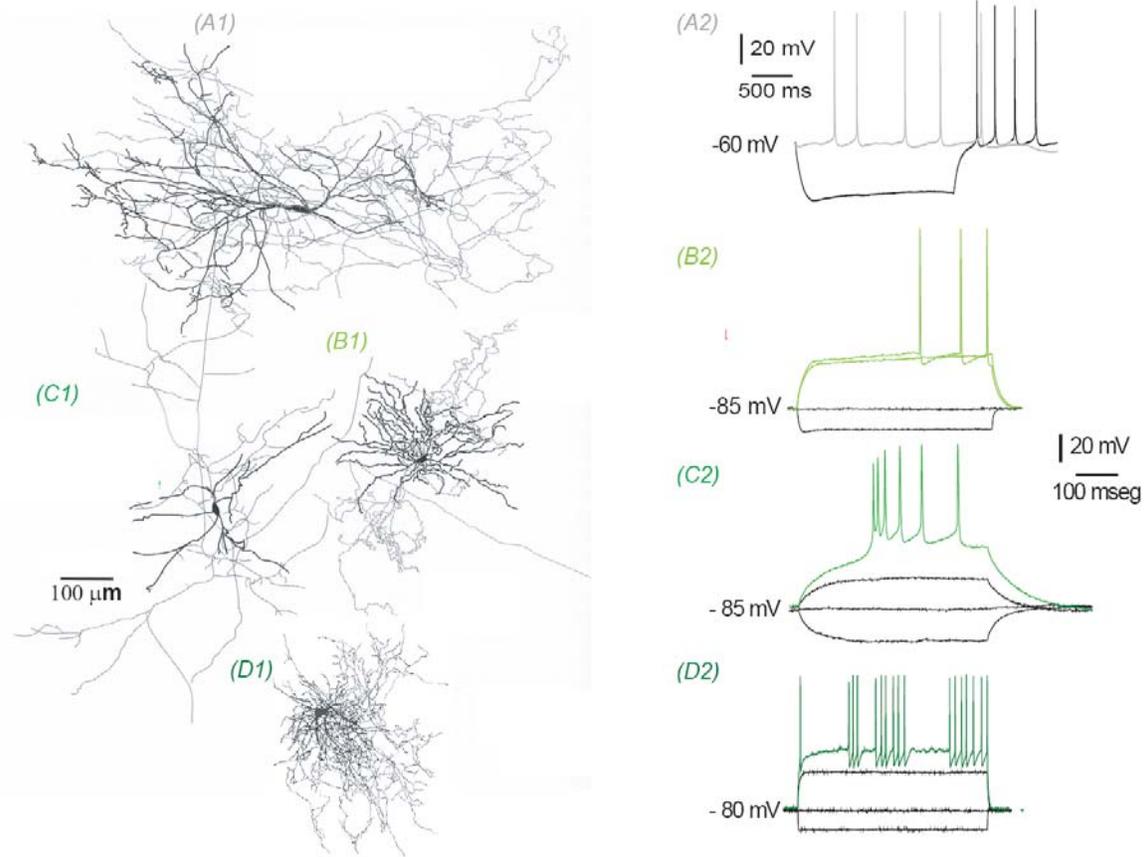


Figura 4. Neuronas del neostriado. Izquierda: reconstrucción de cada tipo de neurona. En color más oscuro se muestra el árbol dendrítico, el color más tenue corresponde al axón. Derecha: respuestas características ante pulsos de corriente (no mostrados) en cada tipo neuronal. La figura de la izquierda fue tomada de Wilson 2004. Los registros de la derecha fueron obtenidos por el autor de la presente Tesis. *A1* y *A2*: Interneurona gigante colinérgica, *B1* y *B2*: Neurona espinosa mediana de proyección, *C1* y *C2*: Interneurona GABAérgica tipo “*Low threshold spike*”, *D1* y *D2*: Interneurona GABAérgica tipo “*Fast spiking*”.

1.8 MICROCIRCUITO GABAÉRGICO EN EL NEOESTRIADO

El origen de la inhibición GABAérgica sobre las *NEMs* está principalmente determinado por las siguientes sinapsis: (i) la sinapsis que interconecta, entre sí, a las neuronas de proyección del *NE* (que algunos autores han denominado inhibición de tipo “*feedback*”), la podemos simbolizar como *NEM*→*NEM*, y (ii) la

variedad de sinapsis que hacen las interneuronas sobre las *NEMs* (como por ejemplo, a la que forma la neurona *FS* la podemos denominar: *FS*→*NEM*; que algunos autores llaman inhibición de tipo “*feedforward*”) (Figura 5).

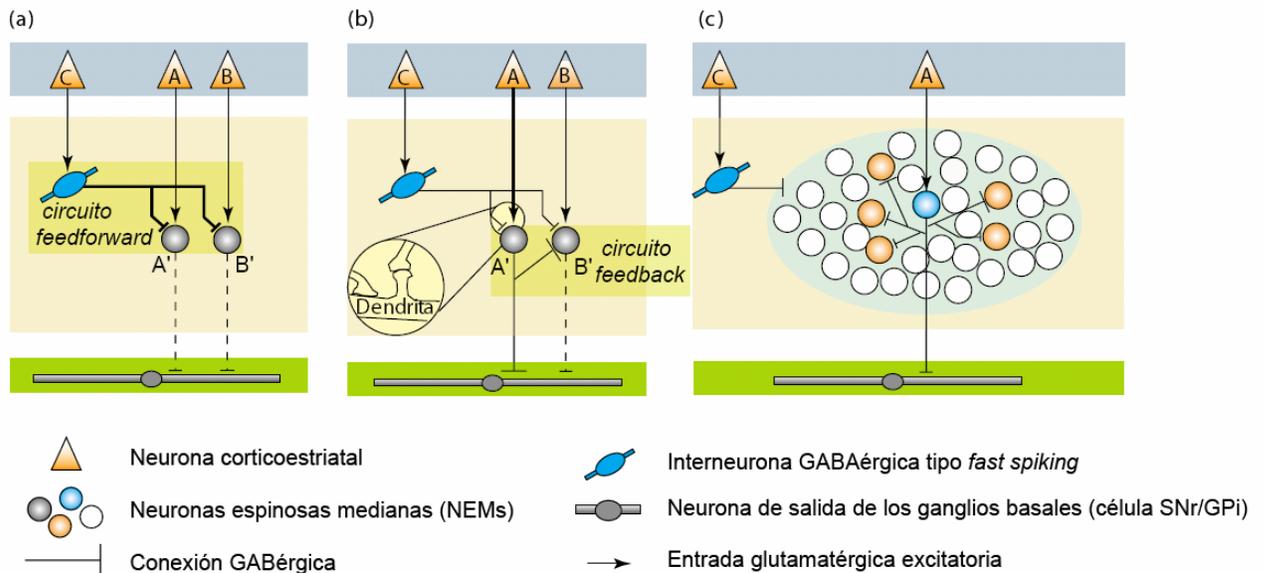


Figura 5. Los tipos de inhibición “*feedforward*” y “*feedback*” contribuyen diferencialmente al procesamiento de las entradas corticales dentro del neocórtex. (a) En la inhibición “*feedforward*”, una entrada cortical (C) inhibe a las *NEMs* A' y B' a través de excitar a la interneurona *fast spiking* (FS). Este tipo de inhibición está determinado sólo por el circuito “*feedforward*” y es independiente de la salida neocortical. Aún pequeñas entradas corticales activan la interneurona FS, que origina una potente ráfaga de potenciales de acción (Plenz y Kitai, 1998; Koós y Tepper, 1999), lo cual produce una inhibición fuerte en las *NEMs*. (b) La inhibición “*feedback*” ocurre cuando la entrada cortical A despolariza a la *NEM* A' por arriba del umbral. Esta condición es considerada “*feedback*” porque la salida de A' deja una entrada en una *NEM* vecina (B) antes de salir del núcleo. La inhibición “*feedback*” está bajo control de la sinapsis cortico-estriatal (la cual puede presentar fenómenos de plasticidad), en consecuencia, la entrada cortical regula la selectividad del procesamiento neocortical (Wickens, 1990). El inserto circular describe a una sinapsis cortical que hace contacto con la cabeza de la espinosa dendrítica, mientras que la sinapsis inhibidora contacta en el tronco de la dendrita. (c) La inhibición “*feedback*” en el neocórtex es espacialmente más selectiva que la inhibición “*feedforward*”. A través de su gran ramificación axonal, la interneurona FS inerva grandes áreas del neocórtex (área color turquesa) (Koós y Tepper, 1999). En contraste, la mayoría de los axones colaterales de las *NEMs* se restringen al árbol dendrítico de sus *NEMs* vecinas (Preston, et al., 1980; Wilson y Groves, 1980). Esto está evidenciado por la relativa baja probabilidad de conexión entre *NEMs* (Tunstall et al., 2002; Czubayko y Plenz, 2002; Koós et al., 2004). Estas diferencias anatómicas sugieren que mientras la inhibición tipo “*feedforward*” es uniforme y global (color turquesa) (Plenz y Kitai, 1998), la inhibición “*feedback*” de una *NEMs* (*NEM* azul) es mucho más local y específica sobre otras *NEMs* (*NEMs* naranja). Las líneas continuas indican actividad, la línea punteada muestra un decremento en la actividad. En (c) la *NEM* azul indica que está activa, el color naranja una *NEM* despolarizada y las blancas son *NEM* sin actividad. Figura tomada de Plenz, 2003.

1.8.1 INHIBICIÓN *FEEDBACK*

La inhibición que una *NEM* recibe de otras *NEMs* es denominada inhibición tipo “*feedback*” (Plenz, 2003). En esta inhibición (e.g. Groves, 1983; Wickens et al., 1991; Plenz 2003; Grillner et al., 2005) el *NE* puede verse como una red de inhibición lateral tipo “*feedback*” (mediada por la transmisión GABAérgica entre las *NEMs*). Las entradas corticales son seleccionadas a nivel del *NE*, la *NEM* que es excitada más fuertemente por la *Cx*, inhibe a las vecinas que ya no podrían disparar. Por lo tanto, la *NEM* más excitada “gana” la salida (Figura 5b), lo cual puede modelarse con un algoritmo computacional denominado “el ganador toma todo” (“*winner takes all*”) (Wickens et al., 1991) (Figura 5C). Los primeros intentos por mostrar la existencia de esta inhibición entre *NEMs* fueron un fracaso (e.g., Jaeger et al., 1994; Stern et al., 1998), lo que llevó a proponer que esta era insignificante o no existía (Jaeger et al., 1994). Sin embargo, la existencia de esta inhibición ha sido demostrada contundentemente mediante el registro de pares de neuronas (Tunstall et al., 2002; Czubayko y Plenz, 2002; Koós et al., 2004; Taverna et al., 2004; Venance et al., 2004; Tecuapetla et al., 2005a; Gustafson et al., 2006). El problema es que la proporción de *NEMs* interconectadas es muy bajo (14-15 %, que se reduce a 0% cuando las neuronas registradas están alejadas más de 100 μm). Claro que se calcula que en el volumen que abarca el árbol dendrítico de una *NEM*, caben cuando menos ~ 2850 *NEMs* (Orschoot, 1996), lo cual indica que cuando menos 407 de ellas conectan con una *NEM* (central) postsináptica.

1.8.2 INHIBICIÓN FEEDFORWARD

Recientemente se ha sugerido que las interneuronas *FS* pueden recibir entradas de áreas corticales distintas comparadas con las que las que reciben la *NEMs* que ellas inervan. Lo cual abre la posibilidad que la inhibición *FS*→*NEM* tenga funciones diferentes a las adscritas a la inhibición *NEM*→*NEM* (“*feedback*”) (Berke et al., 2003).

Si bien los axones colaterales que las *NEMs* dejan dentro del *NE* antes de enviar sus axones hacia los otros núcleos de los *GB* son numerosos (las *NEMs* constituyen ≈ 95 % de la población neuronal del *NE*), e históricamente han sido reconocidos como el centro de la inhibición neostriatal (e.g. “*winer take all*”; ver Plenz, 2003), individualmente, las interneuronas proporcionan una inhibición más potente sobre las *NEMs* (ver “*feedback*” vs “*feedforward*” más adelante). Koós y Tepper han mostrado (1999) que la conexión que una sola interneurona (*FS* o *LTS*) deja sobre una *NEM*, es lo suficientemente fuerte para retardar o inhibir el disparo de potenciales de acción de una *NEM*.

1.8.3 INHIBICIÓN FEEDFORWARD vs. INHIBICIÓN FEEDBACK

La fuerza de la inhibición *NEM*→*NEM*, cuando se considera “el peso” de una sola *NEM* presináptica, es mucho menor que si consideramos el número de *NEMs* presinápticas que potencialmente pueden hacer contactos sinápticos sobre la misma *NEM* postsináptica (Tepper et al., 2004).

Una medición importante de la eficacia sináptica es la amplitud que los potenciales postsinápticos inhibitorios (*IPSPs*) puede alcanzar en el soma. Los *IPSPs* entre dos *NEMs*, registrados a un potencial de membrana de -50 mV,

presentan amplitudes promedio de 150 μV (rango 93-197 μV) (Czubayko y Plenz, 2002; Taverna et al., 2004; Venance et al., 2004; para resumen ver Tepper et al., 2004). Las simulaciones con modelos compartamentales de *NEMs* estiman una atenuación electrofisiológica de las corrientes postsinápticas inhibitorias (*IPSCs*) de tres veces; cuando llegan al soma. Resultando en una reducción de la amplitud de la respuesta del valor observado *in vitro* de 500 a 150 μV (Koós et al., 2004). Por lo anterior, se piensa que la amplitud de la *IPSC* unitaria, registrada en el soma de una *NEM* cerca del umbral de disparo, es muy pequeño (Koós et al., 2004; Tepper et al., 2004).

La manera en la cual la inhibición entre *NEMs* contribuye a la regulación de la actividad de la red en el *NE*, depende del grado en que una sola *NEM* presináptica es capaz de influenciar el disparo de potenciales de acción de otra *NEM* postsináptica. Esto puede ser comparado con la influencia que una sola interneurona *FS* (inhibición tipo “*feedforward*”) tiene sobre el disparo de una *NEM* postsináptica (Koós y Tepper, 1999). Un *IPSP* que se origina en una sola *NEM* induce menos de un milisegundo de retraso en la generación de un potencial de acción en una *NEM* postsináptica (Tepper et al., 2004). En consecuencia, está en discusión que una sola *NEM* tenga una influencia significativa sobre la tasa de disparo de otras *NEMs* (Koós et al., 2004; Tepper et al., 2004). Sin embargo, la amplitud pequeña de las *IPSC* unitarias entre *NEMs* podría ser compensado por un alto grado de convergencia en la red: muchas *NEMs* presinápticas para cada *NEM* postsináptica. Pero si esto es así, se espera que la inhibición *NEM*→*NEM* tenga predominancia en situaciones de hipersincronía.

Por otro lado, la divergencia (número de neuronas postsinápticas que reciben sinapsis de una sola *NEM*) y la convergencia (número de neuronas presinápticas que conectan con una sola *NEM*) pueden ser calculadas a partir de estudios donde se han registrado pares de *NEMs*. Esto provee un estimado de la probabilidad de la conexión entre pares de *NEMs*. La probabilidad promedio de la conexión entre *NEMs* es de 14-15 % (Tunstall et al., 2002; Koós et al., 2004; Taverna et al., 2004; Koós et al., 2004; Tecuapetla et al., 2005a). Estos resultados indican que dentro del volumen abarcado por las colaterales axónicas de una *NEM* presináptica, cerca de 1/7 neuronas son inervadas (Tepper et al., 2004). Basados en estos resultados, aproximadamente 407-518 *NEMs* presinápticas inervan a una sola *NEM* postsináptica (Tepper et al., 2004; Guzmán et al., 2003). Este valor es de 16 a 125 veces más alto que el número de interneuronas *FS* que contactan a una sola *NEM* (Koós y Tepper, 1999). Considerando que la conductancia al pico de las respuestas postsinápticas unitarias, o entre pares de *NEMs*, es 0.6-0.75 nS (Taverna et al., 2004; Koós et al., 2004; Venance et al., 2004), las aproximadamente 400 entradas de otras *NEMs* darían una conductancia máxima de 3-25 veces la conductancia sináptica neta activada por las 4-24 interneuronas presinápticas a una *NEM* (Koós et al., 1999, 2004). Pero esto implicaría que las 400 *NEMs* presinápticas se activaran al unísono (hipersincronía). ¿Habrían estados funcionales en la red que permitan esto? Probablemente no (Wilson, 2004, Tepper et al., 2004). Sin embargo, la actividad simultánea de al menos el 5 % de las *NEMs* presinápticas, tendría un efecto significativo sobre la frecuencia de disparo de una *NEM* postsináptica. Por lo tanto, a pesar de la pequeña contribución de la conexión unitaria *NEM*→*NEM*, el efecto de la inhibición

convergente sobre la tasa de disparo de una *NEM* podría ser muy importante, cuando menos similar al de la inhibición provista por las interneuronas (inhibición “*feedforward*”). Pero el balance entre ambos tipos de inhibición podría ser dinámico, dependiendo del grado de sincronía, lo cual podría depender de la acción neuromoduladora de algunos transmisores.

1.9 LA DOPAMINA Y SUS RECEPTORES EN EL NEOESTRIADO

La dopamina (*DA*) es un neurotransmisor modulador del cerebro de los vertebrados. Experimentos conductuales sugieren que regula una gran variedad de funciones, incluyendo los movimientos motores voluntarios, la locomoción, el reforzamiento conductual, la sensación de recompensa después de la ejecución de una tarea, el aprendizaje, la memoria, la cognición, las respuestas emotivas, la reacción y la adaptación ante los cambios o ante estímulos imprevistos y otros. Asimismo, su función explica las adicciones y el abuso a las drogas (Baik et al., 1995; Greengard et al., 1999; Lubow, 2005; Missale et al., 1998; Salamone et al., 2005; Tobler et al., 2005). Por lo anterior, se piensa

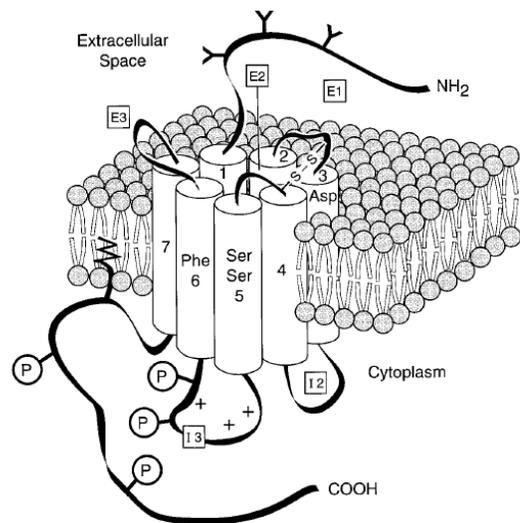


Figura 6. Estructura de un receptor dopaminérgico. Los receptores de la familia *D2* se caracterizan por poseer un segmento COOH-terminal más corto y una tercera asa intracelular más larga. Los aminoácidos aspartato (*Asp*) en el segmento transmembranal 3, las dos serinas (*Ser*) en el segmento 5, y una fenilalanina (*Phe*) en el segmento 6, están implicados en la interacción de la dopamina con el receptor. Los sitios de fosforilación se indican en el segmento COOH-terminal e *I3*, mientras que en el segmento NH₂-terminal se localizan residuos susceptibles de ser glicosilados. Dos residuos de cisteína en las asas extracelulares *E1* y *E2* establecen un enlace disulfuro manteniendo la estructura terciaria del receptor. La clase *D1* contiene a los tipos *D1* y *D5*. La clase *D2* contiene a los tipos *D2*, *D3*, y *D4*. Tomada de Missale et al. (1998).

que el conocimiento de los mecanismos de acción de la dopamina llevará a un mejor entendimiento de todos estos procesos.

La dopamina ejerce su acción al unirse a receptores de membrana específicos (Gingrich y Caron, 1993). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con siete segmentos transmembranales (ver Figura 6) (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000; Sealfon y Olanow, 2000).

Kebabian y Calne en 1979 fueron los primeros en establecer que los múltiples efectos que la dopamina ejerce se deben a su interacción con distintos receptores. En su clasificación de los receptores dopaminérgicos describieron dos familias de receptores. Una familia estaría acoplada positivamente a la adenilato ciclasa y se denomina D_1 . La otra, estaría acoplada negativamente a la adenilato ciclasa y se denomina D_2 .

Posteriormente, con la introducción de procedimientos de clonación, fueron caracterizados más miembros de las dos familias o clases: Los tipos D_3 (Sokoloff et al. 1990), D_4 (Van Tol et al. 1991) y D_5 (Sunahara et al. 1991; Tiberi et al. 1991). Así, la clase D_1 está constituida por los receptores tipo D_1 y tipo D_5 , ambos acoplados positivamente a la adenilato-ciclasa. A su vez, la familia o clase D_2 está constituida por los receptores tipos D_2 , D_3 y D_4 (Civelli et al., 1993; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000). Aunque la visión original destacaba su acoplamiento negativo a la adenilato-ciclasa, descubrimientos posteriores han demostrado que ésta es la vía menos importante para explicar las acciones de los receptores D_2

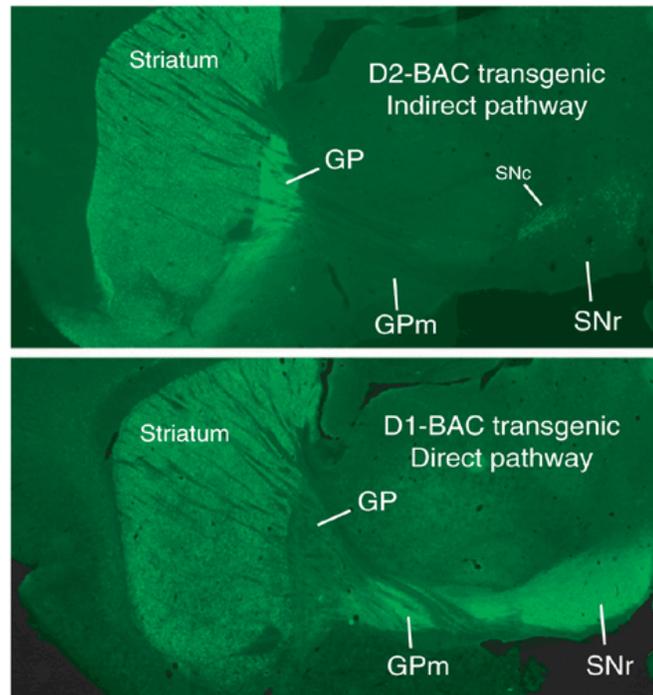
(Beaulieu et al., 2005; Gerfen et al., 2002; Hernandez-Lopez et al., 1997; 2000; Nishi et al., 1997).

Mediante el uso de la transcripción reversa seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (*RT-PCR*) en células disociadas (Surmeier et al., 1993b; 1996; Nicola et al., 2000), se demostró que el 46% de las *NEMs* con niveles detectables de sustancia P pero no de encefalina (*NEMs* de la vía directa) expresaban abundante *ARNm* del receptor tipo D_1 . Pero una subpoblación considerable de estas *NEMs* de la vía directa también co-expresaron *ARNm* para los receptores D_2 (19%), D_3 (38%), y/o D_4 (25%). Por otra parte, 25% de las *NEMs* con *ARNm* para encefalina pero no para sustancia P (de la vía indirecta) expresaban niveles abundantes de *ARNm* para los receptores D_2 (isoformas corta y larga). Pero de nuevo, una subpoblación de este grupo (25%) también coexpresaba *ARNm* para las isoformas D_1 y D_5 . Finalmente, 29% de *NEMs* contaba con niveles detectables de *ARNm* para ambos receptores: tipos D_1 y D_2 . Así, los cinco tipos de receptor dopaminérgico han sido detectados en las *NEMs*. La co-localización de receptores de las clases D_1 y D_2 también se ha demostrado con microscopía confocal de alta resolución (Aizman et al., 2000; David y Harrison, 2002) llegando a decir que hay hasta un 80% de co-localización (Wang et al., 2006).

Sin embargo, la hipótesis de la segregación de las dos clases de receptor (D_1 y D_2) en las vías directa e indirecta, respectivamente, sigue teniendo un soporte muy fuerte de los estudios de hibridización *in situ* (Le Moine et al., 1991; Le Moine y Bloch, 1995; Gerfen, 1990; Bergson et al., 1995; Wang et al., 2006), o

de expresión génica. Por ejemplo, utilizando ratones transgénicos con la proteína verde fluorescente acoplada al promotor específico para cada uno de estos receptores (Gong et al., 2003; Day et al., 2006; Lee et al., 2006; Gerfen, 2006). Las imágenes que dejan estos experimentos, hacen pensar en una segregación de receptores en las dos vías (ver Figura 7).

Figure 7. La marca de *EGFP* acoplada a la expresión de receptores a dopamina apoya la segregación de las vías: directa e indirecta de los ganglios basales (Gerfen, 1990). Ambos paneles muestran una sección sagital del cerebro de ratones transgénicos BAC en los cuales las neuronas que expresan el receptor a dopamina D2 (panel de arriba; D2-BAC) o D1 (panel de abajo; D1-BAC) están marcadas con *EGFP*. La *EGFP* marca los somas de las neuronas dentro del neostriado (Striatum) además de marcar sus proyecciones axonales. El ratón D2-BAC muestran la marca de *EGFP* en las neuronas de la vía indirecta [con sus terminales axónicas proyectando a el globo pálido (GP)], mientras que las neuronas del ratón D1-BAC muestra a las neuronas de la vía directa [sus terminales proyectan a el globo palido medio (GPm) y a la sustancia nigra parts reticular (SNr)]. *EGFP*: "Enhanced Green Fluorescent Protein". Figura tomada de Gerfen, 2006.



En resumen, hay una contradicción en la literatura de los GB. La mayoría de los estudios que cuantifican la proteína del receptor en membrana (farmacología e inmunohistoquímica) (Surmeier y Kitai, 1993; Hernandez-Lopez et al., 1997; Levine et al., 1996; Nicola et al., 1996; Cepeda et al., 1998; Fienberg et al., 1998; Flores-Hernandez et al., 2000; Pérez-Garcí et al. 2002; Surmeier et al. 1996; Nicola et al., 2000) están en contra de la segregación. Mientras que la

mayoría de los estudios que cuantifican la expresión génica (hibridización *in situ* y expresión utilizando genes reporteros) (Le Moine et al. 1991; Le Moine y Bloch, 1995; Gerfen, 1990; Bergson et al. 1995; Wang et al., 2006), favorecen una segregación estricta en dos poblaciones de NEMs: las de la vía directa con receptores de la clase D1 casi de manera exclusiva, y las de la vía indirecta, con receptores D2, también casi de manera exclusiva. La razón de este desacuerdo, que depende del tipo de técnica utilizada, no ha sido resuelta (Graybiel, 2005; Wang et al., 2006).

Una hipótesis para tratar de conciliar los hallazgos obtenidos con diferentes métodos es que la mayor transcripción hallada en una población de neuronas, respecto de un receptor, se debe a la necesidad que esas neuronas tienen de mandar receptores a sus terminales (receptores presinápticos) (Geldwert et al., 2006; Mizuno et al., 2007) y no tanto para sintetizar receptores que se quedarían en la membrana somatodendrítica. Es por eso que entre los objetivos de la presente Tesis se haya el de observar si todas las terminales responden a un determinado agonista, o si hay algunos casos que no conllevan respuesta.

1.9.1 FARMACOLOGÍA DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

Las propiedades farmacológicas de los diferentes receptores dopaminérgicos han sido extensamente estudiadas debido a que los ligandos de estos receptores se utilizan en la terapéutica para el tratamiento de múltiples padecimientos (ver arriba en 1.9) (Seeman y Van Tol, 1994; Sokoloff y Schwartz, 1995; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000). Los ligandos dopaminérgicos

claramente discriminan entre las clases D_1 y D_2 . Sin embargo, no son tan selectivos al comparar los distintos tipos de receptor en una misma clase (ver mas adelante). Esta situación ha llevado a múltiples contradicciones y datos incoherentes en la literatura, como el mencionado arriba acerca de la segregación o no segregación de receptores en distintas poblaciones de *NEMs*. La dificultad de esto es que los modelos fisiopatológicos y terapéuticos realmente difieren si se considera que un determinado fármaco actúa sobre ambas poblaciones de *NEMs* o sólo sobre una de ellas.

Así, el agonista *SKF-81297* es muy selectivo para la clase D_1 pero no distingue entre los tipos D_1 y D_5 en un ensayo funcional. Los estudios de unión muestran que el receptor D_5 tiene una afinidad de apenas 10 veces mayor para la dopamina que el tipo D_1 (Sunahara et al., 1991; Tiberi et al., 1991).

Por otro lado, se han sintetizado agonistas y antagonistas más o menos selectivos para los receptores de la clase D_2 . Con respecto a la dopamina, sin embargo, el receptor tipo D_3 es apenas 20 veces más afín por la dopamina que el receptor tipo D_2 (Sokoloff et al. 1990). ¿Esto quiere decir que el efecto terapéutico de las drogas utilizadas comúnmente en la clínica (e.g., L-DOPA, sulpiride, haloperidol, etc.) está dado por los receptores D_3 ? Este es uno de los tantos problemas que no se han dilucidado.

Entre las familias D_1 y D_2 de receptores dopaminérgicos, hay diferencias significativas en su afinidad por diferentes ligandos de uso clínico. Por ejemplo, la familia de receptores de la clase D_2 (tipos D_2 , D_3 , D_4), es en general más afín por la dopamina que los receptores de la familia de la clase D_1 (tipos D_1 y D_5). Para los primeros, la constante de inhibición es menor a 50 nM, pero para los segundos,

esta llega a ser de 5 μ M (Missale et al., 1998). Esto ha llevado a pensar que hay una acción tónica de la dopamina dada por activación de los receptores de la clase D₂. Mientras que si hay una acción fásica, debida a un incremento súbito en la concentración de DA, ésta estaría dada por la activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D₁ (Giros et al., 1996; Suaud-Chagny et al., 1995). En la presente Tesis estudiamos la plasticidad de corto plazo de las sinapsis pues de esta plasticidad depende que unas terminales respondan a cambios súbitos o fásicos (“*salient*”), o bien a cambios en la estimulación tónica o de fondo (“*background*”).

Entre los agonistas más selectivos para la familia D₂, se encuentra el *quinelorane* (fármaco utilizado en esta Tesis). Como muchos otros agonistas, esta molécula se une tanto a receptores del tipo D₂ como del tipo D₃, la constante de inhibición para el receptor tipo D₂ es de 341 nM, mientras que para el tipo D₃ es de 3.6 nM (Foreman et al., 1989; Sokoloff et al., 1992). Tiene hasta 100 veces mayor afinidad para el receptor tipo D₃, en comparación con el receptor tipo D₂. Entre los agonistas selectivos de la clase D₁ se encuentran las *benzazepinas*. Uno de los ligandos más potentes de estas es el *SKF-81297*. Este fármaco posee una constante de inhibición de 2.2 nM, en estudios de pegado, para el receptor D1 (Andersen y Jansen, 1990). En ensayos farmacológicos, muestra una *EC*₅₀ de 18 nM para estimular a la enzima adenilato ciclasa. En los mismos ensayos, la constante de inhibición para los receptores D₂ es de alrededor de 10 μ M (Andersen y Jansen, 1990). Nótese que las diferencias en afinidad de las dos familias de receptores, para los fármacos utilizados, da confianza para decir si una

respuesta pertenece o no a una determinada clase de receptor. En este sentido, la dopamina misma bien podría considerarse un “agonista” selectivo de los receptores D₂.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La neurona principal o de proyección del neostriado: *NEM*, recibe dos clases de sinapsis GABAérgicas inhibitorias:

- i) las sinapsis que interconectan a las *NEMs* entre sí (inhibición “*feedback*”)
- ii) las sinapsis provenientes de las interneuronas locales (inhibición “*feedforward*”) (Tepper y Plenz, 2004).

