



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**INTEGRACIÓN Y MODULACIÓN DE LA ENTRADA  
CÓRTICO-ESTRIATAL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**PRESENTA:  
EDÉN FLORES BARRERA**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ELVIRA GALARRAGA PALACIO**

**MÉXICO, D. F.**

**JUNIO, 2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biofísica y Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Elvira Galarraga Palacio.

A lo largo de la Maestría conté con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El presente trabajo fue financiado por: CONACyT: 42636  
DGAPA-UNAM: IN200803, IN201507

## *Dedicatoria*

*A mis padres*

*Yolanda Barrera Covarrubias y Nemorio Flores López*

*Por haber creído en mí*

*A mis hermanos*

*Jesse, José Trinidad, Arely, Jesús y Kelly*

*A mis sobrinos*

*A mi abuela Nico*

## *Agradecimientos*

Agradezco a la Dra. María Elvira Galarraga Palacio por su apoyo, confianza, excelente tutoría y por su disposición a ayudarme. ¡Gracias Dra.!

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray y al Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar, quienes con sus comentarios ayudaron al desarrollo del presente trabajo de investigación.

A los sinodales de esta tesis: Dr. José Bargas Díaz, Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray, Dra. María Elvira Galarraga, Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar y Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez, por sus comentarios y sugerencias para el buen término de este trabajo de tesis.

Al Biólogo Dagoberto Tapia, por el trabajo anatómico presentado en esta tesis; y por su amistad y apoyo desde mi llegada al laboratorio.

Al Dr. Arturo Reyes Lazalde, por sus consejos, apoyo y por haberme guiado hasta aquí ¡Gracias Profe!

A mis padres ¡GRACIAS POR TODO!

A mi abuela Nico por sus consejos y apoyo en los momentos difíciles.

A Ana María López, por su amistad y apoyo durante mis estudios de licenciatura ¡Gracias tía!

A la familia Ávila García, por haberme permitido ser parte de ella y por el apoyo desde mis primeros días en el D.F.

A Rosario Andrade, por que a pesar de todo, nos seguimos llevando bien.

A la Sra. Ana María Rodríguez que me ha permitido tener un lugar agradable para convivir.

A mis compañeros del Instituto: Alejandra Figueroa, Fatuel Tecuapetla, Ernesto Mendoza, Gisselle López, Bianca Vizcarra, Osvaldo Ibañez, Azucena Pérez, Aleph Prieto, Humberto Salgado, Luis Carrillo, Javier, Jazmín, Janet, Antonio Laville, Miriam y Valentín de la Cruz, por su amistad.

A mis amigos de Biología: Paty, América, Mary, Gaby, Demian, Jonathan, Anibal, Daniel, Johny, Dulce, Mago, Rosario, Angélica, por los buenos momentos que pasamos.

A Judith Sánchez, por su amistad ¡Gracias por escucharme!

A Estela González y Paty González por su amistad y apoyo incondicionales.

A mis amigos de siempre: Valentín, Misael, Luis, Perla, Cristina, René, Lucia, Rafael, por todo lo que hemos compartido.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Ganglios Basales (GB).....	1
1.1.1 Población neuronal del Neostriado (NSt).....	2
1.1.2 Entradas sinápticas que reciben las neuronas de proyección..	8
1.2 Patrón de disparo de las MSNs.....	10
1.3 Corrientes de calcio.....	13
1.4 Clases de receptores a dopamina.....	14
1.4.1 Farmacología de los receptores a dopamina.....	15
1.4.2 Localización de los receptores dopaminérgicos en el NSt.....	16
1.5 Vías de señalización intracelular asociadas a la activación de receptores dopaminérgicos.....	17
1.5.1 Vía de señalización asociada a receptores dopaminérgicos de la clase D1.....	18
1.5.2 Vía de señalización asociada a receptores dopaminérgicos de la clase D2.....	20
1.6 Modulación dopaminérgica de las respuestas sinápticas.....	22
1.7 Efectos dopaminérgicos sobre el disparo de las MSNs.....	23
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	28
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>HIPÓTESIS</b> .....	29

## **CAPÍTULO 4**

OBJETIVOS.....	30
----------------	----

## **CAPÍTULO 5**

MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
-------------------------	----

5.1 Fármacos.....	34
-------------------	----

5.2 Procesamiento de los datos.....	35
-------------------------------------	----

## **CAPÍTULO 6**

RESULTADOS.....	36
-----------------	----

6.1 Características electrofisiológicas de las MSNs.....	36
--	----

6.2 Participación de sinapsis inhibitoras en la respuesta ortodrómica cortical.....	41
---	----

6.3 Participación del componente glutamatérgico de tipo NMDA durante la generación de las mesetas despolarizantes.....	44
--	----

6.4 Participación de la conductancia intrínseca de $Ca^{2+}$ de tipo L en la respuesta supraumbral.....	46
---	----

6.5 Modulación de la respuesta sináptica por receptores a dopamina de la clase D1.....	52
--	----

6.6 Modulación de la respuesta sináptica por receptores a dopamina de la clase D2.....	53
--	----

6.7 Activación secuencial de receptores a dopamina de las clases D1 y D2.....	54
---	----

## **CAPÍTULO 7**

DISCUSIÓN.....	58
----------------	----

7.1 Componente GABAérgico en la generación de la respuesta ortodrómica supraumbral.....	59
---	----



7.2 Componente glutamatérgico de tipo NMDA en la respuesta supraumbral.....	60
7.3 Participación de la conductancia de $Ca^{2+}$ de tipo L ( $Ca_v1$ ) en la respuesta supraumbral.....	61
7.4 Modulación dopaminérgica de la respuesta sináptica.....	63
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>66</b>

## ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>AMPC</b>	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>Ca-CaM</b>	Proteína calcio-calmodulina
<b>Ctx</b>	corteza
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DARPP-32</b>	Fosfoproteína regulada por AMPc y dopamina de 32,000 daltones ( <i>Dopamine and cAMP Regulated Phosho Protein of 32kDa</i> en inglés)
<b>E<sub>Cl<sup>-</sup></sub></b>	Potencial de equilibrio del ión cloro
<b>EPSPs</b>	Potenciales postsinápticos excitadores ( <i>postsynaptic excitatory potentials</i> en inglés)
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GB</b>	Ganglios basales
<b>Gpe</b>	Globo pálido externo
<b>Gpi</b>	Globo pálido interno
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
<b>IPSPs</b>	Potenciales postsinápticos inhibidores ( <i>postsynaptic inhibitory potentials</i> en inglés)
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de afinidad
<b>LCA</b>	Líquido cerebroespinal artificial
<b>mM</b>	milimoles/litro
<b>ms</b>	milisegundo
<b>MSNs</b>	Neuronas espinosas medianas, principales o de proyección ( <i>medium spiny neurons</i> en inglés o MSNs)
<b>mV</b>	milivoltio
<b>NSt</b>	Neostriado
<b>NST</b>	Núcleo subtalámico

<b>PKA</b>	Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>RMP</b>	Potencial de membrana en reposo ( <i>resting membrane potential</i> en inglés)
<b>PP1c</b>	Fosfatasa uno c
<b>PP-2B</b>	Proteína fosfatasa 2 B o calcineurina
<b>PPH</b>	Postpotencial hiperpolarizante
<b>R<sub>N</sub></b>	resistencia de entrada
<b>scRT-PCR</b>	Transcriptasa inversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa en célula única
<b>SNpc</b>	Sustancia negra parte compacta
<b>SNpr</b>	Sustancia negra parte reticular
<b>ZCPN</b>	zona de conductancia con pendiente negativa
<b>μm</b>	micrómetro
<b>μM</b>	micromoles/litro
<b>μs</b>	microsegundo

## RESUMEN.

Las neuronas estriatales reciben un gran número de contactos sinápticos provenientes de neuronas córtico-estriatales, los cuales favorecen la generación de los estados funcionales que presentan estas neuronas. La respuesta ortodrómica de las neuronas estriatales de proyección, es generada por la activación directa de sinapsis glutamatérgicas (AMPA y NMDA) e indirecta de sinapsis GABAérgicas ( $GABA_A$ ) proveniente de interneuronas y de colaterales axónicas que interconectan a las neuronas espinosas. En este trabajo de tesis nos preguntamos si en las despolarizaciones prolongadas que se producen durante la estimulación cortical producto de los componentes sinápticos, también participan conductancias intrínsecas de las neuronas espinosas medianas. Para responder esto, utilizamos rebanadas de cerebro de rata de 300 micrómetros y la técnica de registro intracelular. Utilizamos un electrodo bipolar concéntrico para estimular las aferencias córtico-estriatales. Comparamos la respuesta sináptica obtenida ante un solo pulso con la respuesta a un tren de cuatro pulsos en la vía córtico-estriatal, para obtener potenciales sinápticos sumados. La respuesta sináptica GABAérgica mostró una acción bifásica: hiperpolarizante al inicio de la respuesta y despolarizante durante la meseta tardía. La aplicación de APV ( $50\mu M$ ) (antagonista de receptores NMDA) produjo una reducción del 50% en la respuesta ortodrómica, lo que demuestra una participación importante por activación de receptores NMDA. La adición de nicaardipina ( $2.5\mu M$ ) o calciseptina ( $400nM$ ) (antagonistas de canales de calcio de tipo L) produjo una reducción de alrededor del 30% en las respuestas sinápticas supraumbrales, lo que permitió concluir que las conductancias sinápticas son capaces de activar conductancias activadas por voltaje. La dopamina parece jugar un papel esencial en la modulación de esta respuesta. Actuando sobre los componentes sinápticos y/o los intrínsecos, la activación de receptores de la clase D1 incrementa  $28\pm 9\%$  y la activación de los receptores de la clase D2 reduce  $20\pm 8\%$  la respuesta sináptica supraumbral. La activación secuencial de ambas clases de receptor, D1 y D2, se pudo observar en el 70% de las neuronas registradas. El efecto D1 no fue bloqueado por la acción previa del receptor tipo D2.

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN.**

La teoría neuronal de la organización del cerebro considera a la sinapsis como un elemento central de integración de las redes neuronales (Sherrington, 1906; Verkhratsky, 2006). La comunicación celular a través de sinapsis depende de la liberación de neurotransmisor de la terminal presináptica y de los procesos celulares (cascadas de señalización) activados una vez que el neurotransmisor interactúa con receptores postsinápticos. El primer evento de integración postsináptica se produce cuando el neurotransmisor liberado cruza la hendidura sináptica y activa receptores postsinápticos. En la membrana plasmática la integración sináptica ocurre vía sumación de respuestas eléctricas generadas por la apertura de receptores ionotrópicos. Además, una parte importante de ésta se lleva a cabo a través de cascadas de señalización intracelular, que controlan diferentes procesos biosintéticos y metabólicos que regulan respuestas neuronales a largo plazo, como la eficacia sináptica, la excitabilidad neuronal y la síntesis de proteínas. El calcio ( $Ca^{2+}$ ) juega un papel importante en estos procesos, ya que numerosas cascadas de señalización dependen de él (Sah y Faber, 2002), así como la plasticidad sináptica de largo plazo (Chittajallu et al., 1998; Cavazzini et al., 2005) y la expresión de genes (Bading, 2000; West et al., 2001).

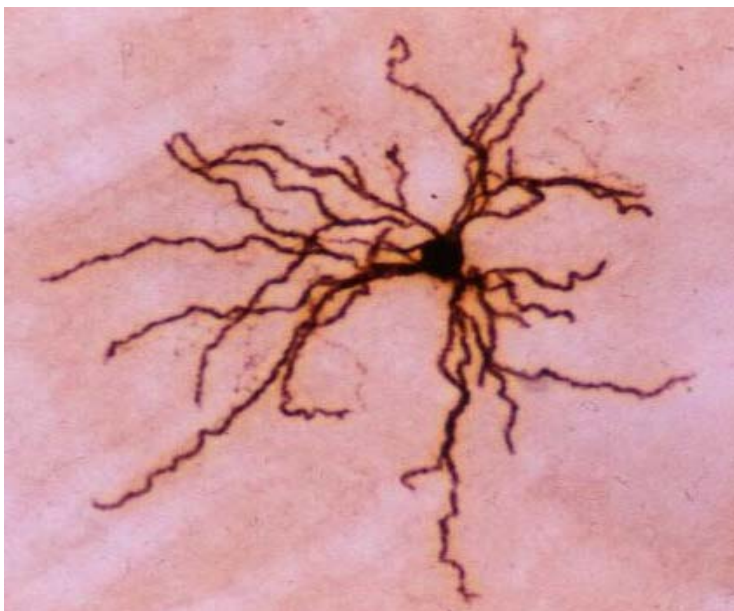
### **1.1 Ganglios Basales.**

Los ganglios basales (GB) son núcleos funcionalmente interconectados distribuidos en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo de peces pulmonados, reptiles, aves y mamíferos (Reiner et al., 1998). Están relacionados con el control motor, el aprendizaje y la memoria de procedimientos, además, están involucrados en la activación de programas motores durante la realización de movimientos (Mink, 1996; Bolam, et al., 2000). Están constituidos por núcleos de entrada como el caudado, el putamen (que forman el Neostriado, NSt), el accumbens y el subtálamo (NST) y núcleos de salida como el globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra parte reticular (SNpr). Hay núcleos intrínsecos como el globo

pálido externo (GPe) y la sustancia negra parte compacta (SNpc) (Wilson, 1994; Calabresi et al., 1996; Mink, 1996; Bargas y Galarraga, 2000). El papel funcional de los GB se ha inferido a partir de la observación de diferentes enfermedades, entre las que se encuentra la Enfermedad de Parkinson, un desorden neurodegenerativo progresivo de los GB, caracterizado clínicamente por movimientos involuntarios (discinesia), movimientos lentos (bradiquinesia), rigidez muscular, inestabilidad postural, entre otros (Mink, 1996; Rao et al., 2003).

### **1.1.1 Población neuronal del Neostriado (NSt).**

El principal núcleo de entrada a los GB es el NSt, cuyas neuronas principales o de proyección son las neuronas espinosas medianas (*medium spiny neurons* en inglés o MSNs), las cuales se caracterizan por liberar el neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Las MSNs constituyen el 77 % y 95 % de la población neuronal del NSt en el primate y en la rata, respectivamente (Bennett y Wilson, 2000). Tienen un soma de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro del cual emergen entre 3 y 6 troncos dendríticos, los cuales se ramifican en dos procesos, que pueden dividirse una o dos veces más, abarcando un volumen esférico de 300 a 500  $\mu\text{m}$  y presentan gran número de espinas, **ver figura 1** (Bolam y Bennett, 1995; Wilson, 1998; Bennett y Wilson, 2000). Las cabezas de las espinas forman una especialización sináptica de tipo asimétrico con terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza y del tálamo. Se estima que cada MSN recibe entre 12,500 y 15,000 aferencias glutamatérgicas (Bennett y Wilson, 2000), y que hasta 10,000 pueden provenir de la corteza (Wickens y Oorschot, 2000), por lo que las aferencias restantes vienen del tálamo. Además, se sabe que cada MSN recibe de 1 a 2 contactos sinápticos de una neurona cortical (Wilson, 1998; Bennett y Wilson, 2000).



**Figura 1.** Neurona espinosa mediana (MSN) del NSt. Neurona marcada intracelularmente con biocitina (concentración 1%) y revelada con diaminobenzidina (D. Tapia).

El NSt se divide en una región sensorio-motora y otra asociativa, de acuerdo a la información cortical que recibe. La región sensorio-motora, localizada en el putamen, recibe proyecciones bilaterales de la corteza motora que controla el cuerpo y las extremidades. La región asociativa, localizada en el caudado, recibe proyecciones homolaterales de las cortezas frontal, parietal, occipital y temporal (Flaherty y Graybiel, 1991). Una aferencia muy importante para el funcionamiento de los GB la constituyen las proyecciones dopaminérgicas provenientes de la SNpc (vía nigroestriatal) (Smith et al., 1998; Wilson, 1998; Kita et al., 1996). La degeneración de la vía nigroestriatal es la causa de la Enfermedad de Parkinson. Las fibras dopaminérgicas forman varicosidades y establecen sinapsis *en passant* en todo el NSt. La SNc de la rata contiene aproximadamente 8,000 neuronas dopaminérgicas, mientras que cada NSt contiene 2.8 millones de MSNs (Oorschot, 2000), revelando un factor de divergencia importante de 300-400 contactos sinápticos (Schultz, 1998). Cada MSN recibe en promedio entre 750-900 sinapsis dopaminérgicas (Bennett y Wilson, 2000).

Las MSNs proyectan hacia otros núcleos de los GB, a través de la vía directa y la vía indirecta. Se ha planteado que estas vías eferentes son originadas en dos grupos diferentes de MSNs (**ver figura 2**) y que tienen acciones opuestas sobre los núcleos de salida que inervan. La vía directa facilita los movimientos mientras que la vía indirecta los reprime.

La vía directa inicia en la corteza cerebral con una proyección glutamatérgica (excitadora) hacia el NSt. Al excitarse las MSNs que coliberan neuropéptidos tales como la sustancia P, la dinorfina, así como el neurotransmisor GABA, inhiben a las neuronas GABAérgicas de los núcleos de salida (GPi y SNpr), que proyectan a los núcleos ventral anterior y lateral del tálamo, lo que produce la desinhibición de los núcleos talámicos y entonces se facilita la salida de la señal a la corteza motora y por lo tanto los movimientos. Sin embargo, cuando no hay una entrada cortical, la actividad espontánea y tónica de las neuronas GABAérgicas del GPi y la SNpr, produce una inhibición constante de las neuronas talámicas. Debido a que éstas proyectan hacia la corteza cerebral, ésta acción evita la activación de la corteza motora y por tanto los movimientos (Wilson, 2004).

La vía indirecta está constituida por MSNs que coliberan el neuropéptido encefalina y GABA, envían sus proyecciones a las neuronas GABAérgicas del GPe, que disparan de manera espontánea (vía estriato-palidal). El GPe, inhibe tónicamente al NST a través de las fibras pálido-subtalámicas. Cuando se activan las MSNs de la vía estriato-palidal se desinhibe el NST. Las neuronas del NST disparan espontáneamente de manera tónica o en ráfagas (García et al., 2003). Cuando se liberan de la inhibición del GPe, cambian su patrón de disparo generando un efecto excitador sobre los núcleos de salida (GPi y SNpr). Al aumentar la actividad de los núcleos de salida, se inhibe el circuito tálamo-cortical y por tanto, se inhiben los movimientos, **ver figura 2** (Wilson, 2004). Éstos son los circuitos propuestos de cómo los movimientos son facilitados o reprimidos al activarse las vías directa e indirecta, respectivamente (Wilson, 2004). Es éste el modelo llamado de “tasa de disparo” (*rate model*), donde los cambios

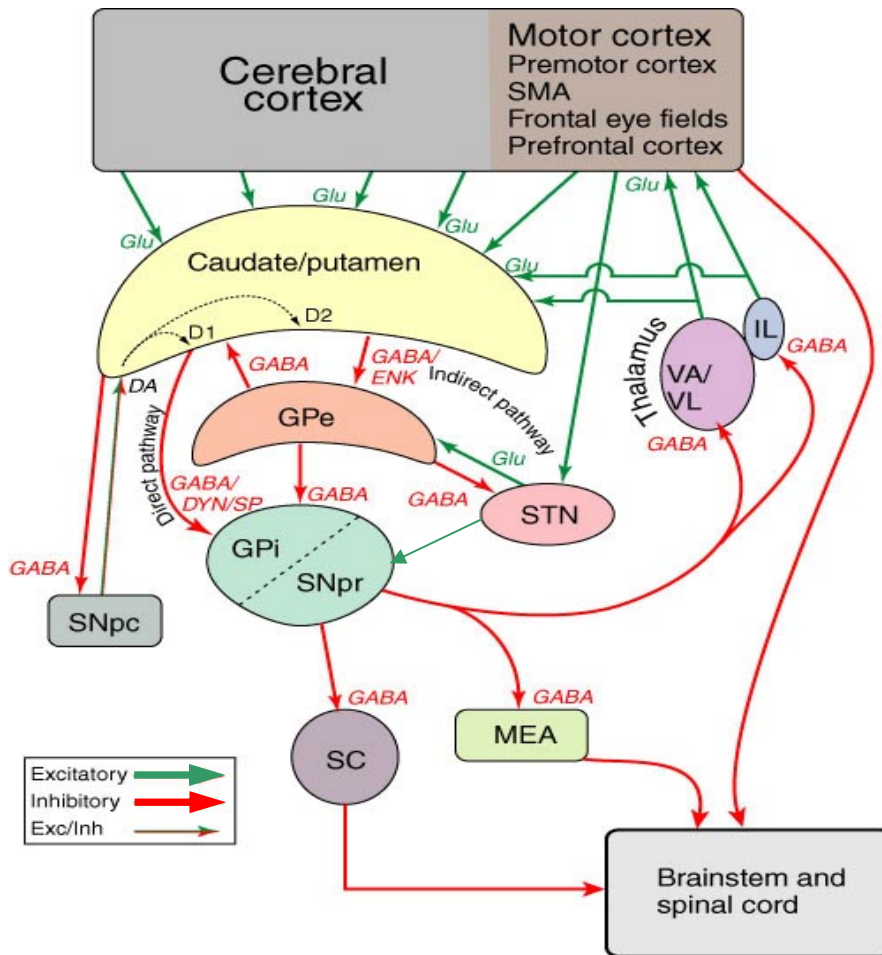


fisiopatológicos en éstas vías llevan finalmente a un aumento o disminución de la tasa de disparo de los núcleos de salida.

En estudios de hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y activación de genes tempranos se ha propuesto que las neuronas de la vía directa que sintetizan sustancia P, expresan preferentemente receptores a dopamina de la clase D1 y que las neuronas de la vía indirecta que sintetizan encefalina, expresan predominantemente receptores a dopamina de la clase D2 (Le Moine C y Bloch B, 1995; Le Moine C et al., 1991).

La diferenciación entre ambas vías se ha cuestionado, ya que se ha demostrado que algunas MSNs que forman parte de la vía directa también envían sus axones hacia el GPe (Kawaguchi et al., 1990), además, de que un porcentaje de MSNs (~30%) expresa ambos neuropéptidos (Surmeier et al., 1996). Por otro lado, existe una segunda vía directa hacia los núcleos de salida, que va de la corteza hacia el NST y de ahí al GPi y la SNpr. También existe una segunda vía indirecta, que va de la corteza al NSt, de ahí al GPe y finalmente al GPi y la SNpr (Albin et al., 1989; Mink, 1996). En realidad no sabemos cual de las vías predomina en un momento dado. Además, el NST y el GPe mantienen conexiones recíprocas, mientras que el GPe manda fibras hacia las interneuronas del NSt (Mink, 1996).