Por ello surge la pregunta:

¿Existen diferencias funcionales entre estas dos entradas?

3. OBJETIVO

Estudiar si existen diferencias funcionales entre las dos clases de entradas inhibitoras que inervan a las *NEMs*.

3.1 Objetivos particulares

- a) Observar si los canales de calcio involucrados en la transmisión GABAérgica de las terminales de las colaterales axónicas que interconectan a las *NEMs* son los mismos que los que utilizan las terminales que las interneuronas dejan sobre las *NEMs*.
- b) Caracterizar la plasticidad a corto plazo en ambas clases de sinapsis.
- c) Observar si los agonistas de los receptores dopaminérgicos de las clases D_1 y D_2 actúan a nivel presináptico modulando la plasticidad de corto plazo en las sinapsis inhibitoras provenientes de las colaterales axónicas.

Nótese en relación al apartado "c" que, si hay diferencias funcionales en las respuestas a los agonistas para las diferentes clases de receptor, y si las respuestas para cada agonista no se presentan en todos los casos, habremos encontrado cierta evidencia para la segregación de receptores a nivel de las terminales sinápticas.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1

Las terminales de las colaterales axónicas utilizan los canales de calcio de tipo N(Ca_v2.2) y P/Q(Ca_v2.1) para la liberación de GABA. En cambio, algunas de las terminales de las interneuronas locales no utilizan alguno de estos canales de calcio.

Hipótesis 2

La plasticidad de corto plazo de las sinapsis inhibitoras será la depresión sináptica (STD), sin embargo, es de esperarse diferencias en la cinética de dicha depresión pues no se espera que todas las terminales sinápticas posean exactamente la misma maquinaria de liberación.

Hipótesis 3

La activación de los receptores dopaminérgicos presinápticos de la clase D₁ provocará un efecto modulador sobre la plasticidad sináptica de corto plazo que será distinto, y acaso contrario, al provocado por la activación de los receptores dopaminérgicos presinápticos de la clase D₂, situados en las terminales de las colaterales axónicas que interconectan a las *NEM*. La sinapsis proveniente de las interneuronas poseerá una plasticidad de corto plazo no modulable.

Rationale de la hipótesis

1. Trabajos realizados en otras terminales sinápticas han demostrado que los canales de calcio implicados en la liberación de neurotransmisor son preferentemente del tipo N(Ca_v2.2) y P/Q(Ca_v2.1) (Takahashi y Momiyama, 1993; Iwasaki y Takahashi, 1998; Iwasaki et al., 2000). Poncer y cols. (1997; 2000) han mostrado que los canales de calcio de tipo N(Ca_v2.2) están implicados en la liberación de GABA de algunas interneuronas del hipocampo y los canales de calcio de tipo P/Q(Ca_v2.1) están implicados en la liberación de GABA de otras interneuronas, mientras que la neurona principal utiliza ambos.

2. Una de las mayores diferencias que se han encontrado entre diversas sinapsis, es el tipo de plasticidad a corto plazo que exhiben. Se piensa que esto se debe a interacciones particulares entre la maquinaria de liberación presináptica y la neurona postsináptica (Thomson, 2000; Zucker y Regehr, 2002; Fuhrmann et al., 2002; Abbott y Regehr, 2004).

3. Existen trabajos previos que sugieren que la modulación dopaminérgica de las terminales de las *NEMs* (Radnikow y Misgeld, 1998; Florán et al., 1990; Cooper y Stanford, 2001; Guzmán et al., 2003) y en particular su probabilidad de liberación (Guzman et al., 2003; Salgado et al., 2005), difieren de acuerdo a la clase de receptor que poseen. Por otro lado, algunos autores han mostrado que modular la probabilidad de liberación en terminales provenientes de interneuronas no afecta su plasticidad sináptica (Hefft et al., 2002; Hjelmstad, 2004; Hefft y Jonas, 2005).

5. METODOS

5.1 OBTENCIÓN DE REBANADAS CEREBRALES

Para estos experimentos se utilizaron rebanadas de cerebro de rata (Wistar albinas) de 13 a 15 días de edad cuando se usó estimulación de campo y de 19 a 21 días de edad cuando se registran pares de neuronas (conexiones unitarias). Estas edades facilitaron las condiciones de registro en cada protocolo. Los animales se sacrificaron por decapitación (previa anestesia) con el fin de extraer el cerebro, que una vez obtenido se sumergió en solución salina fría (4 °C) conteniendo (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃ y 11 de glucosa, a temperatura ambiente, saturada con 95 % de oxígeno y 5 % de dióxido de carbono (300 mOsm/l, pH 7.4). Se obtuvieron rebanadas de 300 μm de espesor a baja temperatura con ayuda de un vibratomo. Una vez obtenidas las rebanadas se mantuvieron incubadas en solución salina a temperatura ambiente por un periodo no menor de 60 min. Posteriormente las rebanadas se trasladaron a una cámara de registro. En estas condiciones es posible obtener registros confiables de más de 2 h de duración sin un deterioro significativo en la preparación. La velocidad de superfusión fue constante (3-6 ml/min). Todos los fármacos que se utilizaron en el presente trabajo fueron disueltos previamente en solución salina y se administraron a través del dispositivo de superfusión.

5.2 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Los registros se llevaron a cabo en las modalidades de fijación de voltaje (postsinapsis) y fijación de corriente (presinapsis) en célula completa. Si bien

mantener un isopotencial en la célula postsináptica se dificulta al registrarla en la modalidad de fijación de voltaje, esta técnica nos permitió perfectamente identificar si los efectos de los fármacos que utilizamos en esta tesis son pre o postsinápticos (ver análisis más adelante). Las rebanadas se observaron con un sistema de video-microscopía infrarroja. Se utilizó microelectrodos de registro con una resistencia d.c. en la punta de 3-6 megaohmios en el baño, los cuales se llenaron con una solución conteniendo (en mM): 72 KH_2PO_4 , 36 KCl, 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na_2ATP , 0.2 Na_3GTP , 5 QX-314 (estimulación de campo) y 1 % de biocitina, pH 7.2, 275 mOsm/l. Nótese que con esta concentración de cloruro las corrientes GABAérgicas serán entrantes.

5.3 Registros poblacionales

Utilizando un electrodo bipolar concéntrico de 12 μm en la punta, con forma de punta de lápiz, colocado sobre la superficie de la rebanada cerebral, es posible ejercer una estimulación de campo muy focalizada, al grado de tener conexiones unitarias con estimulación mínima (Konnerth et al. 1990; Dobrunz y Stevens, 1997; Hanse y Gustafsson 2001a; 2001b). Nosotros decidimos usar estimulaciones que reclutaran varias fibras aferentes para dar solidez estadística a los hallazgos, pero al mismo tiempo, corroboramos las mediciones con conexiones unitarias obtenidas con pares de neuronas (ver abajo). Los electrodos de estimulación se colocaron a una distancia de 0.5-1.0 mm de la neurona postsináptica registrada. Cuando la estimulación de campo se hizo en el globo pálido (Fig. 8A), la intención fue estimular antidrómicamente los axones de las *NEMs* de proyección que necesariamente pasan por este núcleo cuando salen del *NE*. Cuando se generan potenciales de acción antidrómicos en estos axones, estos se propagan hacia los

somas de las *NEMs* que los emiten, distribuyéndose por todas las ramas colaterales del axón. Las ramas colaterales locales, ya dijimos, hacen contactos sinápticos con otras *NEMs*. Una de ellas, es registrada. De esta manera tenemos la activación de varias sinapsis provenientes de *NEMs* presinápticas, haciendo contacto con una *NEM* postsináptica registrada (Fig. 8C). Como la estimulación es de campo y activa varias fibras, la corriente provocada la llamaremos “poblacional”. A la conexión la abreviaremos: *GP*→*NEM* para evitar confusiones (Fig. 8A) (Guzman et al., 2003). Cuando el electrodo de estimulación se colocó intraestriatalmente a 0.5-1.0 mm de distancia estamos virtualmente seguros de que estimulamos, mayoritariamente, aferentes provenientes de interneuronas, haciendo sinapsis con la *NEM* postsináptica registrada, pues como se sabe, la probabilidad de hallar una conexión entre *NEMs*, a distancias mayores de 100 μm , es cero. En cambio, los axones de las interneuronas abarcan 1 mm o más. A esta conexión la simbolizamos como: *NE*→*NEM* (Fig. 8B) (Guzman et al., 2003). Choques simples, pares de choques o trenes de 10 choques de duración 0.2-0.4 ms por choque y a una frecuencia de 0.1 Hz fueron utilizados comúnmente controlándolos desde la computadora. Se utilizó una unidad de aislamiento (Digitimer LTD, Hertfordshire UK) entre la computadora y el electrodo de estimulación para ajustar los parámetros durante el experimento.

5.4 Registros unitarios

La neurona presináptica se registró y estimuló en el modo de fijación de corriente con un potencial de mantenimiento de -85 mV y se estimuló con pulsos breves de corriente despolarizante y supraumbrales para que generara potenciales de acción (1-5 ms, 0.2-0.3 nA; o en trenes de 10 estímulos,

provocados a una frecuencia de 20 Hz cada 10 segundos). La célula postsináptica se registró en el modo de fijación de voltaje a un potencial de mantenimiento de -85 mV. Para monitorear continuamente la conductancia de entrada postsináptica se utilizó un pequeño comando de voltaje hiperpolarizante (10 mV) durante todo el experimento. Si esta conductancia cambiaba el experimento se descartaba.

Los trazos ilustrados son promedios de 4 min de registro (24 trazos), tomando la media de la amplitud cuando ésta era estable en cada condición. Sin embargo, también se ilustran cursos temporales con las respuestas individuales para apreciar la variabilidad cuántica. Todos los registros son filtrados a 1-3 KHz, digitalizados con una interfase AT-MIO-16E10 (National Ins., Austin TX) que utiliza la tarjeta DAQ (NI-DAQ) acoplada a una clona de PC y se almacenaron en disco para luego analizarse. La adquisición de datos en línea se hizo utilizando un programa hecho en el ambiente LabView™ (National Ins.; Lemus-Aguilar et al., 2007).

5.5 ANÁLISIS

Procesamiento. Los registros digitalizados de un experimento fueron analizados con un programa de computo comercial (Origin v. 7.; Microcal, Northampton, MA). Todos los ajustes de funciones teóricas a los datos experimentales fueron no lineales usando el algoritmo de Marquardt implementado en el mismo programa. Se midió la amplitud de las *IPSCs* desde la línea basal al pico. Cuando hubo suma temporal, la corriente precedente se substrajo. El análisis estadístico se realizó en un programa de computo comercial (Systat v.11., SPSS, Chicago, IL; Primer of Biostatistics v.5.0, Stanton A. Glantz).

Curvas intensidad amplitud (I-A). La corriente al pico de la *IPSC* es ajustada a:

$$A(I) = A_{max} / 1 + \exp [-k(I-I_h)] \quad (1)$$

Donde A_{max} describe la amplitud máxima de las *IPSC*, I denota la intensidad del estímulo normalizada en unidades umbral, I_h es la intensidad del estímulo para evocar el 50 % de la amplitud A_{max} ($A_h = 0.5 \cdot A_{max}$) y k describe la pendiente de la *IPSC* (proporcional al número de terminales reclutadas como función del estímulo; Konnerth et al. 1990; Allen y Stevens, 1994; Dobrunz y Stevens, 1997).

Evaluación de los eventos presinápticos mediante el protocolo de pulsos pareados. Para evaluar si el efecto observado es presináptico se utilizó el protocolo de pulsos pareados que consiste en aplicar dos pulsos de igual intensidad separados por un intervalo de tiempo corto (50 ms). Este protocolo se basa en la hipótesis del calcio residual que para explicar la facilitación sináptica describieron Katz y Miledi (1968) (re-evaluado por Zucker y Regehr, 2002 y corroborado en tantas ocasiones y tan diversas sinapsis que se ha tomado como protocolo estándar para evaluar la modulación presináptica).

La hipótesis del calcio residual considera que el influjo de calcio del primer estímulo no es totalmente amortiguado, por lo que al momento de llegada del segundo estímulo, existe un residual que se suma al que entra con el segundo estímulo. Este incremento de calcio hace que la respuesta al segundo choque sea mayor provocando la facilitación sináptica (facilitación por pulsos pareados o *FPP*). La facilitación sucede siempre y cuando haya suficientes terminales y vesículas de reserva. Si éstas se han agotado, pasa lo contrario, la segunda respuesta es menor y hablamos de depresión sináptica por pulsos pareados (*DPP*) (Thomson,

2000a, 2000b; Zucker y Regehr, 2002). En este último caso, se piensa que el primer choque vacía la mayor parte de los sitios de liberación pues la mayoría de ellos posee alta probabilidad de liberación. Así es que *DPP* indica alta probabilidad inicial de liberación. Lo contrario se infiere de la *FPP*. Si se libera más transmisor en la segunda respuesta es porque muchas vesículas no se liberaron en el primer choque debido a la baja probabilidad de liberación de las terminales. Pero al sumarse el calcio de ambos choques, esta probabilidad aumenta, de ahí la facilitación. Así es que *FPP* indica baja probabilidad de liberación.

Las terminales sinápticas poseen diferentes probabilidades de liberación que dependen de la concentración basal de calcio en los botones presinápticos. Por eso, pequeños cambios en la concentración de este ión tienen efectos importantes en la probabilidad de liberación (Zucker y Regehr, 2002; Thomson, 2000a, 2000b).

FPP y *DPP* se cuantifican con la tasa de pulsos pareados (*TPP*):

$$TPP = (IPSC_2) / (IPSC_1)$$

donde *IPSC*₁ y *IPSC*₂ son las amplitudes de la primera y segunda respuesta, respectivamente.

Índice de plasticidad sináptica de corto plazo. Las amplitudes de las respuestas sinápticas a los trenes de estimulación (de *IPSC*₁ a *IPSC*₁₀) se ajustan a una suma de funciones exponenciales:

$$IPSC(t) = A_1 e^{-x/\tau-fast} + A_2 e^{-x/\tau-slow} + y_0 \quad (2)$$

pues ha sido propuesto que la plasticidad sináptica de corto plazo tiene dos componentes: uno transitorio y otro estacionario (Tsodyks y Markram, 1997). Las dos constantes de tiempo se ajustaron al decaimiento rápido (τ -fast) y lento (τ -slow) de la amplitud sináptica (picos de las $IPSC_1$ - $IPSC_{10}$). A_1 y A_2 son las magnitudes de las respuestas postsinápticas a $t=0$ para los componentes rápido y lento, respectivamente, y y_0 representa la amplitud residual determinada por el equilibrio entre lo que se libera y lo que se repone gracias al ciclo vesicular. El índice de depresión de corto plazo *short term depression* (*STD*) es:

$$STD = (IPSC_{7-10}) / (IPSC_1)$$

donde $IPSC_{7-10}$ = a la amplitud promedio de las últimas tres respuestas del tren e $IPSC_1$ es la amplitud de la primera respuesta.

Análisis varianza-media. De 20 a 30 trazos individuales (e.g., trenes de 20 Hz evocados cada 10 seg), fueron usados para realizar el análisis de varianza media (*V-M*) que grafica la amplitud media de las *IPSCs* contra su varianza al pico (Clements y Silver, 2000), lo que teóricamente debe de ajustarse a una parábola de la forma (ec. 3):

$$y = Ax - Bx^2 \quad (3)$$

donde “y” representa la varianza de las *IPSCs*, y “x” representa la amplitud media de las mismas *IPSCs*. A y B son los parámetros libres. El parámetro A indica la pendiente inicial de la parábola directamente relacionado con la amplitud del

“*cuanto*” de liberación. B nos da la anchura de la parábola que está directamente relacionado con el número de sitios de liberación. El valor promedio de la amplitud del “*cuanto*” (Q_w) está dado por (ec. 4):

$$Q_w = A/(1+CV^2) \quad (4)$$

donde CV es el coeficiente de variación de las amplitudes de las IPSCs. El número mínimo de sitios de liberación (N_{min}) se aproxima con:

$$N_{min} = 1/B \quad (5)$$

y la probabilidad promedio entre los sitios de liberación se aproxima con:

$$Pr_w = x(B/A)(1+CV^2) \quad (6)$$

pues el análisis V - M de este tipo asume una función binomial para la liberación (Clements y Silver, 2000). Esta premisa es probablemente falsa, pues numerosos estudios han mostrado poblaciones de sitios activos con P alta junto a poblaciones de sitios activos con P baja en la misma conexión (e.g., el cáliz de Held) (Borst y Sakmann, 1996; Dobrunz y Stevens, 1997; Wu y Borst, 1999; Scheuss y Neher, 2001). Pero la aproximación sigue siendo válida para el presente trabajo si se toman en cuenta las siguientes consideraciones (Clements y Silver, 2000):

a) las sinapsis de este tipo generalmente no aportan datos suficientes para ajustar la función binomial compuesta así que es el único análisis cuantitativo disponible para el tipo de registro (eventos provocados, no espontáneos),

b) las mediciones se hacen en las mismas conexiones sinápticas antes y después del tratamiento por lo que un error sistemático (evidenciado en la abreviatura Q_w donde $W =$ “*weighted*”) se mantiene antes y después,

c) la P usa ambos parámetros libres y es el promedio de P en todos los sitios que liberan, por lo que si por ejemplo, una población de sitios activos tiene

una P muy baja (son quasi-silentes) y otra población una P alta, al aumentar la P de algunos sitios (P_{rw} donde $r = release$ y $W = weighted$), algunos botones quasi-silentes entrarán en juego y acaso esto se vea como un aumento en N y no en P , pues los sitios que ya tenían alta P siguen pesando más y su P ya no cambia, por lo que la P promedio (P_{rw}) no cambia significativamente. En otras palabras, este método no permite distinguir muchas veces entre un cambio en P_{rw} y un cambio en N_{min} cuando los sitios que entran y salen del juego son pocos y la P_{rw} promedio se mantiene. Este problema del método $V-M$ lo probamos midiendo P directamente (Salgado et al., 2006). Mucho menos entonces, el método $V-M$ podrá distinguir entre P_{rw} y N_{min} con la variabilidad natural cuántica de una conexión unitaria de unos cuantos botones ($N = 1-6$), cada uno con su P . Sobretudo, si los botones tienen cada uno, un solo sitio activo siendo la conexión de las llamadas: “un sitio un botón” (Korn, 1998). Sin embargo, ambos P_{rw} y N_{min} son parámetros presinápticos, mientras que Q_w es un parámetro postsináptico. Entonces, lo que sí permite el análisis $V-M$, casi siempre, es distinguir un suceso pre de uno postsináptico. En la modulación presináptica cambiarán N (B) y/o P , mientras que si lo que cambia es la postsinapsis el valor que se mueve es Q (A).

Coeficiente de variación. El coeficiente de variación de las $IPSCs$ se calcula al dividir la desviación estandar de la amplitud del $IPSC_1$ entre su amplitud media. El CV del ruido fue calculado ~ 10 msec antes de la respuesta registrada (Koós y Tepper 2002) y se resta del CV total para quedarnos con el CV sináptico.

5.6 Fármacos. Todos los experimentos se realizaron en presencia del bloqueador de los receptores glutamatérgicos a *AMPA/KA*: (*CNQX*) (50 μ M) y a *NMDA*: (*AP5*) (10 μ M). Todos los fármacos fueron disueltos en solución salina justo antes de su administración por gravedad. Todas las sustancias químicas utilizadas en estos experimentos fueron obtenidas de Sigma-RBI-Aldrich (St. Louis, MO, USA) excepto la ω -conotoxina GVIA (Alomone labs, Jerusalem, Israel) y la ω -agatoxina TK (Peptides International, Louisville, KY, USA).

5.7 Inmunohistoquímica. Las neuronas registradas se llenaron rutinariamente con biocitina. Las rebanadas con una sola neurona (registro de conexión poblacional) o con dos neuronas (registro pareado de conexión unitaria), fueron tomadas en consideración para realizar inmunocitoquímica *post hoc*. Combinamos el marcado intracelular con biocitina y la inmunocitoquímica contra sustancia P (población de *NEMs* de la vía directa), encefalinas (*Leu* o *Met*) (población de *NEMs* de la vía indirecta), o parvalbúmina (población de interneuronas *FS*). Las rebanadas que contenían neuronas registradas fueron fijadas con paraformaldehído 4 % y ácido pícrico 1 % disueltos en amortiguador de fosfatos (PBS 0.1 M, pH 7.40 durante 24 horas). Después, las rebanadas se infiltraron con 30 % de sacarosa y se cortaron con un vibratomo en rebanadas de 40 μ m que se incubaron 4-6 horas en solución PBS más 0.2 N de Triton X-100 y avidina conjugada con Cy3 (1:200 todo disuelto en PBS) (Zymed, San Francisco, CA, USA). Dicho procedimiento permitió identificar a la neurona registrada. Luego se lavaron las secciones en PBS y se incubaron con el anticuerpo primario (de

conejo) contra encefalina o sustancia P por un período de 18–24 horas a 4°C (diluciones de 1:200) (Península, San Carlos, CA, USA), o por 36 horas contra parvalbúmina a 4°C (1:2000) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO). Después de lavar, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario (conjugado a *FITC*; diluido 1:100) por una hora más. Las secciones se montaron usando un medio anti-blanqueo (Vectashield, Vector Laboratorios, Burlingame, CA, USA) se examinaron con microscopía confocal (MRC- 1024; Bio-Rad, Natford, UK) equipada con láser de gases krypton–argon. Dos líneas del láser emitiendo a 490 y 560 nm se usan para excitar *FITC* y *Cy3*, respectivamente. Las células inmunomarcadas se estudiaron en imágenes confocales individuales y secciones reconstruidas proyectando sobre el eje “z” a razón de 2 imágenes/ μm . La digitalización de las imágenes se llevo a cabo con un programa de computo comercial (Olympus-fluoview v.1.4 de Olympus Corp).

6. RESULTADOS

Con el objetivo de facilitar la lectura de ésta Tesis, los resultados se han dividido en tres apartados. El primero comprende experimentos que se realizaron con el fin de aislar las diferentes sinapsis inhibitoras sobre las *NEMs* de manera poblacional (varias fibras aferentes son estimuladas). Se identificaron algunas diferencias funcionales (canales de calcio utilizados para la liberación de neurotransmisor y curvas características de intensidad amplitud) entre estas sinapsis inhibitoras. Este primer apartado concluye en una primera publicación **[anexo A: Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzman JN, Galarraga E & Bargas J (2005) Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. J Neurophysiol 93: 1119–1126].**

El segundo apartado comprende experimentos que muestran como un agonista selectivo para receptores de la clase D_2 modula las terminales sinápticas de las *NEMs* a través de la modulación de canales de calcio presinápticos, y por ende, modulando la probabilidad de liberación. Este segundo apartado resultó en una segunda publicación **[anexo B: Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T, Perez-Burgos A, Perez-Garci E, Galarraga E & Bargas J (2005) A reconfiguration of Ca_v2 Ca^{2+} channels current and its dopaminergic D_2 modulation in developing neostriatal neurons. J Neurophysiol 94:3771-3787].**

El tercer apartado comprende experimentos que se realizaron con el fin de identificar la plasticidad sináptica GABAérgica de corto plazo (*STP*) que poseen las sinapsis inhibitoras que inciden en las NEMs. Se incluyen registros unitarios (pares de neuronas) y poblacionales (estimulación de campo). También se hicieron registros unitarios entre interneurona FS y *NEMs*. Aquí se describe la modulación dopaminérgica de la *STP*. Este tercer apartado constituye un tercer manuscrito actualmente en proceso de revisión por una revista internacional. **[anexo C: Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J & Galarraga E (2007) Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses]. Enviado.**

6.1 Apartado I: Las diferentes entradas inhibitoras a la neurona espinosa mediana pueden ser aisladas con estimulación de campo.

Como se mencionó en la Introducción, la inhibición sobre la neurona espinosa mediana de proyección (*NEM*) del neostriado se origina en gran medida de las colaterales axónicas que interconectan entre sí a estas células (inhibición “*feedback*”) (Czubayko y Plenz, 2002; Koós et al., 2004; Tunstall et al., 2002), y también, de varios tipos de interneuronas (inhibición “*feedforward*”) (Kawaguchi et al., 1995; Kita, 1993; Koós y Tepper, 1999). Un trabajo previo del laboratorio propuso que la estimulación antidrómica de axones de *NEMs* que conectan o pasan a través del globo pálido (*GP*) podría aislar la inhibición del circuito “*feedback*”: *GP*→*NEM* (Guzmán et al., 2003). Además, varios estudios sugieren que la inhibición del circuito “*feedforward*” o *NE*→*NEM* es preferentemente

activada por medio de la estimulación intraestriatal siempre y cuando el electrodo de estimulación esté alejado del de registro más de 100 μm (Ver Métodos 5.3) (Jaeger et al., 1994; Kita, 1993; 1996; Koós y Tepper, 1999; Tepper et al. 1998). Se realizaron experimentos relacionando la intensidad del estímulo de campo con la amplitud de las *IPSCs* obtenidas (curvas *I-A*: Fig. 8) de las *NEMs*. Encontramos importantes diferencias entre las *IPSCs* provocadas desde el *GP* o el *NE*.

Entre las propiedades funcionales que pueden diferir en las terminales están los canales de calcio que utilizan para la liberación (e.g. Poncer et al., 1997; 2000; Takahashi y Momiyama, 1993), así como su dinámica de corto plazo (Gibson y Connors, 2003; Macaferri y Lacaille, 2003; Poncer et al., 2000). Además, las interneuronas pueden expresar diferentes receptores pre y postsinápticos (Freund, 2003; Jonas et al., 2004; Koós y Tepper, 2002; Poncer et al., 2000; Wu y Saggau, 1997). Por lo tanto, la pregunta a responder fue si algunas de estas diferencias podían ser evidenciadas en los dos tipos de inhibición sobre la *NEM*, la proveniente de colaterales que interconectan a las *NEMs* y la de interneuronas (Tecuapetla et al., 2005b).

6.1.1 Distintas poblaciones de terminales GABAérgicas sobre las Neuronas Espinosas Medianas (*NEMs*)

Las curvas *I-A* entre las conexiones *GP*→*NEM* y *NE*→*NEM* (Fig. 8) fueron muy diferentes. Un experimento representativo se muestra en el inserto de la Figura 8E. La amplitud de las *IPSCs* como función de la intensidad de la estimulación (normalizada en unidades umbral) se ajustó a una logística (Figs. 8E y 8F) de 3 parámetros (ver Métodos 5.5.1, ec. 1). Cada línea representa un

experimento. En la figura 8E se muestran experimentos con la conexión $GP \rightarrow NEM$ ($n = 6$) (Guzman et al., 2003). En la figura 8F se muestran los casos para la conexión $NE \rightarrow NEM$ ($n = 12$) (Kita, 1993; Delgado et al., 2000; Guzman et al., 2003). Claramente, la conexión $GP \rightarrow NEM$ mostró una menor dispersión sugiriendo una sola población de aferentes y terminales (Fig. 8E). En contraste, la conexión $NE \rightarrow NEM$ exhibió una mayor dispersión (Fig. 8F), acaso reflejando una gran variedad de aferentes y terminales debido a las distintas interneuronas locales (ver Introducción) (Kita, 1993; Delgado et al., 2000; Erlanger & Passer, 2002; Guzman et al., 2003). Las líneas gruesas representan el promedio de las curvas para ambas clases de terminales GABAérgicas (Fig. 8E-F); superpuestas en la figura 8H. Se encontraron diferencias significativas (al menos $P < 0.01$ para cada comparación; U de Mann-Whitney) para los tres parámetros de las curvas teóricas ajustadas (ver Tabla 1), indicando que se trata de diferentes poblaciones de aferentes inhibitoras (la intensidad de estimulación y la distancia entre el electrodo de estimulación y el electrodo de registro fue similar en ambas estimulaciones).

ver página siguiente para la:

Figura 8. Relación intensidad-amplitud ($I-A$). *A* y *B*. Esquemas mostrando los arreglos experimentales. Rojo= excitación, verde=inhibición. *C* y *D*. Sensibilidad de las $IPSCs$ provocadas a $10 \mu M$ $CNQX$ y $50 \mu M$ $AP-5$; que bloquean el componente glutamatérgico de las respuestas sinápticas. La naturaleza GABAérgica de las respuestas restantes es revelada por la sensibilidad a $30 \mu M$ de bicuculina. *E* y *F*. Curvas $I-A$ que revelan diferentes poblaciones de terminales sinápticas reclutadas mediante los distintos protocolos de estimulación: $GP \rightarrow NEM$ (*A*), $NE \rightarrow NEM$ (*B*). El inserto en *E* muestra registros de un experimento representativo. Cada experimento fue ajustado con la ec. 1 (*H*). Las líneas gruesas en *E* y *F* son los promedios de las curvas $I-A$ individuales, también graficadas en *H*. Los parámetros de las curvas $I-A$ en *H* se muestran la Tabla 1. *G*. Curvas corriente contra voltaje ($I-V$) de la corriente al pico (línea gris) de $IPSCs$ provocados con el esquema $GP \rightarrow NEM$. Potencial de inversión ≈ -29 mV ($n=13$) cerca del potencial de equilibrio para el ión cloro ≈ -30.5 mV con nuestras soluciones extra e intracelulares. *H*. Curvas $I-A$ promedio obtenidas con el esquema $GP \rightarrow NEM$ y $NE \rightarrow NEM$. Una curva $I-A$ fue obtenida estimulando en GP pero registrando una interneurona (tipo *fast spiking*) dentro del NS : $GP \rightarrow FS$.

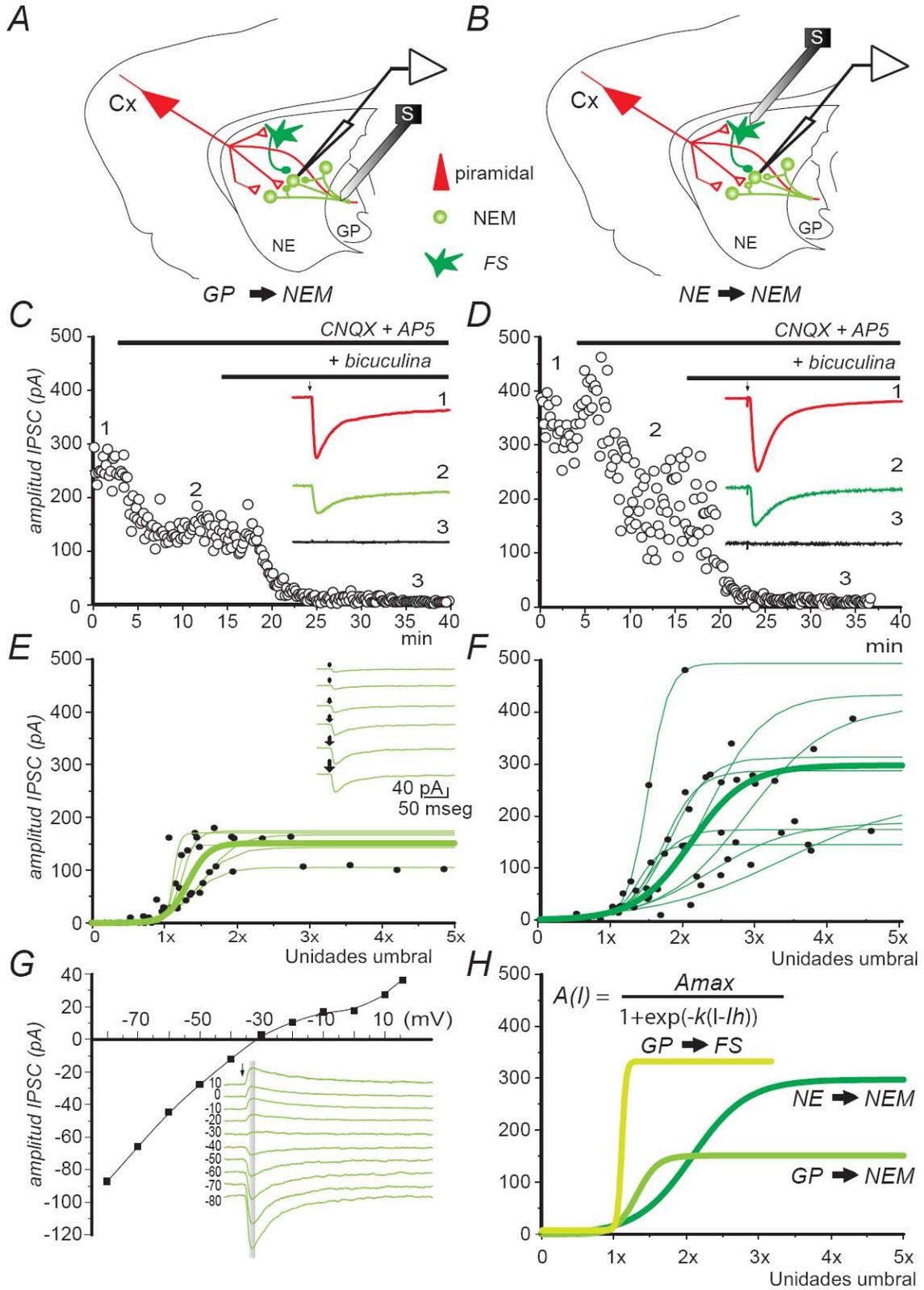


TABLA 1. Parámetros de las curvas *I-A* para las conexiones inhibitoras

	<i>GP</i> → <i>NEM</i> (<i>n</i> = 6)	<i>NE</i> → <i>NEM</i> (<i>n</i> = 9)
<i>A</i> _{max} † (pA)	151 ± 11 (0.171) 157 (105–174)	298 ± 42 (0.419) 287 (145–494)
<i>k</i> * (pA/uu)	10.3 ± 3 7.7 (4.4–22)	3.7 ± 0.7 3.8 (1.1–7)
<i>I</i> _h ‡ (uu)	1.3 ± 0.07 (0.135) 1.3 (1.1–1.5)	2.1 ± 0.23 (0.334) 1.8 (1.3–3.4)
<i>A</i> _h ‡ (pA)	72 ± 4.2 70 (58–86)	149 ± 21 147 (74–250)

En cada celda de Resultados y de arriba hacia abajo: media±E.E.M., mediana y rango en paréntesis. Significancia estadística: **P* < 0.01; †*P* < 0.025; ‡*P* < 0.004. Las curvas *I-A* fueron ajustadas a la ecuación: $A(I) = A_{max}\{1 / \exp[-k(I - I_h)]\}$, donde *A*_{max} es la amplitud máxima de la IPSC (pA), *k* representa la pendiente (pA/estímulo), *I*_h denota la intensidad del estímulo en unidades umbral, necesaria para alcanzar *A*_h, que representa la amplitud al 50 % de la *A*_{max}. La primera columna corresponde a la conexión *GP*→*NEM* y la segunda a la conexión *NE*→*NEM*. El coeficiente de variación en la celda para *A*_{max} e *I*_h en paréntesis. pA: picoamperios, uu: unidades umbral.

Si bien en la mayoría de los casos se utilizó QX 314 intracelular para evitar el disparo (ver métodos), este bloqueador se eliminó en algunos casos seleccionados. En un caso sin QX 314, registramos una interneurona neoesriatal caracterizada por su patrón de disparo (Fig. 9B) y estimulamos desde el GP. Se encontró una curva *I-A* completamente diferente a las descritas anteriormente [Fig. 8C; *GP*→*FS*], sugiriendo que aislamos una tercera conexión, probablemente correspondiente a la vía *pálidoesriatal* en la que las neuronas del GP inervan a las interneuronas esriatales (Kita y Kita, 2001; Bevan et al., 1998). En este

experimento, y otros dos similares, la A_{max} fue tan grande como la obtenida por estimulación intraestriatal (compare en Fig. 8H), pero k (el factor pendiente) fue mayor en comparación con la estimulación desde el *GP*. Una vez que se alcanzó la A_{max} , la sigmoide saturó a pesar de continuar incrementando el estímulo (flechas en Fig. 9C), sugiriendo que la probabilidad de liberación era alta desde el principio (Jonas et al., 2004). Una probabilidad de liberación alta es respaldada por la *TPP* mostrada en el inserto de la Figura 9C que muestra una gran *DPP* (Fig.10A, C) no encontrada en las otras sinapsis y que valida que diferentes tipos de conexión sináptica pueden ser aisladas con estimulación de campo.

6.1.2 Canales de calcio presinápticos

Interesados en determinar el tipo de canales de calcio involucrados en la liberación de GABA en los dos tipos de sinapsis, *GP*→*NEM* y *NS*→*NEM*, analizamos la *TPP* (ver Métodos) (Dunwindle y Hass, 1985; Cooper y Stanford, 2001) de las *IPSCs* provocadas en *NEMs* postsinápticas utilizando toxinas bloqueadas específicas de los canales de calcio.

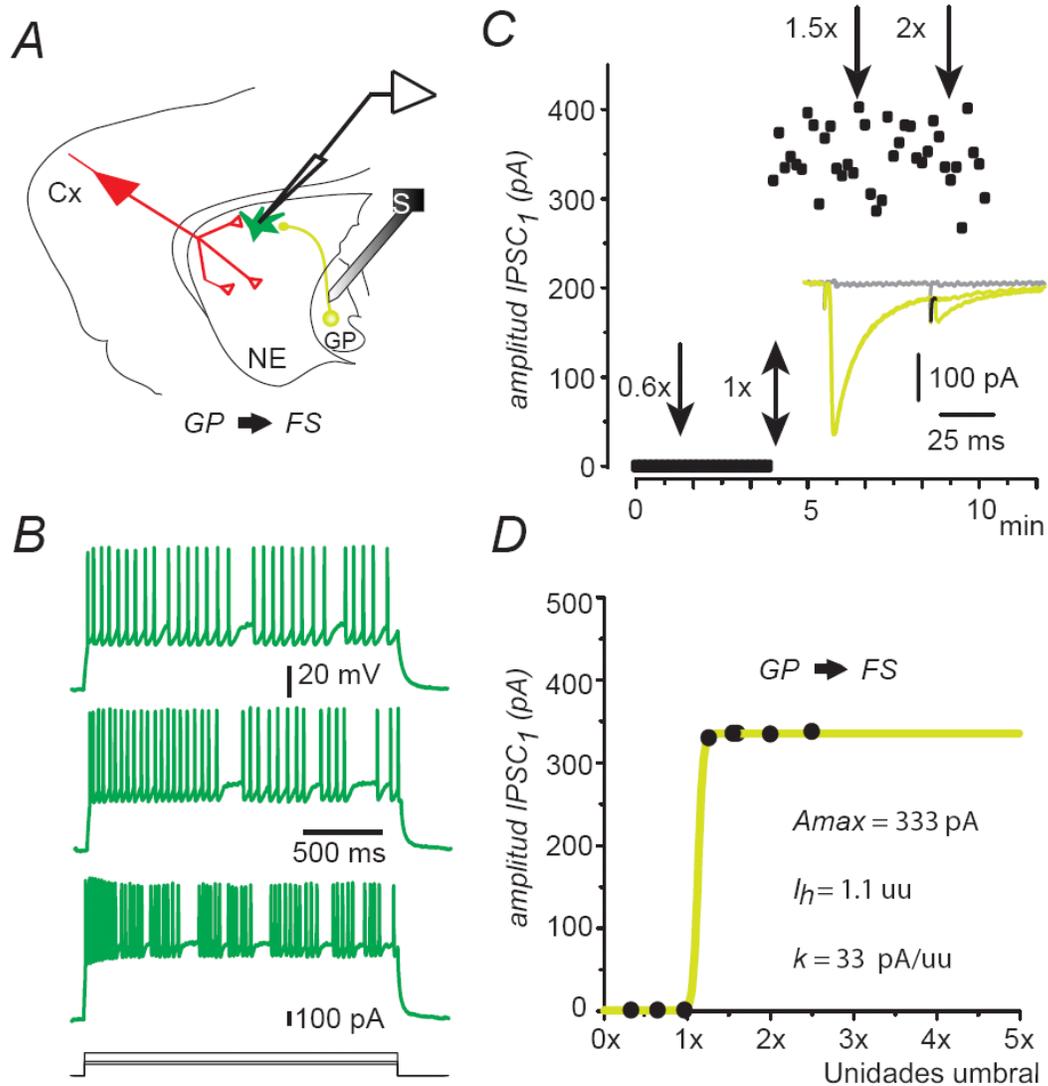


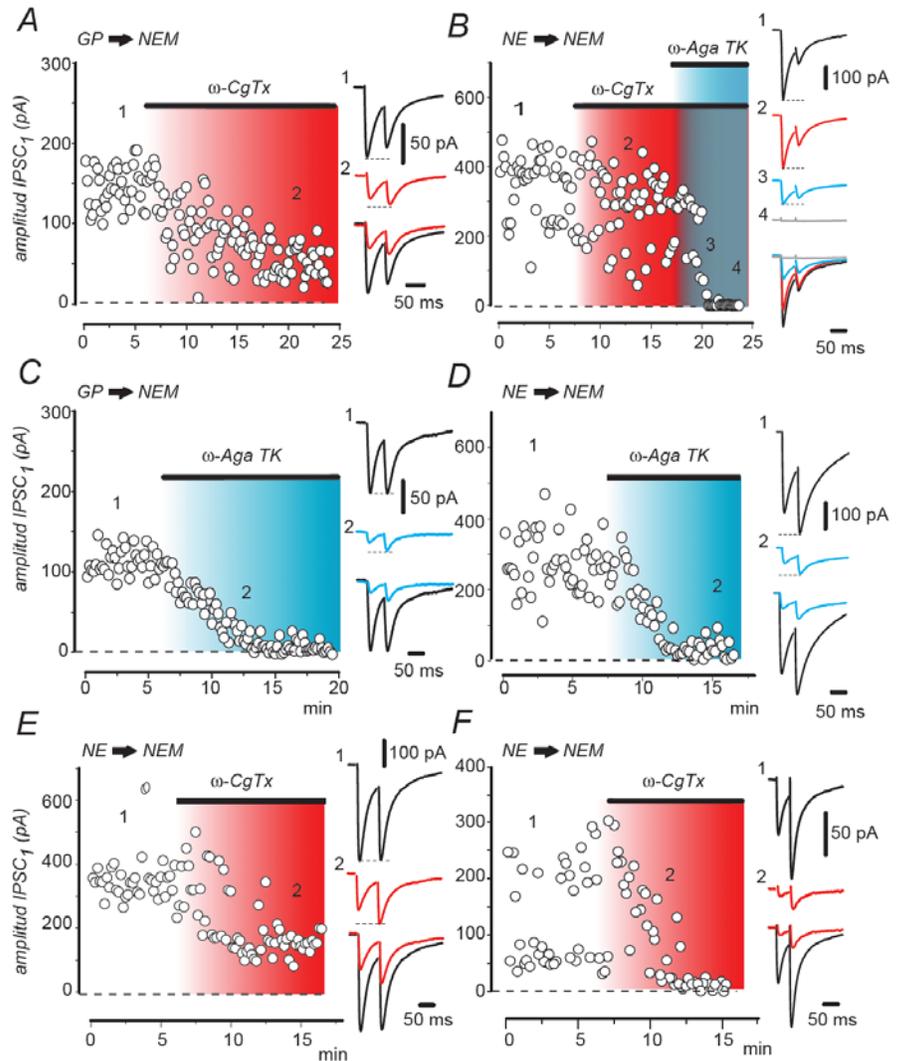
Figura 9. Curva I - A obtenida del registro de una interneurona del NE mientras estimulamos en el GP ($GP \rightarrow FS$). **A.** Esquemas mostrando la localización de los electrodos de registro y estimulación señalando la vía estimulada. **B.** Esta neurona fue registrada sin QX-314 para observar su patrón de disparo antes de obtener la curva I - A . Note que el disparo nos muestra que ésta neurona corresponde a una interneurona tipo FS (respuesta en voltaje ante tres pulsos de corriente de distinta corriente). **C.** Curso temporal de la $IPSC_1$ obtenida con el protocolo mostrado en **A**. Inserto en **C**: tres trazos de $IPSCs$ evocadas sobre esta interneurona mientras estimulamos en el GP , dos trazos corresponden a intensidad umbral y uno a 1.5 unidades umbral. Note la gran amplitud y el alto grado de DPP (cf., Fig. 9A y C). Las flechas representan incrementos de la estimulación en unidades umbral. **D.** Curva I - A de las $IPSCs$ mostradas en **C**. Note que la amplitud (A_{max}) es saturada prácticamente con la intensidad umbral, sugiriendo una alta sincronización para liberar en estas terminales (de alta probabilidad de liberación).

La sensibilidad de las $IPSCs$ GABAérgicas a bloqueadores de canales de calcio fue investigada en registros de $NEMs$ ante la estimulación en el GP ($GP \rightarrow NEM$, lo que aísla las sinapsis que interconectan a las $NEMs$ entre sí). La

figura 10A (insertos 1 y 2) muestra un caso representativo del efecto de un bloqueador de los canales de calcio de tipo N(Ca_v2.2): ω -conotoxina GVIA (ω -Cgtx). El curso temporal del experimento muestra que la toxina disminuye la amplitud de las IPSCs un $64 \pm 7\%$ ($P < 0.05$ *t de Wilcoxon*; $n=8$). Note en el inserto que en el control había DPP que se convirtió FPP por acción de la ω -Cgtx, lo que sugiere que el bloqueo de los canales de calcio tipo N (Ca_v2.2) presinápticos encargados de la liberación de GABA en estas terminales (Dunwiddie y Hass, 1985; Guzman et al., 2003). Por contraste, la figura 10B muestra un caso representativo de la mitad de los experimentos cuando estimulamos intraestriatalmente ($NE \rightarrow NEM$: lo que favorece la conexión entre interneuronas y NEM). Note que la ω -Cgtx tuvo un efecto pequeño del $22 \pm 5\%$ ($n = 6$; $P < 0.005$; *U de Mann-Whitney*) que en algunos casos fue nulo. En estos casos la pendiente de la curva I-A fue menor que el obtenido cuando estimulamos la conexión $GP \rightarrow NEM$ (Tabla 1 y Fig. 8H). La ω -Cgtx no revirtió la TPP (Fig. 10B, *c.f.*, insertos 1 y 2). No obstante la ω -AgaTK (400 nM) bloquea totalmente la liberación de estas IPSCs cuando se administra después. Sin embargo, si medimos la TPP justo antes de alcanzar el bloqueo. Note que a pesar de medir la amplitud de las IPSCs solo instantes antes del bloqueo total (ca. al 90% del bloqueo) por ω -AgaTK, la DPP sigue siendo la plasticidad de esta sinapsis. O sea, estas sinapsis, a diferencia de las que se dan entre NEMs ($GP \rightarrow NEM$) no cambian su TPP aunque cambie su probabilidad de liberar transmisor (Fig. 10B, inserto 3). Por otro lado, comparando las respuestas de $NE \rightarrow NEM$ con la vía pálido \rightarrow estriatal o $GP \rightarrow FS$, interneuronas FS; Fig. 2] observamos que no difieren en A_{max} y sí lo hacen en la

pendiente de la curva $I-A$ (k) (Fig. 8H). Juntos, estos datos muestran que la ω -Cgtx no actúa igual en diferentes terminales GABAérgicas y que por lo tanto puede servirnos para diferenciarlas de manera funcional.

Figura 10. Canales de calcio que controlan la liberación de GABA en las distintas terminales inhibitoras del NE : $GP \rightarrow NEM$ (colaterals axónicas entre NEMs) y $NE \rightarrow NEM$, conexión entre interneuronas y NEMs). A. $GP \rightarrow NEM$: sensibilidad de las $IPSCs$ a un bloqueador de los canales de calcio tipo $N(Ca_v2.2)$ (ω -Conotoxina GVIA; ω -Cgtx) ($1 \mu M$). Note disminución de la $IPSCs$ y cambio de DPP a FPP . B. $NE \rightarrow NEM$: poca sensibilidad a ω -Cgtx, la DPP no se modificó. Aun cuando la ω -Agatoxina TK (ω -Aga TK) ($400 nM$) ya había ejercido gran parte de su bloqueo. C. $GP \rightarrow NEM$: acción bloqueadora de ω -Aga TK, note el aumento de la FPP antes del bloqueo total. D. $NE \rightarrow NEM$: ω -Aga TK bloquea y aumenta la FPP . E. $NE \rightarrow NEM$: en el 50 % de los casos evocados intraestriatalmente la ω -Cgtx tuvo un mayor efecto acompañado de un aumento de FPP . F. $NE \rightarrow NEM$: hay un gran bloqueo de la ω -Cgtx si en el control hay FPP .



Las $IPSCs$ provenientes de interneuronas ($NE \rightarrow NEM$) pueden dividirse en dos grupos en condición control, las que muestran depresión (DPP) y las que muestran facilitación (FPP) de pulsos pareados (Fig. 10B y 10D inserto 1). Ambos grupos fueron sensibles a la ω -AgaTK.

Como la ω -AgaTK bloqueó totalmente las IPSCs provocadas en cualquiera de las conexiones, deducimos que, los canales P/Q ($Ca_v2.1$) están presentes en todas las terminales GABAérgicas sin importar su origen, y que por tanto, no nos pueden servir para distinguir entre estas sinapsis de manera funcional. Como corolario, se puede decir también que para la liberación de GABA, los canales P/Q ($Ca_v2.1$) parecen ser los más importantes (ver el Apartado II de los Resultados). Así, para las conexiones $GP \rightarrow NEM$ el bloqueo con ω -AgaTK fue de $86 \pm 5 \%$ ($n = 6$) (Fig. 10D) y para las conexiones en $NE \rightarrow NEM$ fue $89 \pm 7 \%$ ($n = 8$) (Figs. 10C y D).

Ahora bien, no todas las sinapsis presentan la misma sensibilidad a la ω -Cgtx (c.f., Fig. 10B y 10E y Fig. 11). Claramente, las sinapsis que provienen de las interneuronas también pueden dividirse en dos grupos, los que utilizan canales N para la liberación y las que no. En el grupo sensible la reducción fue de $65 \pm 6\%$ ($n = 6$) ($p < 0.01$; T de Wilcoxon).

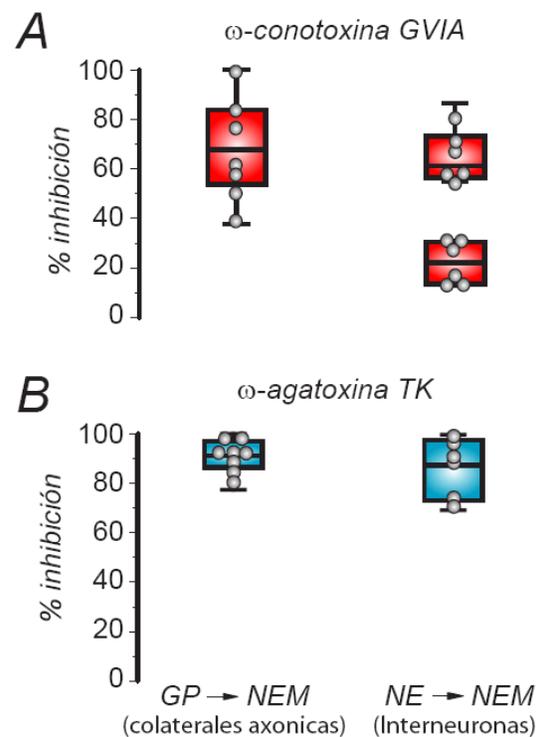


Figura 11. Resumen de la sensibilidad al bloqueo de canales de calcio tipo N (ω -CgTx) y P/Q (ω -Aga TK). A. La ω -CgTx dividió los experimentos de estimulación intraestriatal en dos grupos. La ω -Aga TK bloqueó todos los tipos de inhibición sobre la NEM. ω -conotoxina (ω -CgTx); ω -agatoxina GVIA (ω -Aga TK).

Resumen de la 1ª parte de los resultados:

1. Las entradas inhibitoras (*IPSCs*) pueden diferenciarse por su curva I-A. Mientras las conexiones *GP*→*NEM* presentaron una gran homogeneidad sugiriendo estar constituidas por una sola población, las sinapsis *NE*→*NEM* mostraron heterogeneidad que probablemente refleje a los diversos grupos de interneuronas.
2. El canal de calcio tipo N($Ca_v2.2$) se usa para la liberación en un grupo de interneuronas y no en otro.
3. Ambos tipos de canal el N($Ca_v2.2$) y P/Q($Ca_v2.1$) son utilizados por las terminales que interconectan a las *NEM* (a esta edad, ver Apartado II).
4. El principal canal de calcio que regula la liberación de GABA en cualquier tipo de sinapsis inhibitora es el P/Q($Ca_v2.1$).
5. Cuando se usan tanto los canales N como los P/Q, se presenta el fenómeno de la superaditividad.

Different Inhibitory Inputs Onto Neostriatal Projection Neurons as Revealed by Field Stimulation

Fatuel Tecuapetla, Luis Carrillo-Reid, Jaime N. Guzmán, Elvira Galarraga, and José Vargas

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City D.F., México

Submitted 2 June 2004; accepted in final form 6 September 2004

Tecuapetla, Fatuel, Luis Carrillo-Reid, Jaime N. Guzmán, Elvira Galarraga, and José Vargas. Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol* 93: 1119–1126, 2005. First published September 8, 2004; doi:10.1152/jn.00657.2004. This work investigated if diverse properties could be ascribed to evoked inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) recorded on rat neostriatal neurons when field stimulation was delivered at two different locations: the globus pallidus (GP) and the neostriatum (NS). Previous work stated that stimulation in the GP could antidromically excite projection axons from medium spiny neurons. This maneuver would predominantly activate the inhibitory synapses that interconnect spiny cells. In contrast, intrastriatal stimulation would preferentially activate inhibitory synapses provided by interneurons. This study shows that, in fact, intensity-amplitude experiments are able to reveal different properties for IPSCs evoked from these two locations (GP and NS). In addition, while all IPSCs evoked from the GP were always sensitive to ω -conotoxin GVIA ($\text{Ca}_{v2.2}^{2+}$ or N-channel blocker), one-half of the inhibition evoked from the NS exhibited little sensitivity to ω -conotoxin GVIA. Characteristically, all ω -conotoxin GVIA-insensitive IPSCs exhibited strong paired pulse depression, whereas ω -conotoxin GVIA-sensitive IPSCs evoked from either the GP or the NS could exhibit short-time depression or facilitation. ω -Agatoxin TK ($\text{Ca}_{v2.1}^{2+}$ or P/Q-channel blocker) blocked IPSCs evoked from both locations. Therefore 1) distinct inhibitory inputs onto projection neostriatal cells can be differentially stimulated with field electrodes; 2) N-type Ca^{2+} channels are not equally expressed in inhibitory terminals activated in the NS; and 3) synapses that interconnect spiny neurons use both N- and P/Q-type Ca^{2+} channels.

INTRODUCTION

The laminar architecture of cortical structures allows field stimulation of defined afferents or inhibitory interneurons (e.g., Miles et al. 1996; Shlosberg et al. 2003). This greatly facilitates pharmacological studies on afferent inputs. However, basal ganglia nuclei do not have a laminar structure, and there are problems to identify the origin of synaptic inputs during field stimulation studies.

Inhibition onto neostriatal GABAergic projection neurons comes from axon collaterals interconnecting these cells (Czubayko and Plenz 2002; Koos et al. 2004; Tunstall et al. 2002) and from several types of GABAergic interneurons (Kawaguchi et al. 1995; Kita 1993; Koos and Tepper 1999). It has recently been proposed that antidromic stimulation of spiny cells axons, from the globus pallidus (GP), can isolate the inhibitory component conveyed by the recurrent axon collaterals that interconnect spiny neurons (Guzman et al. 2003). In addition, several studies have posited that GABAergic inter-

neurons are preferentially activated with field stimulation within the neostriatum (NS) (Jaeger et al. 1994; Kita 1993, 1996; Koos and Tepper 1999; Tepper et al. 1998). Here we compared “intensity-amplitude” (I-A) experiments obtained from inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) evoked from these two locations and show that, in fact, significant functional differences can be found for IPSCs evoked from either the GP or the NS.

Among the diverse functional properties that synaptic terminals may exhibit, some very important ones are the Ca^{2+} channels involved in transmitter release (e.g., Poncelet et al. 1997, 2000; Takahashi and Momiyama 1993) and their short-term release dynamics (Gibson and Connors 2003; Macaferri and Lacaille 2003; Poncelet et al. 2000). In addition, interneurons may express different pre- and postsynaptic receptors (Fraund 2003; Jonas et al. 2004; Koos and Tepper 2002; Poncelet et al. 2000; Wu and Saggau 1997). Thus we questioned if these functional differences between afferent inputs can be made evident during field stimulation experiments. A preliminary report of this work has been published in abstract form (Tecuapetla et al. 2003).

METHODS

Preparation of slices and electrophysiological recordings

In this study, acute neostriatal sagittal slices (300 μm thick) were prepared from postnatal day (PD) 12–14 Wistar rats (27–28 g) from either sex, as previously described (see Guzman et al. 2003). In principle, we cannot discard that brain slices cut in other ways (e.g., horizontally) may also yield successful connections with the present protocols. The protocols followed the National University of Mexico and National Institutes of Health guidelines for the use of animals in biomedical experiments.

Slices were continuously superfused (3–6 ml/min) with saline containing (in mM) 123 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl_2 , 2.0 CaCl_2 , 25 NaHCO_3 , and 11 glucose; aerated with 95% CO_2 -5% O_2 to a final pH of 7.4 at room temperature (23–25°C). Neostriatal neurons were visually located with the help of a water immersion objective and an upright microscope (Diaphot, Nikon, Melville, NY) with an adapted CCD camera (CCD-100, Dage-MTI, Michigan City, IN) working with infrared illumination. Neurons were recorded using the whole cell patch-clamp technique in the voltage-clamp configuration. IPSCs recordings were carried out with Axoclamp 2A/2B (Axon Instruments, Foster City, CA) amplifiers, and data were filtered at 1–3 kHz and digitized with an AT-MIO-6040E, a DAQ (NI-DAQ) board (National Instruments, Austin, TX), and a PC clone. On-line data acquisition used custom programs made in the LabVIEW environment (National Instruments). Standard patch pipettes (3–6 M Ω) were

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Address for reprint requests and other correspondence: J. Vargas, Instituto de Fisiología Celular, PO Box 70-253, UNAM, Mexico City DF, 04510 Mexico (E-mail: jvargas@ifc.unam.mx).

6.2 Apartado II: Reorganización de los canales de calcio que regulan la liberación de transmisor durante el desarrollo. Su modulación por receptores dopaminérgicos de la clase D_2 .

6.2.1 Reorganización de los canales de calcio que controlan la liberación en la sinapsis que interconectan a las NEMs

En ratas postnatales de 14 días de nacidas (*PD14*), la proporción de corriente de calcio acarreada por diversos canales en la membrana somatodendrítica de las *NEMs*, se divide de la siguiente manera: corriente acarreada por canales de tipo L: 27 %, corriente tipo P/Q: 22 %; corriente tipo N: 39 %; corriente tipo R: 12 % (Fig. 3A en Salgado et al., 2005; anexo B). En cambio, en las ratas postnatales de 40 días (*PD40*) los porcentajes acarreados por estos canales de calcio son: corriente tipo L: 22 %; tipo P/Q: 38 %; tipo: N 26 %; tipo R: 14 % (Fig. 3B en Anexo B). Estas proporciones muestran que la expresión de los canales de calcio tipo N ($Ca_v2.2$) disminuye, mientras que la de los canales de calcio tipo P/Q ($Ca_v2.1$) aumenta su contribución en términos de porcentaje de la corriente de calcio total (Salgado et al., 2005, anexo B). Una de las principales implicaciones del cambio en la expresión de los canales de calcio de las *NEMs* debería ser la regulación de la liberación de neurotransmisor (Tecuapetla et al., 2005b; Anexo A). Por lo que nos preguntamos si esta reorganización se efectuaba también en las terminales de las *NEMs* y no sólo en la membrana somatodendrítica. Se predijo que la contribución de los canales de calcio tipo N ($Ca_v2.2$) decrementaría su contribución en la liberación a la edad *PD40*. Para probar esta hipótesis, realizamos experimentos utilizando el protocolo *GP*→*NEM* (Guzman et al., 2003; Tecuapetla et al., 2005b, anexo A) y comparando las

edades *PD14* y *PD 40*. A la edad *PD14*, la liberación de neurotransmisor de las NEM es controlada por los dos tipos de canal de calcio: el tipo N ($Ca_v2.2$) y el tipo P/Q ($Ca_v2.1$). El porcentaje de inhibición de las *IPSCs* al bloquear cada uno de estos canales fue de $64 \pm 7 \%$ y $86 \pm 5 \%$, respectivamente (Figura 11). Existe por tanto una sobreposición en estos porcentajes, lo que en otras sinapsis se conoce como “superaditividad” (Wu y Saggau, 1997). En contraste, a la edad *PD40* el canal de calcio tipo N ($Ca_v2.2$) ha disminuido su contribución a un $18 \pm 7 \%$ ($n = 5$; Fig. 4B; $P < 0.009$; U de Mann Whitney; Fig. 12C), mientras que el canal de calcio tipo P/Q ($Ca_v2.1$) la ha aumentado a un $98 \pm 1 \%$ ($n = 5$; Fig. 12F). La contribución del canal de calcio tipo P/Q ($Ca_v2.1$) fue alta en ambos estados del desarrollo. Sin embargo, la contribución del canal de calcio tipo N ($Ca_v2.2$) decrece significativamente durante la maduración (de 64 ± 7 en *PD14* a $18 \pm 7 \%$ en *PD40*).