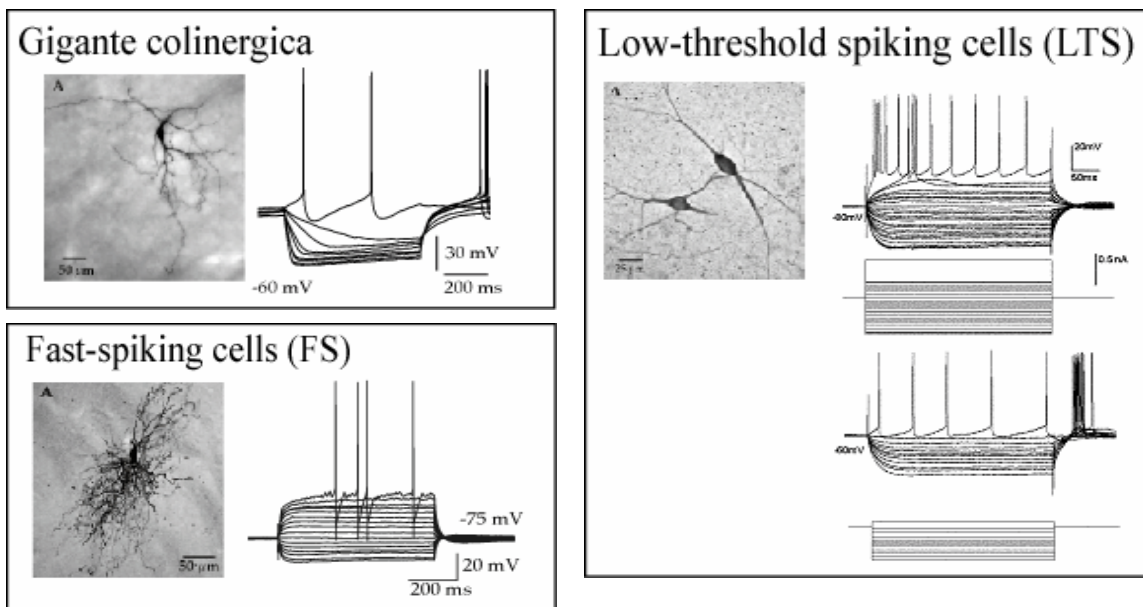
Las neuronas de proyección del NSt de las vías directa e indirecta muestran ligeras diferencias electrofisiológicas. Ambos tipos neuronales presentan un disparo tónico, regular y con poca adaptación sólo cuando son estimuladas (Galarraga et al., 1999; Kerr y Plenz, 2002).



Copyright © 2002, Elsevier Science (USA). All rights reserved.

**Figura 2.** Esquema de los circuitos de los ganglios basales (GB). En el neostriado convergen aferencias glutamatérgicas de la corteza y del tálamo, y dopaminérgicas de la sustancia negra parte compacta (SNpc). Las neuronas espinosas medianas (MSNs) o de proyección del neostriado, NSt (núcleos caudado y putamen), envían proyecciones a otros núcleos de los GB: núcleos de salida como el globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra parte reticular (SNpr). Así, la información procesada regresa a la corteza motora, a través del tálamo o es enviada a través del colículo superior (SC) y el área extrapiramidal del cerebro medio (MEA) a las vías descendentes del tallo cerebral, como los núcleos pedúnculo pontinos (PPN) y el tectum. Otra parte de las eferencias glutamatérgicas del núcleo subtalámico (NST) son enviadas al globo pálido externo (GPe), que establece conexiones recíprocas con el núcleo subtalámico (NST). El NST proyecta a los núcleos de salida (GPi y SNpr) y también recibe aferencias de la corteza. Las flechas en color verde indican las proyecciones excitadoras, las flechas en color rojo las inhibitoras y la flecha con ambos colores (SNpc-NSt) indica el efecto excitador e inhididor de la dopamina sobre las neuronas del NSt.

Además de las neuronas de proyección, en el neocórtex se localizan varios tipos de interneuronas, las cuales representan el 5% de la población neuronal del núcleo (**figura 3**). Tres clases de interneuronas se han descrito: colinérgicas gigantes, que son las de mayor tamaño dentro del NST, su soma es elongado mide entre 50 y 60  $\mu\text{m}$  de largo y entre 12 y 15  $\mu\text{m}$  de ancho. Sus dendritas son lisas o ligeramente espinosas. Las interneuronas GABAérgicas que son inmunoreactivas a parvalbúmina (proteína quelante de calcio), su soma mide entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ . Sus dendritas son lisas en las regiones proximales y presentan varicosidades en zonas distales. Otra clase de interneuronas GABAérgicas son las inmunoreactivas a somatostatina y al neuropéptido Y, además, expresan la enzima óxido nítrico sintetasa que participa en la síntesis de óxido nítrico. Son de tipo bipolar y su soma mide entre 10 y 12  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las tres clases de interneuronas representan del 1 al 2 % de la población neuronal del NST y muestran propiedades anatómicas y electrofisiológicas distintas (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi et al., 1995; Bolam y Bennett, 1995; Bennett y Wilson, 2000).



**Figura 3.** Características morfológicas y propiedades electrofisiológicas de los tres tipos de interneuronas presentes en el NST.

### **1.1.2 Entradas sinápticas que reciben las neuronas de proyección.**

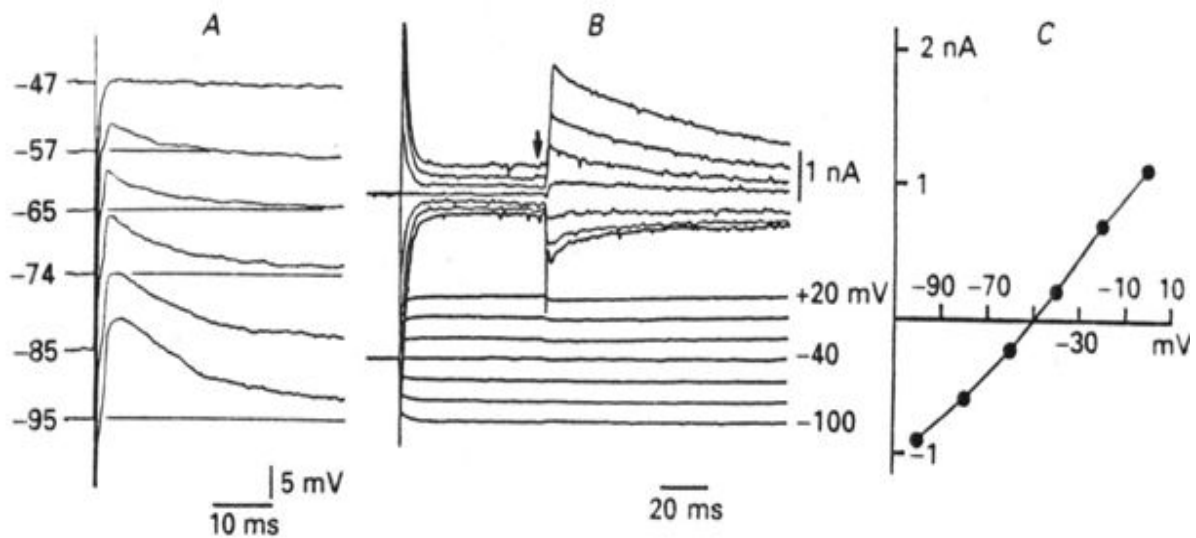
Las MSNs reciben aferentes glutamatérgicas de la corteza y del tálamo, dopaminérgicas de la sustancia negra parte compacta (**figura 2**), colinérgicas de las interneuronas y GABAérgicas provenientes de las dos clases de interneuronas y de las colaterales axónicas de otras MSNs (Bennett y Wilson, 2000).

La principal aferencia sináptica a las MSNs proviene de las neuronas piramidales de las cortezas (sensorial, motora y de asociación). Es mediada por el neurotransmisor excitador ácido glutámico o glutamato, que actúa a través de receptores a NMDA y no-NMDA. Los receptores ionotrópicos N-metil-D-Aspartato (NMDA) y no NMDA  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiónico (AMPA) y kainato, median la respuesta postsináptica excitadora rápida del glutamato en la MSN. Los receptores a NMDA han sido implicados en la amplificación de respuestas sinápticas y oscilaciones del potencial de membrana de las MSNs a potenciales de membrana despolarizados (Galarraga et al., 1997; Cepeda et al., 1998). Los receptores-canal AMPA/Kainato dan las respuestas sinápticas rápidas, mientras que los receptores a NMDA, contribuyen a la generación de potenciales en meseta y dendríticos (Bargas et al., 1991; Vergara et al., 2003) pues activan conductancias dependientes de voltaje.

La respuesta sináptica a potenciales de membrana cercanos a los de reposo es mediada por los receptores no-NMDA, debido a que el receptor-canal NMDA es dependiente de voltaje y a este nivel se encuentra bloqueado por  $Mg^{2+}$ . Sin embargo, si la neurona es despolarizada aproximadamente a -50 mV, el  $Mg^{2+}$  es removido dando lugar a una zona de conductancia con pendiente negativa (ZCPN) en la curva corriente-voltaje, lo que permite las transiciones entre los dos estados funcionales de las MSNs (Bargas et al., 2003).

Los potenciales postsinápticos excitadores (*postsynaptic excitatory potentials* en inglés o EPSPs) se originan por la activación sináptica química de receptores glutamatérgicos, pero puede ser amplificada por conductancias de calcio dependientes de voltaje situadas en las dendritas de las MSNs. Este fenómeno fue demostrado registrando la actividad sináptica en presencia de un bloqueador de canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ) (QX-314, aplicado intracelularmente), en estas condiciones se presentaron respuestas ortodrómicas despolarizantes lentas y potenciales en meseta (Bargas et al., 1991), que disminuyen al bloquear a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (Galarraga et al., 1997). Los componentes dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de los EPSPs, relacionados con respuestas ortodrómicas lentas son: potenciales de acción dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , prepotenciales rápidos y espigas parciales. La sustitución de  $\text{Ca}^{2+}$  por estroncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) favorece el incremento en la duración de la respuesta lenta, además, se presentan potenciales de acción lentos debido a que el  $\text{Sr}^{2+}$  permea a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, por lo que las respuestas ortodrómicas lentas y los potenciales de acción lentos son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bargas et al., 1991).

Las MSNs también reciben conexiones sinápticas inhibitoras de las colaterales axónicas de otras MSNs y de interneuronas, las cuales son mediadas por el neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Buchwald et al., 1973; Jiang y North, 1991; Wilson, 1998; Guzmán et al., 2003). Los potenciales postsinápticos inhibitorios (*postsynaptic inhibitory potentials* en inglés o IPSPs) tienen una duración corta (< 50 ms), son bloqueados con bicuculina y están asociados a la apertura de canales de cloro (Misgeld et al., 1982; Kita et al., 1985; Jiang y North, 1991). La respuesta GABAérgica en las MSNs muestra un potencial de inversión de  $-50\text{mV}$ , por lo que la respuesta sináptica mediada por receptores  $\text{GABA}_A$  registrada en las MSNs a potenciales de membrana de reposo es despolarizante o excitadora, y sólo a potenciales de membrana más despolarizados es hiperpolarizante o inhibitora. **Ver figura 4** (Jiang y North, 1991; Kita, 1996).



**Figura 4.** Potencial de inversión de la respuesta GABAérgica en MSNs. Respuesta GABAérgica evocada por estimulación intraestriatal, en presencia de antagonistas glutamatérgicos CNQX y APV. **A.** Registros intracelulares en fijación de corriente de potenciales postsinápticos a diferentes potenciales de mantenimiento. El potencial postsináptico se invierte a -47mV. **B.** Registros en célula entera, en fijación de voltaje a un potencial de mantenimiento de -40mV. Corrientes postsinápticas (trazos superiores) evocadas por comandos de voltaje en un rango -100 a +20mV (trazos inferiores). La flecha indica un pulso de estimulación intraestriatal. **C.** Se muestra la gráfica del pico de las corrientes sinápticas de B, en función del potencial de membrana (Tomada de Jiang y North, 1991).

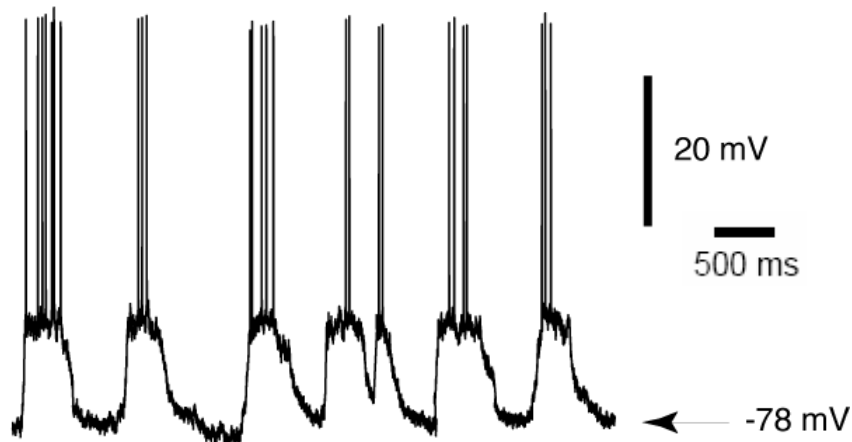
El pentobarbital y la 4-aminopiridina, fármacos que aumentan la neurotransmisión GABAérgica, incrementan la duración hasta 200-300 ms de las respuestas GABAérgicas depolarizantes inducidas por estimulación intraestriatal (Ransom and Barker, 1976).

## 1.2 Patrón de disparo de las MSNs.

Se ha demostrado que las MSNs aumentan su tasa de disparo durante la realización de movimientos voluntarios y durante la presentación de pistas sensoriales que indican al animal el momento de realizar una conducta (Wilson, 1993; Cepeda y Levine, 1998; Nicola et al., 2000).

Los registros intracelulares de MSNs en ratas anestesiadas, han descrito dos estados funcionales en la excitabilidad de las MSNs (**ver figura 6**): uno activo, en donde se observa disparo neuronal a potenciales despolarizados ( $\approx -50$  mV) denominado *up-state* y un estado inactivo o silente, a potenciales hiperpolarizados ( $\approx -80$  mV) llamado *down-state* (Wilson, 1998; Stern et al., 1998).

Estos estados están determinados por la presencia de diversas conductancias iónicas, como los rectificadores de corriente entrante de potasio ( $I_{K_{ir}}$ ) que delimitan el *down-state* (Galarraga et al., 1994; Nisenbaum y Wilson, 1995) y conductancias entrantes de  $Ca^{2+}$  ( $I_{Ca_L}$ ) y salientes de potasio ( $I_A$ ,  $I_{K_{DR}}$ ) que predominan durante el *up-state* (Hernández-López et al., 1997; 2000; Galarraga et al., 1997; Nisenbaum y Wilson, 1995; Vergara et al., 2003).



**Figura 6.** Registros intracelulares de las fluctuaciones espontáneas en el potencial de membrana y el disparo de una MSN *in vivo*. La generación de potenciales de acción ocurre durante los *up-states*. Los estados despolarizados son interrumpidos por cambios hacia el *down-state* cercano al potencial de inversión del ión potasio (Modificada de Stern et al., 1998).

Se ha discutido si estos estados sólo acontecen en animales anestesiados o dormidos y si su correlato sistémico es con las ondas lentas de sueño (Souliere et al., 2000; Murer et al., 2003; Kasanetz et al., 2002, 2006); pero queda claro que despolarizaciones similares pueden acontecer durante la ejecución de movimientos (Mahon et al., 2006) y después de administrar NMDA en

preparaciones *in vitro* (Vergara et al., 2003). Acaso existen diferentes tipos de *up-down-states*.

Se sabe que la entrada cortical es necesaria para producir un *up-state* o estado activado en las MSNs (Wilson, 1993; Nisenbaum y Wilson, 1995; Wilson y Kawaguchi, 1996; Kasanetz et al., 2002; 2006). Un comando cortical convergente, y con una sincronización temporal capaz de compensar la baja resistencia de entrada que caracteriza al estado hiperpolarizado (producida por las corrientes rectificadoras), permite la transición hacia el estado despolarizado y puede durar entre 0.1 y 3 segundos. La generación de potenciales de acción depende de pequeñas fluctuaciones en el potencial de membrana que son de origen sináptico. Las entradas corticales débiles y desincronizadas no son capaces de provocar y/o mantener el estado despolarizado. Y como las MSNs se comunican entre sí mediante colaterales axónicas inhibitorias, aquellas neuronas más excitadas inhibirán a las que son débilmente excitadas, favoreciendo su permanencia en el *down-state*. De esta manera, se piensa que el estriado filtra el “ruido” de las entradas corticales que se están activando para producir un movimiento voluntario (Wickens, 1993; Bar-Gad y Bergman 2001; Bar-Gad et al., 2003). A este tipo de algoritmo “computacional” atribuido al microcircuito estriatal se le conoce como el algoritmo de “*winner takes all*” o “*el que gana toma todo*” (Wickens, 1990; Suri and Schultz 1998, 1999; Bar-Gad y Bergman, 2001)

Así, las entradas corticales, junto con las propiedades intrínsecas de las MSNs, y las conexiones del circuito, favorecen que grupos de neuronas o módulos de las mismas, pasen de un estado al otro (Nicola et al., 2000; Vergara et al., 2003). La alternancia entre estos estados sería el correlato de una secuencia de movimientos voluntarios o “programa motor”. Estas secuencias, la mayor parte de ellas aprendidas, serían los trazos de memoria de procedimientos, como por ejemplo, montar bicicleta, tocar un instrumento, jugar un deporte, etc. Se piensa que el estriado guarda o almacena decenas o cientos de estos programas motores o procedimientos. Lo relevante de este esquema o modelo, a nivel celular, es



cómo la entrada sináptica cortical se combina con las conductancias iónicas intrínsecas para dar un *up-state*. Dilucidar esto, es uno de los objetivos de esta Tesis.

### **1.3 Corrientes de calcio.**

El calcio puede entrar a las células a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje, lo que representa una pieza clave en la regulación de una gran variedad de procesos celulares, como la liberación de neurotransmisores, el metabolismo, la expresión génica, la contracción muscular y la excitabilidad neuronal. En las MSNs la entrada de calcio juega un papel importante en la regulación de la frecuencia de disparo (Galarraga et al., 1989; Pérez-Garci et al., 2003a), y en procesos de integración sináptica (Bargas et al., 1991; Vergara et al., 2003).

En las MSNs se han identificado varios tipos de canales de calcio: L, N, P/Q y R. Los cuales son dependientes de voltaje y se activan a potenciales de membrana despolarizados ( $> -60$  mV) (Bargas et al., 1994; Mermelstein et al., 1998). Las corrientes de calcio generadas por estos canales, confieren diferentes características al patrón de disparo de la MSN. Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, contribuyen con una despolarización lenta que facilita el disparo repetitivo de la MSN (Hernández-López et al., 1997). En cambio, el calcio acarreado por los canales N y P/Q, activa corrientes salientes de potasio de tipo SK y BK, lo que determina el postpotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue a un potencial de acción (Vilchis et al., 2000; Pérez-Garci et al., 2003a), y por tanto reprimen el disparo. Así que el  $\text{Ca}^{2+}$  que fluye a través de los distintos canales de calcio presentes en las MSNs, puede excitar o inhibir dependiendo de cual sea su función intracelular.

Los sistemas dopaminérgicos han sido el foco de atención desde hace varias décadas, debido principalmente a que diversas condiciones patológicas como: la Enfermedad de Parkinson, la Enfermedad de Huntington (HD), el déficit

de atención con desorden hiperkinético (ADHD), la esquizofrenia, el síndrome de Tourette la hiperprolactinemia, así como los efectos psicomotores generados por el abuso de drogas (opiáceos, cocaína, anfetaminas y alcohol) entre otros, han sido relacionadas a una desregulación de la transmisión dopaminérgica (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000).

Existen al menos cinco genes que codifican para los receptores de las clases D1 y D2 y todos son expresados en el NSt. Las MSNs son el blanco principal de las aferentes dopaminérgicas provenientes de la SNpc. A pesar de la importancia de esta inervación, el impacto de la dopamina sobre la excitabilidad de las MSNs ha sido controversial, debido a la carencia de agonistas y antagonistas específicos que han impedido discriminar entre los efectos producidos por los miembros de una misma clase.

#### **1.4 Clases de receptores a dopamina.**

La dopamina (DA) ejerce su acción al unirse a receptores de membrana específicos que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales tienen siete segmentos transmembranales y una alta homología con la rodopsina (Missale et al., 1998).

En 1979 Keabian y Calne, por medio de estudios bioquímicos y farmacológicos, propusieron la existencia de dos clases de receptor a DA: el D1 acoplado positivamente a la adenilato ciclasa (AC) y el D2 acoplado negativamente. Posteriormente, mediante técnicas de clonación se pudieron caracterizar distintos tipos de receptor a dopamina pertenecientes a éstas dos clases, por sus características fisiológicas, farmacológicas y su secuencia aminoacídica. La clase D1 está formada por los receptores de los tipos D1 y D5 que estimulan a la AC. La clase D2 está constituida por los receptores de los tipos D2, D3 y D4 que inhiben a la AC (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000; Sealfon y Olanow, 2000).

#### 1.4.1 Farmacología de los receptores a dopamina.

Debido a que la DA participa en la regulación de diferentes funciones en el sistema nervioso central y la alteración en sus sistemas de transmisión genera diversas patologías, se requiere el diseño de moléculas específicas con implicaciones terapéuticas que imiten o antagonicen sus efectos para el tratamiento de estas patologías. (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000).

Los ligandos dopaminérgicos existentes permiten discriminar entre los receptores de las clases D1 y D2. Sin embargo, no son lo suficientemente selectivos para discriminar entre los miembros de la misma clase (Vallone et al., 2000). Esto ha llevado a conclusiones contradictorias, por ejemplo, en estudios de hibridación *in situ* se muestra la segregación de las clases de receptores en diferentes poblaciones neuronales (Gerfen et al., 1990; Le Moine y Bloch, 1995). Sin embargo, los estudios farmacológicos encuentran respuestas a las dos clases de receptores en la misma célula (Surmeier et al., 1996; Pérez-Garci et al., 2003a; Salgado et al., 2005).

La afinidad de la DA por las dos clases de receptores es diferente, siendo mayor para los receptores de la clase D2; con una constante de afinidad ( $K_D$ ) menor a 50 nM para los mismos. La  $K_D$  está entre 0.5 y 5  $\mu$ M para los D1 (Missale et al., 1998). Además, no ha sido posible diferenciar farmacológicamente a los receptores D1 de los D5, aún cuando se ha descrito que los receptores D5 son 10 veces más afines por la dopamina que los D1 (Seeman y Van Tol, 1994). Por otra parte, los receptores D2, D3 y D4 presentan afinidades muy similares por la dopamina (Vallone et al., 2000) y sólo muy recientemente han aparecido ligandos selectivos.