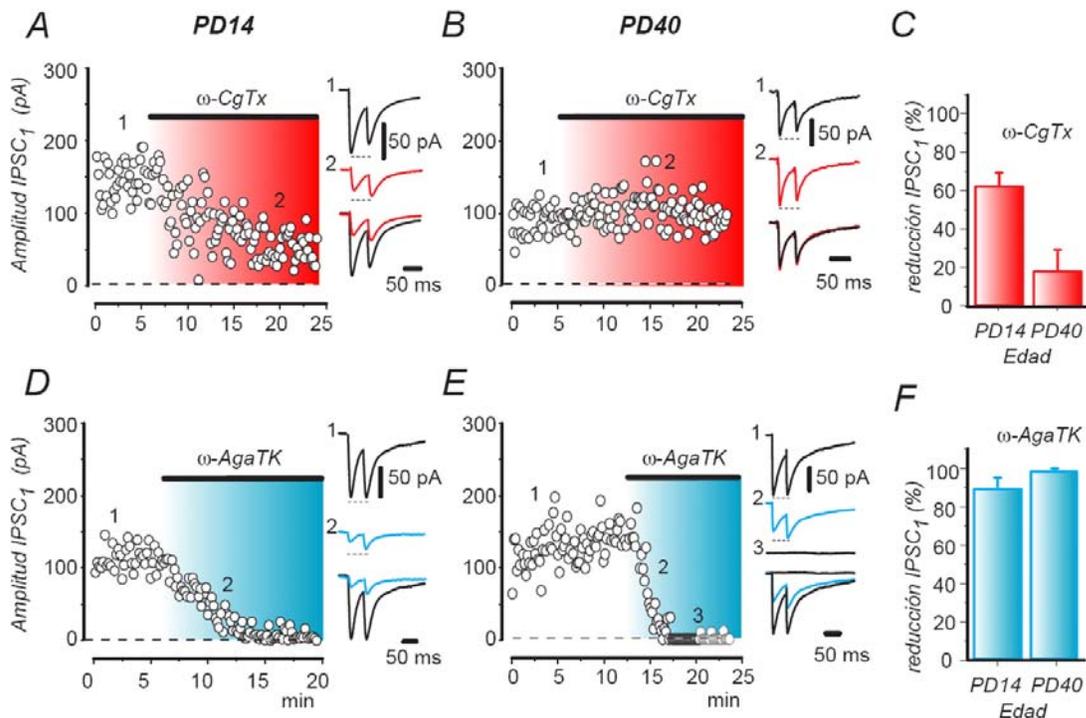


Figura 12. La sensibilidad a ω -Cgtx de las terminales sinápticas que interconectan a las NEMs disminuye durante el desarrollo. **A.** La ω -Cgtx (1 μ M) reduce en un 64 ± 7 % las IPSCs producidas por las colaterales axónicas a la edad PD14. Note que la respuesta al pulso pareado pasa de DPP en el control, a FPP durante la acción de la ω -Cgtx (insertos 1 y 2 respectivamente) indicando que menos calcio participa en la liberación después del bloqueo. **B.** La sensibilidad a la ω -Cgtx se reduce al 18 ± 7 % a la edad PD40. En algunos casos como el que se ilustra, la ω -Cgtx no tiene efecto. La DPP no cambia (inserto). **C.** El histograma resume el efecto de la ω -Cgtx en función de la edad ($P < 0.01$; U de Mann Whitney). **D y E.** La sensibilidad de esta sinapsis a la ω -Aga TK (400 nM) no cambia durante el desarrollo en términos de porcentaje ($P > 0.05$; U de Mann Whitney), aunque la cinética del bloqueo si se hace más rápida con la edad. En ambas edades, el bloqueo de los canales P/Q (Ca_v2.1) produce FPP (insertos). **F.** El histograma resume el resultado.

Estos experimentos muestran que, durante el desarrollo, existe una reorganización de la proporción con que los canales de calcio son utilizados por las terminales para la liberación de GABA (Iwasaki y Takahashi, 1998; Iwasaki et al., 2000; Verderio et al., 1995).

6.2.2 La modulación dopaminérgica también se modifica durante el desarrollo

La activación de los receptores dopaminérgicos modula la corriente de calcio en la membrana somatodendrítica de las NEMs. Esta corriente de calcio puede estar acarreada por los canales de los tipos N (Ca_v2.2) y P/Q (Ca_v2.1) (Nicola et al., 2000; Salgado et al., 2005, anexo B). Así por ejemplo, la activación del receptor de la clase D₂ reduce las corrientes de calcio llevada por estos canales (Salgado et al., 2005, anexo B). Como estos canales son los encargados de regular la liberación de GABA, es importante saber si su reorganización tiene consecuencias sobre la modulación dopaminérgica (Cooper y Stanford, 2001; Guzman et al., 2003; Floran et al., 1997). La figura 13 muestra que la modulación producida por el agonista selectivo a los receptores de la clase D₂, quinolorane (1 μ M), es la misma para ambas edades (PD14 y PD40).

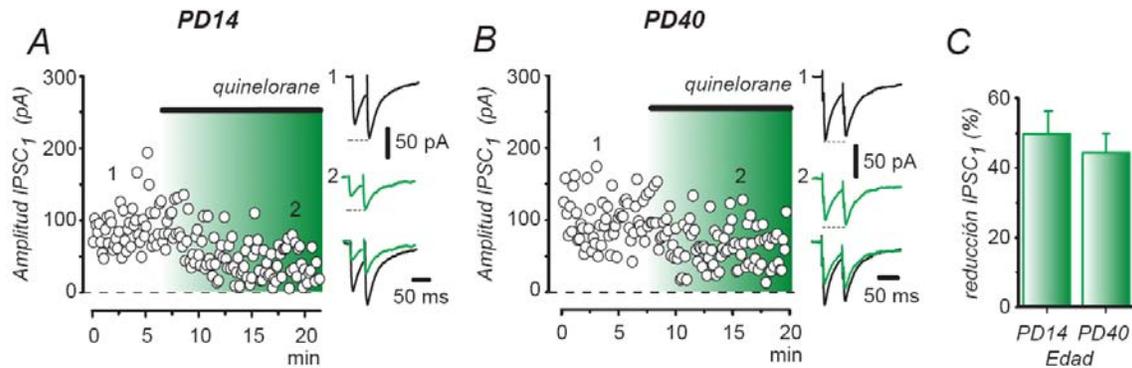


Figura 13. La modulación presináptica producida por la activación de los receptores D₂ es la misma en ambas edades. A. PD14. B. PD40. C. El histograma muestra que no hay cambios significativos.

El quinolorane reduce la amplitud de las *IPSCs* un $50 \pm 8 \%$ a la edad *PD14* ($n = 12$) y un $42 \pm 5 \%$ a la edad *PD40* ($n = 6$) (Fig. 13; $P > 0.05$; U de Mann Whitney). A la edad *PD14*, la *TPP* control fue de (Fig. 13A, insertos) 1.3 ± 0.16 , mientras que después del quinolorane fue de 1.9 ± 0.26 ($n = 12$; $P < 0.002$; T de Wilcoxon). A la edad *PD40* (Fig. 13B, insertos) la *TPP* control fue de 0.82 ± 0.1 y en presencia del agonista fue de 0.97 ± 0.08 ($n = 6$; $P < 0.05$; T de Wilcoxon). El cambio en la *TPP*, que sugiere cambios en la probabilidad de liberación (Zucker y Regher, 2002), indica que la acción del fármaco es presináptica (Fig. 13F) (Guzman et al., 2003; Salgado et al., 2005, anexo B). Sin embargo, para dar mayor peso a esta inferencia, realizamos el análisis de varianza en función de la amplitud media de las *IPSCs* (Clements y Silver, 2000 ver métodos), así como un análisis de las corrientes sinápticas espontáneas.

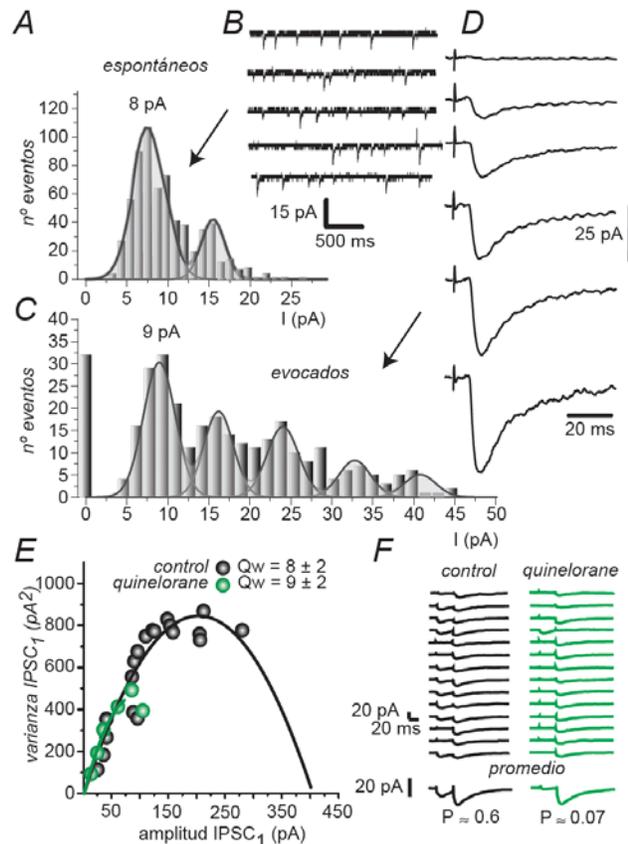
La figura 14A muestra un histograma de amplitudes representativo de las *IPSCs* espontáneas registradas en las *NEMs* (Fig. 14B). Las *IPSCs* espontáneas se originan tanto de interneuronas como de las *NEMs* vecinas (Tepper y Bolam,

2004). Sin embargo, el histograma se ajusta a funciones Gaussianas mostrando dos modas. La primera moda es de 8 pA (rango de 5-12 pA), similar al valor del “*cuanto*” reportado en otras sinapsis GABAérgicas (e.g., Ling y Benardo, 1999). La segunda moda es un múltiplo: 16 pA (rango de 12-20 pA) (cf., Paulsen y Heggelund, 1994).

Cuando se construye el histograma de amplitudes con *IPSCs* provocadas (*GP*→*NEM*) aparecen varias modas (Fig. 14C-D), obteniéndose valores de 9 y 17 pA para las dos primeras modas. El intervalo entre modas fue de 8 a 9 pA (Ling y Benardo, 1999). Con experimentos similares a éste pudimos tener un valor aproximado del valor de un “*cuanto*” (Paulsen, 1998). Este valor se comparó con el obtenido por el análisis de la varianza en función de la amplitud media de las *IPSCs* (Figura 14E; Clements y Silver, 2000). Como se muestra en la figura 14E (círculos grises), al graficar estos valores obtenidos de varios experimentos, se puede ajustar la parábola teórica (ec. 3; ver Métodos). El ajuste reveló una amplitud promedio del “*cuanto*” (Q_w) de 8 ± 2 pA, similar a la primera moda de los histogramas de amplitudes. Al adicionar el agonista de receptores de la clase D_2 , quinelorane (1 μ M), los datos se sobrepusieron a los obtenidos en condiciones control, en la parte inicial de la parábola (Fig. 14E, círculos verdes). De hecho, en el ajuste lineal los datos no fue significativamente diferente, sustentando que la modulación D_2 es presináptica (Clements y Silver, 2000). El Q_w fue 9 ± 2 pA en presencia de quinelorane (no significativamente diferente del control; U de Mann Whitney).

Este tipo de análisis no discierne de manera confiable (dada la variabilidad cuántica) si la modulación se debe a un cambio en la probabilidad de liberación (P_{rw}) o en el número de sitios de liberación (N) (Biro et al., 2006; Clements y Silver, 2000). Parece ser que si la disminución en P_{rw} es muy grande, puede detectarse como un cambio en N y viceversa (Biro et al., 2002). Sin embargo, la P_{rw} puede aproximarse de manera independiente (Fig. 13F) y demostrarse que la activación del receptor D_2 reduce P_{rw} : por ejemplo, de 0.6 en el control a 0.07 después del quinelorane. Esto puede correlacionarse directamente con la FPP (ver Baldelli et al., 2005). Así, diversos análisis convergen en que la acción D_2 es presináptica.

Figura 14. Diversos análisis concuerdan en que la modulación D_2 es presináptica. **A.** Histograma de amplitudes obtenido de $IPSCs$ espontáneas (**B**). Los dos primeros modos son 8 y 16 pA, respectivamente. **C.** Histograma de amplitudes de $IPSCs$ provocadas ($GP \rightarrow NEM$) (**D**). Los dos primeros modos son 9 y 17 pA, mientras que el intervalo al pico de las $IPSCs$ correspondientes a diferentes experimentos hechos con distintas intensidades de estimulación (ver curva $I-A$ en Fig. 7E), fueron graficadas contra sus varianzas (círculos grises). Observe que la parábola teórica (línea negra): $y = Ax - Bx^2$ (Clements y Silver 2000) se ajusta bien a estos datos de forma que se puede obtener Q_w : 8 pA, valor similar al obtenido en el primer modo del histograma de amplitudes. En presencia de quinelorane el valor no fue significativamente diferente: 9 pA (no cambia la pendiente inicial de la parábola; círculos verdes) (Clements y Silver 2000). **F.** Familias de $IPSCs$ en respuesta a la estimulación pareada en control y en presencia de quinelorane. De cinco fallas de $IPSC_1$ en la condición control pasamos a muchas fallas en presencia de quinelorane, revelándose una reducción en la probabilidad de liberación (P).



Para ver si la modulación dopaminérgica dependía de los canales de calcio, primero se estudió el efecto del agonista selectivo de los receptores a dopamina

de la clase D₂, quinelorane, en presencia de 1 μM de ω-CgTx (bloqueador de canales de calcio tipo N). Se compararon las dos etapas del desarrollo: PD14 y PD40. La figura 15A muestra que la ω-CgTx prácticamente abolió la reducción mediada por el agonista D₂ en las IPSCs de animales PD14. La modulación se redujo de 50 ± 8% en control a 10 ± 2% en presencia de ω-CgTx (n= 3; Fig. 15A; P < 0.02; U de Mann Whitney). La aplicación posterior de ω-AgaTK (400 nM) terminó de bloquear las IPSCs (Fig. 15A), confirmando que los canales de tipo P/Q (Ca_v2.1) están presentes en la terminal y que el quinelorane tiene su mayor efecto sólo si los canales de calcio de tipo N (Ca_v2.2) están presentes en la terminal.

Por el contrario, la presencia de ω-CgTx a la misma concentración no disminuyó la acción del agonista D₂ a la edad PD40. La reducción de las IPSCs fue de 42 ± 5% en control y 40 ± 8% en presencia de ω-CgTx (n= 5; Fig. 15B; P > 0.05, U de Mann Whitney). Lo que muestra que el canal de calcio de tipo N (Cav2.2) ya no es el blanco de la modulación del agonista D₂ a esta edad. Estos resultados se resumen en el histograma de la Fig. 15C.

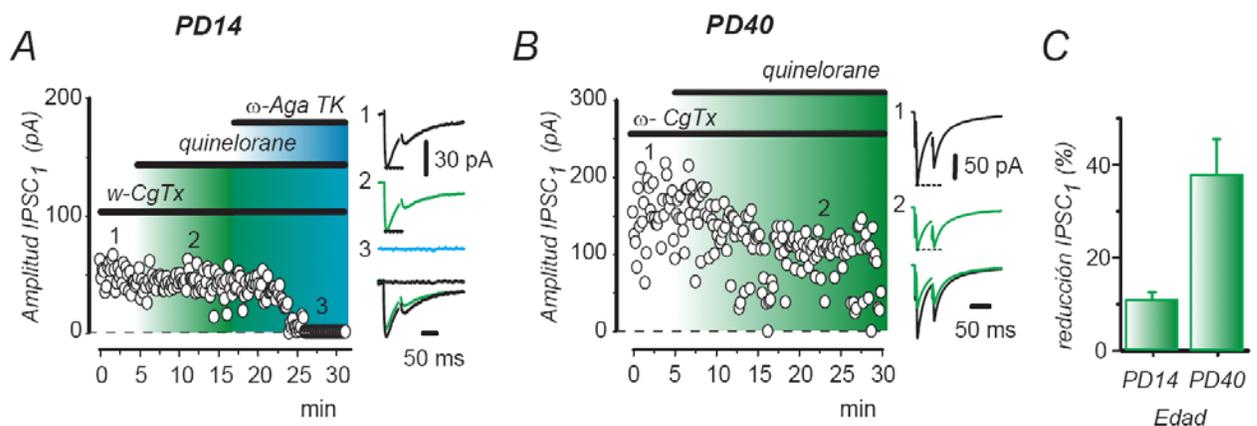


Figura 15. La modulación presináptica D2 utiliza diferentes canales de calcio a diferentes edades. **A.** Curso temporal de la amplitud de las *IPSCs* en presencia de ω -*Cgtx* (1 μ M). El quinolorane no actuó cuando los canales N ($Ca_v2.2$) estaban bloqueados. El bloqueo posterior de los canales P/Q ($Ca_v2.1$) bloqueó completamente las *IPSCs* (inserto). Esto muestra que el agonista no actúa sobre estos canales a esta edad. Esto es, la modulación depende de la presencia de canales N ($Ca_v2.2$) funcionales. **B.** El quinolorane sí puede reducir las *IPSCs* a la edad *PD40* aun en presencia de ω -*Cgtx*. Lo que sugiere que la modulación ya no depende de los canales N ($Ca_v2.2$) a esta edad. **C.** Los histogramas muestran el porcentaje de modulación por quinolorane en presencia de ω -*Cgtx* en los dos estadios del desarrollo ($P < 0.009$; U de Mann Whitney).

Resumen de la 2ª parte de los resultados:

1. Existe una reorganización en la expresión de los canales de calcio que participan en la liberación de neurotransmisor en las terminales de las colaterales axónicas que interconectan a las *NEMs* durante el desarrollo. El canal de calcio de tipo N ($Ca_v2.2$) reduce su participación al llegar a la etapa adulta y el canal de tipo P/Q ($Ca_v2.1$) se queda encargado de la liberación.
2. La activación de receptores de la clase D_2 modula presinápticamente la liberación de GABA de las terminales de las *NEMs* de manera similar en animales jóvenes (*PD14*) y adultos (*PD40*).
3. Esta modulación está mediada por distintos canales de calcio en animales jóvenes y adultos. Esto implica que la señalización activada por el receptor D_2 cambia el blanco de su modulación durante el desarrollo, dejando al canal que ve reducida su participación en la liberación [N ($Ca_v2.2$)] y adoptando al canal que se queda encargado de la misma [P/Q ($Ca_v2.1$)].

A Reconfiguration of $\text{Ca}_v2 \text{Ca}^{2+}$ Channel Current and Its Dopaminergic D_2 Modulation in Developing Neostriatal Neurons

Humberto Salgado, Fatuel Tecuapetla, Tamara Perez-Rosello, Azucena Perez-Burgos, Enrique Perez-Garci, Elvira Galarraga, and Jose Bargas

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Submitted 3 May 2005; accepted in final form 17 August 2005

Salgado, Humberto, Fatuel Tecuapetla, Tamara Perez-Rosello, Azucena Perez-Burgos, Enrique Perez-Garci, Elvira Galarraga, and Jose Bargas. A reconfiguration of $\text{Ca}_v2 \text{Ca}^{2+}$ channels current and its dopaminergic D_2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 94: 3771–3787, 2005. First published August 24, 2005; doi:10.1152/jn.00455.2005. The modulatory effect of D_2 dopamine receptor activation on calcium currents was studied in neostriatal projection neurons at two stages of rat development: postnatal day (PD)14 and PD40. D_2 -class receptor agonists reduced whole cell calcium currents by about 35% at both stages, and this effect was blocked by the D_2 receptor antagonist sulpiride. Nitrendipine partially occluded this modulation at both stages, indicating that modulation of Ca_v1 channels was present throughout this developmental interval. Nevertheless, modulation of Ca_v1 channels was significantly larger in PD40 neurons. ω -Conotoxin GVIA occluded most of the Ca^{2+} current modulation in PD14 neurons. However, this occlusion was greatly decreased in PD40 neurons. ω -Agatoxin TK occluded a great part of the modulation in PD40 neurons but had a negligible effect in PD14 neurons. The data indicate that dopaminergic D_2 -mediated modulation undergoes a change in target during development: from $\text{Ca}_v2.2$ to $\text{Ca}_v2.1 \text{Ca}^{2+}$ channels. This change occurred while $\text{Ca}_v2.2$ channels were being down-regulated and $\text{Ca}_v2.1$ channels were being up-regulated. Presynaptic modulation mediated by D_2 receptors reflected these changes; $\text{Ca}_v2.2$ type channels were used for release in young animals but very little in mature animals, suggesting that changes took place simultaneously at the somatodendritic and the synaptic membranes.

INTRODUCTION

Neostriatal projection neurons express a diverse array of voltage-gated Ca^{2+} channels (Bargas et al. 1994). The different types of Ca^{2+} channels exhibit striking dissimilar roles during repetitive firing and transmitter release (Perez-Garci et al. 2003; Tecuapetla et al. 2005; Vilchis et al. 2000). For example, L-type Ca^{2+} (Ca_v1) channels activate near spike threshold and contribute to set the range of frequencies for evoked discharge—the dynamic range (Hernandez-Lopez et al. 1997, 2000; Perez-Garci et al. 2003). By this token, dopaminergic D_1 receptor activation facilitates neuronal excitability by enhancing Ca^{2+} current through L-type Ca^{2+} channels (Hernandez-Lopez et al. 1997; Surmeier et al. 1995). Activation of dopaminergic D_2 receptors reduces L-type Ca^{2+} currents, leading to a decrease in firing (Hernandez-Lopez et al. 2000; Olson et al. 2005). These actions partially explain the so-called facilitatory and repressing actions of dopamine on striatal output at the molecular level (Prescott et al. 2003).

However, not only $\text{Ca}_v1 \text{Ca}^{2+}$ channels but also $\text{Ca}_v2 \text{Ca}^{2+}$ channels may be controlled by dopamine. Consequently, this study asked if D_2 receptor activation also regulates $\text{Ca}_v2 \text{Ca}^{2+}$ channels in striatal neurons. The dopaminergic modulation of $\text{Ca}_v2 \text{Ca}^{2+}$ channels may be important given the roles of these channels in spiny cells (Perez-Garci et al. 2003; Tecuapetla et al. 2005; Vilchis et al. 2000). Moreover, because the contribution of diverse $\text{Ca}_v2 \text{Ca}^{2+}$ channels may change during development (Chameau et al. 1999), and because medium spiny neurons have a protracted development (Tepper et al. 1998) with respect to other neurons, it is important to see what happens with dopaminergic modulation during possible channel reconfigurations.

The relevance of this question becomes evident when recalling that Ca_v2 channels supply the Ca^{2+} necessary to activate Ca^{2+} -dependent K^+ channels (Vilchis et al. 2000) in mature neurons. In turn, these K^+ channels generate the postspike afterhyperpolarization (AHP) that makes up the interspike interval. The AHP controls the firing of spiny cells by setting the gain for a given stimulus (Bargas et al. 1999; Perez-Garci et al. 2003; Pineda et al. 1992; Vilchis et al. 2000). In addition, Ca_v2 channels are in charge of GABA release at the synaptic terminals of spiny neurons (Tecuapetla et al. 2005). In this place too, there is evidence that dopamine exerts a presynaptic modulation of GABA release (Guzman et al. 2003). Thus theoretically, dopamine could control neostriatal output at two different levels through the regulation of $\text{Ca}_v2 \text{Ca}^{2+}$ channels: first, at the somatodendritic membrane through the regulation of the firing mechanism, and second, at the synaptic terminals (Cooper and Stanford 2001; Guzman et al. 2003) through the regulation of transmitter release. Accordingly, the main objective of this study was to find evidence of this dual regulation. In relation to this, it was recently shown that activation of muscarinic M_1 receptors controls both the interspike interval and the transmitter release at the synaptic terminals of spiny neurons (Perez-Rosello et al. 2005). Because muscarinic M_1 receptors and dopaminergic D_2 receptors seem to be linked to the same signaling cascade (Hernandez-Lopez et al. 2000; Rakhilin et al. 2004), it seems interesting to ask if these receptors share some physiological actions in neostriatal cells, and if not, why. This work has been published in abstract form (Salgado et al. 2004).

Address for reprint requests and other correspondence: J. Bargas, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico City DF 04510, Mexico (E-mail: jbargas@ifc.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

6.3 Apartado III: Modulación dopaminérgica de la plasticidad sináptica de corto plazo en las sinapsis inhibitoras del neocórtico

La fuerza sináptica es modificada continuamente en los circuitos neuronales. Esto se debe a una propiedad de las sinapsis conocida como “plasticidad de corto plazo” (o “*short term plasticity*”: *STP* por sus siglas en inglés) (Zucker, 1989; Markram y Tsodyks 1996; Abbott et al., 1997; O’Donovan y Rinzel, 1997; Abbott y Nelson 2000; Dittmar et al., 2000; Thomson 2000; Zuker y Regehr 2002; Abbott y Regehr 2004). La *STP* provee a las sinapsis con capacidades funcionales tales como ser detectores de coincidencias y filtros de señales (O’Donovan & Rinzel, 1997; Thomson, 2000b; Abbott y Regehr, 2004; Richardson et al., 2005).

Decidimos investigar la *STP* y su posible modulación dopaminérgica en las dos sinapsis inhibitoras que hacen contacto con las *NEMs*: i) las sinapsis que interconectan a las *NEMs* con ellas mismas (*inhibición “feedback”*) y ii) las sinapsis provenientes de las interneuronas locales (e.g. la interneurona “*Fast spiking*”) (*inhibición “feedforward”*).

6.3.1 Inhibición sobre las *NEMs*

La conexión sináptica entre *NEMs* (aquí abreviada como *NEM*→*NEM*) y la inhibición de las interneuronas *fast spiking* sobre la *NEM* (aquí abreviada como *FS*→*NEM*) se estudiaron mediante registros simultáneos de pares de neuronas (cada tipo neuronal fue identificado electrofisiológicamente por las características descritas en la Figura 16; ver tabla 2). Las *IPSCs* de ambas conexiones fueron

provocadas mediante la despolarización de la neurona presináptica mientras se registraba una *NEM* postsináptica (Fig. 17A y B). En el presente apartado se le denomina “respuesta unitaria” a los registros obtenidos de pares de neuronas.

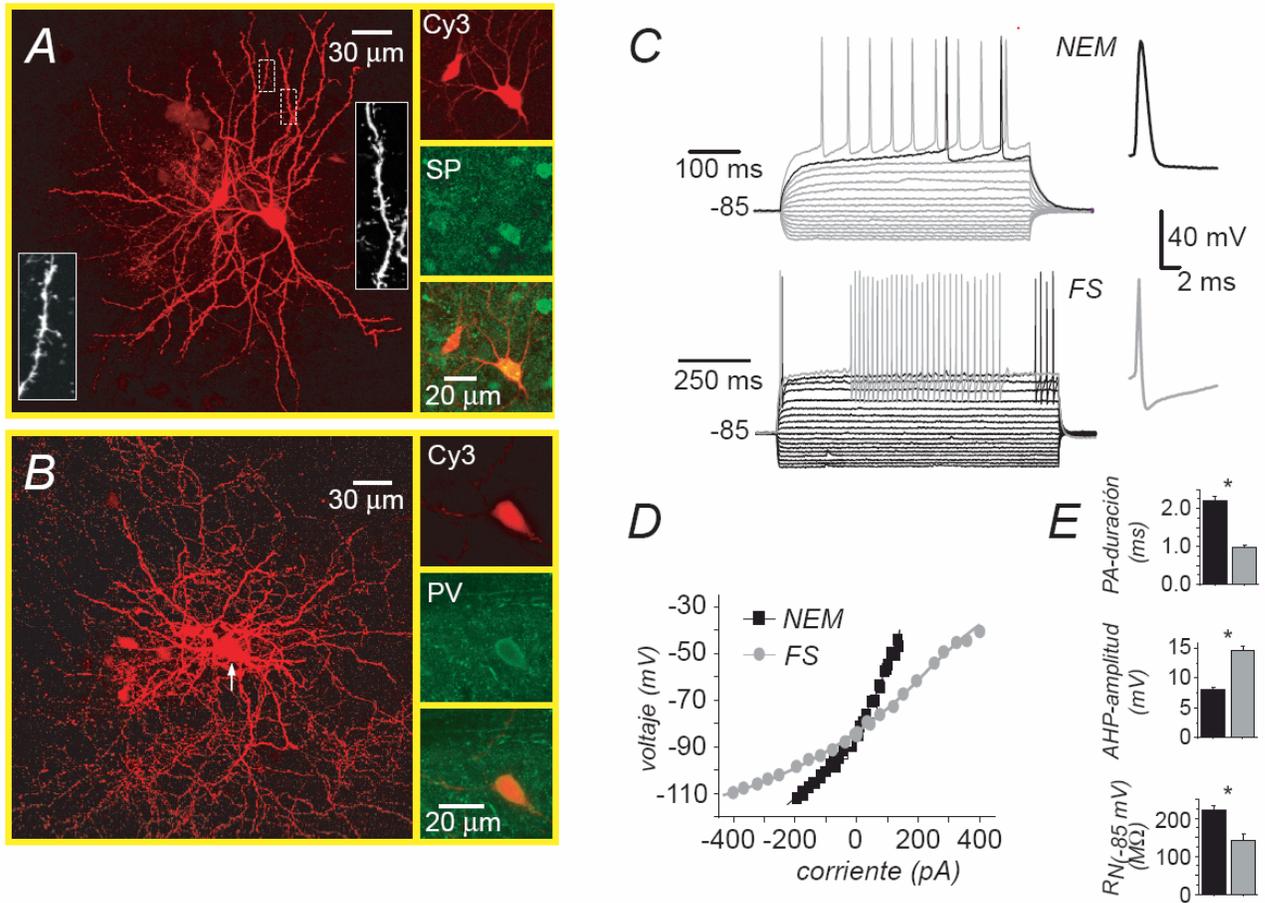


Figura 16. Identificación electrofisiológica de las neuronas del neostriado. **A.** Par de *NEMs* sinápticamente conectado, cada neurona fue llenada con biocitina (ver Métodos). La reconstrucción confocal se basó en 50 cortes de 0.2 μm en el eje Z. La neurona presináptica (derecha) mostró ser inmunopositiva a sustancia P (*SP*) mientras que la neurona postsináptica (izquierda) fue negativa. Esta conexión *NEM*→*NEM* fue modulada por quinelorane (1 μM) **B.** Interneurona *Fast spiking* (*FS*). La neurona *FS* fue inmunopositiva a parvalbúmina (*PV*) **C.** Respuestas de voltaje características a pulsos rectangulares de corriente hiper y despolarizantes (no se muestran) de una *NEM* (arriba) y una interneurona *FS* (abajo). Note que sus características electrofisiológicas son tan distintas que se les puede identificar durante el experimento. El retardo a la primera espiga, la rectificación entrante y el disparo tónico característicos de las *NEMs*, no se encuentran en las interneuronas. **D.** Relaciones corriente-voltaje representativas de las *NEM* (cuadros negros) y las interneuronas *FS* (círculos grises). **E.** Los histogramas resumen algunas diferencias significativas entre los parámetros electrofisiológicos: la amplitud del postpotencial hiperpolarizante (*AHP*), la duración del potencial de acción (*PA*) y la resistencia de entrada neuronal registrada a -85 mV para muestras de *NEMs* ($n = 36$) y de interneuronas *FS* ($n = 11$). * $P < 0.05$; U de Mann Whitney.

Tabla 2. Parámetros electrofisiológicos utilizados para diferenciar a las neuronas espinosas medianas (*NEMs*) de las interneuronas *fast spiking* (*FS*).

	<i>NEM</i> (N = 30)	<i>FS</i> (N=11)
Resistencia de entrada a -85 mV (MΩ) †	208±13 204 (90-407)	142±16 126 (81-239)
Duración del PA (ms) *	2.19±0.1 2.16 (1.3-3.8)	0.95±0.06 0.9 (0.7-1.3)
Amplitud del AHP (mV) *	8±0.38 8.35 (3.71-12)	14±0.94 13.31 (11-21)

En cada celda de datos, de arriba hacia abajo: media± S.E.M, mediana y rango en paréntesis. * P < 0.0001; † P < 0.02 (U de Mann Whitney). MΩ: Megaohmios, ms: milisegundos, mV: milivoltios.

Pero por los resultados anteriores sabemos que otra manera de aislar la inhibición entre las *NEM* es por estimulación antidrómica desde el globo pálido (abreviada aquí como *GP*→*NEM*) (ver Figura 8A). Me referiré a la respuesta sináptica de este protocolo como la “respuesta poblacional” entre *NEMs* debido a que, muy probablemente, se origina de más de un axón presináptico haciendo contacto con la *NEM* postsináptica (ver Apartado I y Discusión). Sin embargo, hasta antes de esta Tesis, nadie había comparado, de manera detallada, las respuestas unitarias y poblacionales entre *NEMs*. Hay una serie de razones por las que estas podrían ser diferentes, por lo que decidimos hacer esta comparación.

Se obtuvieron 14 pares de *NEMs* sinápticamente conectadas de 106 pares de *NEMs* registradas (≈13%) a una distancia de separación entre el par de neuronas no mayor de 100 μm (Fig. 16A y 17A). La conexión *NEM*→*NEM* se

bloquea por 10 μM de bicuculina (no se muestra pero ver: Taverna et al., 2003), lo que confirma su naturaleza GABAérgica.

Se obtuvieron 13 pares $FS \rightarrow NEM$ conectados de 24 pares registrados ($\approx 55\%$) (Fig. 17B). Esta conexión también se bloquea con bicuculina (10 μM), además de mostrar un potencial de equilibrio ($IPSCs$) que corresponde al potencial de inversión para el ión cloruro (no se muestra pero ver: Koós y Tepper, 1999; Koós et al., 2004).

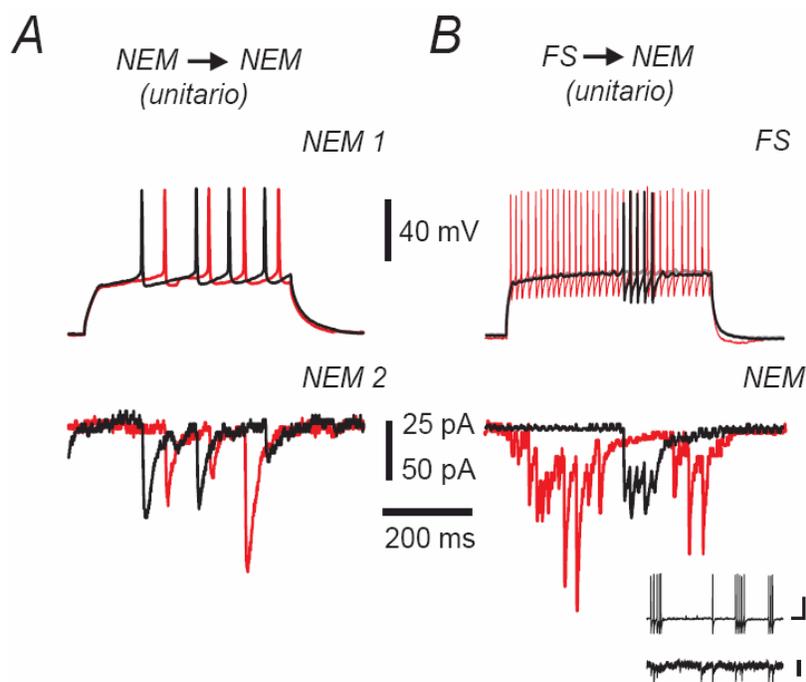


Figura 17. Inhibición sobre la *NEM*. Registros unitarios. *A.* Conexión $NEM \rightarrow NEM$ (inhibición tipo “*feedback*”). Las neuronas presinápticas se registraron en el modo de fijación de corriente mientras que las neuronas postsinápticas se registraron en el modo de fijación de voltaje en este y los demás casos. *B.* Conexión $FS \rightarrow NEM$. El inserto de abajo muestra el disparo en ráfagas de una interneurona ante una despolarización continua y las respuestas correspondientes en la *NEM*. Calibración: barra horizontal 50 ms, barra vertical 20 mV y 50 pA respectivamente.

Para realizar la comparación, graficamos la duración a la amplitud media de las $IPSCs$ (*half-widths*) contra el tiempo que se tardan en alcanzar la máxima

amplitud (*time to peak* o tiempo al pico). Esto genera los llamados “*shape index plots*” o gráficas de forma. Por supuesto, no sólo comparamos las conexiones aquí denominadas $NEM \rightarrow NEM$ (círculos vacíos) y $GP \rightarrow NEM$ (círculos llenos), si no que también incluimos la conexión $FS \rightarrow NEM$ (círculos grises). No se encontraron diferencias significativas entre las dos primeras conexiones (Fig. 18D; $n = 9$; $P > 0.05$ Mann-Whitney’s U test), lo que confirma que la conexión $GP \rightarrow NEM$ es una versión poblacional de la conexión entre *NEMs* (Guzman et al., 2003; Tecuapetla et al., 2005b; Perez-Rosello et al., 2005; Salgado et al., 2005), esto es, la conexión no está contaminada por otras conexiones mono o polisinápticas y se puede aislar con estimulación de campo. Esto es muy difícil de hallar en otras preparaciones aisladas del *SNC*. Como las *IPSCs* poblacionales podían ser mucho mas grandes debido al reclutamiento de más de un axón presináptico desde el globo pálido (ver Figura 8E en apartado I) confirmamos el carácter poblacional de este protocolo. Así, la unión de ambos protocolos de estimulación y aislamiento de esta sinapsis: $NEM \rightarrow NEM$ y $GP \rightarrow NEM$, refuerza de manera importante el análisis estadístico y las conclusiones de este apartado.

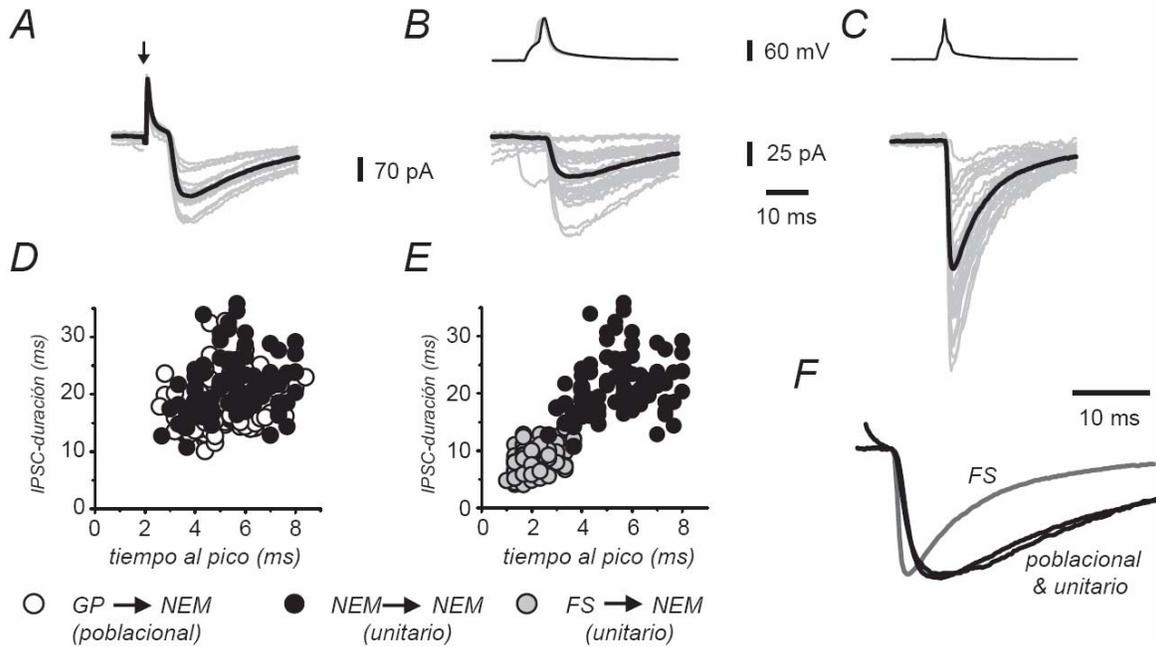


Figura 18. Comparación de las *IPSCs* registradas en las *NEMs*. *A.* *GP*→*NEM*. *B.* *NEM*→*NEM*. *C.* *FS*→*NEM*. En *A-C* los trazos negros corresponden al promedio de 20-24 trazos individuales (en gris). *D* y *E.* Gráfica de la duración a la amplitud media contra el tiempo al pico de las *IPSCs*: *GP*→*NEM* (círculos vacíos) y *NEM*→*NEM* (círculos llenos) y *FS*→*NEM* (círculos grises) ($n = 9$ de c/u). *F.* Promedios normalizados para la amplitud de las *IPSCs* obtenidas con los tres protocolos. El trazo gris corresponde a la conexión *FS*→*NEM*. Note la virtual sobreposición de las *IPSCs* de las conexiones *GP*→*NEM* y *NEM*→*NEM*.

Las dos conexiones unitarias sí mostraron diferencias significativas (Figs. 18B-C y E). Las *IPSCs* de la conexión *FS*→*NEM* mostró tiempos al pico y duración más rápidos (Fig. 18F), además de mostrar una mayor amplitud promedio: 56 ± 12 pA vs. 23 ± 4 pA de la conexión *NEM*→*NEM*, respectivamente ($P < 0.01$; Mann-Whitney's U test) (Koós et al., 2004; Gustafson et al., 2006). Pero cuando normalizamos la amplitud de las *IPSCs* promedio de cada condición, observamos que las conexiones *GP*→*NEM* y *NEM*→*NEM* son prácticamente idénticas (Figura 18F), y claramente diferentes de las *IPSCs* de la conexión *FS*→*NEM*.

En resumen, esta es la primera demostración experimental clara de que la estimulación de campo desde el *GP* es capaz de aislar, prácticamente sin contaminantes, a las sinapsis entre las *NEMs*. Un aislamiento de esta calidad no se obtiene, ni siquiera, con las colaterales de Schaffer en el hipocampo. Se podría pensar entonces que, la conexión estriopalidal podría quizás hallarse tan aislada como la conexión entre *NEMs*. Pero como discutiremos más adelante esto no es así.

6.3.2 Plasticidad sináptica de corto plazo de las sinapsis inhibitoras que hacen contacto con las *NEMs*

La dinámica de corto plazo fue estudiada con trenes de diez estímulos (a 10, 20 y 50 Hz) dados cada 10 s. Como todas las frecuencias arrojaron los mismos resultados cualitativos, decidimos analizar de manera detallada la frecuencia intermedia de 20 Hz, que tiene relevancia fisiológica pues es la frecuencia más observada en las *NEMs in vivo* y más utilizada por los comandos corticales que le llegan a las *NEMs* (Romo et al., 1992; Schultz y Romo, 1992). Además, el intervalo entre espigas más comúnmente encontrado *in vivo* durante los “*up states*” es alrededor de 50 milisegundos ($1/50 \text{ ms} \approx 20 \text{ Hz}$) (Stern et al., 1997).

Encontramos que las cinéticas de la *STP* de las conexiones *GP*→*NEM* y *NEM*→*NEM* fueron virtualmente idénticas y muy diferentes a la cinética de la conexión *FS*→*NEM* (Fig. 19A-D). No obstante, la *STP* encontrada en las tres conexiones fue la “*depresión de corto plazo*” (o *STD*: *short term depression* por sus siglas en inglés).

Esta cinética ya había sido reportada para la sinapsis $NEM \rightarrow NEM$ (Koós et al., 2004; Gustafson et al., 2006). El índice de la STD (amplitud promedio del $IPSC_1$ dividido entre la amplitud promedio de las $IPSC_{7-10}$) fue de 5.13 ± 0.39 ($n = 27$; mediana 4.34, rango: 1.12 – 20) para la conexión poblacional $GP \rightarrow NEM$ y de 4.52 ± 0.87 para la respuesta unitaria $NEM \rightarrow NEM$ ($n = 11$; mediana 3.02, rango: 1.21 – 25) ($P > 0.5$; prueba de Kruskal-Wallis con comparación pareada *post hoc* utilizando la prueba de Dunn). La diferencia para la conexión $FS \rightarrow NEM$: 2.43 ± 0.15 si fue significativa ($n = 10$; mediana 2.35, rango: 0.92 – 4.0; $P < 0.01$; Kruskal-Wallis más prueba *post hoc* de Dunn). También ajustamos la suma de dos funciones exponenciales a esta cinética (ec. 2; vg., Abbott y Nelson 2000; Zucker y Regehr, 2002) para comparar la cinética de la STD de manera más cuantitativa (Fig. 19D). Se observaron diferencias significativas entre la conexión $FS \rightarrow NEM$ y la $NEM \rightarrow NEM$ en la constante de tiempo rápida o τ_1 (ec. 2, ver Métodos), fue de 87 ± 11 ms para la conexión $FS \rightarrow NEM$ y de 31 ± 4 ms para la conexión $NEM \rightarrow NEM$ ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis más prueba de Dunn *post hoc*). Sin embargo, la constante de tiempo de la conexión $NEM \rightarrow NEM$ fue prácticamente la misma que la encontrada para la conexión $GP \rightarrow NEM$: 31 ± 2 ms. Una razón por la cual este resultado puede ser clasificado de sorprendente es la siguiente, cuando se estimulan las mismas fibras en la dirección ortodrómica (Cooper y Stanford, 2001), la conexión se contamina con la activación polisináptica dada por las colaterales axónicas que interconectan a las neuronas palidales. Pero estamos diciendo que las NEMs también se interconectan. Entonces, ¿por qué no se contamina la cinética? Esto es, ¿por qué no observamos una mayor caída en la

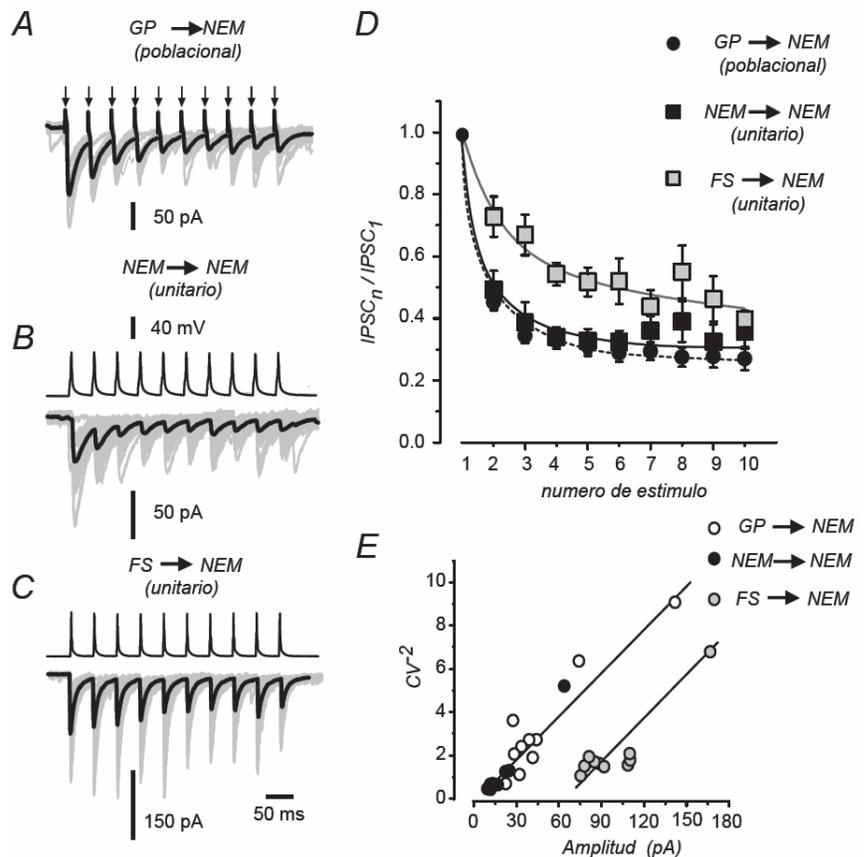
conexión GP→NEM dada por la inhibición provocada por las colaterales? La única explicación hipotética que tenemos en este momento es que la tasa de conexión entre estas neuronas es sumamente baja: $\approx 13\%$ (ver arriba) para tener su efecto a estas intensidades de estimulación. Esto sugiere que la probabilidad de que las neuronas estimuladas antidrómicamente, y que están haciendo contacto con la NEM postsináptica, estén conectadas entre sí, es muy baja. Esto no sucede cuando la conexión estriopalidal es la estudiada (las mismas fibras pero estimuladas ortodrómicamente) (Cooper y Stanford, 2001). Parece ser que la densidad de conexiones laterales entre las neuronas palidales es mayor. Esto da cuenta de la importancia de haber hecho esta comparación.

Pero además, encontramos una correlación significativa entre la amplitud de las IPSCs cuando las graficamos en función del recíproco del coeficiente de variación al cuadrado (CV^{-2} ; proporcional al contenido cuántico y por tanto a la amplitud promedio del “cuanto” de liberación obtenido anteriormente) (Fig. 19E; $n = 6$ experimentos para cada condición; r^2 de al menos 0.9 ± 0.01 ; $p < 0.002$ para cada condición) (Silver et al., 1998; Thomson, 2000b). Esto sugiere fuertemente que el mecanismo de la STP es presináptico tanto para la conexión FS→NEM, como para la conexión entre NEMs (GP→NEM y NEM→NEM). De hecho, las correlaciones de las conexiones GP→NEM y NEM→NEM fueron indistinguibles y muy diferentes a la correlación de la conexión FS→NEM que se ve claramente desplazada hacia la derecha sugiriendo mayor contenido cuántico (Fig. 19E) (Kubota y Kaguaguchi, 2000; Biro et al., 2006). Estas correlaciones terminan por descartar una contaminación polisináptica en la conexión GP→NEM. Recordemos

que la cinética de la *STD* es muy particular de cada sinapsis, como una huella digital electrofisiológica (Abbott y Regehr, 2004; Thomson, 2000a, b; Zucker y Regehr, 2002). Por lo que pensamos que ha quedado debidamente demostrado que los protocolos para obtener las conexiones aquí denominadas *GP*→*NEM* y *NEM*→*NEM* nos dan las respuestas poblacional y unitaria, respectivamente, de los eventos sinápticos entre *NEMs* (ver Discusión).

A partir de estos resultados, la hipótesis de trabajo implica que la modulación por agonistas dopaminérgicos (ver más adelante) será la misma con ambos protocolos: *GP*→*NEM* y *NEM*→*NEM*. Debido a que esta hipótesis se confirmó (ver abajo), los datos de ambos protocolos se agruparon para reforzar el análisis estadístico.

Figure 19. Depresión de corto plazo (*STD*) en las sinapsis que interconectan a las *NEMs*. *A-C*. Promedio de 20-24 trazos individuales en negro con los tres protocolos. Se muestran las respuestas a trenes de 10 *IPSCs* provocados a 20 Hz dados a intervalos de 10 seg. *A*. *IPSCs* poblacionales (*GP*→*NEM*). *B*. *IPSCs* unitarias (*NEM*→*NEM*). *C*. *IPSCs* unitarias (*FS*→*NEM*). *D*. Se promediaron varios experimentos para cada condición, luego de normalizar para la amplitud de la *IPSC*₁. *E*. Inverso al cuadrado del coeficiente de variación de las *IPSCs* en función de la amplitud de las mismas. Note que la pendiente es diferente de cero. Estas correlaciones descartan contaminación por acciones postsinápticas y sugieren que la *STD* se da por mecanismos principalmente presinápticos.



6.3.3 Modulación dopaminérgica de la STD entre NEMs

No existen muchos trabajos en las sinapsis del cerebro de los mamíferos donde se demuestre que la *STD* puede ser modulada. La figura 20 muestra que un agonista selectivo a receptores de la clase D1, el *SKF 81297* (1 μ M), incrementa la *STD* registrada en las conexiones *NEM*→*NEM* ($n = 3/5$ pares registrados) y *GP*→*NEM* ($n = 5/12$ registros poblacionales). Esto prueba la hipótesis expresada más arriba (ver Discusión).

Por lo tanto, el índice de la *STD* aumentó significativamente (media \pm S:E:M.) de 3.3 ± 0.4 en el control a 9.7 ± 3.7 en presencia del *SKF 81297* (Figura 20H; $n = 8$; $P < 0.03$; T de Wilcoxon) en las sinapsis responsivas. Es muy importante mencionar que el modelo actual de los GB postula a manera de hipótesis que hay una segregación de receptores en diferentes terminales. Los datos negativos (sinapsis que no responden al agonista) son entonces altamente significativos, pues nos dan la primera prueba experimental funcional de esta segregación.

Nuestros resultados muestran además que el coeficiente de variación (CV) de la primera *IPSC* del tren se reduce en todos los casos en que hubo respuesta alrededor de un 54 ± 8 % en promedio, respecto del control (Fig. 20G; $n = 8$; $P < 0.03$; T de Wilcoxon). Al mismo tiempo, una prueba de varianza no paramétrica (prueba F) muestra que hay un incremento significativo en la varianza de las *IPSCs* después de el *SKF- 81297* ($P \leq 0.001$; $n = 8$) en cada sinapsis responsiva al agonista (Clements y Silver, 2000; Koós y Tepper, 2002). Esto confirma que la modulación está mediada por receptores presinápticos (Guzman et al., 2003).

Adicionalmente, la τ_1 de la *STD* fue acelerada significativamente de 31 ± 3 a 23 ± 2 ms ($n = 8$; $P < 0.01$; T de Wilcoxon; ver Fig.23B), sugiriendo que el mecanismo de modulación es la “redistribución sináptica” (Markram y Tsodyks, 1996; Tsodyks y Markram, 1997). La acción dopaminérgica fue bloqueada por el antagonista selectivo de los receptores de la clase D_1 , el *SCH 39393* ($1 \mu\text{M}$) ($n = 4$; Fig. 22A). Se utilizó un agonista no hidrolizable (e.g., Hernandez-Lopez et al., 1997; 2000; Guzman et al., 2003) y se descartaron las respuestas inestables (ver apéndice B) a los trenes. El agonista no distingue entre los receptores a dopamina de los tipos D_1 y D_5 (ver Introducción), problema que abordaré en la Discusión.

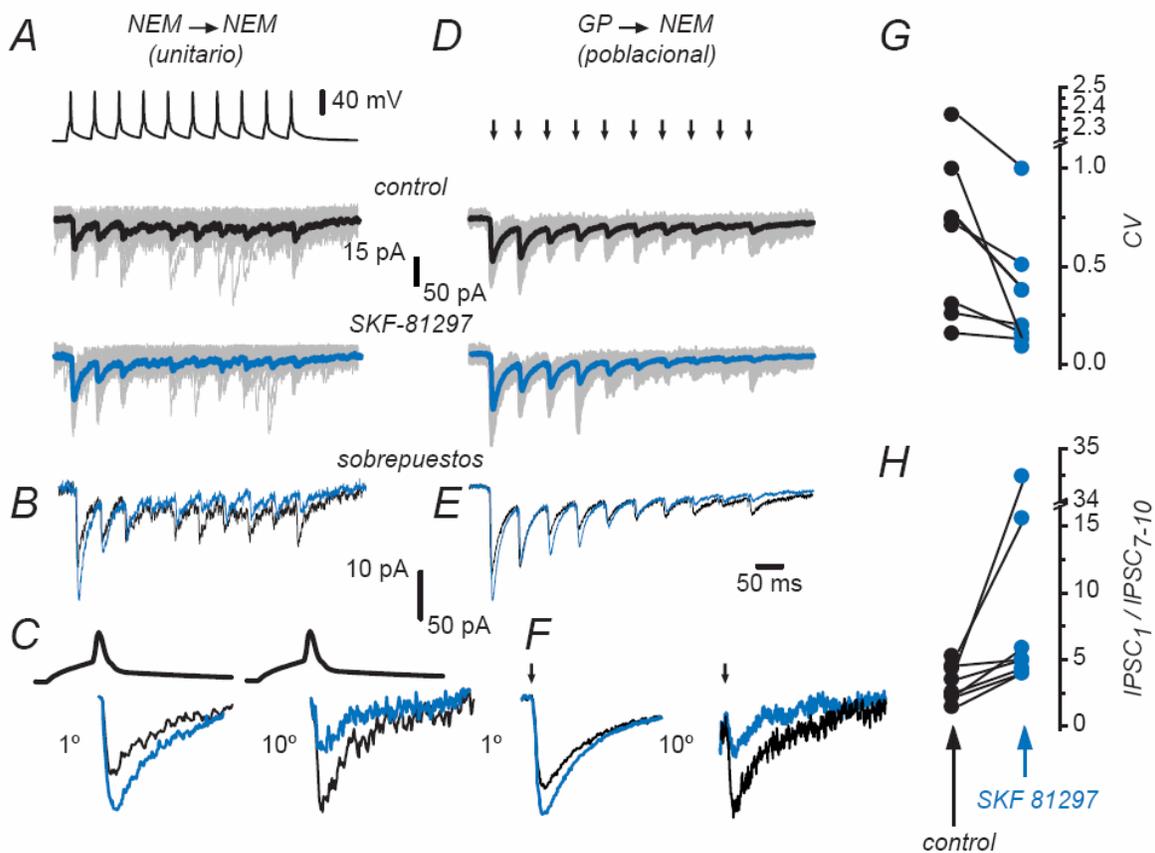


Figura 20. La activación del receptor a dopamina de la clase D₁ incrementa la *STD* en las sinapsis que interconectan a las *NEMs*. **A.** *NEM*→*NEM*, de arriba hacia abajo: potenciales de acción de la *NEM* presináptica (20 Hz), *IPSCs* promedio (trazo negro; condición control) registrados en la *NEM* postsináptica (los trazos grises son trazos individuales como en la Fig. 19), *IPSCs* después de la aplicación del agonista (trazos azules). **B.** Sobreposición de los trazos promedio en condición control y durante la aplicación del agonista (1 μM). **C.** Amplificación del primer (1^o) y décimo (10^o) eventos en ambas condiciones. **D.** *GP*→*NEM*: de arriba hacia abajo, estímulos presinápticos (flechas) provocados por estimulación de campo desde el *GP*: condición control, y respuestas ante el mismo tren de estimulación en presencia del agonista. **E.** Sobreposición de los trazos promedio en ambas condiciones. **F.** Amplificación como en C. **G.** Coeficiente de variación (*CV*) control y durante la activación del receptor clase D₁ ($P < 0.03$; T de Wilcoxon). **H.** Índice de la *STD* ($IPSC_1/IPSC_{7-10}$) en ambas condiciones ($P < 0.03$; T de Wilcoxon).

También fue investigada la acción del receptor a dopamina de la clase D₂ en sinapsis unitarias (*NEM*→*NEM*) y poblacionales (*GP*→*NEM*) utilizando el agonista selectivo no hidrolizable quinolorane (1 μM). La figura 21 muestra que éste agonista reduce la *STD* en las sinapsis que interconectan a las *NEM*: *NEM*→*NEM* ($n = 2/3$) y poblacional: *GP*→*NEM* ($n = 9/11$). Como en el caso de la acción clase D₁, la acción clase D₂ no estuvo presente en todos los casos (ver Discusión) lo que sugiere cierto grado de segregación. Pero todos los casos responsivos fueron similares y la diferencia con el control fue significativa. El índice de la *STD* cambió de 4.5 ± 0.6 en el control a 2.7 ± 0.4 en presencia de quinolorane (ver Figuras 21H; $n = 11$; $p < 0.03$; T de Wilcoxon). Asimismo, el *CV* de la primera *IPSC* incrementó significativamente a $220 \pm 40\%$ del control ($P < 0.03$; T de Wilcoxon); sugiriendo que la modulación está mediada por un mecanismo presináptico (Guzmán et al., 2003). Pero al mismo tiempo la varianza de la amplitud disminuyó ($p < 0.05$; $n = 11$; prueba *F*) en presencia del quinolorane en cada experimento donde hubo respuesta (Fig. 21G). La τ_1 de la *STD* incrementó de 31 ± 2 a 42 ± 4 ms (Fig. 23B; $P < 0.03$; T de Wilcoxon), sugiriendo nuevamente un mecanismo de “redistribución sináptica” (Markram y

Tsodyks, 1996; Tsodyks y Markram, 1997). Al usar el quinolorane se tuvo especial cuidado en descartar los casos que mostraron depresión de largo plazo (ver apéndice B) ante la estimulación repetitiva del tren. En cualquier caso, el efecto del quinolorane fue completamente bloqueado por el antagonista selectivo de la clase D₂ sulpiride (1 μM) (n=4; Figura 22D).