El quinpirole y quinolorane se encuentran entre los agonistas más selectivos para los receptores de la clase D2. El quinpirole tiene una  $K_D$  de 576 nM para la isoforma D2 y una  $K_D$  de 5.1 nM para la isoforma D3, además posee una  $K_D$  de 46 nM para la isoforma D4 (Sokoloff et al., 1990). El quinolorane por

otro lado tiene una  $K_D$  de 341 nM para el receptor D2 y de 3.6 nM para el receptor D3 (Foreman et al., 1989; Sokoloff et al., 1992). Estos dos agonistas presentan hasta 100 veces mayor afinidad por los receptores D3 en comparación con la isoforma D2.

Dentro de la familia de las benzazepinas se encuentran los agonistas selectivos para los receptores D1, uno de los más potentes es el SKF81297, que posee una  $K_D$  de 2.2 nM y en ensayos farmacológicos una  $EC_{50}$  de 18 nM para estimular a la enzima adenilato ciclasa. Este mismo agonista posee una  $K_D$  de aproximadamente 10  $\mu$ M para los receptores D2 (Andersen y Jansen, 1990).

#### **1.4.2 Localización de los receptores dopaminérgicos en el NSt.**

Por medio de la distribución del ARNm de los receptores dopaminérgicos sensado con técnicas de hibridación, se ha determinado la localización de los distintos tipos de receptores a dopamina en el sistema nervioso central (Sokoloff y Schwartz, 1995).

La hibridación *in situ* realizada en el NSt encontró que las MSNs de la vía directa o estriato-nigrales, contienen grandes cantidades del ARNm que codifica para el receptor tipo D1. Sólo el 17% de estas neuronas expresa ARNm para el receptor tipo D2. Por otra parte, neuronas estriato-palidales, o de la vía indirecta, expresan ARNm para el receptor tipo D2 y un bajo porcentaje para el receptor tipo D1 (Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1991). A partir de estos resultados se sugirió que los receptores dopaminérgicos están segregados: los D1 en neuronas de la vía directa y los D2 en neuronas de la vía indirecta.

Sin embargo, otros trabajos con técnicas de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos específicos con marca fluorescente contra las clases de receptores a dopamina, han puesto en duda el modelo de segregación ya que reportan niveles significativos de colocalización de las dos clases de receptor en una población importante de neuronas. En rebanadas de cerebro se reporta 80% de co-expresión de receptores de las clases D1 y D2 (Aizman et al., 2000; David y

Harrison, 2002). Estas diferencias pueden deberse a las limitaciones de las técnicas utilizadas. El uso de anticuerpos puede generar reacciones cruzadas y la técnica de hibridación *in situ* no permite detectar cantidades pequeñas de ARNm (Wang et al., 2006).

Se ha demostrado con el uso de transcripción inversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa en células únicas (scRT-PCR) del NSt dorsal de rata, que las neuronas positivas a sustancia P expresan abundante ARNm del receptor D1 (46% de la muestra n=35), y que una subpoblación importante de éstas co-expresa ARNm para los receptores D2 (19%), D3 (38%) o D4 (25%). Además, muchas neuronas positivas a encefalinas (26% de la muestra n=35) expresan niveles abundantes de ARNm para las dos isoformas del receptor D2, y entre el 10 y 20% de éstas co-expresan ARNm para las isoformas D1 y D5. Por último, se describe una población de neuronas (29%) que co-expresan ARNm para sustancia P, encefalina, receptores D1 y D2 (Surmeier et al., 1993, 1996; Nicola et al., 2000).

Por todos estos datos contradictorios arrojados por las diversas técnicas el tema de la segregación sigue en discusión y es parte del debate actual.

### **1.5 Vías de señalización intracelular asociadas a la activación de receptores dopaminérgicos.**

La activación de receptores dopaminérgicos activa diversas cascadas de señalización intracelular, las cuales regulan diferentes efectores moleculares en las células.

Una vez que la dopamina se une a sus receptores promueve la activación de proteínas G heteroméricas ( $G_{\alpha\beta\gamma}$ ) a las cuales se encuentran acoplados. La hidrólisis de GTP en GDP en la subunidad  $G_{\alpha}$  ocasiona la separación de las subunidades  $G_{\alpha}$  y  $G_{\beta\gamma}$ , estas últimas activan o inhiben diferentes proteínas hasta

llegar a sus efectores, que pueden ser regulados por fosforilación a través de proteínas cinasas y desfosforilación por proteínas fosfatasas (Missale et al., 1998).

Los receptores de la clase D1 acoplados a proteínas  $G_s$ ,  $G_{olf}$  activan a la AC y aumentan los niveles de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) en MSNs. Por otra parte, los receptores de la clase D2, acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  (sensibles a la toxina pertusis) inhiben a la AC y por lo tanto deprimen los niveles de AMPc intracelular (Missale et al., 1998). Los receptores dopaminérgicos también activan la vía de fosfoinosítidos a través de proteínas  $G_q$  (Hernández-López et al., 2000).

### **1.5.1 Vía de señalización asociada a receptores dopaminérgicos de la clase D1.**

La vía de señalización activada al estimular los receptores dopaminérgicos de la clase D1 aumenta las corrientes de  $Ca^{2+}$  de tipo de L en las MSNs. El receptor dopaminérgico de la clase D1 está acoplado a una proteína  $G_s$  o  $G_{olf}$ , capaces de estimular a la AC. La activación de la AC eleva los niveles de AMPc citosólicos, los cuales activan a la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) para promover su disociación en las subunidades reguladora y catalítica (Snyder et al., 1998). La PKA activa tiene varios efectos, entre ellos, la fosforilación del canal de  $Ca^{2+}$  de tipo L. Además fosforila y activa a un inhibidor endógeno de fosfatasas, el DARPP-32 (*Dopamine and cAMP Regulated Phospho Protein of 32kDa* o fosfoproteína regulada por AMPc y dopamina de 32,000 daltones) (Svenningsson et al., 2004; Nishi et al., 1997; Greengard et al., 1998; Fienberg et al., 1998). Una vez activo, el DARPP-32 fosforila e inhibe a la fosfatasa uno c (PP1c). La inhibición de PP1c permite a los diferentes efectores (como por ejemplo el canal de  $Ca^{2+}$ ) permanecer más tiempo fosforilados, por la PKA, **ver figura 5** (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 2000). Si las fosfatasas están activas, la fosforilación por PKA es transitoria y es rápidamente revertida, pues PKA también fosforila y activa a varias fosfatasas (Nishi et al., 1997; Hernández-López et al., 2000). Así, PKA comienza y también termina o

revierte su propia acción, a menos que active al DARPP-32 para retardar sus efectos. El DARPP-32 es la proteína del cerebro que más se fosforila por la acción de la dopamina y su concentración más alta se encuentra precisamente en las MSNs, que cuantitativamente, pueden considerarse los principales blancos de acción de éste neurotransmisor modulador (Greengard et al., 1998; Svenningsson et al., 2004; Greengard P, 2001). El efecto de la fosforilación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L es el de amplificar los estímulos despolarizantes y por lo tanto facilitar el disparo de las MSNs. Sin embargo, como estos canales se activan a potenciales despolarizados y cercanos al umbral de disparo éste efecto no se observa cuando la célula está en el potencial de reposo (-80 mV), sólo se observa si la neurona ha sido previamente despolarizada (Hernández-López et al., 1997; Galarraga et al., 1997).

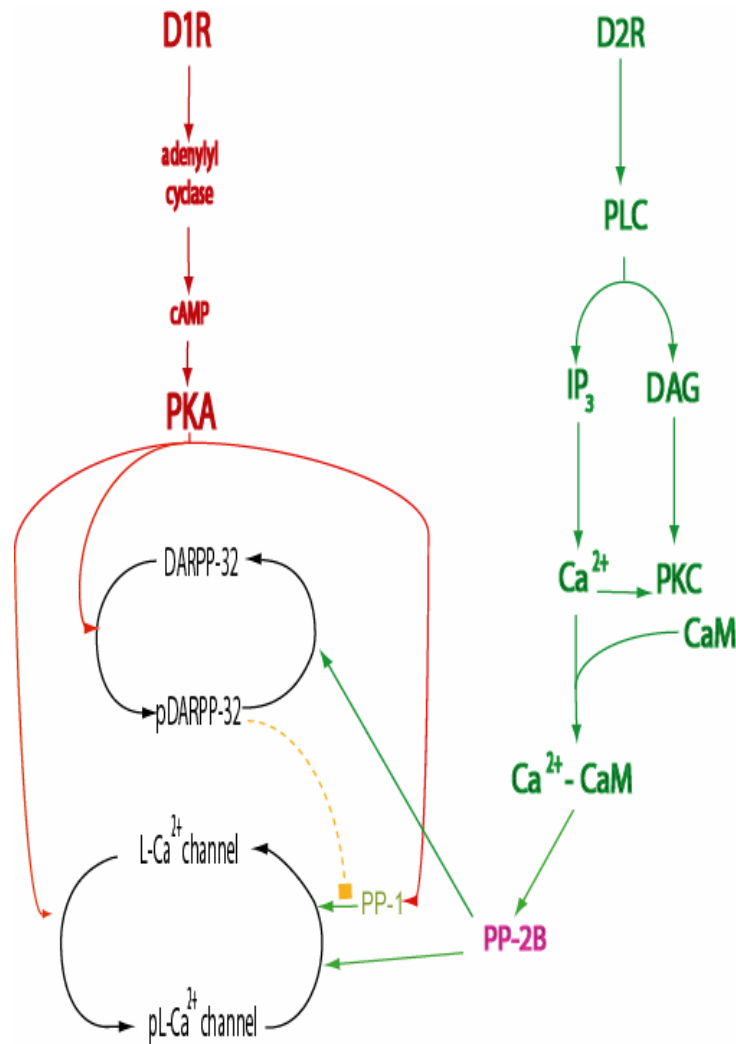
La vía de señalización de los receptores D1, también actúa sobre canales de potasio activados a potenciales de membrana hiperpolarizados (< -80mV), los cuales median la rectificación entrante en las MSNs (Pacheco-Cano et al., 1996; Mermelstein et al., 1998). Por lo tanto, la DA disminuye la frecuencia de disparo cuando su acción se observa desde un nivel hiperpolarizado, donde los canales rectificadores de potasio están activos (Hernández-López et al., 1997). Así tenemos el caso de un neurotransmisor que es inhibitorio a potenciales hiperpolarizados y excitador a niveles despolarizados.

Además, la DA disminuye las corrientes de sodio en las MSNs, a través de la vía AMPc-PKA-canal debido a la fosforilación directa del canal (Nicola et al., 2000). En neuronas piramidales de la corteza prefrontal la activación de receptores D1 disminuye las corrientes transitorias de sodio, pero no las corrientes persistentes del mismo (Maurice et al., 2001), a través de la misma vía. Como se ve, las acciones sobre ciertas corrientes tienden a dificultar el disparo, mientras que otras tienden a facilitarlo.

### **1.5.2 Vía de señalización asociada a receptores dopaminérgicos de la clase D2.**

La vía de señalización activada al estimular los receptores dopaminérgicos de la clase D2 reduce la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, produciendo la disminución en la excitabilidad neuronal (Hernández-López et al., 2000). Éste es un efecto contrario al de los receptores D1, por lo que el mismo neurotransmisor puede tener efectos opuestos sobre el mismo efector molecular dependiendo de cual receptor se activa. Esta modulación es mediada por la activación del complejo  $\beta\gamma$  de la proteína Gq, que activa a la isoforma  $\beta 1$  de la fosfolipasa C (PLC). La activación de la PLC aumenta los niveles intracelulares del segundo mensajero Inositol 1, 4, 5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), que promueve la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de las pozas intracelulares así como del diacilglicerol (DAG). El aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa a la proteína calcio-calmodulina (Ca-CaM) que a su vez activa a la proteína fosfatasa 2 B o calcineurina (PP-2B). Esta fosfatasa es la que desfosforila al canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (Hernández-López et al., 2000). Por otro lado, el DAG activa la proteína cinasa C (PKC). La activación de receptores D2 reduce corrientes de sodio en las interneuronas colinérgicas neostriatales a través de la fosforilación por PKC (Maurice et al., 2004). **Ver figura 5.**





**Figura 5.** Vías de señalización relacionadas con la activación de receptores a dopamina de las clases D1 y D2. Los receptores de la clase D1, a través de la vía AMPc/PKA, estimulan la fosforilación de diferentes proteínas efectoras (e.g., canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, etc.). Pero la PKA también fosforila a proteínas fosfatasas, como la PP-1, que acaban la acción de la misma PKA, haciendo que la misma sea transitoria. Sin embargo, cuando la PKA activa a DARPP-32, este se convierte en un potente inhibidor de la PP-1, manteniendo el canal en el estado fosforilado. Así, sólo si se inhiben las fosfatasas hay acción de la DA sobre los canales de Ca<sup>2+</sup> y por tanto se facilita el disparo. En contraste, la activación de receptores D2 comienza con la activación de PLC, que a su vez produce IP<sub>3</sub>, DAG y aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular. Este último activa a la Ca-CaM, que a su vez activa a la PP-2B, misma que desfosforila directamente al canal de Ca<sup>2+</sup> y a DARPP-32, desinhibiendo a PP-1 y reduciendo aún más la corriente de Ca<sup>2+</sup> lo que reprime el disparo (Nishi et al., 1997; Hernández-López et al., 2000).

Como las cadenas de señalización afectan distintas conductancias iónicas de la membrana, estas acciones cambian la forma de integrar la información de las células (la función entrada-salida o *I/O function*), es decir, cambia la manera en que las células generan los diferentes patrones temporales de disparo ante un determinado estímulo y por lo tanto la capacidad de interacción o comunicación con la distintas neuronas del circuito (Hernández López et al., 1997, 2000; Pérez-Garci et al., 2003a; Guzmán et al., 2003; Salgado et al., 2005). Esto modifica el procesamiento de la información y la actividad global de un circuito neuronal.

Se sabe que entre los principales efectores moleculares de la señalización dopaminérgica se encuentran los canales de  $Ca^{2+}$  (Surmeier et al., 1996; Hernández-López et al., 1997, 2000; Pérez-Garci et al., 2003a; Salgado et al., 2005), los canales de sodio, los de potasio dependientes de voltaje y distintos receptores-canal de tipo ionotrópico como los glutamatérgicos (AMPA/KA y NMDA) y GABAérgicos ( $GABA_A$ ) (Cepeda et al., 1993; Pisani et al., 2000; Tseng y O'Donnell, 2004; Guzmán et al., 2003). Así es que las acciones de un neurotransmisor de éste tipo pueden ser muy complejas. No pueden verse simplemente como excitación o inhibición.

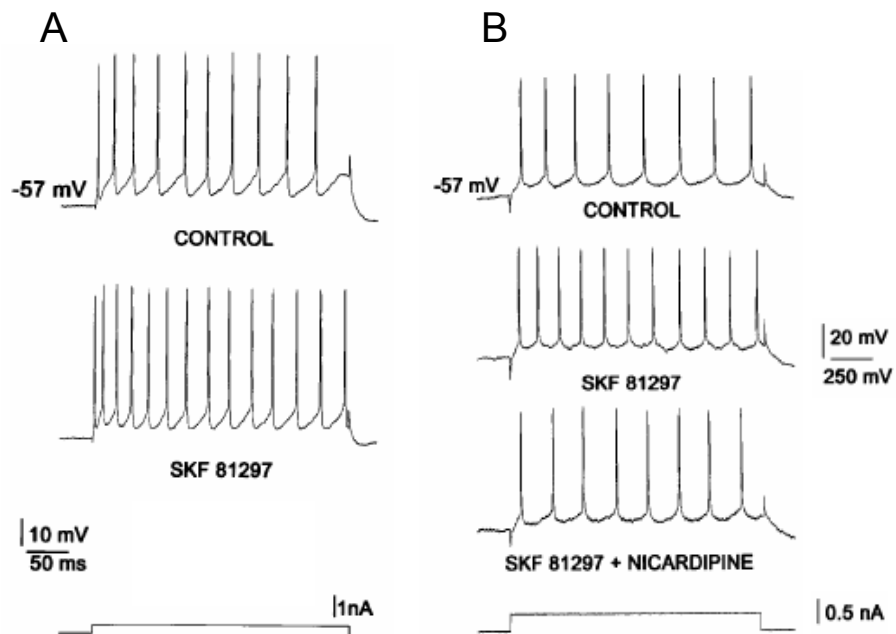
### **1.6 Modulación dopaminérgica de las respuestas sinápticas.**

Los receptores dopaminérgicos activos tienen acciones diferenciales sobre los componentes glutamatérgicos (Cepeda et al., 1993; Levine et al., 1996; Cepeda y Levine, 1998; Flores-Hernández et al., 2002). La activación de receptores D1 potencia las respuestas NMDA y AMPA aisladas o provocadas por estimulación de las aferentes córtico-estriatales. Este aumento puede ser amplificado por la activación de canales de  $Ca^{2+}$ , particularmente del tipo L (Galarraga et al. 1997; Cepeda y Levine, 1998; Flores-Hernández et al., 2002). La aplicación de forskolina y ácido okadaico aumentan la respuesta NMDA de manera similar a los receptores D1 (Galarraga et al., 1997; Cepeda y Levine, 1998).

Por el contrario, la administración de quinpirole disminuye significativamente el aumento provocado por los receptores D1 (Flores-Hernández et al., 2002) y también disminuye selectivamente los EPSPs mediados por AMPA y los provocados por la aplicación iontoforética de AMPA y glutamato (Cepeda y Levine, 1998; Hernández-Echeagaray et al., 2004).

### 1.7 Efectos dopaminérgicos sobre el disparo de las MSNs.

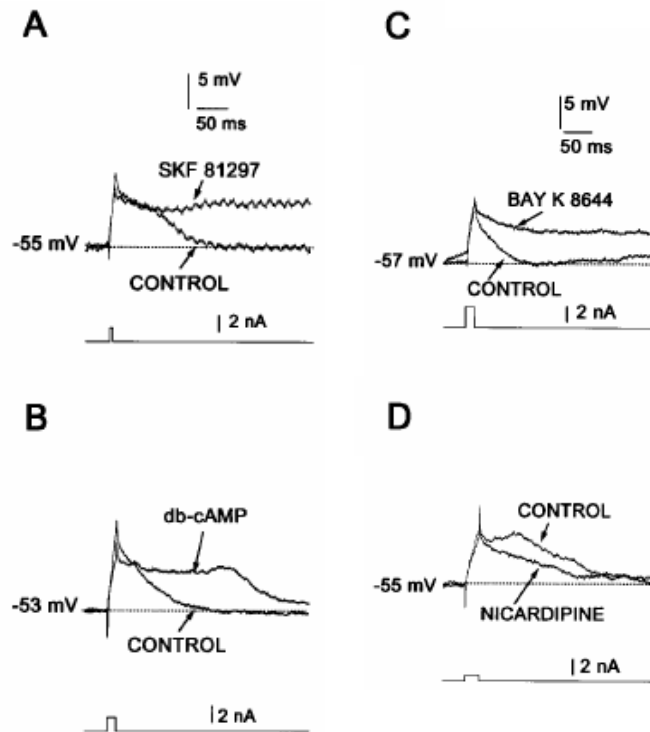
En registros intracelulares de MSNs obtenidos a potenciales de mantenimiento despolarizados (-55mV) la activación de receptores a dopamina D1 produce un incremento en la frecuencia de disparo (Hernández-López et al., 1997). Este incremento en la frecuencia de disparo es revertido por el antagonista de canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L, nicardipina (ver figura 7, Hernández-López et al., 1997).



**Figura 7.** Aumento en la frecuencia de disparo por activación de receptores tipo D1. Trenes de potenciales de acción producidos por un pulso rectangular de corriente despolarizante a un potencial de membrana de -57mV en condición control **A** y después de la aplicación del agonista dopaminérgico D1, SKF81297 (trazo inferior de A), en la misma neurona. Note el aumento en el número de potenciales de acción ante el mismo estímulo. En **B** se muestra como el efecto del agonista dopaminérgico D1 (comparar trazos superior y medio) se revierte al administrar nicardipina (trazo inferior) (Hernández-López et al., 1997).

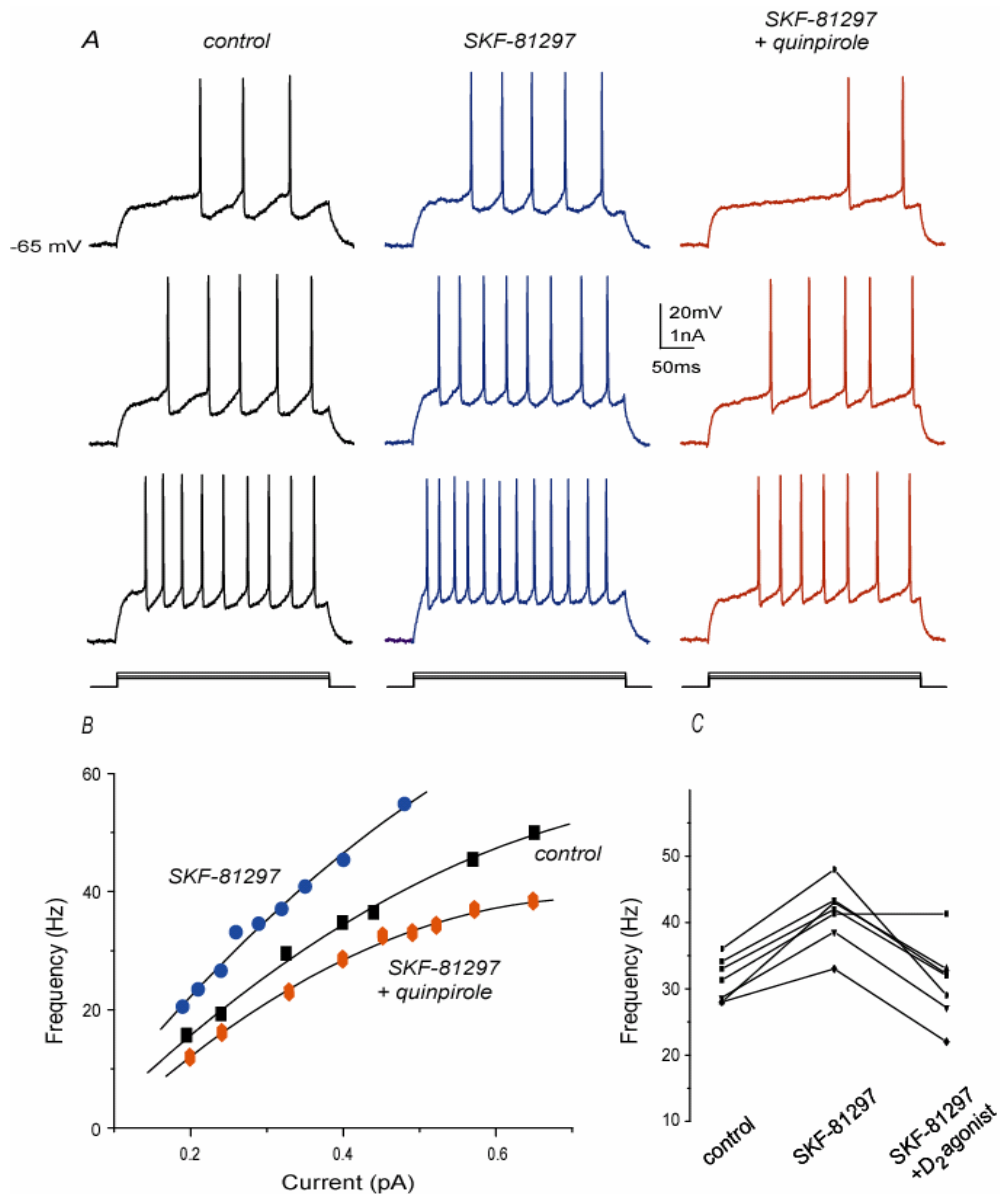
La activación de receptores D1 provoca un aumento en la frecuencia de disparo al facilitar las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. El incremento en la frecuencia de disparo se explica por aumento en la probabilidad de apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 2000), que generan despolarizaciones lentas persistentes durante la estimulación a -60 mV (e.g., figura 8); donde la influencia de la rectificación entrante de potasio es mínima. La corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L acerca el potencial de membrana hacia el umbral de disparo del potencial de acción y por lo tanto aumenta la frecuencia de disparo. Esto ocurre aún cuando los receptores D1 aumentan ligeramente la amplitud del postpotencial hiperpolarizante (PPH). El efecto puede ser ocluido por el agonista del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, BAY-K 8644 (Hernández-López et al., 1997). Los análogos de AMPc mimetizan el efecto producido por el agonista D1. La calciseptina, la nifedipina y otras dihidropiridinas, bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, bloquean el efecto dopaminérgico D1 (**figura 8**).