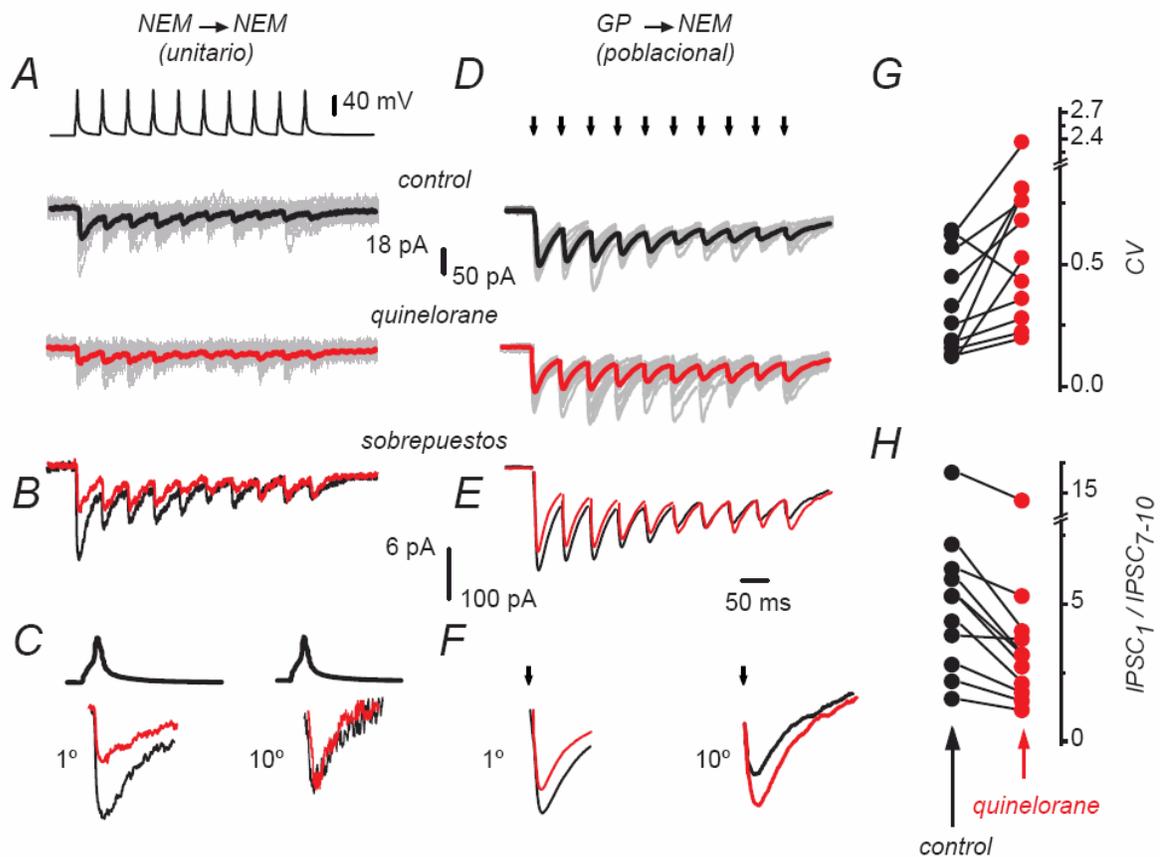


Figura 21. La activación del receptor a dopamina de la clase D₂ reduce la STD en las sinapsis que interconectan a las NEMs. **A.** NEM→NEM: de arriba hacia abajo, potenciales de acción provocados en la NEM presináptica (20 Hz), IPSCs promedio (trazo negro; condición control) registrados en la NEM postsináptica (los trazos grises son trazos individuales como en la Fig. 19), trazos en presencia del agonista quinolorane (1 μM) (trazos rojos). **B.** Sobreposición de los trazos promedio en condición control y durante la aplicación del agonista. **C.** Amplificación de la primera (1°) y décima (10°) IPSC en ambas condiciones. **D.** GP→NEM: de arriba hacia abajo, estímulos presinápticos (flechas) evocados por estimulación de campo desde el GP, IPSCs poblacionales ante esta estimulación: condición control (en negro), y las respuestas ante el mismo tren de estimulación en presencia del agonista. **E.** Sobreposición de los trazos promedio en ambas condiciones. **F.** Amplificación como en C. **G.** Coeficiente de variación (CV) control y durante la activación del receptor D₂ (P < 0.03; T de Wilcoxon). **H.** Índice de la STD (IPSC₁/IPSC₇₋₁₀) en ambas condiciones (P < 0.03; T de Wilcoxon).

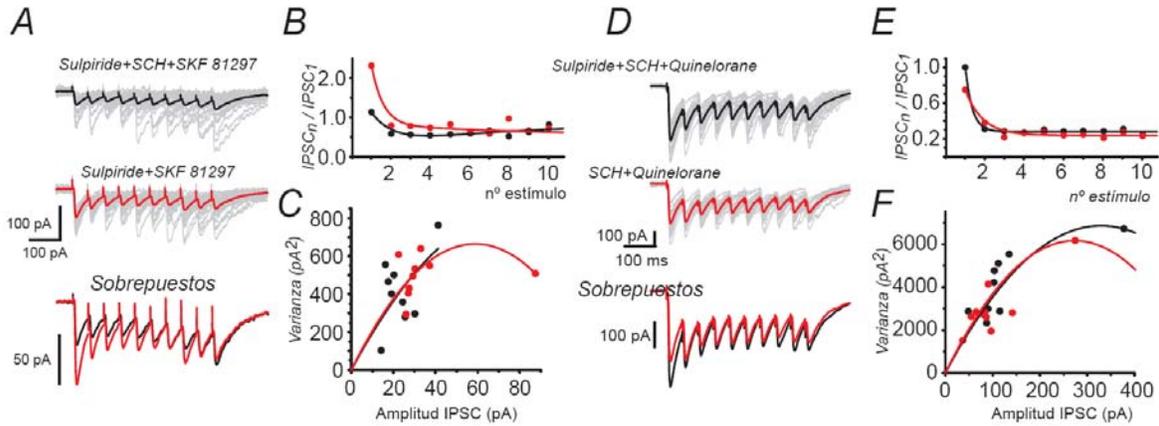


Figura 22. Los antagonistas respectivos bloquean las acciones del *SKF 81297* y el *quinelorane*. *A* y *D*. Las líneas gruesas representan promedios y los trazos grises registros individuales ($n = 20-24$) en cada condición. *B* y *E*. *IPSCs* normalizadas al pico de la *IPSC*₁ en la condición inicial. Note el incremento en la *STD* después de quitar el antagonista del receptor a dopamina clase-D₁ (*SCH* 1 μ M) en *B*, y el decremento en la *STD* después de lavar el antagonista de los receptores clase-D₂ en *E*. *C* y *F*. Análisis varianza-media (ver Métodos): se observa que la activación de receptores de la clase-D₁ (*A*) y la clase-D₂ (*D*) no cambia la pendiente inicial.

La figura 23B ilustra la media \pm S.E.M. de las funciones ajustadas (ec. 2 en los Métodos) para la *STD* después de normalizar y promediar todos los casos responsivos en presencia de *SKF 81297* (azul) o *quinelorane* (rojo). Note que las diferencias significativas son claramente observadas durante la parte inicial del proceso, mientras que las diferencias en la parte final del mismo no son evidentes. Esta imagen es típica de la redistribución sináptica (Markram y Tsodyks, 1996; Tsodyks y Markram, 1997), lo que fue confirmado modificando P_{rw} y la constante de tiempo de recuperación de la depresión (τ_{rec}) con el modelo de Tsodyks y Markram (1997) programado en Igor (Figura 23 A) y donado amablemente por *Tibor Koós* para la simulación de nuestros experimentos.

Aunque en algunos casos no se observó efecto a los agonistas, fue posible obtener la respuesta de ambos (*SKF 81297* y *quinelorane*), aplicados secuencialmente, en un par de experimentos. Tomamos ventaja de estos

experimentos para realizar el análisis de varianza-media (Clements y Silver, 2000; Koós et al., 2004). Un caso representativo es mostrado en la figura 23A. Notablemente, la pendiente inicial (parámetro A de la ec. 3 ver Métodos) de las parábolas ajustadas no difiere significativamente en ninguna condición y a pesar de dejar libres los tres parámetros durante el ajuste no lineal con el algoritmo de Marquardt (parámetro \pm error de estimación): 9 ± 1.1 para el control, 9 ± 0.8 en presencia de *SKF 81297* ($1 \mu\text{M}$), y 10 ± 1.2 después de agregar *quinolorane* ($1 \mu\text{M}$). Estos resultados descartan la posibilidad de una acción postsináptica para explicar los efectos de los agonistas dopaminérgicos. También descartan el mecanismo de “escalamiento sináptico” (Biro et al., 2002) para explicar la modulación. Se descartaron ambas posibilidades porque la amplitud del “cuanto” promedio (Q_w en ec. 4 en Métodos), que depende de la pendiente inicial (A), no cambio después de los agonistas: 8 ± 1 pA, 8 ± 0.7 pA y 9 ± 1.1 pA para el control, la acción del *SKF 81297* y la del *quinolorane*, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados afirman un efecto presináptico (Guzmán et al., 2003; Salgado et al., 2005), lo cual está de acuerdo con la correlación positiva encontrada entre la amplitud de la *IPSCs* y su CV^2 (Fig. 18E) (Silver et al., 1998; Thomson, 2000b), y con el concepto de redistribución sináptica (Figs. 22B y C) (Markram y Tsodyks, 1996; Tsodyks y Markram, 1997). De hecho, la amplitud de las parábolas ajustadas es diferente si se deja libre el parámetro B del cual depende N (Fig. 23A) (Clements y Silver, 2000), aunque la variabilidad intrínseca del “cuanto” asociada a la conexión unitaria dificulta precisar a qué se debe el cambio

presináptico, si a N_{min} o a P_{rw} (P_{rw} : probabilidad de liberación y N_{min} : numero de sitios de liberación; ver ecs. 3, 5 y 6 en los Métodos, además de ver la Discusión).

Juntos, estos resultados demuestran que el sistema dopaminérgico puede tener acciones importantes a nivel del microcircuito del *NE*, porque es capaz de cambiar/redistribuir la probabilidad de liberación entre las terminales sinápticas de una misma conexión. De manera interesante, la dirección de esta redistribución depende de los receptores a dopamina. La clase D_1 incrementa la *STD*, mientras que la clase D_2 decremanta la *STD*. Claramente no todas las sinapsis respondieron a los agonistas, sugiriendo que algún nivel de segregación esta presente a nivel de las terminales sinápticas. Sin embargo, hubo terminales sinápticas que respondieron a los agonistas de ambos receptores (Geldwert et al., 2006; Mizuno et al., 2007; Wu et al., 2006).

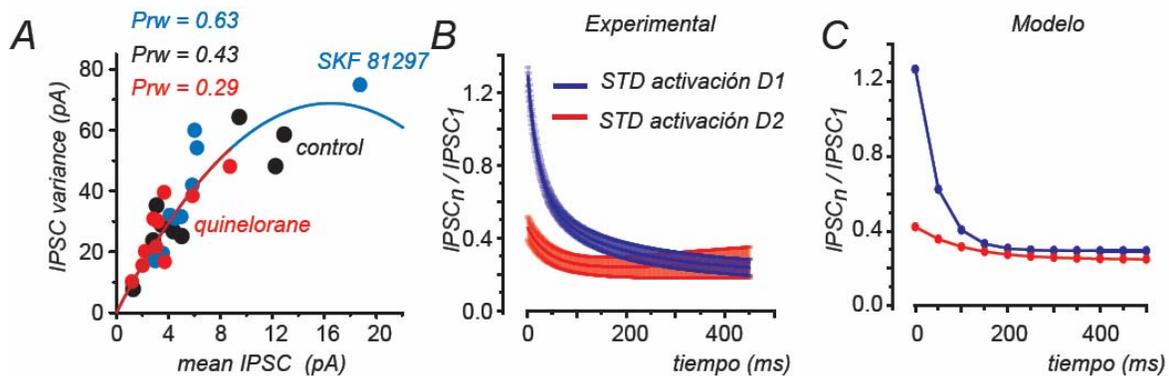


Figura 23. La redistribución de la eficacia sináptica es el mecanismo responsable de la modulación presináptica dopaminérgica de la *STD* por activación de los receptores a dopamina. *A.* Análisis varianza-media en una *NEM* que respondió a los agonistas de ambas clases ($n = 2$) de receptores. *B.* Imagen representativa de la redistribución sináptica (Tsodyks y Markram, 1997; Abbott y Nelson, 2000). (*NEM*→*NEM* y *GP*→*NEM* agrupadas) Respuesta D_1 (azul: media \pm S.E.M.) y respuesta D_2 (rojo). *C.* Simulación con el modelo de Tsodyks y Markram (1997), los parámetros que difieren de la curva azul a la curva roja son: $P_{rw}(D_1) = 0.6$ a $P_{rw}(D_2) = 0.2$ y $\tau_{rec}(D_1) = 320$ ms a $\tau_{rec}(D_2) = 200$ ms. P_{rw} : probabilidad de liberación promedio, τ_{rec} = constante de tiempo de la recuperación de la depresión (indica rellenamiento de la poza de liberación rápida de vesículas). Note que a mayor vaciamiento, las terminales tardan más en recuperarse, si no se mueve este parámetro en la simulación, no se pueden reproducir los experimentos.

6.3.4 Modulación dopaminérgica de la sinapsis entre interneuronas Fast spiking y NEMs.

Para el estudio de la *STD* en la conexión *FS*→*NEM* se utilizaron registros de pares de neuronas. El agonista selectivo D_1 , *SKF 81297* ($1 \mu\text{M}$), incrementó las *IPSCs* unitarias en uno de cuatro pares ($n = 1/4$) mientras que el agonista selectivo D_2 , *quinelorane* ($1 \mu\text{M}$), decrementó las *IPSCs* unitarias en tres de cuatro casos ($n = 3/4$).

Tres conexiones *FS*→*NEM* mostraron una respuesta al *quinelorane* con una reducción promedio de la *IPSC* del $66 \pm 1\%$. Un caso representativo está ilustrado en la figura 24B-D. Note que este caso no respondió al *SKF 81297*. No obstante la reducción en la amplitud observada después del *quinelorane* (Fig. 24B), el índice de la *STD* no cambió significativamente (Fig. 23C): de 2.7 ± 4 en control a 2.6 ± 0.5 en presencia de *quinelorane*. Esto es, una modulación presináptica de la fuerza de la conexión no necesariamente lleva a la modulación de la *STD*. De todas maneras investigamos el sitio de acción de este efecto por medio del análisis varianza-media (ver métodos), además de analizar el *CV* de la *IPSC*₁. Ninguno de los tres casos que respondieron a *quinelorane* exhibió un cambio en la pendiente inicial de la parábola ajustada, a pesar de mostrar cambios en la amplitud y en la varianza, que sugieren que la modulación es de origen presináptico (Fig. 24D).

El caso que respondió al D_1 (Fig. 23E) lo hizo con un aumento en amplitud de la corriente del 159 %. Como en los caso del agonista D_2 , esta acción no interfirió con la *STD*. El análisis varianza-media mostró sin embargo que aquí si hay entremezclada una acción postsináptica (Flores-Hernández et al., 2000).

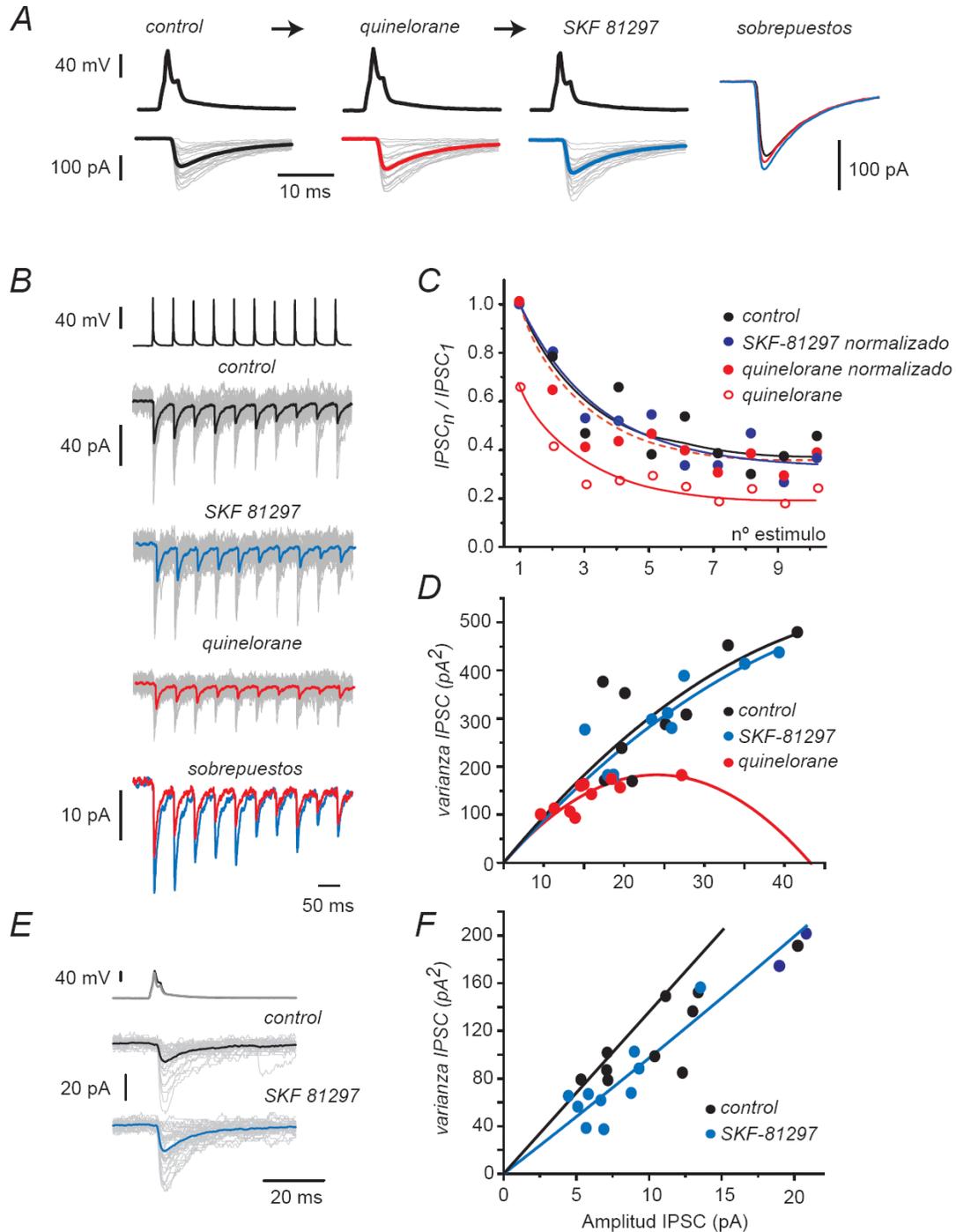


Figura 24. Los receptores dopaminérgicos no modulan la *STD* de la inhibición *FS*→*NEM*. **A.** Algunas conexiones *FS*→*NEM* no respondieron a ningún agonista dopaminérgico. **B.** De arriba hacia abajo: potenciales de acción presinápticos en una interneurona-*FS*, *IPSCs* registrados en una *NEM* postsináptica a la misma, en control (negro), durante la aplicación de *SKF 81297* (1 μ M) (azul) y durante la aplicación adicional de *quinolorane* (1 μ M) (rojo). Los trazos promedio están expandidos y sobrepuestos (D_1 y D_2). **C.** No hubo cambios significativos sobre la dinámica de la *STD* durante la activación de los agonistas dopaminérgicos en esta conexión. **D.** Análisis varianza-media de las *IPSCs* del experimento en **A**: no hubo cambios significativos en la pendiente inicial de la parábola después del *quinolorane* aunque si cambia el ancho de la misma (N y/o P). Sin embargo, note que la variabilidad cuántica es la que quizás impide encontrar un ajuste significativamente diferente. (parámetro B ec. 3, ver métodos). **E.** Conexión *FS*→*SPN* que respondió al *SKF 81297*. **F.** Cambio en la pendiente inicial indicando modificaciones postsinápticas.

Resumen de la 3ª parte de los resultados:

1. Las conexiones $NEM \rightarrow NEM$ y $GP \rightarrow NEM$ aíslan la misma sinapsis. Son las versiones poblacional y unitaria de la sinapsis entre $NEMs$, respectivamente.
2. La fuerza sináptica “promedio” es mayor en la sinapsis $FS \rightarrow NEM$ que en la $NEM \rightarrow NEM$.
3. La plasticidad sináptica de ambos tipos de inhibición ($FS \rightarrow NEM$ y $NEM \rightarrow NEM$) fue la depresión de corto plazo (STD). Sin embargo, la STD de la conexión $FS \rightarrow NEM$ es más lenta.
4. La activación de los receptores a dopamina de la clase D_1 aumenta la STD , mientras que la activación de receptores a dopamina de la clase D_2 disminuye la STD .
5. Ambas clases de receptor (D_1 y D_2) parecen estar presentes en la conexión $FS \rightarrow NEM$, sin embargo, ninguno modificó la STD de la misma.

Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses

Fatuel Tecuapetla, Luis Carrillo-Reid, José Bargas and Elvira Galarraga

Depto. de Biofísica. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). PO Box, 70-253. México City, D.F. México. 04510.

Abstract. Circuit properties, such as the selection of motor synergies, have been hypothesized as relevant tasks for the recurrent inhibitory synapses between spiny projection neurons of the neostriatum; a nucleus of the basal ganglia participating in procedural learning and voluntary motor control. Here we show how the dopaminergic system regulates short term plasticity (STP) in these synapses. STP is thought to endow neuronal circuits with computational powers such as gain control, filtering, and the emergence of transitory net states. But little is known about STP regulation. Employing unitary and population synaptic recordings we observed that activation of dopamine receptors can modulate STP between spiny neurons. A D₁-class agonist enhances whereas a D₂-class agonist decreases short term depression; most probably via synaptic redistribution. Presynaptic receptors appeared to be responsible for this modulation. In contrast, STP between fast-spiking interneurons and spiny projection neurons is largely unregulated in spite of expressing presynaptic receptors. Thus, the present experiments provide a novel explanation of dopamine actions at the circuit level: the control of STP between lateral connections of output neurons and the reorganization of the balance between different forms of inhibitory transmission. Theoretically, D₁ receptors would promote a sensitive responsive state for temporal precision (dynamic component) whereas D₂ receptors would sense background activity (static component).

7. DISCUSIÓN

La selección y organización de las sinergias motoras depende de la inhibición recíproca entre neuronas espinosas medianas (Groves, 1983; Wickens et al., 1991; Beiser y Houk, 1998; Wickens y Oorshchot, 2000; Bar-Gad y Bergman, 2001; Plenz, 2003; Nicola et al., 2004; Koós et al 2004a, b; Latash et al., 2005; Silkis, 2006). La presente tesis muestra evidencia experimental de que el proceso que controla la plasticidad sináptica de corto plazo en la inhibición recíproca entre neuronas espinosa medianas, la depresión de corto plazo o *STD*, está modulado por el sistema dopaminérgico, el cual regula los canales de calcio que controlan la liberación, y en consecuencia, modifica la probabilidad de liberación. Esto es, la probabilidad de liberación se redistribuye entre las terminales, permitiendo a las sinapsis cambiar su capacidad de transmitir información (Tsodiks y Markram, 1997; Abbott et al., 1997; Abbott y Regehr, 2004).

Las diferentes entradas inhibitorias a la neurona espinosa mediana pueden ser puestas de manifiesto con estimulación de campo.

Se investigó la posibilidad de activar diferentes fuentes de inhibición sobre las *NEMs* por medio de la estimulación de campo. Esta investigación se basó en dos hechos: 1) los registros de pares de neuronas sinápticamente conectadas han mostrado que las sinapsis de diferentes orígenes presentan propiedades funcionales distintas (Gibson y Connors, 2003; Jonas et al. 2004; Whittington y Traub, 2003) y 2) la evidencia disponible mostraba que esto también sucedía en el neocórtex (Kawaguchi et al., 1995; Koós y Tepper, 1999; Kubota y Kawaguchi,

2000). Esto sugirió que las propiedades funcionales de las diferentes sinapsis GABAérgicas dentro del neostriado podrían ponerse de manifiesto con, por ejemplo, las curvas intensidad-amplitud y los canales de calcio utilizados para la liberación del transmisor. Así, registrando *IPSCs* provocados por estimulación de campo en *NEMs* postsinápticas, pudimos observar diferentes propiedades funcionales de las sinapsis inhibitoras cuando la estimulación se realizaba desde el globo pálido (*GP*→*NEM*) o en el mismo neostriado (*NE*→*NEM*).

Con el protocolo *GP*→*NEM*, se provocaron *IPSCs* con amplitud máxima (A_{max}) de ≈ 150 pA, y un factor de reclutamiento (k) de ≈ 10 pA por unidad umbral. El estímulo necesario para llegar al 50 % de la amplitud máxima (I_h) estuvo muy cerca de la estimulación umbral (1.3 unidades umbral), sugiriendo que estaba estimulando fibras y/o terminales con propiedades muy similares (Tabla 1). Estas *IPSCs* fueron sensibles a ω -CgTx y ω -AgaTK (*PD14*) indicando que tanto los canales de calcio de tipo N (CaV2.2) como los de tipo P/Q (CaV2.1) estaban implicados en la liberación del neurotransmisor. En cambio, la estimulación *NS*→*NEM* evocó dos tipos de *IPSCs*. Ambas mostraron una amplitud máxima (A_{max}) alrededor del doble que la obtenida estimulando en el *GP* (≈ 300 pA), sugiriendo que la fuerza sináptica es mayor en las sinapsis estimuladas con este protocolo (Kita, 1993, 1996; Delgado et al., 2000). Sin embargo, el factor de reclutamiento fue menor: ≈ 4 pA / unidad umbral, indicando una mayor dispersión y variedad anatómica de fibras aferentes y/o terminales alrededor del electrodo de estimulación; incluso probablemente, diversas velocidades de conducción (Erlanger y Gasser, 1937). Estos datos sugieren que la estimulación intraestriatal

activa diversas clases de entradas inhibitoras, mientras que desde el GP se halla mayor uniformidad.

La heterogeneidad en el *NE* era esperada, pues hay distintos tipos de interneuronas además de las mismas colaterales axónicas que interconectan a las *NEMs* (e.g., Jonas et al., 2004; Whittington y Traub, 2003). Esto se corroboró al ver que un grupo de sinapsis intraestriatal (ca., 50 %) mostró una menor sensibilidad a la ω -*CgTx* que el otro grupo que de manera casi exclusiva utiliza al canal P/Q para la liberación. El grupo sensible a la ω -*CgTx* también fue sensible a la ω -*Aga TK*. Así, hubo diferencias funcionales entre las sinapsis estimuladas con el protocolo *GP*→*NEM* y las provocadas con el protocolo *NE*→*NEM*. Concluimos que acaso se podrían aislar más específicamente las diferentes fuentes de inhibición sobre estas neuronas. Por lo que el interés de la tesis recayó en las sinapsis que parecía se podían aislar más homogéneamente estimulando desde el *GP*: esto es, las sinapsis de la inhibición lateral entre las *NEMs*. Trabajos futuros podrán enfocarse a las sinapsis que se activan dentro del mismo *NE*.

Las sinapsis de las NEMs, activadas por estimulación desde el globo pálido (GP→NEM), se originan exclusivamente de los axones colaterales que interconectan a las NEM.

Aparte de la homogeneidad funcional descrita arriba, una serie de evidencias se han ido acumulando para afirmar que con estimulación de campo desde el *GP*, se estimula un solo tipo de sinapsis sobre las *NEMs*, sin contaminantes; hecho de gran relevancia fisiológica y farmacológica. Estos son:

1. En un trabajo previo, se destruyeron las neuronas intrínsecas del *GP* (eliminando la conexión *pálido-estriatal*; Bevan et al., 1998; Kita y Kita 2001) y se obtuvieron *IPSCs* sobre las *NEMs*, similares a los descritos aquí (Guzman et al., 2003).
2. La estimulación desde el *GP* puede evocar potenciales de acción antidrómicos en las *NEMs* cuando la neurona es registrada sin QX-314 en la pipeta de registro (ver apéndice C).
3. La aplicación local de glutamato en el *GP*, no incrementa la presencia de las *IPSCs* espontáneas en las *NEM* (Guzman et al., 2003), mostrando que las sinapsis de neuronas palidales sobre la *NEM* son escasas.
4. A la edad *PD14*, estas sinapsis utilizan los canales de calcio de los tipos N (CaV2.2) y P/Q (CaV2.1) para la liberación de neurotransmisor. Los mismos canales se encuentran en la membrana somatodendrítica de las *NEMs* a esta edad. Sin embargo, a edades posteriores (*PD40*), tanto la membrana somatodendrítica de las *NEMs*, como las terminales estimuladas desde el *GP*, muestran una reorganización de los canales de calcio llegando a un predominio de los P/Q (CaV2.1), y reduciéndose mucho la influencia de los N (CaV2.2).
5. Encontramos que las *IPSCs* de la vía pálido estriatal [*GP*→*FS*] tiene propiedades funcionales muy distintas a las encontradas en las *NEMs*.
6. No encontramos diferencias significativas en los parámetros de forma ("*shape index*") tales como la duración a la amplitud media y el tiempo al pico, entre la respuesta provocada por estimulación de campo desde el *GP* y la obtenida entre pares de *NEMs*.

7. No encontramos diferencias significativas en la cinética de la *STD* entre la respuesta provocada por estimulación de campo desde el *GP* y la obtenida entre pares de *NEMs*. Recordemos que la cinética de la *STP* de una sinapsis es muy particular.

8. Al investigar la modulación dopaminérgica presináptica que modula la *STD* entre pares de *NEMs*, resultó ser virtualmente idéntica a la obtenida al estimular antidrómicamente desde el *GP*.

Juntos, estos datos indican fuertemente que las *IPSCs* registradas en una *NEM* por estimulación de campo en el *GP* son corrientes aisladas de uno sólo tipo de sinapsis, la que conecta a las *NEMs* entre sí.

La estimulación intraestriatal (NE→NEM) evoca IPSCs provenientes principalmente de interneuronas

Evidencias reportadas previamente sugieren que la estimulación de campo intraestriatal estimula, a distancias mayores de 500 μm , y de manera predominante, las sinapsis de las interneuronas locales sobre las *NEMs* (Jaeger et al. 1994; Kita 1993, 1996; Koós y Tepper, 1999; Tepper et al., 1998; Delgado et al., 2000). Otras evidencias que respaldan esta aseveración son:

1. En la corteza y en el neocórtex, los contactos registrados entre neuronas principales decaen a cero cuando nos alejamos a más de 250 μm en los registros de pares de neuronas (Hellwig, 2000; Holmgren et al., 2003; Koós y Tepper, 1999; Tunstall et al., 2002). Sin embargo, los contactos entre interneuronas y la neurona principal no decaen significativamente a estas distancias (Holmgren et al., 2003),

pues la arborización axonal de las interneuronas ocupa mucho más volumen (Gupta et al., 2000; Tepper y Bolam, 2004). Como en esta tesis la distancia utilizada entre el electrodo de registro y el electrodo de estimulación nunca fue menor a 0.5-1.0 mm, se infiere que las *IPSCs* venían de las interneuronas.

2. A pesar de que la distancia entre los electrodos de registro y de estimulación fue la misma, la amplitud máxima (A_{max}) promedio alcanzada es mayor en el caso de la estimulación intraestriatal (Kita 1993; Koós y Tepper, 1999; Koós et al., 2004). Esto resultados se correlacionan con el hecho de que existe una menor amplitud en la conexión entre pares de *NEMs* que entre interneuronas *FS* y *NEMs* (Koós et al., 1999; Koós et al., 2004; Gustafson et al., 2006). No sólo eso, la correlación entre la amplitud de las corrientes sinápticas y CV^{-2} (proporcional al contenido cuántico) fue mayor en las conexiones *FS*→*NEM*. Esto concuerda con que se ha reportado que interneurona deja más botones, y más grandes, sobre una espinosa mediana, que los que dejan otras *NEMs* (Kubota y Kawaguchi, 2000).

3. Las funciones logísticas ajustadas a las curvas *I-A* eran heterogéneas, con una pendiente o factor de reclutamiento que acaso refleje la variedad de interneuronas (Kawaguchi et al., 1995; Tepper y Bolam, 2004).

4. Algunas interneuronas presentan *DPP* y otras *FPP* (Gupta et al., 2000; Gibson y Connors, 2003). Ambas respuestas fueron observadas utilizando estimulación de campo en el *NE*.

5. Las *IPSCs* provocadas intraestriatalmente que mostraron poca sensibilidad a la ω -*CgTx*, presentaron *DPP*, sugiriendo una alta probabilidad de liberación.

Características propias de las interneuronas *Fast spiking* (Poncer et al., 1997, 2000) y corroboradas por nosotros en pares *FS*→*NEM*.

En otros casos la estimulación intraestriatal provocó *IPSCs* que exhibían *FPP* y gran amplitud (A_{max}). Se sugiere que esta conexión probablemente se origina de otro tipo de interneurona (Gupta et al., 2000; Tepper y Bolam, 2004), digna de ser abordada en trabajos posteriores.

6. La modulación dopaminérgica sobre las terminales de las interneuronas tipo “*Fast spiking*” (inmunopositivas a parvalbúmina) regula la fuerza de la conexión sin afectar la plasticidad sináptica de corto plazo. Hjelmstad en el 2004, reportó que las *IPSCs* evocadas con estimulación de campo sobre una *NEM*, a pesar de ser moduladas por dopamina, no afectan la plasticidad de corto plazo (*STP*). Juntos, estos resultados muestran evidencia de que el protocolo de estimulación intraestriatal evoca *IPSCs* sobre una *NEM* que provienen preferentemente de interneuronas.

Canales de calcio utilizados para la liberación

El canal de calcio de tipo P/Q ($Ca_v2.1$) es el más importante para la transmisión sináptica GABAérgica en el neostriado. Tanto en las sinapsis pertenecientes a las colaterales axónicas de las *NEMs* como en la mitad de las sinapsis provenientes de interneuronas. Cuando los canales N ($Ca_v2.2$) y P/Q ($Ca_v2.1$) resultaron importantes, se presentó un fenómeno conocido como “superaditividad” (Wu y Saggau, 1997), que está presente en muchas sinapsis del sistema nervioso.

La reorganización de los canales de calcio que controlan la liberación de neurotransmisor durante el desarrollo lleva a su vez a un cambio en la señalización dopaminérgica de la clase D₂

La reorganización de los canales durante el desarrollo de las terminales de las *NEMs* es como sigue: la contribución de los canales de tipo N (CaV2.2) disminuye mientras la del tipo P/Q (CaV2.1) aumenta. Esta reorganización ha sido observada otras sinapsis (Iwasaki y Takahashi, 1998; Iwasaki et al., 2000; Verderio et al., 1995). Sin embargo, parece ocurrir a tiempos más tardíos en las sinapsis que interconectan a las *NEMs* (cf., Iwasaki et al., 2000; ver Tepper et al., 1998; Colwell et al., 1998).

Las *NEMs* expresan receptores a dopamina de la clase-*D₂* (e.g., Aizman et al., 2000; Surmeier et al., 1993, 1996). El número de estos receptores se incrementa durante la tercera y cuarta semana postnatales (Broaddus y Bennett, 1990), al mismo tiempo que llega la última oleada de terminales dopaminérgicas para inervar al *NE* (Antonopoulos et al., 2002). Los canales de calcio de tipo N (CaV2.2) son el blanco de la modulación dopaminérgica a edades tempranas (*PD14*). Pero ya no lo son a edades tardías (*PD40*). En estas últimas, el blanco de la modulación dopaminérgica es el canal de calcio tipo P/Q(CaV2.1). En otras palabras, la señalización se modifica adquiriendo un nuevo blanco, aquél que se convierte en el canal mayoritario, y desechando el blanco juvenil, aquél que va reduciendo su importancia. Sin embargo, la reorganización paralela de los canales y su modulación se organizan de tal manera que, en términos absolutos, es la misma en ambas edades.

Pensamos que los canales de tipo P/Q ($Ca_v2.1$) se convierten en la molécula mediante la cual la dopamina controla la liberación pues:

1. Los canales de calcio de tipo L no participan en la liberación de neurotransmisor entre *NEMs* (Tecuapetla et al., 2005b; Wu y Saggau, 1997).
2. Los canales de calcio tipo P/Q ($CaV2.1$) son los canales principales que controlan la liberación.
3. Los canales de calcio de tipo P/Q ($CaV2.1$) son desfosforilados por la activación del receptor D_2 en la membrana somatodendrítica de las *NEMs* adultas (Salgado et al., 2005).

La modulación presináptica por receptores D_2 distingue la inhibición neostriatal (Centonze et al., 2003; Cooper y Stanford, 2001; Guzman et al., 2003; Momiyama, 2003) de la entrada inhibitoria que pudiera originarse de la proyección pálido estriatal (Bevan et al., 1998, Kita y Kita, 2001); la cual se sabe, es insensible a los agonistas selectivos del receptor D_2 (Cooper y Stanford, 2001; Shin et al., 2003).

¿Cual es el impacto funcional de la reorganización de los canales de calcio de las terminales?

A los canales de calcio de tipo N ($CaV2.2$) y P/Q($CaV2.1$) les corresponden terminales que exhiben dos tipos radicalmente diferentes de plasticidad de corto plazo. Así, los canales de tipo N ($CaV2.2$) favorecen la facilitación de corto plazo, mientras que los de tipo P/Q ($CaV2.1$) favorecen la depresión de corto plazo (Scheuber et al. 2004).

Los experimentos en animales *PD14* mostraron que la estimulación *GP*→*NEM* podía encontrar sinapsis que se facilitaban o se deprimían cuando se daban pulsos pareados. En cambio, en los animales *PD40* sólo se encontró depresión (Scheuber et al., 2004; Salgado et al., 2005). Esto quiere decir que la *STD* es una propiedad de estas sinapsis que se potencia en el animal adulto.

Modulación dopaminérgica de la depresión sináptica de corto plazo (STD)

El grado de *STD* determina la frecuencia límite¹ para la transferencia de información en las sinapsis, es decir marca cuando una sinapsis pasa de transmitir fielmente la frecuencia de la presinapsis a la postsinapsis, a transmitir sólo los cambios de frecuencia (Tsodyks y Markram, 1997; Abbott et al., 1997). En general encontramos sinapsis que hacen una u otra cosa. En la presente tesis estamos mostrando que la misma sinapsis puede hacer las dos cosas pues se puede modular su nivel de *STD*. Esta modulación la realiza la dopamina. En otras palabras, la dopamina probablemente regule la sincronización entre redes neuronales del estriado (Tsodyks y Markram, 1997; O'Donovan y Rinzel, 1997; Abbott et al., 1997; Thomson, 2000b; Fuhrmann et al., 2002; Abbot y Regehr, 2004). Esto, podría modular la precisión de la selección y organización de las sinergias motoras para realizar actos voluntarios. Esto es, la dopamina permite un ajuste continuo del nivel de sincronía de la red.

¹ Frecuencia a partir de la cual la amplitud estacionaria de un tren de entradas sinápticas disminuye en proporción inversa a la frecuencia, lo cual determina que las conexiones sinápticas puedan transmitir información sólo en el momento en que suceden cambios de frecuencia. Esto hace que cuando hay mucha *STD* sólo se transfieran los cambios. En cambio, cuando hay poca *STD* la neurona postsináptica puede seguir la frecuencia de la presinapsis, de manera tónica o continua (Tsodyks y Markram, 1997).

La *STD* es incrementada por la activación del receptor a dopamina de la clase- D_1 , lo que proporcionaría al circuito (“*feedback*”) la capacidad de responder a cambios transitorios de frecuencia (Abbott et al., 1997) fortaleciendo la inhibición entre *NEMs* activadas por la corteza (Wilson, 2004). Así, probablemente, se ayudaría a seleccionar qué programas de movimientos se va a activar (Grillnet et al., 2005). Se facilitarían los cambios bruscos entre programas. Esto da lugar a un sistema fásico de detección de comandos corticales, especializado en transferir los cambios.

Por otro lado, la activación de receptores a dopamina de la clase D_2 disminuye la *STD*, lo que ajusta el microcircuito para mantener una respuesta a niveles basales de actividad (ver Abbott et al., 1997; Silberberg et al., 2004, Richardson et al., 2005) y transferir los cambios continuos o basales.

Hubo terminales que no fueron afectadas por alguno de los agonistas, respaldando la hipótesis de la segregación de los receptores dopaminérgicos en diferentes terminales sinápticas. Se tiene evidencia de que los receptores D_1 predominaría en la vía directa y los D_2 en la indirecta (Gerfen et al., 1990; 2000). Si este fuera el caso podemos hipotetizar que la vía directa es la base estructural del componente dinámico del circuito, mientras que, la vía indirecta constituye el componente estático, y en este sentido, ambas vías serían complementarias una a la otra (Albin et al., 1995; Silkis, 2006). Sin embargo, algunas conexiones unitarias (*NEM*→*NEM*) respondieron a los dos agonistas de ambas clases de receptores (tanto D_1 como D_2), sugiriendo algún grado de co-localización de los receptores (Yan et al., 1996; Deng et al., 2006; Geldwert et al., 2006; Mizuno et al., 2007).

Es importante mencionar que los agonistas empleados no distinguen entre los tipos de receptor que pertenecen a cada clase de receptor (*SKF 81297* es agonista para los receptores D_1 y D_5 ; mientras que el quinelorane es agonista para receptores D_2 , y D_3). El hecho de que las dos vías se complementen (vía directa e indirecta) es lógico (Deng et al., 2006), pues cada “set” de movimientos coordinados puede tener grupos de músculos designados para realizar acciones rápidas en secuencia (componente dinámico), y otros músculos designados para preservar el tono necesario para el mantenimiento de la postura (componente estático). Por lo tanto, al menos respecto a la *STD*, los receptores no pueden ser visualizados como opuestos sino como parte del mismo control. Una predicción de esta idea es que cuando éste control se pierde, el sistema se puede dirigir hacia uno de los extremos (e.g. en la enfermedad de Parkinson).

El otro blanco de la modulación dopaminérgica en el neostriado son las interneuronas y sus terminales sinápticas (Tepper y Plenz, 2004), las cuales controlan la salida de las *NEMs* (Nisenbaum y Berger, 1992; Berke et al., 2004; Mallet et al., 2005). Las interneuronas tipo “*Fast spiking*” son despolarizadas postsinápticamente por la dopamina a través del receptor D_1 (Bracci et al., 2002). En la mayoría de los casos no se observaron acciones presinápticas, de acuerdo con reportes previos (Nicola y Malenka, 1998; Guzman et al., 2003). Sólo en un caso (de cuatro) se observó un incremento en las *IPSCs* acompañado de una disminución en el tamaño del “*cuanto*” (Fig. 24F) (Flores-Hernández et al., 2000). Un caso similar ha sido reportado en la corteza prefrontal (Gonzalez-Islas y Hablitz, 2001). No se observaron cambios en la *STD*.

La inhibición presináptica de las sinapsis de las interneuronas por la activación del receptor D₂ había sido previamente sugerida (Delgado et al., 2000). La observamos en tres de cuatro (75 %) registros de pares *FS*→*NEM*. Notablemente, la *STD* tampoco sufrió cambios. Puede haber modulación presináptica de la fuerza sináptica sin afectar la plasticidad de corto plazo (Hefft y Jonas, 2005). Esta tesis muestra este fenómeno por primera vez en el *NE*. Recordemos que todas las interneuronas del telencéfalo tienen el mismo origen embrionario (Marin et al., 2000; Xu et al., 2004). Se infiere de esto que la modulación de la *STD* en este tipo de interneuronas no depende de condiciones post diferenciación (ver Sippy et al., 2003).

El hecho de que el sistema dopaminérgico cambia la *STD* en unas conexiones y no en otras puede llevar a un re-arreglo en el balance funcional entre los diferentes tipos de inhibición (Tepper y Plenz, 2004; Richardson et al., 2005).

La modulación presináptica de la liberación de neurotransmisores es mucho más que la regulación de la fuerza sináptica

La plasticidad de corto plazo depende principalmente de la presinapsis en la mayoría de las sinapsis estudiadas a la fecha, aunque algunos mecanismos en la postsinapsis como la desensibilización de los receptores pueden tener participación en algunas sinapsis (Jensen et al., 1999; Gupta et al., 2000). Esto significa que el parámetro principal en el control de la plasticidad es la probabilidad de liberación y la tasa del restablecimiento de las vesículas en los sitios activos de la terminal (Tsodyks y Markram, 1997; Thomson, 2000a; Brenowitz y Trussell, 2001; Rosov et al 2001; Hefft y Jonas 2005; Wang et al., 2006). Esto es, la

probabilidad de liberación de cada sitio de liberación se está configurando todo el tiempo y es distinta en cada sitio de liberación. Lo que hace la modulación es reconfigurar estas probabilidades originando la redistribución sináptica.

La probabilidad de liberación depende de la dinámica del calcio de la terminal (Zucker y Regehr, 2002; Rosov et al., 2001; Felmy et al., 2003; Rusakov y Fine, 2003; Bollmann y Sakman, 2005; Xu y Wu, 2005). Pero la dinámica de calcio en la presinapsis refleja el “uso” o “historia” de la actividad de la red (Tsodyks y Markram, 1997; Thomson, 2000a; Rosov et al., 2001; Fuhrmann et al., 2002; Froemke y Dan, 2002; Thomson et al., 2002; Silberberg et al., 2004; Xu y Wu, 2005). La probabilidad de liberación puede ser modulada por receptores presinápticos (Schuman y Madison, 1991; Shibuki y Okada, 1991; Borst y Sakmann, 1998; Geiger y Jonas, 2000; Parnas et al., 2000; Wilson y Nicoll 2001; Kreitzer y Regehr, 2001; Guzman et al., 2003; Salgado et al., 2005; Brenowitz y Regehr, 2005; Namiki et al., 2005; Geldwert et al., 2006). Por tanto, los receptores presinápticos pueden ser concebidos como sensores y reguladores de la dinámica y las propiedades computacionales del circuito, y no simplemente, como moduladores de la fuerza de las conexiones.

Por ejemplo, las manipulaciones que reducen la probabilidad de liberación enlentecen la constante de tiempo de la depresión produciendo una menor *STD*. Esto no modifica la amplitud de los últimos *IPSCs* en un tren. Esta es la imagen característica de la redistribución sináptica en las sinapsis que presentan *STD* (Markram et al., 1996; Tsodyks y Markram, 1997; Abbott y Regehr, 2004; Wang et al., 2006). Este mecanismo parece ser el seleccionado por la modulación dopaminérgica en las sinapsis que interconectan a las *NEMs* para modular la *STD*.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott LF, Nelson SB (2000) Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci* 3:1178-1183.

Abbott LF, Regehr WG (2004) Synaptic computation. *Nature* 431:796-803.

Abbott LF, Varela JA, Sen K, Nelson SB (1997) Synaptic depression and cortical gain control. *Science* 275:220-224.

Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey AI, Forsberg H, Greengard P, Aperia A (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3:226-230.

Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.

Albin RL, Young AB, Penney JB (1995) The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 18:63-64.

Alheid GF, Heimer L (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27:1-39.

Allen C, Stevens CF (1994) An evaluation of causes for unreliability of synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10380-10383.

Andersen PH, Jansen JA (1990) Dopamine receptor agonists: selectivity and dopamine D1 receptor efficacy. *Eur J Pharmacol* 188:335-347.

Antonopoulos J, Dori I, Dinopoulos A, Chiotelli M, Parnavelas JG (2002) Postnatal development of the dopaminergic system of the striatum in the rat. *Neuroscience* 110:245-256.

Ariano MA, Stromski CJ, Smyk-Randall EM, Sibley DR (1992) D2 dopamine receptor localization on striatonigral neurons. *Neurosci Lett* 144:215-220.

Armstrong DM, Saper CB, Levey AI, Wainer BH, Terry RD (1983) Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 216:53-68.

Aronin N, Chase K, DiFiglia M (1986) Glutamic acid decarboxylase and enkephalin immunoreactive axon terminals in the rat neostriatum synapse with striatonigral neurons. *Brain Res* 365:151-158.

Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E (1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377:424-428.

Baldelli P, Hernandez-Guijo JM, Carabelli V, Carbone E (2005) Brain-derived neurotrophic factor enhances GABA release probability and nonuniform distribution of N- and P/Q-type channels on release sites of hippocampal inhibitory synapses. *J Neurosci* 25:3358-3368.

Bar-Gad I, Bergman H (2001) Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 11:689-695.

Bar-Gad I, Morris G, Bergman H (2003) Information processing, dimensionality reduction and reinforcement learning in the basal ganglia. *Prog Neurobiol* 71:439-473.

Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122:261-273.

Beiser DG, Houk JC (1998) Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events. *J Neurophysiol* 79:3168-3188.

Bennet BD, Wilson CJ (2000) Synaptology and physiology of neostriatal neurons. In: *Brain dynamics and striatal complex* (Miller R, Wickens JR, eds), pp 11-140. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

Bennett BD, Bolam JP (1993) Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat. *Brain Res* 609:137-148.

Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1995) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15:7821-7836.

Berke JD, Okatan M, Skurski J, Eichenbaum HB (2004) Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron* 43:883-896.

Besson MJ, Graybiel AM, Quinn B (1990) Co-expression of neuropeptides in the cat's striatum: an immunohistochemical study of substance P, dynorphin B and enkephalin. *Neuroscience* 39:33-58.

Bevan MD, Bolam JP (1995) Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci* 15:7105-7120.

Bevan MD, Wilson CJ (1999) Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci* 19:7617-7628.

Bevan MD, Crossman AR, Bolam JP (1994) 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* 659:99-109.

Bevan MD, Booth PAC, Eaton SA, Bolam JP (1998) Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *Journal of Neuroscience* 18,22:9438-9452.

Biro AA, Holderith NB, Nusser Z (2006) Release probability-dependent scaling of the postsynaptic responses at single hippocampal GABAergic synapses. *J Neurosci* 26:12487-12496.

Bishop GA, Chang HT, Kitai ST (1982) Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 7:179-191.

Bolam JP, Izzo PN (1988) The postsynaptic targets of substance P-immunoreactive terminals in the rat neostriatum with particular reference to identified spiny striatonigral neurons. *Exp Brain Res* 70:361-377.

Bolam JP, Smith Y (1992) The striatum and the globus pallidus send convergent synaptic inputs onto single cells in the entopeduncular nucleus of the rat: a double anterograde labelling study combined with postembedding immunocytochemistry for GABA. *J Comp Neurol* 321:456-476.

Bolam JP, Smith Y (1995) Microcircuitry of the neostriatum. In: *Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function* (Ariano MA, Surmeier DJ, eds), pp 1-20. Austin: Landes.

Bolam JP, Wainer BH, Smith AD (1984) Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12:711-718.

Bolam JP, Powell JF, Wu JY, Smith AD (1985) Glutamate decarboxylase-immunoreactive structures in the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study including a combination of Golgi impregnation with immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 237:1-20.

Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4):527-542.

Bolam JP, Somogyi P, Takagi H, Fodor I, Smith AD (1983a) Localization of substance P-like immunoreactivity in neurons and nerve terminals in the neostriatum of the rat: a correlated light and electron microscopic study. *Journal of Neurocytology* 12:325-344.

Bolam JP, Somogyi P, Takagi H, Fodor I, Smith AD (1983b) Localization of substance P-like immunoreactivity in neurons and nerve terminals in the neostriatum of the rat: a correlated light and electron microscopic study. *J Neurocytol* 12:325-344.

Bolam JP, Smith Y, Ingham CA, von Krosigk M, Smith AD (1993) Convergence of synaptic terminals from the striatum and the globus pallidus onto single neurones in the substantia nigra and the entopeduncular nucleus. *Prog Brain Res* 99:73-88.

Bollmann JH, Sakmann B (2005) Control of synaptic strength and timing by the release-site Ca²⁺ signal. *Nat Neurosci* 8:426-434.

Borst JG, Sakmann B (1998) Calcium current during a single action potential in a large presynaptic terminal of the rat brainstem. *J Physiol* 506 (Pt 1):143-157.

Bracci E, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2002) Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J Neurophysiol* 87:2190-2194.

Brenowitz S, Trussell LO (2001) Minimizing synaptic depression by control of release probability. *J Neurosci* 21:1857-1867.

Brenowitz S, David J, Trussell L (1998) Enhancement of synaptic efficacy by presynaptic GABA(B) receptors. *Neuron* 20:135-141.

Brenowitz SD, Regehr WG (2005) Associative short-term synaptic plasticity mediated by endocannabinoids. *Neuron* 45:419-431.

Broaddus WC, Bennett JP, Jr. (1990) Postnatal development of striatal dopamine function. I. An examination of D1 and D2 receptors, adenylate cyclase regulation and presynaptic dopamine markers. *Brain Res Dev Brain Res* 52:265-271.

Buchwald NA, Price DD, Vernon L, Hull CD (1973) Caudate intracellular response to thalamic and cortical inputs. *Exp Neurol* 38:311-323.

Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48:591-604.

Carter DA, Fibiger HC (1978) The projections of the entopeduncular nucleus and globus pallidus in rat as demonstrated by autoradiography and horseradish peroxidase histochemistry. *J Comp Neurol* 177:113-123.

Centonze D, Grande C, Usiello A, Gubellini P, Erbs E, Martin AB, Pisani A, Tognazzi N, Bernardi G, Moratalla R, Borrelli E, Calabresi P (2003) Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *J Neurosci* 23:6245-6254.

Cepeda C, Levine MS (1998) Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci* 20:1-18.

Chang HT, Wilson CJ, Kitai ST (1981) Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Science* 213:915-918.

Chang HT, Wilson CJ, Kitai ST (1982) A Golgi study of rat neostriatal neurons: light microscopic analysis. *J Comp Neurol* 208:107-126.

Chesselet MF, Graybiel AM (1986) Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience* 17:547-571.

Chevalier G, Deniau JM (1990) Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends Neurosci* 13:277-280.

Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:281-307.

Clements JD, Silver RA (2000) Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends Neurosci* 23:105-113.

Colwell CS, Cepeda C, Crawford C, Levine MS (1998) Postnatal development of glutamate receptor-mediated responses in the neostriatum. *Dev Neurosci* 20:154-163.

Cooper AJ, Stanford IM (2001) Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41:62-71.

Cowan RL, Wilson CJ, Emson PC, Heizmann CW (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 302:197-205.

Czubayko U, Plenz D (2002) Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15764-15769.

David DJ, Harrison MB (2002) Colocalization of dopaminergic and muscarinic receptor subtypes on medium spiny striatal neurons in the rat. In: Washington, D.C.: Society for Neurosciences.

Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9:251-259.

Delgado A, Sierra A, Querejeta E, Valdiosera RF, Aceves J (2000) Inhibitory control of the GABAergic transmission in the rat neostriatum by D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 95:1043-1048.

DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.

Deng YP, Lei WL, Reiner A (2006) Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. *J Chem Neuroanat* 32:101-116.

DiFiglia M (1987) Synaptic organization of cholinergic neurons in the monkey neostriatum. *J Comp Neurol* 255:245-258.

DiFiglia M, Carey J (1986) Large neurons in the primate neostriatum examined with the combined Golgi-electron microscopic method. *J Comp Neurol* 244:36-52.

DiFiglia M, Pasik P, Pasik T (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* 114:245-256.

Dittman JS, Kreitzer AC, Regehr WG (2000) Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci* 20:1374-1385.

Divac I, Fonnum F, Storm-Mathisen J (1977) High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature* 266:377-378.

Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18:995-1008.

Dumitriu D, Cossart R, Huang J, Yuste R (2007) Correlation between axonal morphologies and synaptic input kinetics of interneurons from mouse visual cortex. *Cereb Cortex* 17:81-91.

Dunwiddie TV, Haas HL (1985) Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol* 369:365-377.

Erlanger J, Gasser HS (1937) Electrical signs of nervous activity. Philadelphia, P.A.: Cited by Junge, D. En: *Nerve and Muscle Excitation* 3ra. Editado por Sinauer, MA.

Felmy F, Neher E, Schneggenburger R (2003) Probing the intracellular calcium sensitivity of transmitter release during synaptic facilitation. *Neuron* 37:801-811.

Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, Cheramy A, O'Callaghan JP, Miller DB, Cole DG, Corbett R, Haile CN, Cooper DC, Onn SP, Grace AA, Ouimet CC, White FJ, Hyman SE, Surmeier DJ, Girault J, Nestler EJ, Greengard P (1998) DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281:838-842.

Fisher RS, Buchwald NA, Hull CD, Levine MS (1986) Neurons of origin of striatonigral axons in the cat: connectivity and Golgi markers of somatodendritic architecture. *Brain Res* 397:173-180.

Floran B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D (1990) Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 116:136-140.

Floran B, Floran L, Sierra A, Aceves J (1997) D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett* 237:1-4.

Flores-Hernandez J, Hernandez S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P, Surmeier DJ (2000) D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol* 83:2996-3004.

Foreman MM, Fuller RW, Hynes MD, Gidda JS, Nichols CL, Schaus JM, Kornfeld EC, Clemens JA (1989) Preclinical studies on quinelorane, a potent and highly selective D2-dopaminergic agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 250:227-235.

Freund TF (2003) Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26:489-495.

Froemke RC, Dan Y (2002) Spike-timing-dependent synaptic modification induced by natural spike trains. *Nature* 416:433-438.

Fuhrmann G, Segev I, Markram H, Tsodyks M (2002) Coding of temporal information by activity-dependent synapses. *J Neurophysiol* 87:140-148.

Geiger JR, Jonas P (2000) Dynamic control of presynaptic Ca(2+) inflow by fast-inactivating K(+) channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* 28:927-939.

Geldwert D, Norris JM, Feldman IG, Schulman JJ, Joyce MP, Rayport S (2006) Dopamine presynaptically and heterogeneously modulates nucleus accumbens medium-spiny neuron GABA synapses in vitro. *BMC Neurosci* 7:53.

Gerfen CR (2000) Dopamine-mediated gene regulation in models of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47:S42-50; discussion S50-42.

Gerfen CR (2006) Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 9:157-158.

Gerfen CR, Young WS, 3rd (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460:161-167.

Gerfen CR, Wilson CJ (1996) The basal ganglia. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Swanson LW, Bjorklund A, Hkfelt T, eds), pp 371-468: Elsevier Science BV.

Gerfen CR, Baimbridge KG, Miller JJ (1985) The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8780-8784.

Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P (2002) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci* 22:5042-5054.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.

Gibson JR, B.W. C (2003) Neocortex: Chemical and electrical synapses. In: *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks* (Arbib MA, ed), pp 725-729. Cambridge, M.A.: MIT Press.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379:606-612.

Glanz SA (2002) *Biostatistics*. New York: McGraw-Hill.

Godukhin OV, Zharikova AD, Novoselov VI (1980) The release of labeled L-glutamic acid from rat neostriatum in vivo following stimulation of frontal cortex. *Neuroscience* 5:2151-2154.

Gonzalez-Islas C, Hablitz JJ (2001) Dopamine inhibition of evoked IPSCs in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 86:2911-2918.

Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M (1985) A Golgi study of the human neostriatum: neurons and afferent fibers. *J Comp Neurol* 234:317-333.

Graybiel AM (2005) The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol* 15:638-644.

Graybiel AM, Baughman RW, Eckenstein F (1986) Cholinergic neuropil of the striatum observes striosomal boundaries. *Nature* 323:625-627.

Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23:435-447.

Grillner S, Hellgren J, Menard A, Saitoh K, Wikstrom MA (2005) Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28:364-370.

Groves PM (1983) A theory of the functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movement. *Brain Res* 286:109-132.

Gupta A, Wang Y, Markram H (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287:273-278.

Gustafson N, Gireesh-Dharmaraj E, Czubyko U, Blackwell KT, Plenz D (2006) A comparative voltage and current-clamp analysis of feedback and feedforward

synaptic transmission in the striatal microcircuit in vitro. *J Neurophysiol* 95:737-752.

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

Haber SN, Nauta WJ (1983) Ramifications of the globus pallidus in the rat as indicated by patterns of immunohistochemistry. *Neuroscience* 9:245-260.

Hanse E, Gustafsson B (2001a) Quantal variability at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 531:467-480.

Hanse E, Gustafsson B (2001b) Paired-pulse plasticity at the single release site level: an experimental and computational study. *J Neurosci* 21:8362-8369.

Hassler R, Haug P, Nitsch C, Kim JS, Paik K (1982) Effect of motor and premotor cortex ablation on concentrations of amino acids, monoamines, and acetylcholine and on the ultrastructure in rat striatum. A confirmation of glutamate as the specific cortico-striatal transmitter. *J Neurochem* 38:1087-1098.

Hefft S, Jonas P (2005) Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat Neurosci* 8:1319-1328.

Hefft S, Kraushaar U, Geiger JR, Jonas P (2002) Presynaptic short-term depression is maintained during regulation of transmitter release at a GABAergic synapse in rat hippocampus. *J Physiol* 539:201-208.

Hellwig B (2000) A quantitative analysis of the local connectivity between pyramidal neurons in layers 2/3 of the rat visual cortex. *Biol Cybern* 82:111-121.

Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J Neurosci* 17:3334-3342.

Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]₁-IP₃-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987-8995.

Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R (2000) Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol Rev* 80:953-978.

Hjelmstad GO (2004) Dopamine excites nucleus accumbens neurons through the differential modulation of glutamate and GABA release. *J Neurosci* 24:8621-8628.

Holmgren C, Harkany T, Svennenfors B, Zilberter Y (2003) Pyramidal cell communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex. *J Physiol* 551:139-153.

Hornykiewicz O (1973) Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA). *Br Med Bull* 29:172-178.

Iwasaki S, Takahashi T (1998) Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol* 509 (Pt 2):419-423.

Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel OD, Takahashi T (2000) Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci* 20:59-65.

Izzo PN, Graybiel AM, Bolam JP (1987) Characterization of substance p- and [met]enkephalin-immunoreactive neurons in the caudate nucleus of cat and ferret by a single section golgi procedure. *Neuroscience* 20,2:577-587.

Jaeger D, Kita H, Wilson CJ (1994) Surround Inhibition Among Projection Neurons is Weak or Nonexistent in the Rat Neostriatum. *Journal of Neurophysiology* 72,4:1-4.

Jonas P, Bischofberger J, Fricker D, Miles R (2004) Interneuron Diversity series: Fast in, fast out--temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *Trends Neurosci* 27:30-40.

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

Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *Journal of Neuroscience* 13,11:4908-4923.

Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476-486.

Kawaguchi Y, Kubota Y (1998) Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* 85:677-701.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1989) Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *Journal of Neurophysiology* 62,5:1052-1068.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10:3421-3438.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.

Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.

Kemp JM, Powell TP (1971) The site of termination of afferent fibres in the caudate nucleus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:413-427.

Kita H (1993) GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99:51-72.

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

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

Kita H, Kita T (2001) Number, origins, and chemical types of rat pallidostriatal projection neurons. *J Comp Neurol* 437:438-448.

Kita H, Kosaka T, Heizmann CW (1990) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 536:1-15.

Kitai ST, Kocsis JD, Preston RJ, Sugimori M (1976) Monosynaptic inputs to caudate neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res* 109:601-606.

Kiyatkin EA, Rebec GV (1996) Dopaminergic modulation of glutamate-induced excitations of neurons in the neostriatum and nucleus accumbens of awake, unrestrained rats. *J Neurophysiol* 75:142-153.

Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P (2003) Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421:844-848.

Kocsis JD, Sugimori M, Kitai ST (1977) Convergence of excitatory synaptic inputs to caudate spiny neurons. *Brain Res* 124:403-413.

Konnerth A, Llano I, Armstrong CM (1990) Synaptic currents in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2662-2665.

Koos T, Tepper JM (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2:467-472.