A diferencia de los receptores D1, los receptores de la clase D2 provocan la disminución de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, en los potenciales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por TEA y en corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  aisladas registradas en MSNs disociadas. Esto correlaciona con la disminución de la frecuencia de disparo y de las despolarizaciones persistentes a potenciales despolarizados; aún cuando se reduce de manera ligera en algunas células, la amplitud del PPH (Pérez-García et al., 2003b), pues agonistas D2 reducen las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q (Salgado et al., 2005), necesarias para facilitar las corrientes de potasio activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  que generan el PPH. Se requiere bloquear tanto a las corrientes P/Q como las N para realmente reducir el PPH (Pérez-García et al., 2003a).

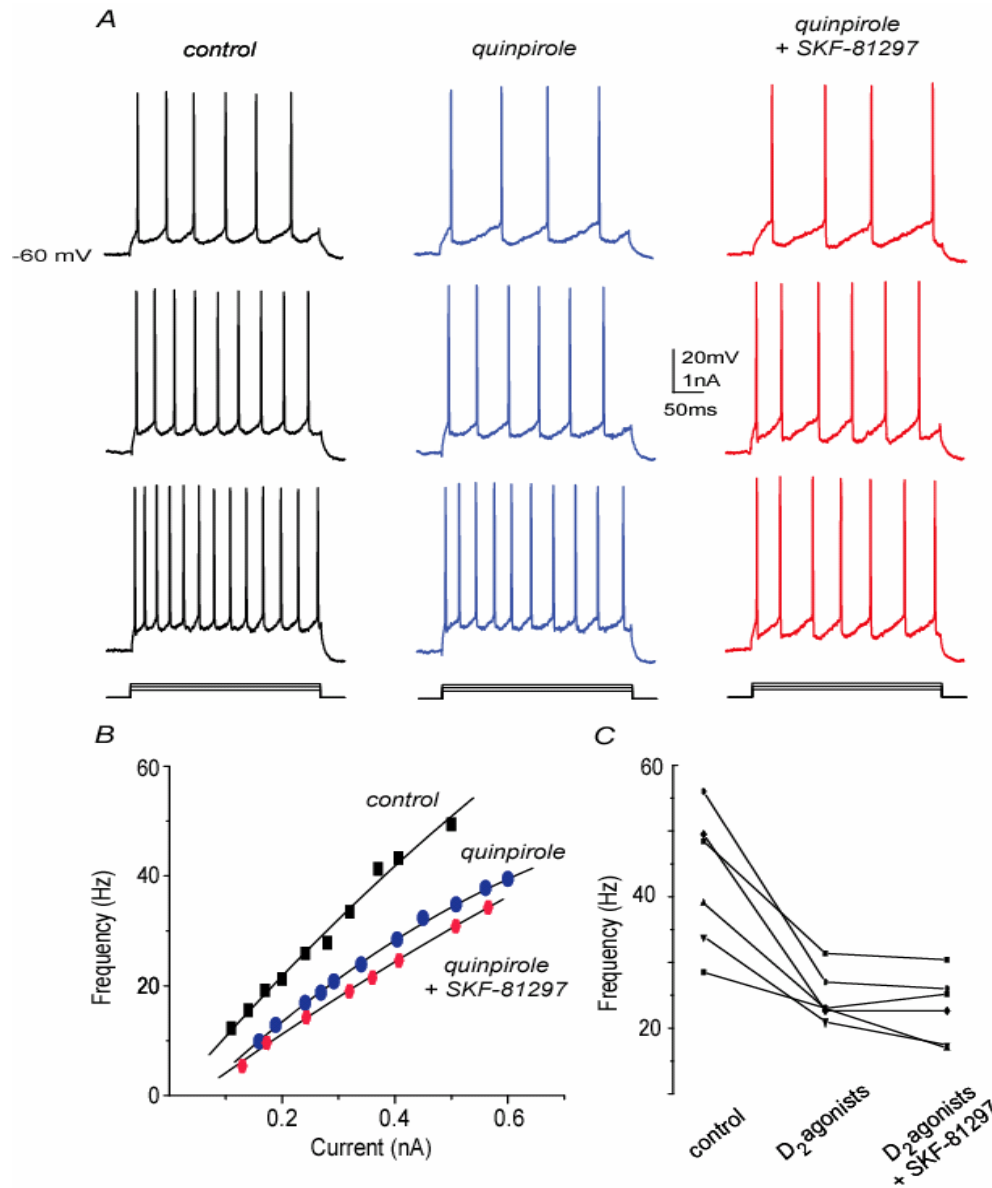


**Figura 8.** Facilitación de las despolarizaciones lentas persistentes debido a la activación de receptores a dopamina de la clase D1. **A.** Respuestas de voltaje sobrepuestas inducidas por la aplicación de un pulso breve de corriente despolarizante cerca de los -60 mV, en condición control y después de la aplicación del agonista dopaminérgico D1 (SKF81297). **B.** Con el mismo protocolo de estimulación la adición de análogos de AMPc mimetizan el efecto provocado por el agonista tipo D1. **C.** La aplicación del agonista de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L BAYK 8644 también mimetiza el aumento producido por el agonista tipo D1. **D.** La aplicación del antagonista de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, nicardipina, reduce estas despolarizaciones (Hernández-López et al., 1997).

Cuando se aplicaron secuencialmente los agonistas de receptores a dopamina de las clases D1 y D2 en la misma neurona, se observó que la acción del receptor D2 predomina sobre la acción del receptor D1; tanto a nivel de las corrientes de  $Ca^{2+}$  de tipo L como en los potenciales de  $Ca^{2+}$  inducidos por TEA. Esto también se observa sobre las despolarizaciones persistentes registradas a potenciales despolarizados y sobre la frecuencia de disparo (las figuras 9 y 10 muestran los efectos sobre el disparo) (Pérez-Garci et al., 2003b; Salgado et al., 2005).



**Figura 9.** El aumento en la frecuencia de disparo producido por agonistas de la clase D1 es revertido por la activación de receptores de la clase D2. En **A** se muestran trenes de potenciales de acción evocados por la inyección de pulsos de corriente de diferente intensidad, en condición control (columna izquierda), en presencia del agonista D1, SKF81297 (columna central) y durante la aplicación del agonista D2, quinpirole en presencia del agonista D1 (columna derecha). **B.** Curva intensidad-frecuencia (I-F). **C.** Muestra experimental graficando la frecuencia a la mitad de la curva I-F.



**Figura 10.** La disminución en la frecuencia de disparo producido por agonistas de la clase D2 no es revertida por la activación de los receptores de la clase D1. En **A** se muestran trenes de potenciales de acción inducidos por pulsos de corriente despolarizante en condición control (columna de la izquierda); en presencia del agonista D2, quinpirole (columna central); en presencia del agonista D1, SKF81297 y del agonista D2 (columna derecha). **B.** Curva I-F de los trazos de la célula mostrada en A. El agonista D2 produjo una disminución en la frecuencia de disparo, como puede ser observado por el corrimiento de la curva hacia la derecha. La aplicación del agonista D1 no revirtió este efecto. **C.** Se muestran los valores en una muestra de neuronas utilizando la frecuencia media de la curva I-F.

## CAPÍTULO 2

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La mayor parte de estudios relacionados con las aferencias sinápticas a las MSNs se han realizado con estimulaciones subumbrales. Por lo tanto, se ha llegado a decir que el componente sináptico de tipo NMDA no es importante, además de que no se ha valorado la influencia disináptica GABAérgica en la respuesta a la activación cortical (Kita et al., 1985; Kita, 1996; Calabresi et al., 2000).

Pero se sabe que la entrada cortical es necesaria para producir los “*up-states*” o estados activados que no se pueden explicar con la suma de eventos sinápticos subumbrales (Wilson, 1993; Nisenbaum y Wilson, 1995; Wilson y Kawaguchi, 1996). Por lo que nos hacemos la pregunta: ¿qué tanto es necesaria la interacción de las entradas sinápticas glutamatérgicas (incluyendo la que depende de NMDA) y GABAérgicas con las conductancias intrínsecas de las MSNs para permitir la generación de las despolarizaciones prolongadas provocadas por la estimulación cortical?.

Los estudios de la modulación dopaminérgica sobre la frecuencia de disparo reportan un predominio de las acciones del receptor D2 sobre las acciones del receptor D1 (Hernández-López et al., 1997, 2000; Pérez-Garci et al., 2003b). Pero si esto es así, ¿para qué queremos a los receptores D1? ¿No habrá una condición fisiológica en que predominen los efectos de los receptores D1?.

En el presente trabajo se estudió la interacción de los componentes sinápticos GABAérgico y glutamatérgico (NMDA), con la corriente intrínseca de  $Ca^{2+}$  de tipo L, durante la generación de las mesetas despolarizantes provocadas ortodrómicamente. También se estudió la modulación dopaminérgica de dichos eventos despolarizantes.



## **CAPÍTULO 3**

### **HIPÓTESIS.**

1.- Mientras los receptores AMPA/Kainato producen las respuestas sinápticas rápidas subumbrales y umbrales a los estímulos de la corteza cerebral, los receptores a NMDA y los receptores GABA<sub>A</sub> activados indirectamente por excitación de neuronas GABAérgicas vecinas (MSNs e interneuronas) que conectan con la neurona registrada, contribuyen a la generación de potenciales en meseta dendríticos. La combinación de estos eventos sinápticos, podría llegar a activar conductancias intrínsecas de calcio dependientes de voltaje, presentes en las dendritas de las MSNs.

2.- La integración de la entrada sináptica en las neuronas espinosas medianas esta modulada por dopamina. Ante estímulos supraumbrales deberíamos observar la contribución de ambas clases de receptor dopaminérgico: D1 y D2.

## **CAPÍTULO 4**

### **OBJETIVOS.**

- Estudiar la participación glutamatérgica y GABAérgica en la respuesta sináptica (ortodrómica) supraumbrales al estimular la vía córtico-estriatal.
- Estudiar la interacción de la respuesta sináptica con las conductancias intrínsecas de las MSNs, enfocándonos en la conductancia de calcio de tipo L.
- Estudiar la modulación dopaminérgica sobre la respuesta ortodrómica supraumbrales.

## **CAPÍTULO 5**

### **MATERIAL Y MÉTODOS.**

Se realizaron registros intracelulares en la modalidad de fijación de corriente de MSNs del NSt dorsal, utilizando rebanadas sagitales de 350  $\mu\text{m}$  de grosor de cerebro de ratas macho Wistar de 40 a 60 días de edad (100-120 gramos).

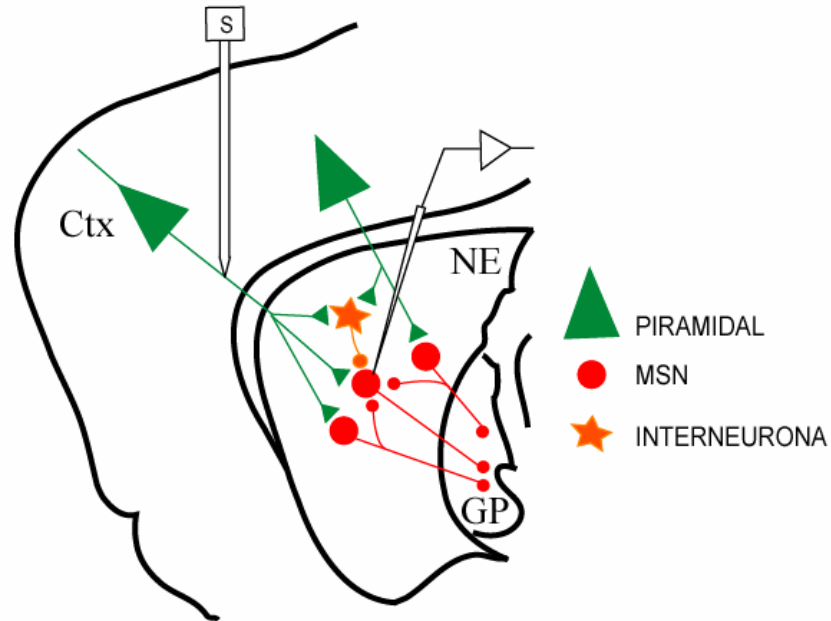
Para el registro se decapitó un animal para extraer el cerebro. Éste se sumergió en líquido cerebroespinal artificial (LCA) a 4° C, constituido por (en mM): 127.5 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> y 11 glucosa (pH 7.4, 300mOsm/l con glucosa), burbujeado continuamente con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido un minuto, al cerebro se le quitó el cerebelo y el bulbo olfatorio. Mediante un corte sagital en la línea media se separaron los hemisferios. Cada hemisferio se adhirió por separado con cianocrilato al piso de una caja Petri colocada en un vibratomo (PELCO 101), y se obtuvieron rebanadas sagitales. Se seleccionaron las rebanadas con NSt dorsal y se incubaron en LCA burbujeado con carbógeno a temperatura ambiente por un periodo de 1 h para su recuperación (Bargas et al., 1991). Las rebanadas se colocaron en una cámara de registro y se perfundieron por gravedad con LCA a una tasa de 1 ml/min a una temperatura de 33-35°C. Las neuronas fueron empaladas con microelectrodos de vidrio (borosilicato Frederick Haer & Co, Bowdoinham ME), llenados previamente con acetato de potasio 3M y biocitina al 1% (la resistencia d.c. fue de 80-120 M $\Omega$ ). Los electrodos se elaboraron con un estirador de micropipetas horizontal (Sutter Instruments Co. P-87).

La señal registrada fue amplificada con un sistema de amplificación de alta impedancia, acoplado a un puente activo de Wheatstone (Neuro Data, Cygus Technology, Inc, Delaware Water Gap, PA). Los registros se digitalizaron a 40 kHz y se grabaron en cintas de video VHS.

Durante cada experimento la señal electrofisiológica se monitoreó con un osciloscopio (Nicolet 310, Madison WI.), y se balanceó el puente de Wheatstone para quedarnos con los desplazamientos de voltaje dados por la resistencia de entrada neuronal ( $R_N$ ).

A través del electrodo de registro se inyectaron pulsos rectangulares de corriente de duración y amplitud variable generados por un estimulador (Grass Instruments S88, Quincy MA). La intensidad y duración de los estímulos fueron controladas mediante una unidad de aislamiento (Digitimer LTD, DS2A).

Por medio de un electrodo bipolar concéntrico ( $50\mu\text{m}$ ) colocado sobre la superficie de la rebanada cerebral a nivel de la corteza, se aplicaron uno o cuatro choques breves de voltaje ( $800\ \mu\text{s}$ ) de intensidad variable (8-30 V) a una frecuencia de 0.1Hz producidos por un estimulador (Grass Instruments S88, Quincy MA). La intensidad fue controlada mediante una unidad de aislamiento (Digitimer LTD, DS2A) (**ver figura 11**).



**Figura 11.** Esquema de los componentes del circuito córtico-estriatal que en ésta Tesis demostramos que se están estimulando. Los triángulos representan las aferentes provenientes de la corteza (**Ctx**); dentro del neostriado (**NSt**), los círculos representan a las **MSNs**. Observe que se conectan entre sí constituyendo una entrada inhibitoria para la neurona que se registra. La estrella simboliza a los diferentes tipos de interneuronas GABAérgicas presentes en el circuito y que también hacen contacto con las MSNs. Se muestran el electrodo de estimulación S colocado a nivel de la corteza cerebral y el de registro situado en el NSt, registrando una MSN.

En cada experimento se tomaron registros control, es decir, en los que cada protocolo de estimulación se realizó en ausencia de cualquier fármaco. Después se aplicaron los fármacos, se repitieron los protocolos y los registros. El tiempo aproximado para el recambio total y el equilibrio de un fármaco en el LCA de la cámara de registro es de 15 minutos (medidos con colorantes), a partir de los cuales se obtuvieron los registros experimentales o en presencia de los fármacos. En el transcurso del experimento la neurona fue inyectada con biocitina para poder identificarla anatómicamente después de los registros.

Las rebanadas se fijaron en paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 1% en un amortiguador de fosfatos (PBS 0.1 M, pH 7.4) durante 24 horas. Por medio de un vibratomo se obtuvieron rebanadas de 60  $\mu\text{m}$  de grosor y fueron incubadas con avidina-peroxidasa (Kit ABC-HRP de Vector) y Tritón X-100 (0.2%). Después los cortes se lavaron con una solución salina amortiguada con fosfatos a temperatura ambiente. Por último, la actividad de la peroxidasa se visualizó con 3,3-diaminobenzidina (0.05%) y peróxido de hidrógeno (0.01%) por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente (Horikawa y Armstrong, 1988).

### **5.1 Fármacos.**

Los siguientes fármacos fueron utilizados para la caracterización de la respuesta sináptica ortodrómica:

Antagonista de receptores-canal GABA<sub>A</sub>: bicuculina metil-iodinada (10  $\mu\text{M}$ ; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Antagonista de receptores-canal a glutamato de tipo NMDA: ácido DL-2-amino-5-fosfonoaléxico (APV 50  $\mu\text{M}$ ; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Antagonista de receptores-canal a glutamato de tipo AMPA: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico (10  $\mu\text{M}$ ; CNQX; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Antagonistas de canales de calcio de tipo L: nicardipina (2.5  $\mu\text{M}$ ; RBI-Sigma St. Louis, MO) y calciseptina (400nM; Alomone Labs. Jerusalem-Israel).

Agonista de receptores-canal a glutamato de tipo NMDA: N-metil-D-aspartato (5  $\mu\text{M}$  NMDA; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Agonista de receptores a dopamina de la clase D1: SKF-81297 (1-5  $\mu\text{M}$ ; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Agonista de receptores a dopamina de la clase D2: quinelorane (1-5  $\mu\text{M}$ ; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Estos reactivos fueron preparados al momento del experimento a partir de soluciones madre preparadas previamente.

## **5.2 Procesamiento de los datos.**

Los datos obtenidos fueron transferidos a una computadora PC mediante el uso de programas diseñados en el laboratorio en el ambiente LabView (National instruments, Austin TX). Los registros obtenidos fueron analizados y graficados con el programa Origin (v 7.0; Microcal TM, Northampton MA).

Los resultados obtenidos son pareados, es decir, en cada neurona registrada se compararon las respuestas en condición control y después de la adición de alguno o algunos de los fármacos. Por ello se utilizó la prueba no paramétrica de rangos asignados: T de Wilcoxon de dos colas (Siegel y Castellan 1995; Systat v.7.SPSS Inc., Chicago IL). Además utilizamos la prueba no paramétrica de  $X^2$  de Pearson, para determinar la variabilidad de las respuestas sinápticas (Downie y Heath, 1973).

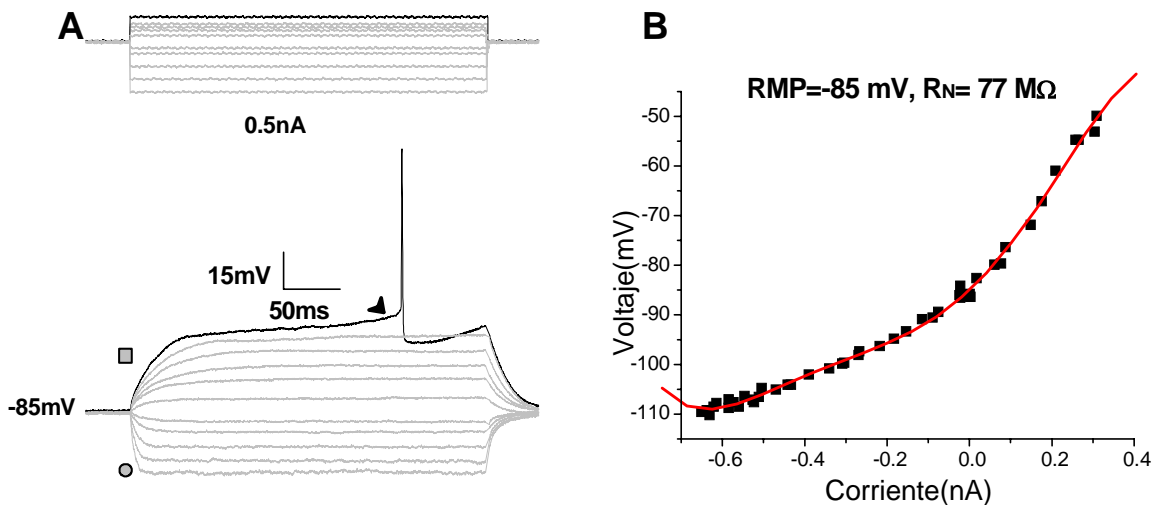
## CAPÍTULO 6

### RESULTADOS.

#### 6.1 Características electrofisiológicas de las MSNs.

Los resultados que se presentan a continuación fueron obtenidos de MSNs del NSt dorsal identificadas electrofisiológicamente y muchas de ellas, anatómicamente.

Se registraron 100 MSNs con un potencial de membrana en reposo (RMP) promedio ( $\pm$ ESM) de:  $-83\pm 4$  mV y con una resistencia de entrada ( $R_N$ ) de  $46\pm 16$  M $\Omega$  ( $n=55$ ). Las neuronas presentaban rectificación (es decir, la relación corriente-voltaje o “curva I-V” no fue lineal). El retraso en la aparición del primer potencial de acción iba precedido por una rampa despolarizante en respuesta a la inyección de corriente catódica (cabeza de flecha en la figura 12). Estas características identifican a las MSNs (Bargas et al., 1989; Galarraga et al., 1989; 1994; Kerr y Plenz, 2002). Las curvas I-V se ajustaron a un polinomio de segundo orden cuya derivada en  $I=0$  se tomaba como la  $R_N$ .

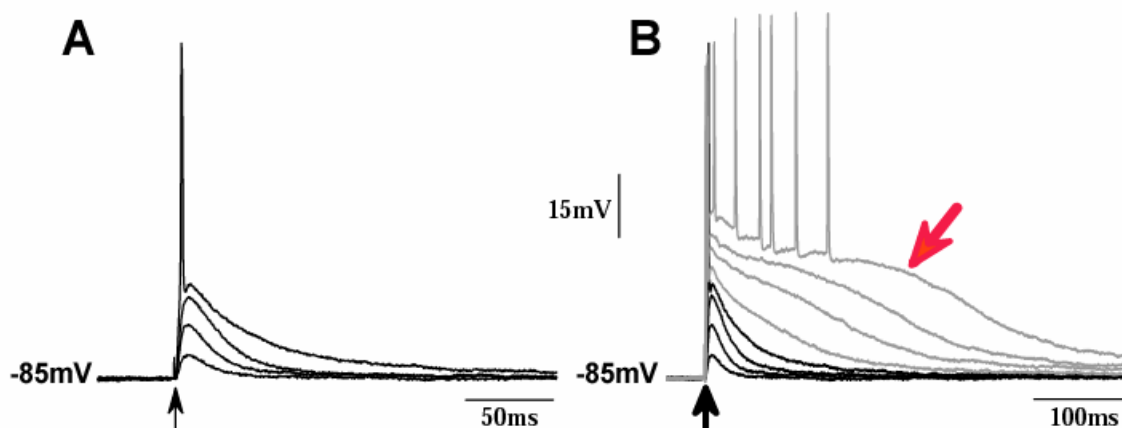


**Figura 12.** Identificación electrofisiológica de una MSN. **A.** Respuestas del potencial de membrana (abajo) a la inyección de corriente somática (arriba). **B.** Relación corriente-voltaje o curva I-V. No es lineal, se le ajusta un polinomio de 2<sup>o</sup> orden (cuadrática).



A través de un electrodo de estimulación bipolar concéntrico ( $50 \mu\text{m}$  de diámetro en la punta), se estimuló a nivel de la corteza cerebral mediante la aplicación de uno o cuatro choques breves producidos por un estimulador. Esto estimuló las aferentes córtico-estriatales. En las MSNs se registraron las respuestas a estos choques (Bargas et al., 1991) o a un tren de cuatro choques semejantes (intervalos entre choques = 50 ms).

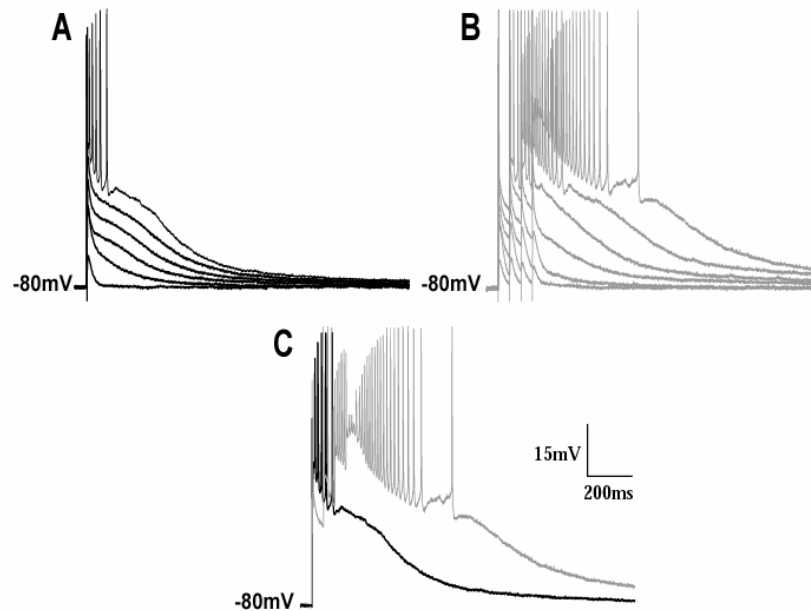
En las **figuras 13A y B** se muestran respuestas sinápticas representativas obtenidas con este protocolo. Nótese que las respuestas sinápticas provocadas con intensidades leves tiene la forma de potenciales sinápticos típicos y que conforme se va aumentando la intensidad de los estímulos se llega al umbral de disparo y se genera un potencial de acción (fig. 13A). Pero si se sobrepasa la intensidad umbral (fig. 13B) se genera una meseta despolarizante con una cinética que difiere de la caída de un potencial sináptico subumbral (**figura 13B flecha**) y que puede dar origen a un tren de potenciales de acción (Galarraga et al., 1997).



**Figura 13.** Respuestas ortodrómicas a la estimulación en corteza. **A** Respuesta subumbrales y umbral. **B.** Respuestas supraumbrales. La respuesta mayor es una meseta despolarizante (trazos grises) que presenta disparo repetitivo ante un solo choque (flecha en B). Las flechas inferiores indican el momento de la estimulación.

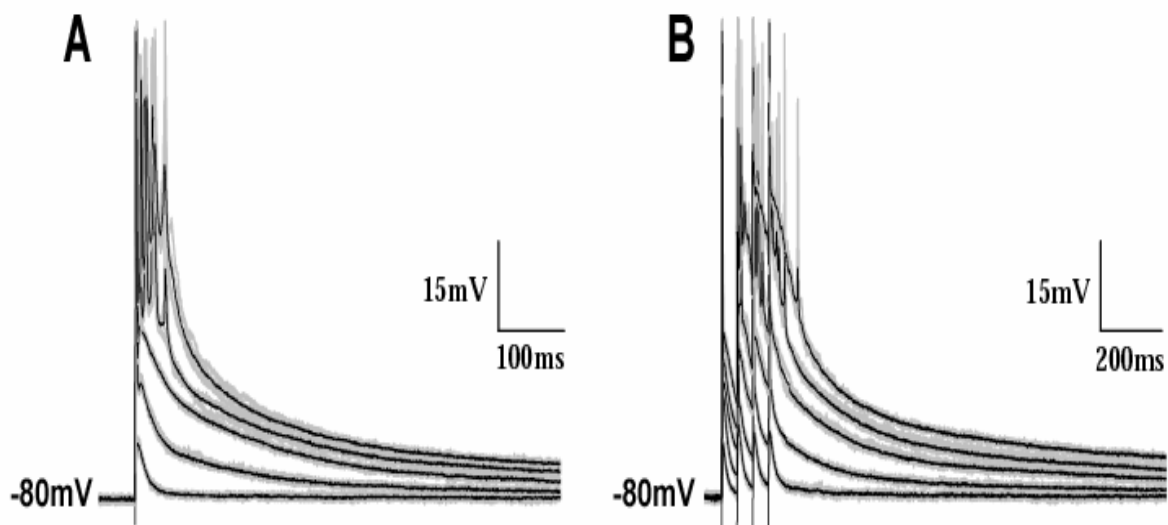
Estas respuestas ortodrólicas se deben a que las MSNs reciben un gran número de contactos sinápticos convergentes provenientes de neuronas piramidales de la corteza, las cuales favorecen la generación de los estados funcionales conocidos como *up-states* (Bennett y Wilson, 2000).

Para observar la sumación temporal de las respuestas sinápticas aplicamos un tren de cuatro choques a la vía córtico-estriatal. En la **figura 14** se muestra la comparación de las respuestas sinápticas obtenidas con uno y cuatro pulsos de intensidad variable en corteza (misma neurona postsináptica). En **A** se presenta una respuesta sináptica generada con un solo estímulo. En **B** se muestran las respuestas sinápticas obtenidas con un tren de cuatro estímulos. En **C** se sobrepone ambas respuestas para comprobar que si hay sumación temporal. El aumento en el área bajo la curva de la respuesta máxima provocada con cuatro estímulos fue  $246\pm 14\%$  mayor con respecto a la evocada por un solo choque ( $n=18$ , T de Wilcoxon  $p<0.05$ ).



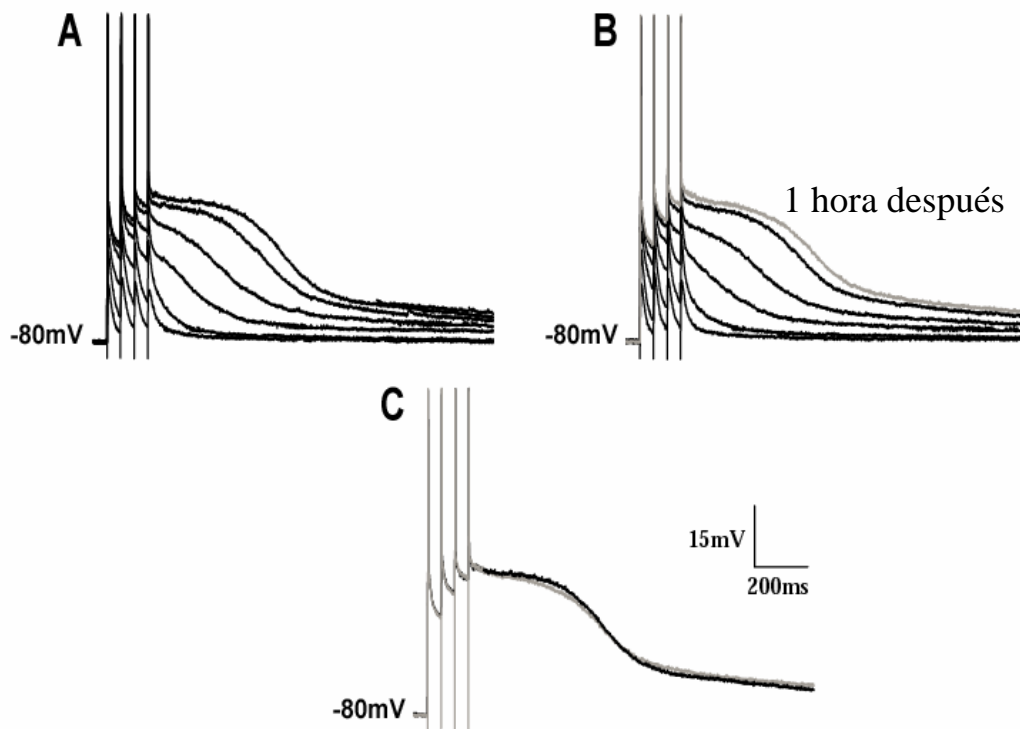
**Figura 14.** Respuestas postsinápticas obtenidas con los dos protocolos de estimulación. **A.** Respuestas sinápticas supraumbrales provocadas por un solo choque de intensidad creciente en la vía córtico-estriatal. **B.** Respuestas provocadas por un tren de cuatro choques. **C.** Trazos sobrepuestos de las respuestas en A y B (misma neurona).

Se promedian cinco respuestas sinápticas (**figura 15 A y B, trazos en color negro**) en la misma neurona para cada intensidad de estimulación de manera consecutiva, a una frecuencia de 0.1 Hz (**figura 15 A y B trazos en color gris**). La variabilidad de las respuestas sinápticas no mostró diferencias significativas (n=5, para cada una de las intensidades de estimulación,  $\chi^2$  de Pearson  $p < 0.05$ )



**Figura 15.** La variabilidad de las respuestas sinápticas no es significativa. En gris se muestran registros de cinco trazos consecutivos de las respuestas sinápticas obtenidos con un pulso **A** y con el tren de pulsos **B** a diferentes intensidades de estimulación. Los promedios son los trazos negros mientras que los trazos individuales están en gris.

Evaluamos qué tanto se conservan estas respuestas en el tiempo (**figura 16 A y B**). Como se puede observar en los trazos sobrepuestos, las respuestas son estables. Por lo tanto, los efectos descritos a continuación no se deben a la variabilidad intrínseca.



**Figura 16.** Estabilidad de las respuestas sinápticas. Se muestran las respuestas sinápticas obtenidas con un tren de estimulación de diferentes intensidades a los 15 min de obtenido el empale y una hora después (**A y B**). Los trazos sobrepuestos con la máxima intensidad de estimulación (**C**) muestran que las respuestas son estables por largos periodos de tiempo.

Una vez que demostramos que las respuestas obtenidas con los dos protocolos de estimulación no presentaban variabilidad significativa a través de largos periodos de tiempo, procedimos a la caracterización de las mismas.

## **6.2 Participación de sinapsis inhibitoras en la respuesta ortodrómica cortical.**

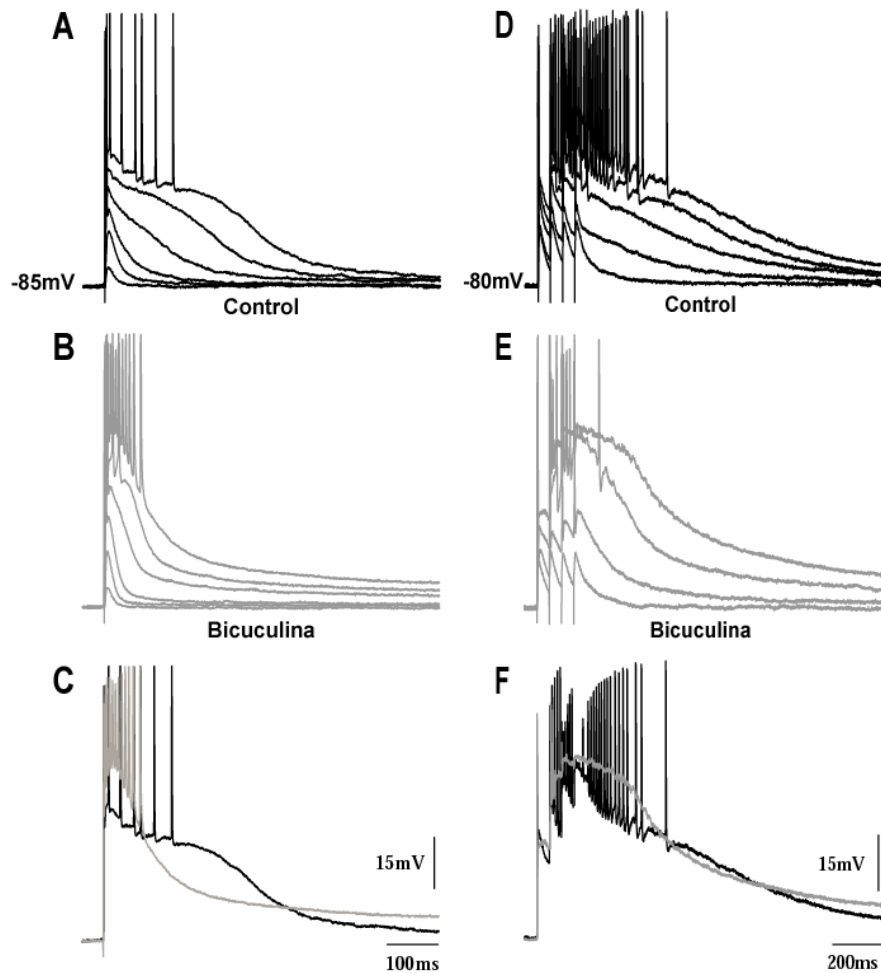
La respuesta GABAérgica en las MSNs muestra un potencial de inversión de  $-50\text{mV}$ , mientras que el umbral de disparo en estas neuronas es de alrededor de  $-45\text{mV}$ ; por lo que la respuesta mediada por receptores-canal  $\text{GABA}_A$  registrada en las MSNs a potenciales de membrana de reposo ( $-80\pm 5\text{mV}$ ), debe ser despolarizante, y sólo a potenciales de membrana menos negativos debe de convertirse en inhibitora (Jiang y North, 1991; Kita, 1996).

Para probar esta hipótesis, se obtuvieron respuestas sinápticas supraumbrales en forma de mesetas despolarizantes, con uno y cuatro choques y se aplicó bicuculina ( $10\ \mu\text{M}$ ) (antagonista de los receptores-canal  $\text{GABA}_A$ ).

Como se esperaba, la adición de bicuculina aumentó la amplitud de la respuesta sináptica supraumbral en la fase temprana, cuando se alcanza la despolarización más alta y el disparo de potenciales de acción. La bicuculina hizo entonces que se generaran más potenciales de acción que en condición control. Esto confirma que el componente GABAérgico temprano es inhibitor del disparo. En el caso de cuatro choques, la despolarización pudo llegar a ser tan grande que llevó a la inactivación de las espigas de sodio. La fase temprana de la respuesta sináptica supraumbral aumentó  $35\pm 6\%$ . Esto es, la respuesta GABAérgica genera un potencial que se opone a la despolarización causada por la entrada cortical. Cuando se bloquea por acción de la bicuculina, esta despolarización no tiene oposición y alcanza niveles muy positivos hasta producir un aumento en la tasa de disparo (un solo choque), o incluso inactivar a los potenciales de acción (cuatro choques).

Sin embargo, en una fase relativamente más tardía de la respuesta sináptica supraumbral, ésta puede quedar abajo (más negativa) que la respuesta control, lo que indica que el componente GABAérgico genera un potencial que se suma al producido por las sinapsis excitadoras corticales y que les ayuda a mantener la despolarización a ciertos potenciales. Así, después de un solo choque, la bicuculina reduce la meseta despolarizante un  $30\pm 4\%$  ( $n=8$ , T de Wilcoxon;  $p<0.05$ ).

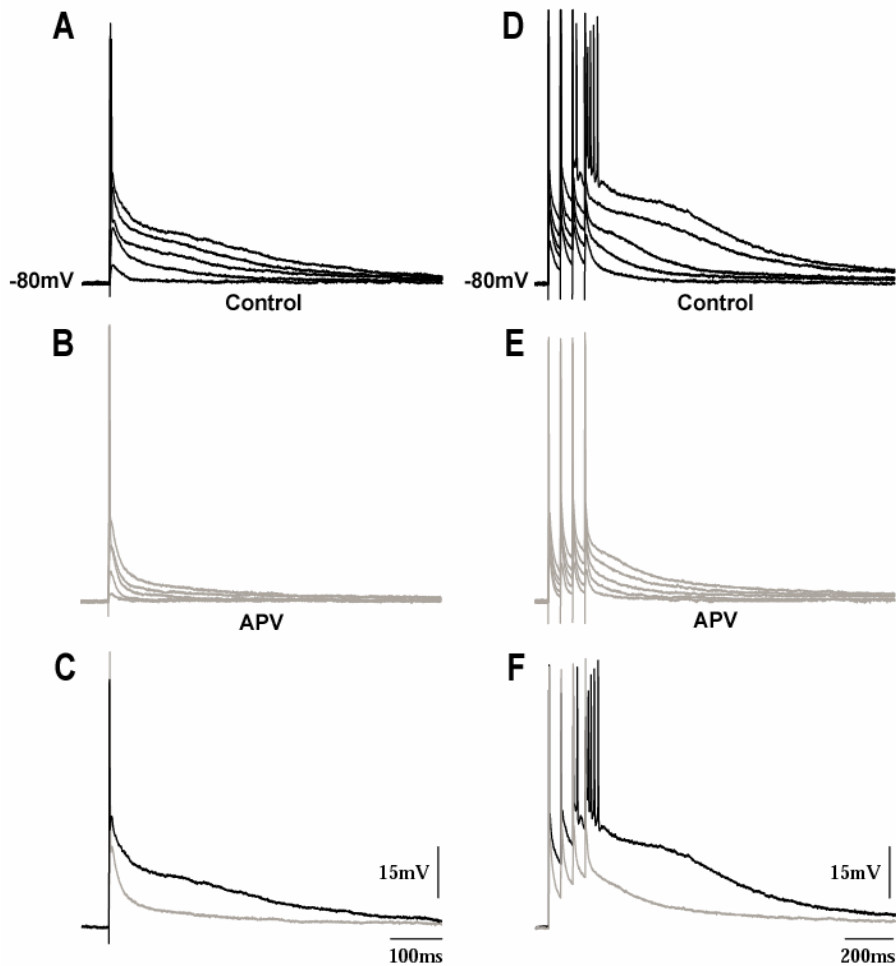
Por lo tanto, concluimos que a nivel supraumbral el componente GABAérgico es inhibitor en tanto a la generación de potenciales de acción, pero cuando la meseta es subumbral, el GABA activa una corriente despolarizante, que ayuda a mantener la meseta cuando no hay potenciales de acción. Éste es un efecto bifásico (**figura 17**), que bien puede deberse al potencial de equilibrio del ión cloro ( $E_{Cl^-}$ ) en estas células (-50 mV) (ver Discusión).



**Figura 17.** Contribución de las corrientes mediadas por el receptor-canal GABA<sub>A</sub> en la respuesta ortodrómica cortical. Respuestas supraumbrales en condición control ante uno (A-C) o cuatro choques (D-F). B y E. Respuestas después de la administración de bicuculina (10  $\mu$ M). Note que el comienzo de las respuestas queda más positivo, la parte media más negativa y la parte final otra vez más positiva que la respuesta control. C y F. Superposición de las respuestas ante la estimulación de intensidad máxima. Bicuculina (trazo gris).

### 6.3 Participación del componente glutamatérgico de tipo NMDA durante la generación de las mesetas despolarizantes.

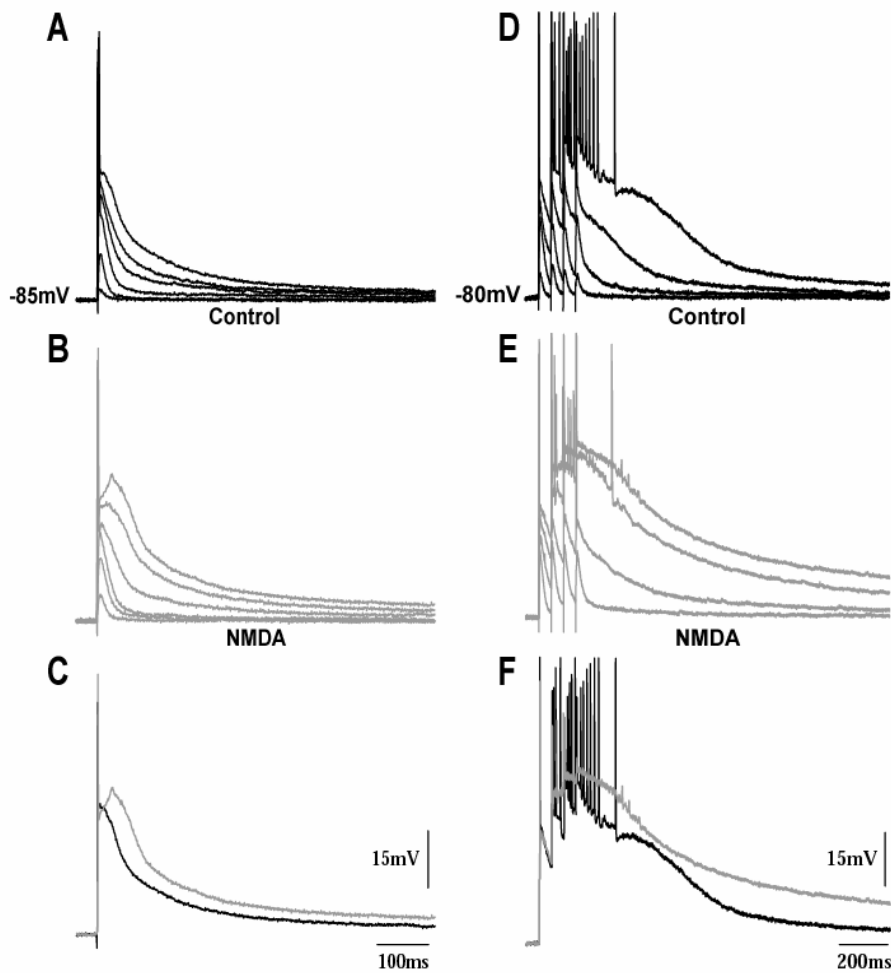
A la misma respuesta sináptica supraumbral se le administró APV ( $50 \mu\text{M}$ ), antagonista de receptores a glutamato tipo NMDA. Como podemos observar en la **figura 18**, se redujo gran parte de la meseta después de bloquear la corriente acarreada por los receptores-canal tipo NMDA. La reducción fue de  $50 \pm 6\%$  ( $n=6$ , T de Wilcoxon;  $p < 0.01$ ). Este experimento sugiere que los receptores a NMDA participan de manera importante en la generación de la meseta despolarizante provocada por la estimulación de la vía córtico-estriatal.