Koos T, Tepper JM (2002) Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci* 22:529-535.

Koos T, Tepper JM, Wilson CJ (2004) Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24:7916-7922.

Korn H (1998) Correlation of morphology and function: the one-vesicle hypothesis at Mauthner neuron inhibitory synapses. In: *Central Synapses: Quantal Mechanisms and Plasticity* (Faber DS, Korn H, Redman SJ, Thompson SM, Altman JS, eds), pp 37-46. Strasbourg: HFSP.

Kreitzer AC, Regehr WG (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29:717-727.

Kubota Y, Kawaguchi Y (1993) Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J Comp Neurol* 332:499-513.

Kubota Y, Kawaguchi Y (2000) Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. *J Neurosci* 20:375-386.

Latash ML, Shim JK, Smilga AV, Zatsiorsky VM (2005) A central back-coupling hypothesis on the organization of motor synergies: a physical metaphor and a neural model. *Biol Cybern* 92:186-191.

Le Moine C, Bloch B (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355:418-426.

Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4205-4209.

Lee KW, Kim Y, Kim AM, Helmin K, Nairn AC, Greengard P (2006) Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3399-3404.

Lemus-Aguilar I, Bargas J, Tecuapetla F, Galarraga E, Carrillo-Reid L (2006) Diseño modular de instrumentación virtual para la manipulación y análisis de senales electrofisiológicas. *Rev Mex Ing Biomed* 27:82-92.

Levesque M, Parent A (2005) The striatofugal fiber system in primates: a reevaluation of its organization based on single-axon tracing studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11888-11893.

Levey AI, Wainer BH, Mufson EJ, Mesulam MM (1983) Co-localization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat cerebrum. *Neuroscience* 9:9-22.

Levine MS, Altemus KL, Cepeda C, Cromwell HC, Crawford C, Ariano MA, Drago J, Sibley DR, Westphal H (1996) Modulatory actions of dopamine on NMDA receptor-mediated responses are reduced in D_{1A}-deficient mutant mice. *Journal of Neuroscience* 16:5870-5882.

Ling DS, Benardo LS (1999) Restrictions on inhibitory circuits contribute to limited recruitment of fast inhibition in rat neocortical pyramidal cells. *J Neurophysiol* 82:1793-1807.

Lubow RE (2005) Construct validity of the animal latent inhibition model of selective attention deficits in schizophrenia. *Schizophr Bull* 31:139-153.

Maccaferri G, Lacaille JC (2003) Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications--making things as simple as possible, not simpler. *Trends Neurosci* 26:564-571.

Mahon S, Vautrelle N, Pezard L, Slaght SJ, Deniau JM, Chouvet G, Charpier S (2006) Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep-wake cycle. *J Neurosci* 26:12587-12595.

Mallet N, Le Moine C, Charpier S, Gonon F (2005) Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. *J Neurosci* 25:3857-3869.

Marin O, Anderson SA, Rubenstein JL (2000) Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20:6063-6076.

Markram H, Tsodyks M (1996) Redistribution of synaptic efficacy between neocortical pyramidal neurons. *Nature* 382:807-810.

McGeer PL, McGeer EG, Scherer U, Singh K (1977) A glutamatergic corticostriatal path? *Brain Res* 128:369-373.

Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16:815-823.

Mink JW, Thach WT (1991) Basal ganglia motor control. I. Nonexclusive relation of pallidal discharge to five movement modes. *J Neurophysiol* 65:273-300.

Mink JW, Thach WT (1993) Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. *Curr Opin Neurobiol* 3:950-957.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.

Mizuno T, Schmauss C, Rayport S (2007) Distinct roles of presynaptic dopamine receptors in the differential modulation of the intrinsic synapses of medium-spiny neurons in the nucleus accumbens. *BMC Neurosci* 8:8.

Momiyama T (2003) Parallel decrease in omega-conotoxin-sensitive transmission and dopamine-induced inhibition at the striatal synapse of developing rats. *J Physiol* 546:483-490.

Moriizumi T, Nakamura Y, Okoyama S, Kitao Y (1987) Synaptic organization of the cat entopeduncular nucleus with special reference to the relationship between the afferents to entopedunculothalamic projection neurons: an electron microscope study by a combined degeneration and horseradish peroxidase tracing technique. *Neuroscience* 20:797-816.

Nakanishi H, Kita H, Kitai ST (1987) 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* 437:45-55.

Namiki S, Kakizawa S, Hirose K, Iino M (2005) NO signalling decodes frequency of neuronal activity and generates synapse-specific plasticity in mouse cerebellum. *J Physiol* 566:849-863.

Nicola SM, Malenka RC (1998) Modulation of synaptic transmission by dopamine and norepinephrine in ventral but not dorsal striatum. *J Neurophysiol* 79:1768-1776.

Nicola SM, Kambian SB, Malenka RC (1996) Psychostimulants depress excitatory synaptic transmission in the nucleus accumbens via presynaptic D1-like dopamine receptors. *J Neurosci* 16:1591-1604.

Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.

Nicola SM, Woodward Hopf F, Hjelmstad GO (2004) Contrast enhancement: a physiological effect of striatal dopamine? *Cell Tissue Res* 318:93-106.

Nisenbaum ES, Berger TW (1992) Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by GABAergic and dopaminergic inputs--I. In vivo analysis. *Neuroscience* 48:561-578.

Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997) Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17:8147-8155.

O'Donovan MJ, Rinzel J (1997) Synaptic depression: a dynamic regulator of synaptic communication with varied functional roles. *Trends Neurosci* 20:431-433.

Oertel WH, Mugnaini E (1984) Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci Lett* 47:233-238.

Oorschot DE (1996) Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol* 366:580-599.

Park MR, Lighthall JW, Kitai ST (1980) Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res* 194:359-369.

Parnas H, Segel L, Dudel J, Parnas I (2000) Autoreceptors, membrane potential and the regulation of transmitter release. *Trends Neurosci* 23:60-68.

Parra P, Gulyas AI, Miles R (1998) How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron* 20:983-993.

Paulsen O (1998) The importance of independent estimates of quantal parameters. In: *Central synapses quantal mechanisms and plasticity* (Faber DS, Korn H, Redman SJ, Thompson SM, Altman JS, eds), pp 47-55. Strasbourg: HFSP.

Paulsen O, Heggelund P (1994) The quantal size at retinogeniculate synapses determined from spontaneous and evoked EPSCs in guinea-pig thalamic slices. *J Physiol* 480 (Pt 3):505-511.

Paulsen O, Moser EI (1998) A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 21:273-278.

Penny GR, Afsharpour S, Kitai ST (1986) The glutamate decarboxylase-, leucine enkephalin-, methionine enkephalin- and substance P-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: evidence for partial population overlap. *Neuroscience* 17:1011-1045.

Perez-Garci E, Bargas J, Galarraga E (2003) The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14:1253-1256.

Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman JN, Galarraga E, Bargas J (2005) Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca²⁺ channels. *J Neurophysiol* 93:2507-2519.

Phelps PE, Houser CR, Vaughn JE (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol* 238:286-307.

Plenz D (2003) When inhibition goes incognito: feedback interaction between spiny projection neurons in striatal function. *Trends Neurosci* 26:436-443.

Plenz D, Kitai ST (1998) Up and down states in striatal medium spiny neurons simultaneously recorded with spontaneous activity in fast-spiking interneurons

studied in cortex-striatum-substantia nigra organotypic cultures. *J Neurosci* 18:266-283.

Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH, Thompson SM (1997) Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron* 18:463-472.

Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH, Thompson SM (2000) Differential control of GABA release at synapses from distinct interneurons in rat hippocampus. *J Physiol* 528 Pt 1:123-130.

Preston RJ, Bishop GA, Kitai ST (1980) Medium spiny neuron projection from the rat striatum: an intracellular horseradish peroxidase study. *Brain Res* 183:253-263.

Radnikow G, Misgeld U (1998) Dopamine D1 receptors facilitate GABA_A synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 18:2009-2016.

Reubi JC, Cuenod M (1979) Glutamate release in vitro from corticostriatal terminals. *Brain Res* 176:185-188.

Ribak CE, Vaughn JE, Roberts E (1979) The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 187:261-283.

Richardson MJ, Melamed O, Silberberg G, Gerstner W, Markram H (2005) Short-term synaptic plasticity orchestrates the response of pyramidal cells and interneurons to population bursts. *J Comput Neurosci* 18:323-331.

Romo R, Scarnati E, Schultz W (1992) Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. II. Movement-related activity in the anterior striatum. *Exp Brain Res* 91:385-395.

Rozov A, Burnashev N, Sakmann B, Neher E (2001) Transmitter release modulation by intracellular Ca²⁺ buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a target cell-specific difference in presynaptic calcium dynamics. *J Physiol* 531:807-826.

Rusakov DA, Fine A (2003) Extracellular Ca²⁺ depletion contributes to fast activity-dependent modulation of synaptic transmission in the brain. *Neuron* 37:287-297.

Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF (2004) Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J Comp Neurol* 469:325-339.

Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM (2005) Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol* 5:34-41.

Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T, Perez-Burgos A, Perez-Garci E, Galarraga E, Vargas J (2005) A reconfiguration of CaV2 Ca²⁺ channel current and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 94:3771-3787.

Sandell JH, Graybiel AM, Chesselet MF (1986) A new enzyme marker for striatal compartmentalization: NADPH diaphorase activity in the caudate nucleus and putamen of the cat. *J Comp Neurol* 243:326-334.

Scheuber A, Miles R, Poncer JC (2004) Presynaptic Cav2.1 and Cav2.2 differentially influence release dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 24:10402-10409.

Scheuss V, Neher E (2001) Estimating synaptic parameters from mean, variance, and covariance in trains of synaptic responses. *Biophys J* 81:1970-1989.

Schultz W, Romo R (1992) Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. I. Preparatory activity in the anterior striatum. *Exp Brain Res* 91:363-384.

Schuman EM, Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254:1503-1506.

Sealfon SC, Olanow CW (2000) Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci* 23:S34-40.

Seeman P, Van Tol HH (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15:264-270.

Shibuki K, Okada D (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349:326-328.

Shin RM, Masuda M, Miura M, Sano H, Shirasawa T, Song WJ, Kobayashi K, Aosaki T (2003) Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons. *J Neurosci* 23:11662-11672.

Shink E, Smith Y (1995) Differential synaptic innervation of neurons in the internal and external segments of the globus pallidus by the GABA- and glutamate-containing terminals in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 358:119-141.

Shink E, Bevan MD, Bolam JP, Smith Y (1996) The subthalamic nucleus and the external pallidum: two tightly interconnected structures that control the output of the basal ganglia in the monkey. *Neuroscience* 73:335-357.

Sil'kis IG (2006) A possible mechanism for the effect of modifiable lateral inhibition in the striatum on the selection of conditioned reflex motor responses. *Neurosci Behav Physiol* 36:631-643.

Silberberg G, Wu C, Markram H (2004) Synaptic dynamics control the timing of neuronal excitation in the activated neocortical microcircuit. *J Physiol* 556:19-27.

Silver RA, Momiyama A, Cull-Candy SG (1998) Locus of frequency-dependent depression identified with multiple-probability fluctuation analysis at rat climbing fibre-Purkinje cell synapses. *J Physiol* 510 (Pt 3):881-902.

Sippy T, Cruz-Martin A, Jeromin A, Schweizer FE (2003) Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat Neurosci* 6:1031-1038.

Smith Y, Parent A (1986) Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Res* 372:241-252.

Smith Y, Bolam JP (1991) Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labelling study. *Neuroscience* 44:45-73.

Smith Y, Bolam JP, Von Krosigk M (1990) Topographical and Synaptic Organization of the GABA-Containing Pallidosubthalamic Projection in the Rat. *Eur J Neurosci* 2:500-511.

Smith Y, Parent A, Seguela P, Descarries L (1987) Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol* 259:50-64.

Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.

Sokoloff P, Schwartz JC (1995) Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends Pharmacol Sci* 16:270-275.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146-151.

Sokoloff P, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Martres MP, Giros B, Schwartz JC (1992) Pharmacology of human dopamine D3 receptor expressed in a mammalian cell line: comparison with D2 receptor. *Eur J Pharmacol* 225:331-337.

Somogyi P, Hodgson AJ, Smith AD (1979) An approach to tracing neuron networks in the cerebral cortex and basal ganglia. Combination of Golgi staining, retrograde transport of horseradish peroxidase and anterograde

degeneration of synaptic boutons in the same material. *Neuroscience* 4:1805-1852.

Somogyi P, Bolam JP, Smith AD (1981) Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. *J Comp Neurol* 195:567-584.

Spencer HJ (1976) Antagonism of cortical excitation of striatal neurons by glutamic acid diethyl ester: evidence for glutamic acid as an excitatory transmitter in the rat striatum. *Brain Res* 102:91-101.

Stern EA, Kincaid AE, Wilson CJ (1997) Spontaneous subthreshold membrane potential fluctuations and action potential variability of rat corticostriatal and striatal neurons in vivo. *J Neurophysiol* 77:1697-1715.

Stern EA, Jaeger D, Wilson CJ (1998) Membrane potential synchrony of simultaneously recorded striatal spiny neurons in vivo. *Nature* 394:475-478.

Suaud-Chagny MF, Dugast C, Chergui K, Msghina M, Gonon F (1995) Uptake of dopamine released by impulse flow in the rat mesolimbic and striatal systems in vivo. *J Neurochem* 65:2603-2611.

Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350:614-619.

Surmeier DJ, Kitai ST (1993) D₁ and D₂ dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. In: *Progress in Brain Research* (Arbuthnott GW, Emson PC, eds), pp 309-324. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579-6591.

Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366:156-158.

Taverna S, van Dongen YC, Groenewegen HJ, Pennartz CM (2004) Direct physiological evidence for synaptic connectivity between medium-sized spiny neurons in rat nucleus accumbens in situ. *J Neurophysiol* 91:1111-1121.

Tecuapetla F, Bargas J, Tapia D, Carrillo-Reid L, Galarraga E (2005a) Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity between neostriatal spiny neurons: pair recording. In: 41.14: Society for Neuroscience.

Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzman JN, Galarraga E, Bargas J (2005b) Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol* 93:1119-1126.

Tepper JM, Bolam JP (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14:685-692.

Tepper JM, Plenz D (2005) Microcircuits in the striatum: Striatal cell types and their interaction. In: *The Interface between Neurons and Global Brain Function, Dahlem Workshop Report 93* (Grillner S, Graybiel AM, eds), pp 127-148. Cambridge, M.A.: MIT, Press.

Tepper JM, Koos T, Wilson CJ (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 27:662-669.

Tepper JM, Sharpe NA, Koos TZ, Trent F (1998) Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev Neurosci* 20:125-145.

Thomson AM (2000a) Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends Neurosci* 23:305-312.

Thomson AM (2000b) Molecular frequency filters at central synapses. *Prog Neurobiol* 62:159-196.

Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT, Jr., Caron MG (1991) 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 U S A* 88:7491-7495.

Tobler PN, O'Doherty J P, Dolan RJ, Schultz W (2006) Human neural learning depends on reward prediction errors in the blocking paradigm. *J Neurophysiol* 95:301-310.

Toledo-Rodriguez M, Blumenfeld B, Wu C, Luo J, Attali B, Goodman P, Markram H (2004) Correlation maps allow neuronal electrical properties to be predicted from single-cell gene expression profiles in rat neocortex. *Cereb Cortex* 14:1310-1327.

Totterdell S, Bolam JP, Smith AD (1984) Characterization of pallidonigral neurons in the rat by a combination of Golgi impregnation and retrograde transport of horseradish peroxidase: their monosynaptic input from the neostriatum. *J Neurocytol* 13:593-616.

Tsodyks MV, Markram H (1997) The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:719-723.

Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR (2002) Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol* 88:1263-1269.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24:125-132.

Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-614.

Venance L, Glowinski J, Giaume C (2004) Electrical and chemical transmission between striatal GABAergic output neurones in rat brain slices. *J Physiol* 559:215-230.

Verderio C, Coco S, Fumagalli G, Matteoli M (1995) Calcium-dependent glutamate release during neuronal development and synaptogenesis: different involvement of omega-agatoxin IVA- and omega-conotoxin GVIA-sensitive channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6449-6453.

Vergara R, Rick C, Hernandez-Lopez S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E, Surmeier DJ, Vargas J (2003) Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol* 553:169-182.

Vincent SR, Hokfelt T, Christensson I, Terenius L (1982) Dynorphin-immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat. *Neurosci Lett* 33:185-190.

Wang Y, Markram H, Goodman PH, Berger TK, Ma J, Goldman-Rakic PS (2006) Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 9:534-542.

Whittington MA, Traub RD (2003) Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci* 26:676-682.

Wichmann T, DeLong MR (1996) Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 6:751-758.

Wichmann T, DeLong MR (1998) Models of basal ganglia function and pathophysiology of movement disorders. *Neurosurg Clin N Am* 9:223-236.

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

Wickens JR, Oorschot DE (2000) In: *Brain Dynamics and the Striatal Complex* (Miller R, Wickens JR, eds), pp 141-150. Harwood, Australia.

Wickens JR, Alexander ME, Miller R (1991) Two dynamic modes of striatal function under dopaminergic-cholinergic control: simulation and analysis of a model. *Synapse* 8:1-12.

Williams MN, Faull RL (1985) The striatonigral projection and nigrotectal neurons in the rat. A correlated light and electron microscopic study demonstrating a monosynaptic striatal input to identified nigrotectal neurons

using a combined degeneration and horseradish peroxidase procedure. *Neuroscience* 14:991-1010.

Wilson CJ (1986) Three - dimensional analysis of dendritic spines by means of HVEM. *J Electron Microscop* 35:1151-1155.

Wilson CJ (1993) The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. In: *Chemical Signalling in the Basal Ganglia* (Arbuthnott GW, Emsom PC, eds), pp 277-297. Oxford: Elsevier.

Wilson CJ (2004) Basal Ganglia. In: *The Synaptic Organization of the Brain* (Shpard GM, ed), pp 361-414. Oxford: Oxford University Press.

Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599-615.

Wilson CJ, Groves PM (1981) Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Res* 220:67-80.

Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16:2397-2410.

Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588-592.

Wooten GF (1990) Parkinsonism. In: *Neurobiology of Disease* (A.L. Pearlman, ed), pp 454-468. New York: Oxford, Univ. Press.

Wu J, Dougherty JJ, Nichols RA (2006) Dopamine receptor regulation of Ca²⁺ levels in individual isolated nerve terminals from rat striatum: comparison of presynaptic D1-like and D2-like receptors. *J Neurochem* 98:481-494.

Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 20:204-212.

Wu LG, Borst JG (1999) The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron* 23:821-832.

Xu J, Wu LG (2005) The decrease in the presynaptic calcium current is a major cause of short-term depression at a calyx-type synapse. *Neuron* 46:633-645.

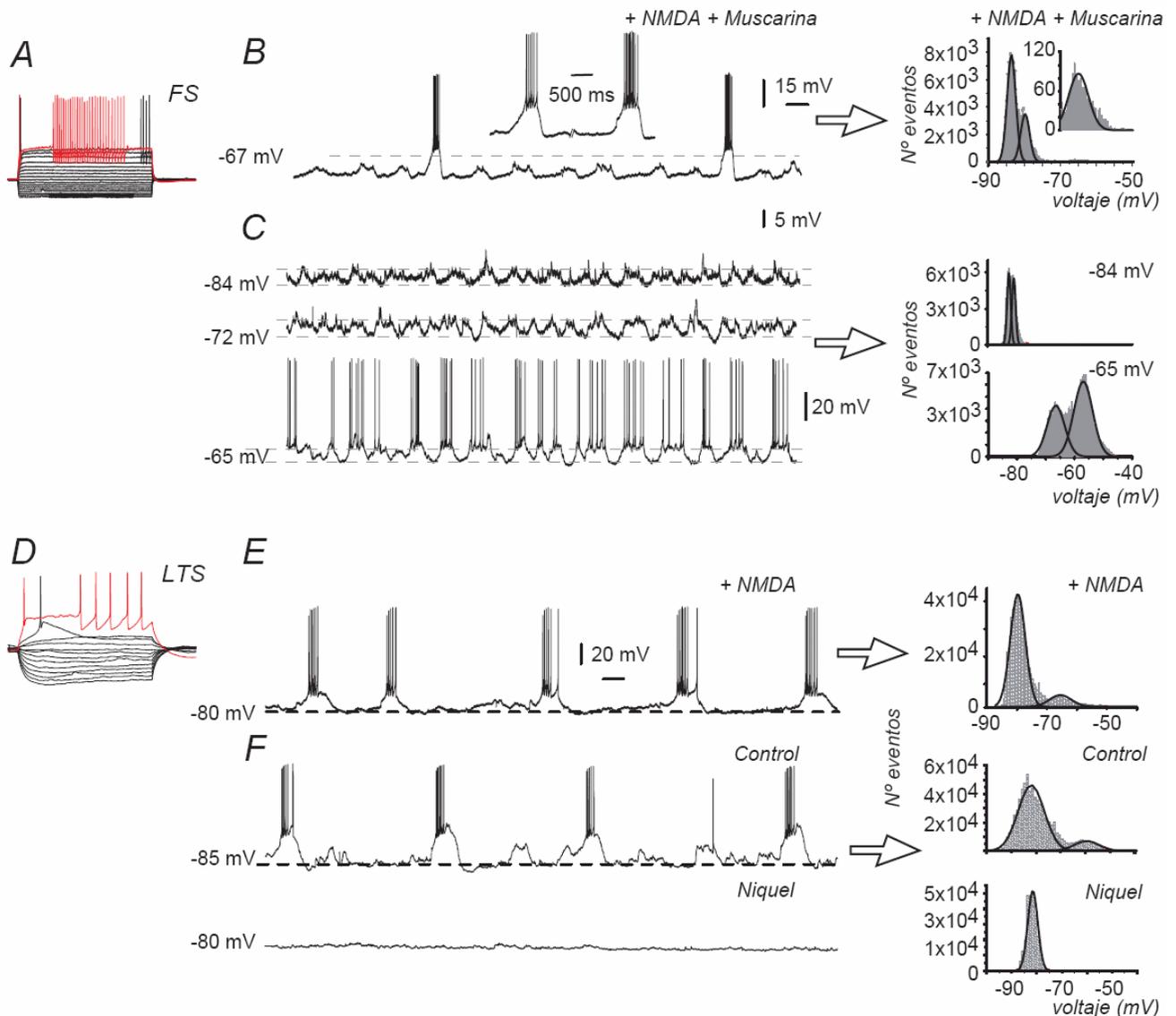
Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24:2612-2622.

Yan Z, Surmeier DJ (1996) Muscarinic (m₂/m₄) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16:2592-2604.

Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12:13-31.

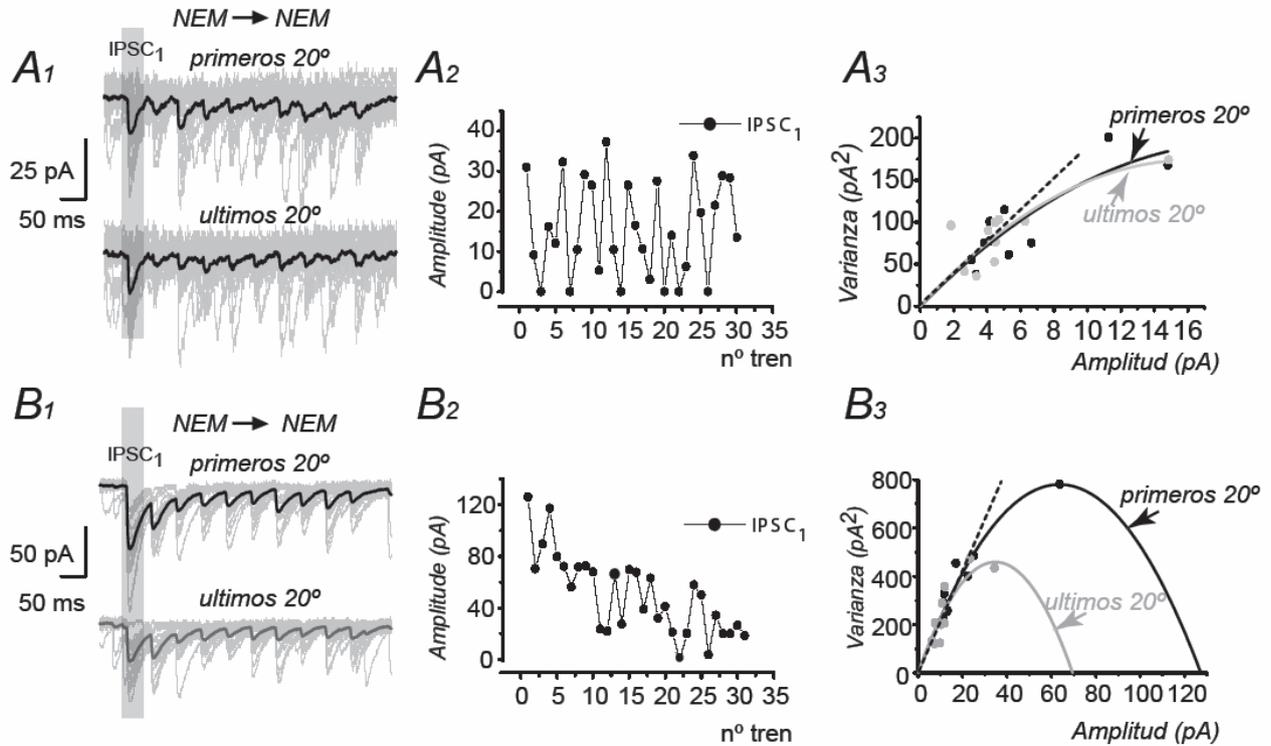
Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.

Apéndice A



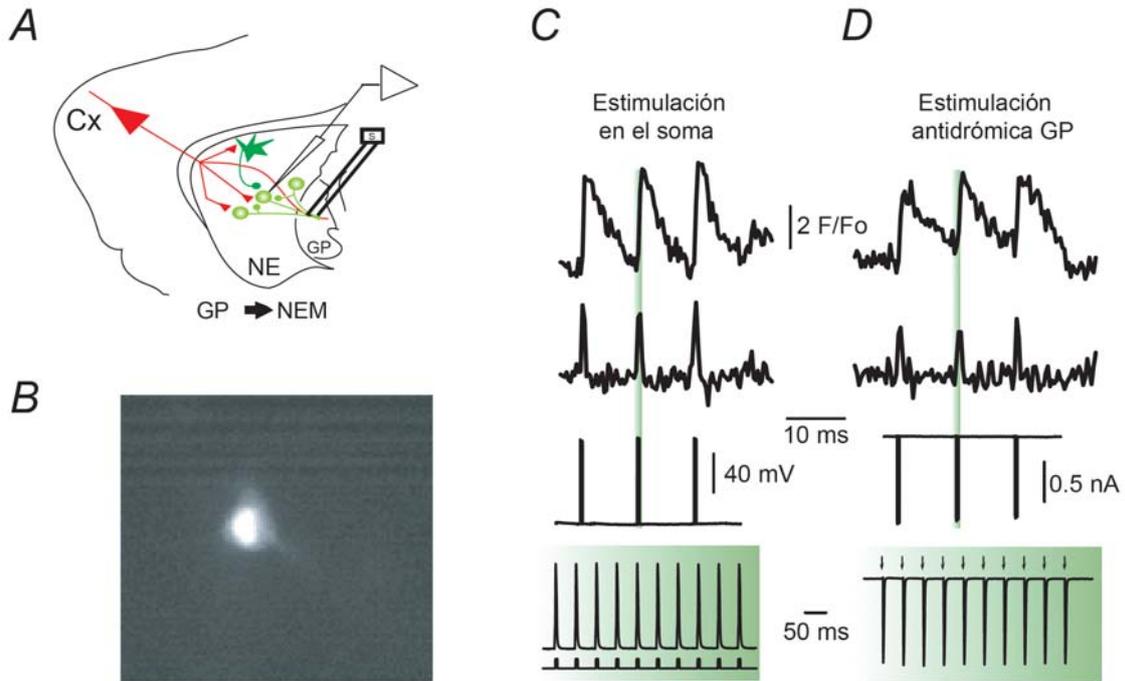
Las interneuronas del neostriado presentan oscilaciones en el potencial de membrana. **A.** Respuesta en voltaje ante pulsos hiper y despolarizantes (no mostrados) de una interneurona tipo "fast spiking" (FS). **B.** En la preparación utilizada en esta tesis (ver métodos) oscilaciones del potencial de membrana en una FS solo aparecen ante la co-aplicación de NMDA (15 μ M) y muscarina (5 μ M). **C.** En otra interneurona FS que solo presento oscilaciones sub-umbrales, la despolarización con inyección de corriente (\sim 20 mV) hizo mas robusta esta oscilación convirtiéndola en supra-umbral. **D.** Respuesta en voltaje ante pulsos hiper y despolarizantes de una interneurona tipo "low threshold spike" (LTS). **E.** La administración de NMDA (10 μ M) induce la presencia de oscilaciones en el voltaje que son suprimidas por niquel (40 μ M) (**F** panel de abajo). Este tipo de interneuronas presento oscilaciones espontáneas aun en ausencia de NMDA. **F.** La oscilación en el potencial de membrana de manera espontánea en una interneurona LTS es ilustrada en **F** (panel de arriba). Los paneles de la derecha en **B**, **C**, **E** y **F** corresponden a histogramas del potencial de membrana. Note que la presencia de dos picos en los histogramas corresponde a oscilaciones en el potencial de membrana.

Apéndice B



Depresión de largo plazo entre NEMs. Algunas conexiones *NEM*→*NEM* mostraron depresión de largo plazo (*LTD*) después del 10°-15° tren de estimulación. **A1.** Experimento representativo de un par de *NEMs* sinápticamente conectadas donde no observamos el fenómeno de *LTD*. (Esto es lo que consideramos una condición control estable para la realización de experimentos de modulación). Arriba del 1°-20° tren de estimulación, abajo 10°-30° tren de estimulación (promedio y trazos individuales, negro y gris respectivamente). **A2.** Curso temporal del IPSC₁ de **A1**. **A3.** Análisis de medias contra varianzas de los datos mostrados en **A1**. **B.** Experimento representativo de una conexión unitaria (*NEM*→*NEM*) en la cual identificamos que el fenómeno de *LTD* tiene origen presináptico (**B3**). Note que la pendiente inicial de las parábolas no cambia, lo cual indica que el cambio en amplitud es a nivel presináptico (Clemnts y Silver, 2000)

Apéndice C



Potenciales de acción antidrómicos en la neurona espinosa mediana (*NEM*). *A.* esquema mostrando los sitios de los electrodos de registro y estimulación. *B.* Célula cargada con Fluo-4 el cual fluoresce cuando se eleva la concentración intracelular de calcio (e.g. generado por potenciales de acción). *C.* De arriba hacia abajo: transitorio de fluorescencia, derivada del transitorio de fluorescencia, trenes de 10 potenciales de acción generados por pulsos despolarizantes de corriente (abajo) en el soma de una *NEM*. *D.* De arriba hacia abajo: transitorios de calcio como en *C* pero ante la estimulación antidrómica del axón de la *NEM* mostrada en *B*. Note en *C* que los transitorios de fluorescencia se generaron con corrientes de acción (abajo). En *C* la célula esta en fijación de corriente, en *D* en fijación de voltaje.