**Figura 18.** Los receptores-canal tipo NMDA participan en la respuesta supraumbral. Respuestas sinápticas obtenidas con un solo choque (**A-C**) o cuatro choques (**D-F**). **B** y **E**. Al adicionar APV ( $50 \mu\text{M}$ ), la meseta despolarizante se reduce en ambos casos. **C** y **F**. Superposición de las respuestas obtenidas con la máxima intensidad de estimulación.



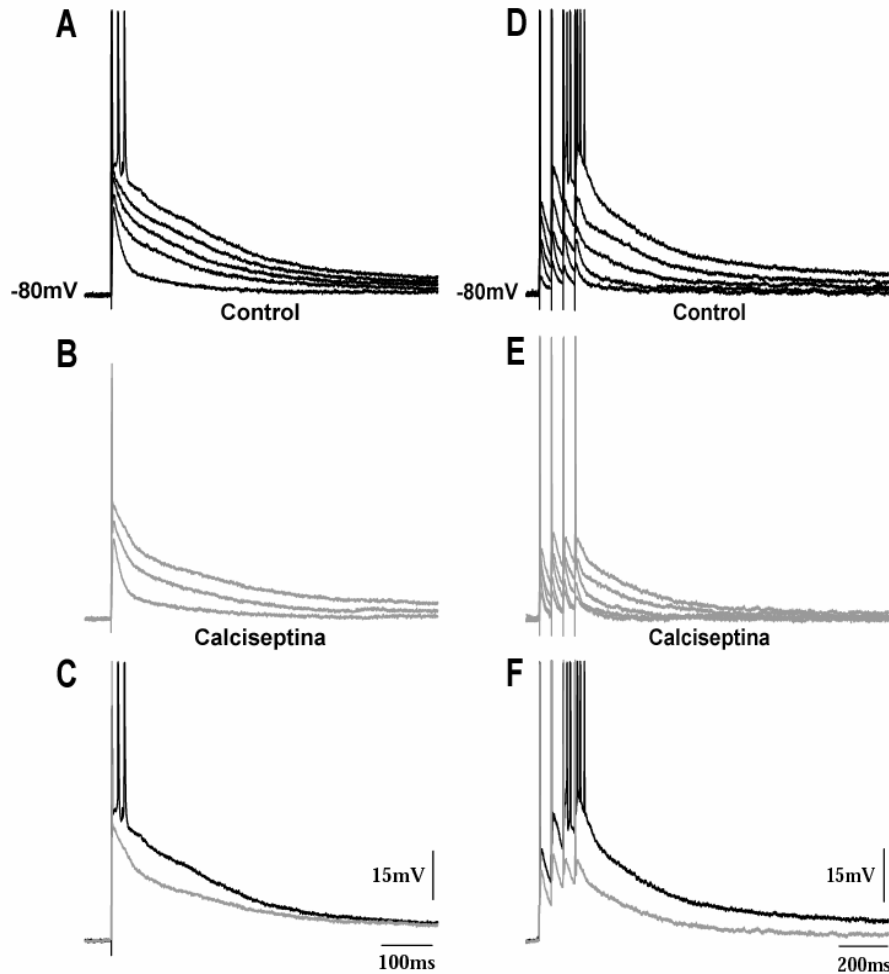
Si el bloqueador de los receptores-canal tipo NMDA redujo la despolarización, la adición del agonista NMDA ( $5 \mu\text{M}$ ) debería de aumentarla. La **figura 19** muestra que esto es así, el aumento fue de  $50 \pm 12\%$  ( $n=5$ , T de Wilcoxon;  $p < 0.05$ ) en la respuesta sináptica supraumbral. Esto confirma las sospechas, de que el receptor-canal tipo NMDA se activa de manera importante durante la activación cortical, pero además muestra que aún con una estimulación supraumbral la respuesta no está saturada.



**Figura 19.** El NMDA aumenta las respuestas sinápticas supraumbrales. **A** y **D**, controles. **B** y **E**. La administración de NMDA ( $5 \mu\text{M}$ ) aumenta la amplitud de las mesetas despolarizantes. **C** y **F**. Superposición de la respuesta a la mayor intensidad.

#### **6.4 Participación de la conductancia intrínseca de $\text{Ca}^{2+}$ de tipo L en la respuesta supraumbral.**

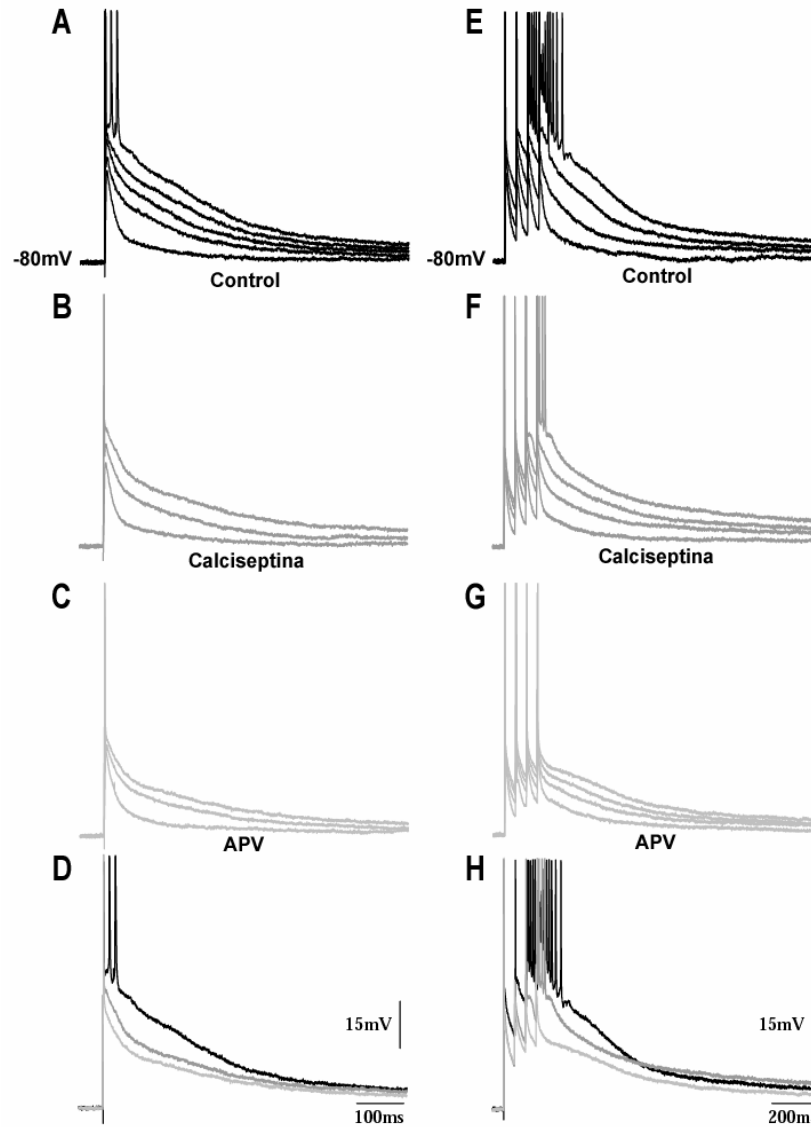
Una de las preguntas a responder era, qué tanto la activación de las conductancias sinápticas son capaces de activar a su vez conductancias intrínsecas postsinápticas dependientes de voltaje. Para lo cual aplicamos calciseptina (400 nM), bloqueador selectivo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. El bloqueo de ésta conductancia produjo una reducción del  $31\pm 5\%$  (n=5, T de Wilcoxon;  $p < 0.05$ ) de la meseta despolarizante producida sinápticamente (**figura 20**). De donde concluimos que la activación sináptica puede llegar a activar corrientes entrantes intrínsecas en estas neuronas. Como la activación de los receptores-canal tipo NMDA y  $\text{GABA}_A$  participan en el mantenimiento de la meseta despolarizante, uno de ellos, o ambos, favorecería que la membrana somatodendrítica de las MSNs llegara al voltaje de activación de estos canales. Resultados similares se obtuvieron con nicardipina (2.5  $\mu\text{M}$ ), otro bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L.



**Figura 20.** Participación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L en la respuesta supraumbra. **B** y **E**. La aplicación de calciseptina (400 nM), antagonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, redujo la meseta despolarizante producida por la estimulación cortical; cuando se produjo con un solo choque (**A-C**) y con cuatro choques (**D-F**). **C** y **F**. Las respuestas obtenidas con la máxima intensidad de estimulación se superponen.

Como el bloqueo de receptores a glutamato de tipo NMDA produjo una disminución de la meseta despolarizante de alrededor de 50% y el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L provocó una disminución de la misma meseta de alrededor del 30%, concluimos que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L constituyen más de la mitad de la respuesta activada por los receptores-canal NMDA. Para apoyar esta deducción realizamos experimentos con ambos bloqueadores, APV y calciseptina en la respuesta supraumbra. Como se muestra en la **figura 21**, la adición de APV (50  $\mu\text{M}$ ) después de la reducción de la respuesta producida por

calciseptina (400 nM), produjo una reducción adicional; que se suma a la producida por el bloqueador del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. Esto no sucede cuando se agrega primero el APV (**figura 21**). Esto quiere decir que la despolarización producida por la corriente que pasa a través de los receptores-canal tipo NMDA activa a la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L.

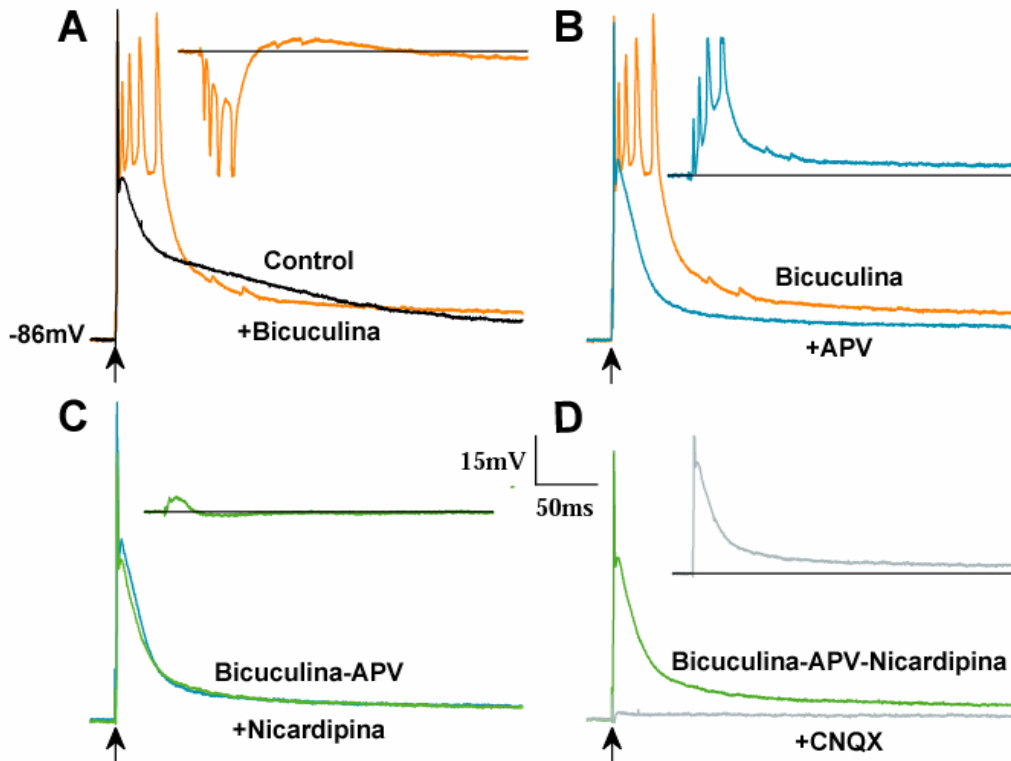


**Figura 21.** La activación de receptores-canal tipo NMDA induce la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. Las reducciones en la meseta despolarizante producidas por calciseptina (400 nM) y APV (50  $\mu\text{M}$ ) administrados secuencialmente se suman (**B y C; F y G**). Lo que no sucede si el APV se administra primero (**ver figura 18**). Esto sugiere que la despolarización provocada por los receptores-canal tipo NMDA activa al canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, el cual amplifica la despolarización sináptica. **D y H**. Superposición.

En la **figura 21** se muestra la aplicación secuencial de los antagonistas, evidenciando que si el APV se administra antes que los bloqueadores de los canales intrínsecos ya no hay sumación de las respuestas, sino oclusión de los efectos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L.

Así la bicuculina ( $10 \mu\text{M}$ ) reduce la despolarización relativamente tardía (aunque aumenta la despolarización durante los disparos) y cuando se sigue de APV ( $50 \mu\text{M}$ ), el efecto de este último fármaco se suma. Esto es, en la membrana somatodendrítica y a nivel subumbral (antes de generar disparos), ambos, el GABA y el glutamato despolarizan la membrana.

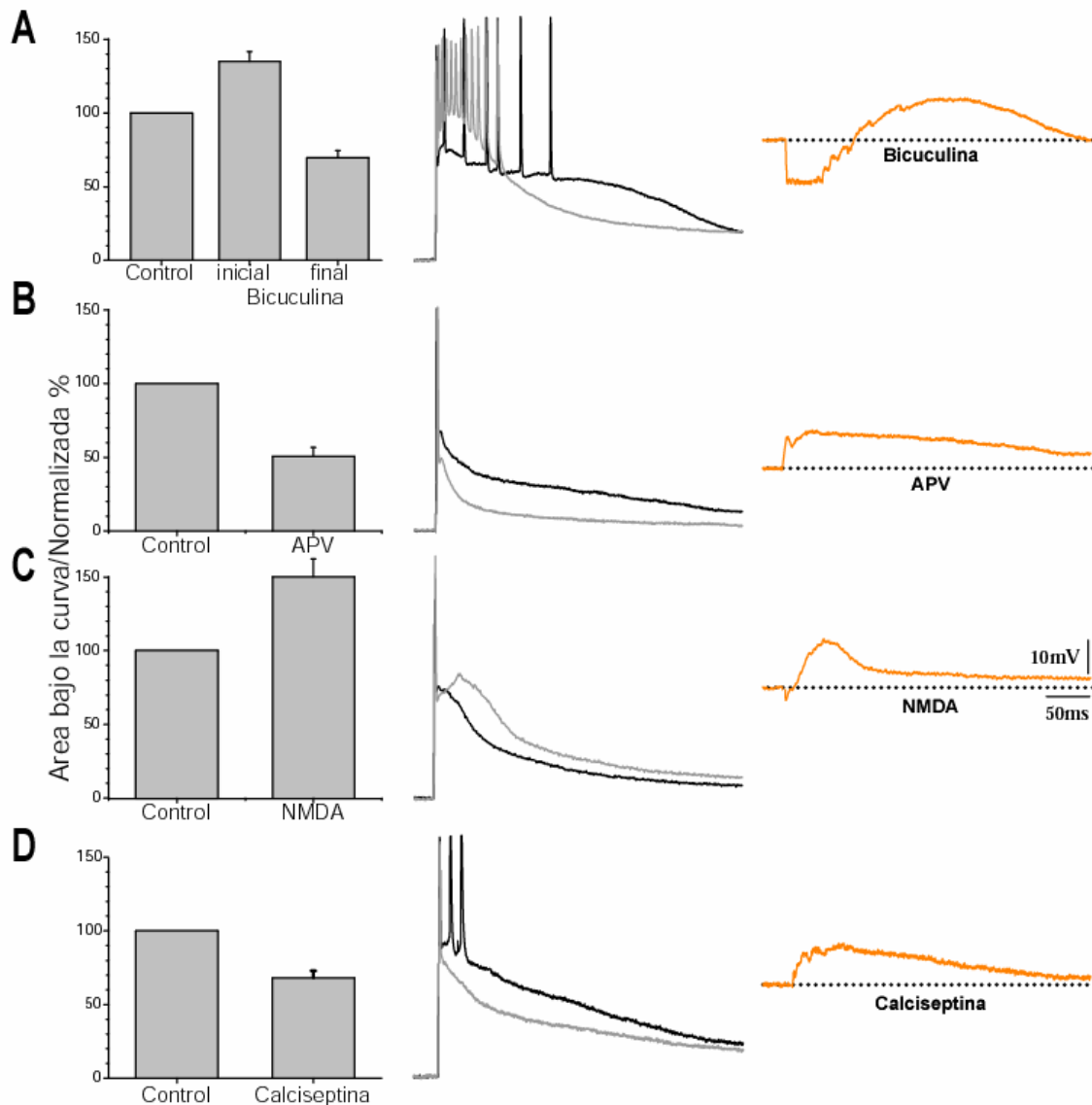
Sin embargo, si luego de bloquear los receptores-canal tipo NMDA se agrega nicardipina ( $2.5 \mu\text{M}$ ) ya no hay un efecto ulterior. Lo que confirma que primero se activan los receptores ionotrópicos y luego los canales intrínsecos. Finalmente, la despolarización remanente es bloqueada por CNQX ( $10 \mu\text{M}$ ), evidenciando que todo el evento supraumbral se debe a una activación sináptica inicial debida a los receptores-canal tipo AMPA/KA, que es lo que se espera de las aferentes córtico-estriatales.



**Figura 22.** Resumen de los componentes extrínsecos e intrínsecos de la respuesta sináptica ortodrómica supraumbrales. **A.** La bicuculina ( $10 \mu\text{M}$ ), inhibe el disparo pero mantiene la despolarización. **B.** El receptor-canal tipo NMDA es en gran medida responsable de la despolarización. Después de administrar APV ( $50 \mu\text{M}$ ), disminuye la despolarización y la caída de la respuesta sináptica se acerca a una caída de tipo exponencial. **C.** En estas condiciones, el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L con nicardipina ( $2.5 \mu\text{M}$ ), no produce una reducción adicional, de donde se deduce que la activación del receptor-canal tipo NMDA activa a su vez a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. **D.** El bloqueo de los receptores-canal tipo AMPA/KA con CNQX, bloquea el potencial remanente comprobando que se debe a éstos. Los insertos muestran las substracciones de la parte sensible a cada uno de los fármacos en las diferentes condiciones.

En la **figura 23** se resume la primera parte de resultados de ésta tesis. La columna de la izquierda (arriba) muestra que la bicuculina despolariza tempranamente e hiperpolariza tardíamente la respuesta sináptica supraumbrales córtico-estriatal, esto es, el GABA impide el disparo repetitivo excesivo (frena la hiperexcitabilidad), pero mantiene la despolarización prolongada, como muestra la superposición (**A** en medio) y la resta (derecha).

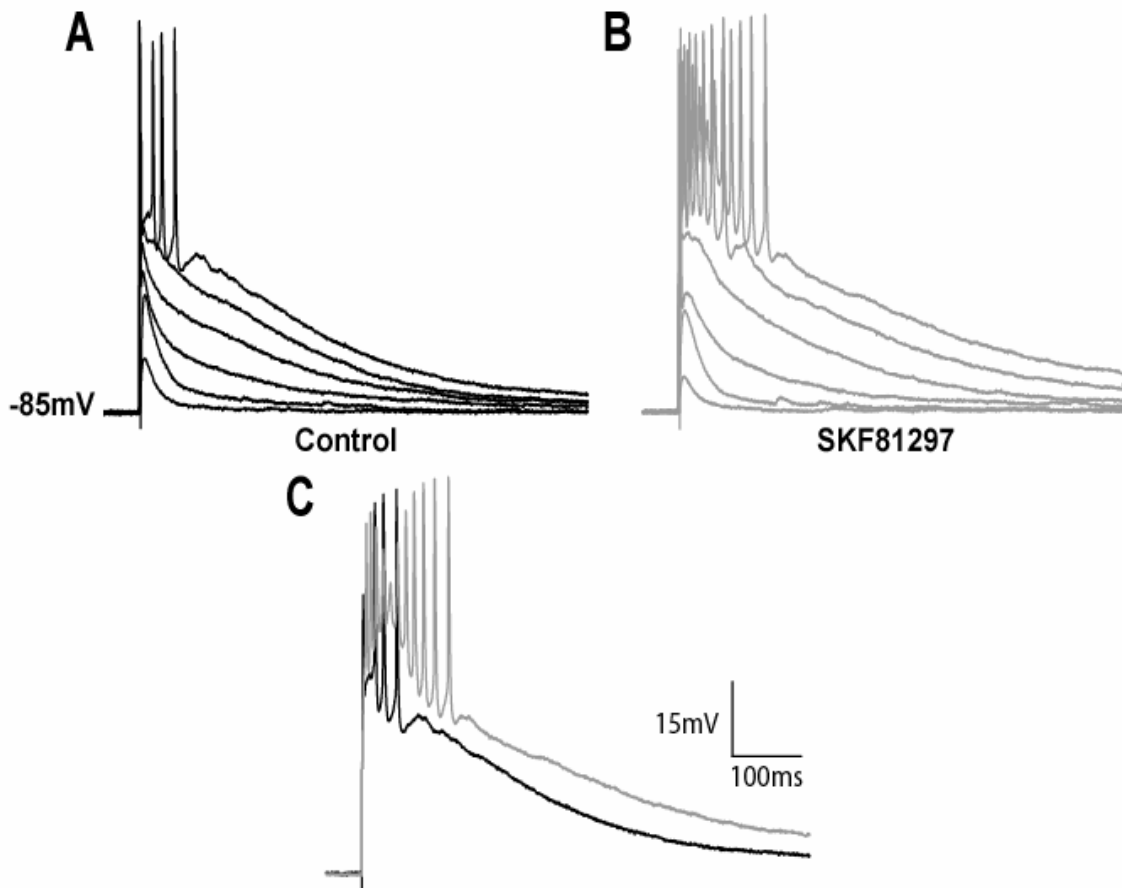
Las substracciones en B y C muestran que el receptor-canal tipo NMDA es en gran medida el responsable del mantenimiento de la meseta despolarizante, mientras que en D se pone en evidencia que esto lo logra gracias a la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, como ya se mostró en la figura 21, la activación de receptores-canal tipo NMDA, produce una despolarización tal que permite llegar al umbral de activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, provocando un aumento adicional sobre la meseta despolarizante.



**Figura 23.** Resumen de los componentes de la respuesta sináptica supraumbral. **Columna izquierda.** Porcentaje de cambio del área bajo la curva con cada fármaco. **Columna media.** Superposición de trazos representativos de cada condición. **Columna derecha.** Substracción de la parte sensible a cada uno de los fármacos en cada condición.

### 6.5 Modulación de la respuesta sináptica por receptores a dopamina de la clase D1.

La modulación de receptores a dopamina de la clase D1 (tipos D1 y D5) sobre la respuesta sináptica, se estudió aplicando el agonista selectivo SKF-81297 (1-5  $\mu\text{M}$ ). Este agonista produjo un incremento de la meseta despolarizante del  $28\pm 9\%$  ( $n=10$ , T de Wilcoxon;  $p<0.05$ ), así como en el número de potenciales de acción (**figura 24**). Estos resultados concuerdan con reportes previos de que los receptores D1 producen un incremento en la frecuencia de disparo (Hernández-López et al., 1997; Pérez-Garci et al., 2003b).

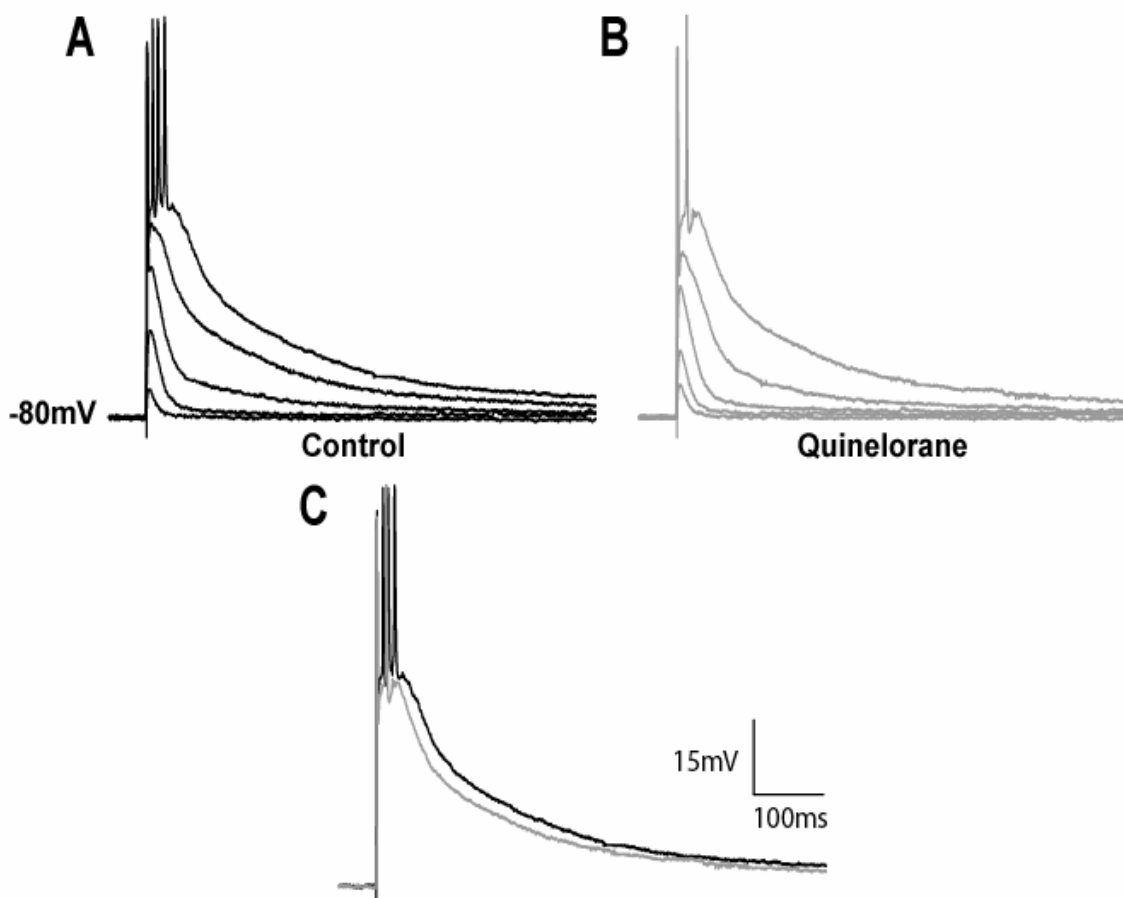


**Figura 24.** La activación de receptores a dopamina de la clase D1 aumenta la meseta despolarizante. **A**, control, **B**, en presencia de SKF-81297 (1-5  $\mu\text{M}$ ), **C**. Superposición de los trazos que corresponden a la respuesta a la máxima intensidad de estimulación.



## 6.6 Modulación de la respuesta sináptica por receptores a dopamina de la clase D2.

La modulación de la respuesta sináptica mediada por los receptores a dopamina de la clase D2 fue examinada por medio de la aplicación de quinolorane (1-5  $\mu\text{M}$ ), agonista selectivo a receptores de la clase D2 (tipos D2, D3 y D4) (figura 25). El quinolorane produjo una disminución de la meseta despolarizante de un  $20\pm 8\%$  ( $n=10$ , T de Wilcoxon;  $p<0.05$ ).

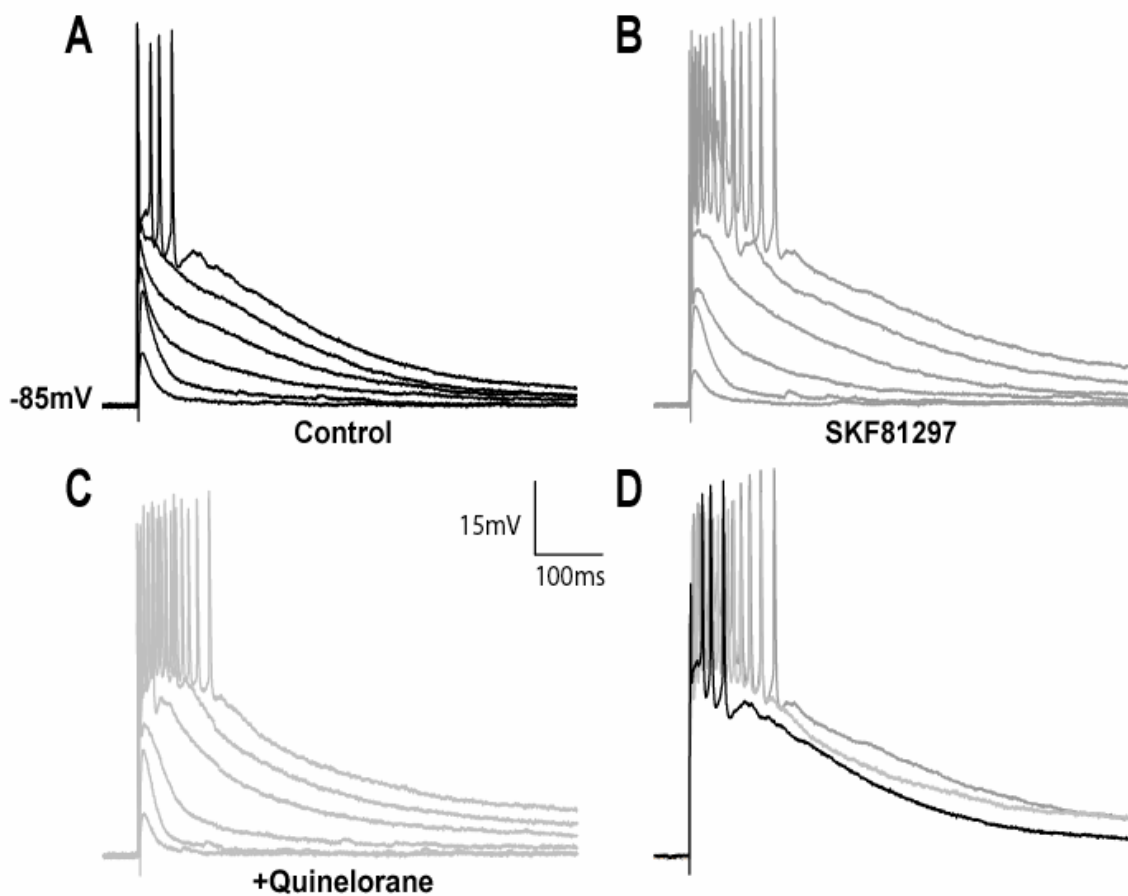


**Figura 25.** La activación de receptores a dopamina de la clase D2 produce una reducción en las respuesta sináptica supraumbral. **A**, control; **B**, en presencia de quinolorane (1-5  $\mu\text{M}$ ). **C**, superposición.

## **6.7 Activación secuencial de receptores a dopamina de las clases D1 y D2.**

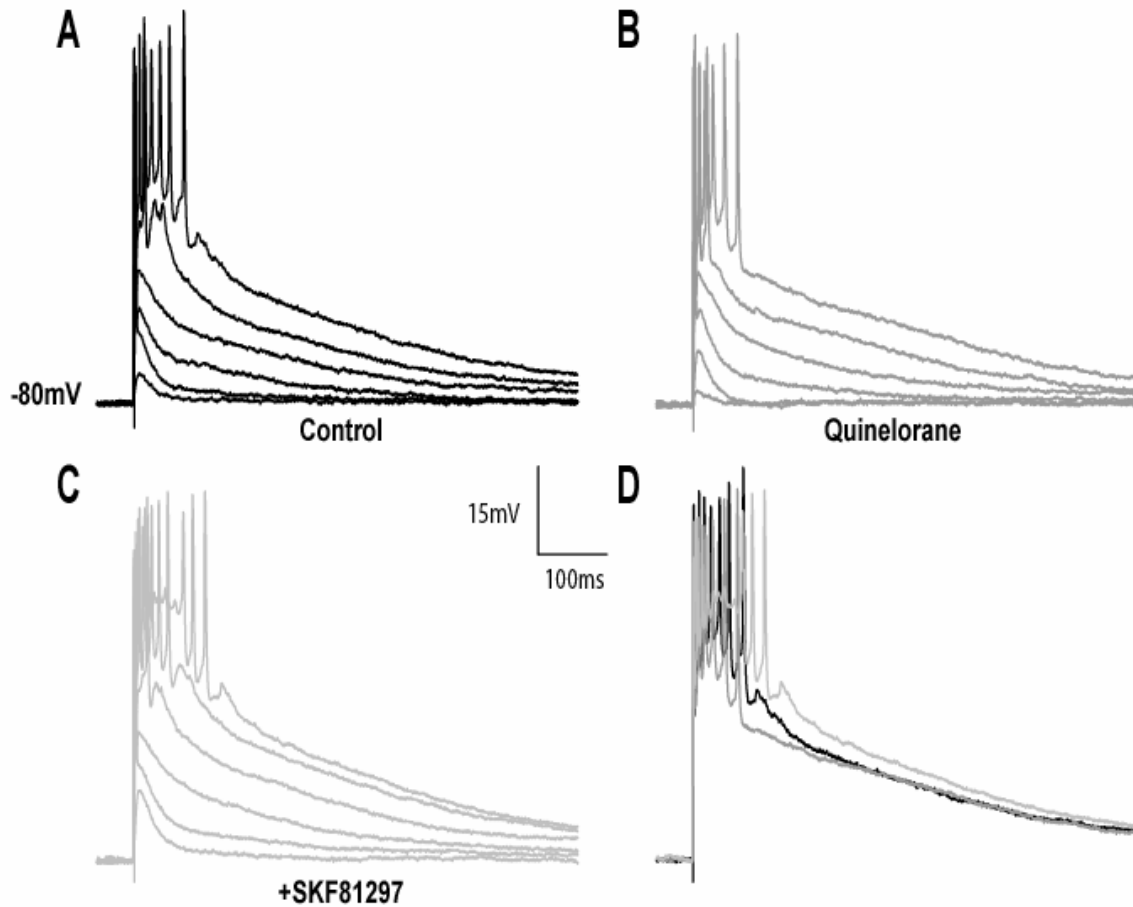
Como los receptores a dopamina de ambas clases parecen tener efectos contrarios decidimos estudiar la modulación que ejercen en la misma célula. Como se mencionó en los antecedentes de ésta tesis, se propone que distintas poblaciones neuronales poseen distintas clases de receptor, así que otra de las preguntas era saber que porcentaje de neuronas presentaba ambas respuestas. Con el objeto de estudiar la modulación ejercida por la activación de ambas clases de receptor a dopamina (D1 y D2) aplicamos de manera secuencial los dos agonistas, ya sea primero el SKF-81297 y luego el quinolorane, agonistas selectivos de las clases D1 y D2, respectivamente, o viceversa.

La aplicación de SKF-81297 (1-5  $\mu$ M) produjo un aumento de la meseta despolarizante ( $28\pm 9\%$ ), efecto que fue disminuido al aplicar quinolorane (1-5  $\mu$ M) en un  $14\pm 1\%$ . De hecho, se pudo observar que ambos agonistas pueden actuar de manera simultánea en la misma neurona en 70 % de los casos ( $n=7/10$ ). Como puede observarse en la **figura 26**, la respuesta supraumbrales nunca regresa a la condición control (antes del agonista D1), sino que el agonista D2 modula la despolarización exagerada que el agonista D1 tiende a provocar quedándose la respuesta con un tren de disparos intermedio entre la situación control y la situación con el agonista D1, esto es, los receptores D1 y D2 actúan como un control de doble dirección.



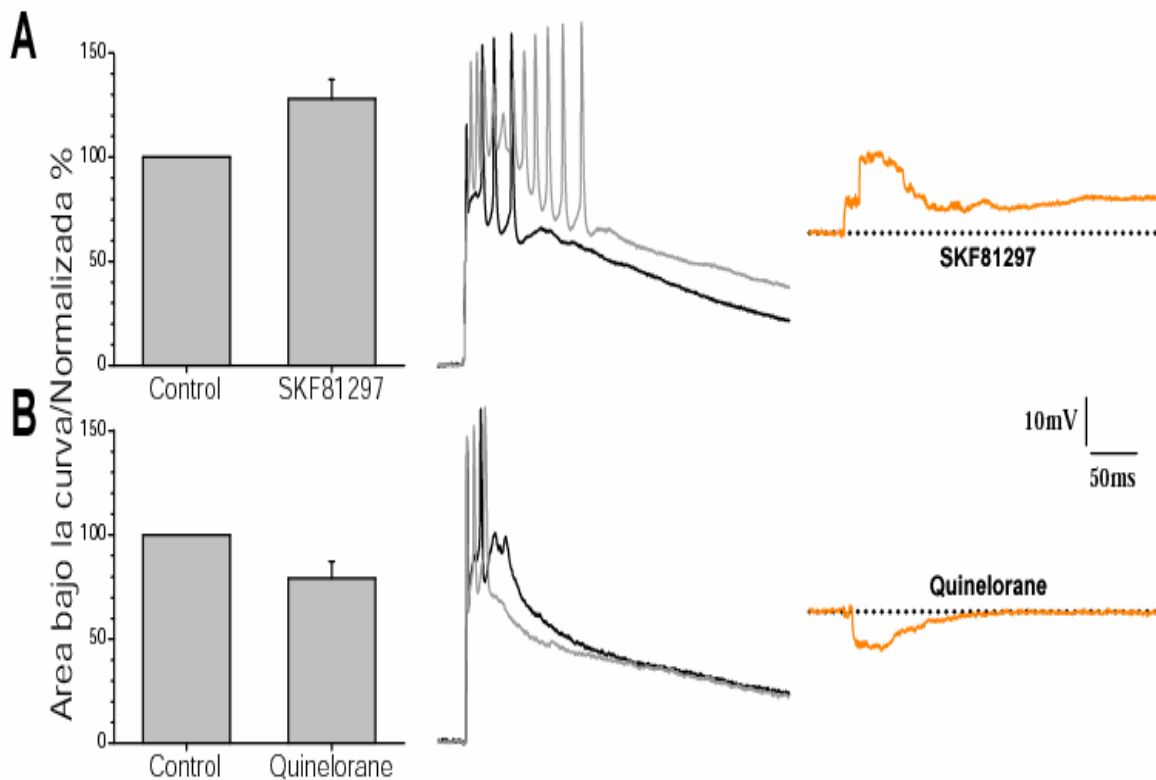
**Figura 26.** El aumento de la meseta despolarizante producido al activar los receptores a dopamina de la clase D1 (cf. **A y B**) no es totalmente revertido durante la activación secuencial de los receptores de la clase D2 (**C**). La superposición (**D**) de todas las respuestas muestra que ambos agonistas pueden actuar simultáneamente modulando la respuesta supraumbra.

Cuando los mismos agonistas se administraron en el orden inverso se obtuvo básicamente el mismo resultado, **figura 27**.



**Figura 27.** Activación de receptores D2 seguidos de la activación de receptores D1. La disminución de la meseta despolarizante debida a la activación de receptores de la clase D2 (**A y B**), fue revertida por la activación secuencial de los receptores de la clase D1 (**C**). Superposición de las respuestas máximas (**D**).

Las substracciones de la **figura 28**, muestran que la activación de receptores de la clase D1 aumenta, mientras que la activación de receptores de la clase D2 disminuye la despolarización en meseta activada por la estimulación cortical. Esto es, entre ambos receptores se afina la respuesta cortical.



**Figura 28.** Modulación dopaminérgica de la respuesta sináptica ortodrómica. **Columna izquierda.** Porcentaje de cambio del área bajo la curva con el agonista D1 (arriba) y el agonista D2 (abajo). **Columna de en medio.** Superposición de trazos representativos con ambos agonistas y sus respectivos controles. **Columna derecha.** Substracción de la parte sensible a cada agonista de la respuesta supraumbra, en un caso es despolarización (D1) y en el otro hiperpolarización (D2) de la respuesta supraumbra.



## CAPÍTULO 7

### DISCUSIÓN.

Uno de los principales problemas en neurociencias es el de entender cómo las neuronas transforman las señales sinápticas en potenciales de acción. Esto se conoce como la “función entrada-salida” (*input-output* o *I/O function*) de las neuronas. La suma lineal espacial y temporal de las entradas sinápticas es sólo una de muchas funciones *I/O* que puede realizar una neurona (Reyes A, 2001).

Los estudios sobre la aferencia sináptica que reciben las MSNs de la corteza, se han referido a las respuestas subumbrales y umbrales y casi nunca han considerado las respuestas supraumbrales, sobre todo recalcando los posibles componentes di- y poli-sinápticos GABAérgicos, así como la interacción con las conductancias intrínsecas de las neuronas (Kita et al., 1985; Bargas et al., 1991; Kita, 1996; Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997; Világi et al., 1998; Wickens y Wilson 1998; Calabresi et al., 2000; Vergara et al., 2003).

Los resultados presentados en esta Tesis son los primeros en revelar la compleja interacción de conductancias sinápticas GABAérgicas ( $GABA_A$ ), glutamatérgicas (AMPA/KA/NMDA) e intrínseca (canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L) en la generación de la respuesta sináptica supraumbral córtico-estriatal.

El disparo que resulta de las entradas sinápticas lleva el “código” o comando que dispara movimientos voluntarios y programas motores almacenados en el estriado. Poco se sabe acerca de cómo la dopamina modula o regula este código. En esta Tesis se muestra que la respuesta postsináptica tiene componentes mono- y poli-sinápticos que resultan de una activación múltiple (¿modular?) del circuito estriatal. La dopamina parece jugar un papel esencial en la modulación de esta respuesta tanto a nivel pre- como post-sináptico. Esta es la primera vez que se muestra que ambas clases de receptor a dopamina pueden actuar de manera simultánea sobre una misma respuesta.

### **7.1 Componente GABAérgico en la generación de la respuesta ortodrómica supraumbral.**

El componente GABAérgico registrado en la respuesta supraumbral, puede provenir de las colaterales axónicas de otras MSNs que están siendo excitadas simultáneamente, así como de interneuronas GABAérgicas presentes dentro del microcircuito del NSt y que son activadas por la corteza (Buchwald et al., 1973; Jiang y North, 1991; Kita, 1996; Wilson, 1998; Guzmán et al., 2003). Siendo el NSt un núcleo formado en su mayoría por neuronas GABAérgicas, se esperaría un predominio inhibitorio en el núcleo, pues la actividad en una región inhibiría a las regiones aledañas. Sin embargo, el potencial de membrana de las MSNs en reposo (*down-state*) se encuentra alrededor de -80 mV, mientras que el potencial de inversión de la respuesta GABAérgica es de -50 mV; cercano al potencial de equilibrio del ión cloruro ( $E_{Cl^-}$ ) (Jiang y North, 1991; Kita, 1996; Bracci y Panzeri, 2006). Por ésta razón, la respuesta mediada por receptores-canal  $GABA_A$  en las MSNs ayuda a mantener la despolarización cuando ocurre a un nivel debajo del  $E_{Cl^-}$ , y sólo se ve que inhibe el número de espigas que se disparan durante la respuesta supraumbral. La respuesta GABAérgica tiene entonces una acción bifásica: hiperpolarizante al llegar o sobrepasar el  $E_{Cl^-}$  y despolarizante cuando está debajo del  $E_{Cl^-}$ .

Así, al bloquear los receptores-canal  $GABA_A$  aplicando bicuculina en el medio de perfusión, se produjo un aumento en el disparo, señal de que los receptores a GABA lo estaban inhibiendo, y un efecto de mantener la duración de la despolarización sostenida, lo que nos lleva a concluir que el GABA se opone a la despolarización que sobrepasa el umbral, pero favorece la llegada a ese mismo umbral. Sin embargo, cuando hay sumación temporal (con cuatro choques), sólo se produce un pequeño cruce de la respuesta obtenida en presencia de bicuculina, indicando que cuando se da una despolarización mayor el papel del GABA para mantener la respuesta es menor. Recientemente, se ha descrito usando la técnica de doble fotón, que en células bipolares "ON" de la retina, en donde la respuesta a GABA es despolarizante, el gradiente de cloro está invertido



(Duebel et al., 2006). El efecto GABAérgico despolarizante también se ha observado en diferentes neuronas cerebrales (Gulledge y Stuart, 2003; Woodruff et al., 2006) y ha sido relacionado con el control de varios fenómenos del desarrollo dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluyendo proliferación neuronal, la migración, etc. (Lo Turco et al., 1995; Serafini et al., 1995). Sin embargo, en el sistema nervioso maduro el efecto que predomina es el inhibidor, el cual está acoplado a la expresión del cotransportador  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (KCC2) durante el desarrollo (Rivera et al., 1999). Una hipótesis de trabajo para el futuro es que éste cotransportador no está expresado de la misma manera en las MSNs, de ahí el diferente  $E_{\text{Cl}^-}$ .

## **7.2 Componente glutamatérgico de tipo NMDA en la respuesta supraumbral.**

Sorprendentemente, cuando se provocan EPSPs con estimulación intraestriatal o córtico-estriatal, se reporta que el receptor-canal tipo NMDA no juega un papel relevante, pues se observó que estos EPSPs son insensibles a APV (antagonista NMDA), mientras que son sensibles a CNQX (antagonista AMPA/KA) (Calabresi et al., 1996, 2000).

Sin embargo, si la manera en que estas células inducen los movimientos, es generando trenes de potenciales de acción, u *up-states*, es fácil hallar resultados que indican que los receptores-canal tipo NMDA son funcionales en condiciones fisiológicas (Mori et al., 1994), además de que experimentos de inmunohistoquímica muestran la presencia de abundantes receptores a NMDA y no-NMDA en las MSNs (Chen y Reiner, 1996). También se ha reportado que la proporción funcional de receptores glutamatérgicos (NMDA vs no-NMDA) puede ser diferente entre neuronas (Zhou et al., 2006; Világi et al., 1998; Popescu et al., 2007).

A diferencia de tales estudios, nuestros resultados demuestran una participación preponderante de los receptores-canal tipo NMDA en la generación de la respuesta ortodrómica de importancia fisiológica. Cuando estos receptores

se bloquean con APV hay una disminución del 50% en esta respuesta ortodrómica. Lo que pasa, es quizá que en los estudios previos no se alcanzó la despolarización necesaria para activar a los receptores-canal tipo NMDA. Esta despolarización ha de ser equivalente a la alcanzada durante los *up-states* (ver fig. 18).

La entrada sináptica excitadora córtico-estriatal es primordial para la transición del *down-* al *up-state*, lo que ha sido demostrado por decorticación e interrupción de las aferentes talámicas, lo que abole éstas transiciones espontáneas (Wilson, 1993). En éste estado, los potenciales de acción pueden ser inducidos por pequeñas despolarizaciones (Vergara et al., 2003).

### **7.3 Participación de la conductancia de $\text{Ca}^{2+}$ de tipo L ( $\text{Ca}_v1$ ) en la respuesta supraumbral.**

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las MSNs juega un papel importante en la regulación de la frecuencia de disparo (Galarraga et al., 1989; Pérez-Garci et al., 2003a) y en procesos de integración sináptica (Bargas et al., 1991, Vergara et al., 2003; Carter y Sabatini, 2004). La activación de receptores-canal tipo AMPA y NMDA promueve la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las dendritas de las MSNs. La despolarización alcanzada en las dendritas puede activar canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje que generan potenciales de acción de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bargas et al., 1991, Carter y Sabatini, 2004).

Los registros intracelulares en fijación de corriente han mostrado que las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, participan en la despolarización prolongada que facilita el disparo repetitivo de las MSNs (Hernández-López et al., 1997; Pérez-Garci et al., 2003a). De manera similar, en esta Tesis mostramos que la adición de nicaardipina o calciseptina (antagonistas de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L), producen una reducción de alrededor del 30% en las respuestas sinápticas supraumbrales. Por lo tanto, queda demostrada la participación de ésta conductancia intrínseca como resultado de la activación sináptica.

Debido a que el porcentaje de reducción en la respuesta ortodrómica al aplicar APV, fue mayor que cuando se aplicó nicardipina o calciseptina en el medio de perfusión, y que la participación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L es evidente cuando estos canales se bloquean antes, pero no después de bloquear a los receptores-canal tipo NMDA (**figs. 18, 20 y 21**), concluimos que la activación de los receptores a NMDA genera la despolarización necesaria para activar a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (Vergara et al., 2003).

Aún, la suma temporal de potenciales sinápticos cerca del umbral de disparo puede generar respuestas sinápticas prolongadas con disparo repetitivo (Vergara et al., 2003). Sin embargo, un estímulo único, debe tener una intensidad supraumbral para generar potenciales en meseta. Esto sugiere que a nivel fisiológico una señal debe reclutar un número mínimo de entradas sinápticas de manera sincronizada para favorecer la generación del potencial en meseta. ¿Cuántas neuronas presinápticas habría que activar?. Si un botón produce un cuanto de 10 pA o cerca de 500  $\mu\text{V}$  de amplitud (Wickens, 1993; Wickens y Oorschot, 2000) y la transición del *down* al *up-state* es de alrededor de 35 mV para llegar al umbral, se tendrían que activar alrededor de 70 terminales presinápticas de manera simultánea si asumimos una simple suma espacial y lineal; pero una neurona cortical deja de uno a dos botones en una MSN, esto significa que deben activarse entre 35 y 70 neuronas piramidales simultáneamente. Esto sería un número máximo debido a que ya vimos que: a) las sinapsis GABAérgicas ayudan en la despolarización y b) la activación sináptica es amplificada por la conductancia intrínseca de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (*boosted*). Así es que 50 neuronas podría ser una cifra apropiada, esto es, la mitad de las neuronas presentes en una mini-columna o módulo cortical. Sin embargo, una neurona espinosa puede recibir hasta 10,000 sinapsis de éste tipo. O lo que es lo mismo, hay un mínimo de 5,000 neuronas corticales conectadas presinápticamente con una MSN, 100 veces más que las necesarias para llegar a producir una meseta o una transición. Esto sugiere que las neuronas espinosas pueden ser activadas por distintas regiones de la corteza y quizás participar en diferentes tareas o

secuencias de movimientos dependiendo del contexto (Flaherty y Graybiel, 1991). De suerte que no siempre serían activadas por las mismas neuronas piramidales. Las propiedades activas de las dendritas (conductancias intrínsecas dependientes de voltaje), pueden producir interacciones no lineales entre las entradas sinápticas y el disparo de potenciales de acción, que generan cambios en la función neuronal. Las dos funciones principales de las neuronas son: decodificar las entradas sinápticas y producir una salida funcional, y segundo alterar la eficacia de conexiones sinápticas específicas, así que ciertas entradas tendrán mayor o menor control en la salida de la neurona (Shepherd, 2004). Ésta es la situación ideal para el aprendizaje asociativo de tipo Hebbiano.

#### **7.4 Modulación dopaminérgica de la respuesta sináptica.**

Se sabe que las entradas corticales son moduladas presinápticamente por receptores de la clase D2 (Flores-Hernández et al., 1997; Yin y Lovinger, 2006); posiblemente del tipo D3 (Wu et al., 2006), y que las entradas inhibitorias provenientes de otras MSNs y de interneuronas, también son moduladas por receptores de las clases D1 y D2 (Guzmán et al., 2003). Además, se sabe que las cadenas de señalización intracelular activadas postsinápticamente por la dopamina modulan diferentes conductancias iónicas que influyen en la generación del disparo (Hernández-López et al., 1997, 2000; Pérez-Garci et al., 2003b). ¿Cuál es el resultado de todas estas acciones actuando de manera conjunta?

En la presente Tesis mostramos que los efectos modulatorios dopaminérgicos pueden revelarse sobre la respuesta ortodrómica global. Los receptores de la clase D1 incrementan, mientras que los receptores de la clase D2 reducen dicha respuesta. Sorprendentemente, ambos efectos pueden verse simultáneamente sobre la misma neurona.

Sin embargo, cuando los agonistas selectivos para ambas clases de receptor (D1 y D2) se administran en secuencia, el resultado es una sinergia funcional entre ambos, contrario a lo observado en registros de la frecuencia de

disparo o de fijación de voltaje. Ambas respuestas se pueden observar juntas, y el efecto D1 ya no es bloqueado por la acción D2. Ésto nos hizo pensar que puede existir una condición fisiológica al activarlos a nivel dendrítico que le permite actuar a la vía de señalización de los receptores D1.

El desarrollo de nuevas técnicas con la utilización de fluoróforos de  $\text{Ca}^{2+}$  que permiten la visualización de los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las arborizaciones neuronales, han permitido observar las transiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurren a nivel dendrítico en respuesta a estímulos (Kerr y Plenz, 2002, 2004). Ésto hace suponer que ante una fuerte entrada cortical que activa a las MSNs, se produce un aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel dendrítico que inhibe a la proteína fosfatasa calcineurina (PP-2B), impidiendo la desfosforilación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, por lo que se favorece la vía de señalización de los receptores de la clase D1 (Groth et al., 2003). Queda por dilucidar cuales efectos son pre- y cuales postsinápticos.

## **CONCLUSIONES.**

1. La respuesta sináptica de una neurona estriatal ante la estimulación cortical es compleja y parece tener: a) componentes sinápticos y b) componentes intrínsecos.
2. Los componentes sinápticos son de tipo glutamatérgico y GABAérgico.
3. El componente glutamatérgico incluye la activación de receptores-canal tipo NMDA.
4. El componente sináptico induce la participación de las conductancias intrínsecas, como por ejemplo, la conductancia de calcio de tipo L.
5. Actuando sobre los componentes sinápticos y/o los intrínsecos, la activación de receptores de la clase D1 incrementa y la activación de receptores de la clase D2 reduce la respuesta sináptica supraumbrales.
6. La activación de ambas clases de receptor, D1 y D2, se puede observar en la misma neurona postsináptica.
7. La activación secuencial de receptores a dopamina de las clases D1 y D2 dio como resultado una sinergia funcional entre ambos.

## REFERENCIAS.

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. *TINS* 12: 366-375.

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

Bading, H (2000). Transcription-dependent neuronal plasticity the nuclear calcium hypothesis. *Eur J Biochem* 267: 5280–83.

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 (6): 689-95. Review.

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

Bargas J y Galarraga E (2000). La acción neuromoduladora de la dopamina sobre los ganglios basales. *Ciencia al día. Instituto de Fisiología Celular.* 3: 45-56.

Bargas J, Galarraga E and Aceves J (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res.* 539, 159-163.

Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989). An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res.* 75: 146-56.

Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994). Cellular and molecular characterization of Ca<sup>2+</sup> currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci.* 14: 6667-6686.

Bargas J, Vergara R y Galarraga E (2003). Propiedades emergentes en redes neuronales de tejido cerebral. En Fronteras de la biología en los inicios del siglo XXI. pp. 49-74. El Colegio Nacional. México D.F.

Bennett BD and Wilson CJ (2000). Synaptology and physiology of neostriatal neurons. In: *Brain dynamics and the striatal complex.* R. Miller and J. Wickens (eds.) Harwood Academic Publishers.

Bolam JP y Bennett BD (1995). Microcircuitry of the neostriatum. En: Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function. Eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 1-19. Austin, TX: Landes.

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

Bracci E y Panzeri S (2006). Excitatory GABAergic effects in striatal projection neurons. *J Neurophysiol* 95: 1285–1290.

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

Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisan A, Bernardi G (2000). Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23: 120-126.

Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1996). The corticostriatal projection: From synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 19: 19-24.

Carter AG, Sabatini BL (2004). State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron*. 44: 483-93.

Cavazzini M, Bliss T y Emptage N (2005). Ca<sup>2+</sup> and synaptic plasticity. *Cell Calcium* 38: 355–367.

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

Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS (1993). Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(20): 9576-80.

Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Chandler SH y Levine MS (1998). Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *J Neurophysiol* 79, 82-94.

Chen Q, Reiner A (1996). Cellular distribution of the NMDA receptor NR2A/2B subunits in the rat striatum. *Brain Res*. 743: 346 –352.

Chittajallu R, Alford S y Collingridge GL (1998). Ca<sup>2+</sup> and synaptic plasticity. *Cell Calcium* 24: 377–385.

Downie NM y Heath RW (1973).  $\chi^2$  de Pearson. En: Métodos estadísticos aplicados. Ed. Harla. pp. 212-231. México D.F.

Duebel J, Haverkamp S, Schleich W, Feng G, Augustine GJ, Kuner T, Euler T (2006). Two-photon imaging reveals somatodendritic chloride gradient in retinal ON-type bipolar cells expressing the biosensor Clomeleon. *Neuron*. 49: 81-94.

Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, Cherman 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: 838-42.

Flaherty AW y Graybiel AM (1991). Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *J Neurophysiol* 66: 1249-1263.



Flores-Hernández J, Cepeda C, Hernández-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P, Levine MS (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol.* 88: 3010-20.

Flores-Hernández J, Galarraga E, Bargas J (1997). Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse.* 25(2): 185-95.

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.

Galarraga E, Bargas J, Sierra A, Aceves J (1989). The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res.* 75: 157-168.

Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Barral J y Bargas J (1997). Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type  $Ca^{++}$  conductance. *NeuroReport.* 8: 2183-86.

Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Miranda I, Bermúdez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J (1999). Cholinergic modulation of neostriatal output: A functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J. Neurosci.* 19: 3629-3638.

Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández JV, Bargas J (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res.* 100: 239-49.

García L, Audin J, D'Alessandro G, Bioulac B, Hammond C (2003). Dual effect of highfrequency stimulation on subthalamic neuron activity. *J Neurosci* 23(25): 8743-51.

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

Greengard P (2001). *The Neurobiology of Dopamine Signaling.* Bioscience Reports. 21: 247-69

Greengard P, Nairn AC, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, Allen PB, Fienberg A, Nishi A (1998). The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Brain Res Rev.* 26: 274-284.

Groth RD, Dunbar RL, and Mermelstein PG (2003). Calcineurin regulation of neuronal plasticity. *Biochem Biophys Res Commun.* 311: 1159–71.

Gulledge AT y Stuart GJ (2003). Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron.* 37: 299-309.

Guzmán JN, Hernández 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: 8931-40.

Hernández-Echeagaray E, Starling AJ, Cepeda C y Levine MS (2004). Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: are dendrites necessary? *Eur J Neurosci.* 19: 2455-63.

Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A and Galarraga E (1997). D1 Receptor Activation Enhances Evoked Discharge in Neostriatal Medium Spiny Neurons by Modulating an L-Type Ca<sup>2+</sup> Conductance. *J Neurosci.* 17: 3334–42.

Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC[ $\beta$ ]<sub>1</sub>-IP3-calcineurin signaling cascade. *J Neurosci.* 20: 8987-95.

Horikawa K, Armstrong WE (1988). A versatile means of intracellular labeling: Injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25:1-11.

Jiang ZG y North RA (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro. *J.Physiol.* 443: 533-553.

Kasanetz F, Riquelme LA, Murer MG (2002). Disruption of the two-state membrane potential of striatal neurones during cortical desynchronisation in anaesthetised rats. *J Physiol (Lond)* 543: 577–589.

Kasanetz F, Riquelme LA, O'Donnell P, Murer MG (2006). Turning off cortical ensembles stops striatal UP states and elicits phase perturbations in cortical and striatal slow oscillations in vivo. *J Physiol (Lond)*, 577: 97-113.

Kawaguchi Y (1993). Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13, 4908-23.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18: 527-35.

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

Kerr JND y Plenz D (2002). Dendritic calcium encodes striatal neurons output during up-states. *J Neurosci* 22: 1499-1512.

Kerr JND y Plenz D (2004). Action potential timing determines dendritic calcium during striatal up-states *J Neurosci* 24: 877-885.

Kita H (1996). Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neuroscience.* 4: 925-940.

Kita T, Kita H and Kitai ST (1985). Local stimulation induced GABAergic response in rat striatal slice preparations: intracellular recordings on QX-314 injected neurons. *Brain Res.* 360: 304-310.

Le Moine C y 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: 418-26.

Le Moine C, Normand E y Bloch B (1991). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 4205-9.

Levine MS, Li Z, Cepeda C, Cromwell HC y Altemus KL (1996). Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. *Synapse.* 24: 65-78.

LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB y Kriegstein AR (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15: 1287-98.

Mahon S, Vautrelle N, Pezard L, Slaght SJ, Deniau JM, Chouvet G and Charpier S (2006). Distinct Patterns of Striatal Medium Spiny Neuron Activity during the Natural Sleep–Wake Cycle. *J of Neurosci* 26(48): 12587–12595

Maurice N, Mercer J, Chan CS, Hernández-López S, Held J, Tkatch T, Surmeier DJ (2004). D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* 24: 10289-301.

Maurice N, Tkatch T, Meisler M, Sprunger LK, Surmeier DJ (2001). D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci.* 21: 2268-77.

Mermelstein PG, Song WJ, Tkatch T, Yan Z, Surmeier DJ (1998). Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci.* 18: 6650-61.

Mink JW (1996). The Basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Progress Neurobiol* 50: 381- 425.

Misgeld U, Wagner A and Ohno T (1982). Depolarizing IPSPs and depolarization by GABA of rat neostriatum cells in vitro. *Expl. Brain Res.* 45, 108-114.

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

Mori A, Takahashi T, Miyashita Y, Kasai H (1994). Two distinct glutamatergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurones of neonatal rats and paired-pulse depression. *J Physiol.* 476(2): 217–228.

Murer MG, Tseng KY, Kasanetz F, Belluscio M, Riquelme LA (2003). Brain oscillations, medium spiny neurons and dopamine. *Cell Mol Neurobiol* 22: 611-32.

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

Nisenbaum ES y Wilson CJ (1995). Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci.* 15: 4449-63.

Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997). Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci.* 17: 8147-55.

Oorschot DE (2000). The domain hypothesis: A central organizing principle for understanding neostriatal circuitry?. En: *Brain dynamics and striatal complex*. Eds Miller R y Wickens JR, pp 151-163. Harwood Academic publisher, Amsterdam.

Pacheco-Cano MT, Vargas J, Hernández-López S, Tapia D and Galarraga E (1996). Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs(+)-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res.* 110 (2): 205-11.

Pérez-Garci E (2003b). Caracterización de la modulación del patrón de disparo de la neurona espinosa mediana del neostriado, por activación del receptor dopaminérgico tipo D<sub>2</sub>. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México D.F.

Pérez-Garci E, Vargas J, Galarraga E (2003a). The role of Ca<sup>2+</sup> channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport.* 14: 1253-1256.

Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P y Bernardi G (2000). Activation of D<sub>2</sub>-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* 20(7): RC69.

Popescu AT, Saghyan AA, Pare D (2007). NMDA-dependent facilitation of corticostriatal plasticity by the amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(1): 341-6.

Ransom BR and Barker JL (1976). Pentobarbital selectively enhances GABA-mediated post-synaptic inhibition in tissue cultured mouse spinal neurons. *Brain Res.* 114: 530-535.

Rao G, Fisch L, Srinivasan S, D'Amico F, Okada T, Eaton C, Robbins C (2003). Does this patient have Parkinson disease? *JAMA* 289: 347-53 Review.

Reiner A, Medina L y Veenman CL (1998). Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res Rev.* 28, 235-285.

Reyes A (2001). Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 653-75.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature.* 397: 251-5.

Sah P y Faber ES (2002). Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol* 66: 345–353.

Salgado H, Tecuapetla F, Pérez-Rosello T, Pérez-Burgos A, Pérez-Garci E, Galarraga E, Vargas J (2005). A reconfiguration of Ca<sub>v</sub>2 Ca<sup>2+</sup> channels current

and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol.* 94: 3771-87.

Schultz W (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol.* 80: 1-27.

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

Seeman P y Van Tol HH (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 6: 602-8.

Serafini R, Valeyev AY, Barker JL y Poulter MO (1995). Depolarizing GABA-activated Cl<sup>-</sup> channels in embryonic rat spinal and olfactory bulb cells. *J. Physiol.* 488: 371-86.

Sherrington CS (1906). *The Integrative Action of the Nervous System.* Charles Scribner's Sons, New York.

Shepherd GM (2004). Hippocampus. En The synaptic organization of the brain, ed. Shepherd GM, 5<sup>th</sup> Edition, pp. 455-498. Oxford University Press, Oxford.

Siegel S y Castellan NJ (1995). Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta 4<sup>a</sup> edición. México. Trillas (reimpresión 1998).

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

Snyder GL, Fienberg AA, Huganir RL, Greengard P (1998). A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18: 10297-10303.

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

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.

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.

Souliere F, Urbain N, Gervasoni D, Schmitt P, Guillemort C, Fort P, Renaud B, Luppi PH, Chouvet G (2000). Single-unit and polygraphic recordings associated with systemic or local pharmacology: a multi-purpose stereotaxic approach for the awake, anaesthetic-free, and head-restrained rat. *J Neurosci Res* 61: 88 –100.

Stern EA, Jaeger D, Wilson CJ (1998). Membrane potential synchrony of simultaneously recorded striatal spiny neurons in vivo. *Nature* 394 (6692): 475-8.

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.

Suri RE, Schultz W (1998). Learning of sequential movements by neural network model with dopamine-like reinforcement signal. *Exp. Brain Res.* 121, 350–354.

Suri RE, Schultz W (1999). A neural network model with dopamine-like reinforcement signal that learns a spatial delayed response task. *Neuroscience* 91, 871–890

Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC JR, Nairn AC, Greengard P (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron.* 14: 385-97.

Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS, Ariano MA (1993). Are neostriatal dopamine receptors co-localized? *Trends Neurosci.* 16: 299-305.

Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci.*16: 6579-91.

Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Geengard P (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 269-96.

Tseng KY, O'Donnell P (2004). Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *J Neurosci.* 24: 5131-9.

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

Verkhatsky A (2006). Calcium ions and integration in neural circuits. *Acta Physiol.* 187: 357–369.

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

Világi I, Kocsis P, Tarnawa I y Banczerowski-Pelyhe I (1998). Effect of glutamate receptor antagonists on excitatory postsynaptic potentials in striatum *Brain Research Bulletin.* 46: 483–486.

Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galván E, Galarraga E (2000). Ca<sup>2+</sup> channels that activate Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95: 745-752.

Wang HB, Laverghetta AV, Foehring R, Deng YP, Sun Z, Yamamoto K, Lei WL, Jiao Y, Reiner A (2006). Single-cell RT-PCR, in situ hybridization histochemical, and immunohistochemical studies of substance P and enkephalin co-occurrence in striatal projection neurons in rats. *J Chem Neuroanat.* 31: 178-199.

West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.*98: 11024-31.

Wickens JR (1993). A Theory of the Striatum. Pregamon Press, Oxford.

Wickens JR (1990). Striatal dopamine in motor activation and reward-mediated learning: steps towards a unifying model. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 80, 9–31

Wickens JR y Oorschot DE (2000). Neural dynamics and surround inhibition in the neostriatum: A possible connection. En: Brain dynamics and striatal complex, eds. Miller R y Wickens JR, pp. 141-150. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Wickens JR, Wilson CJ (1998). Regulation of action-potential firing in spiny neurons of the rat neostriatum in vivo. *J Neurophysiol.* 79(5): 2358-64.

Wilson CJ (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99: 277-297.

Wilson CJ (1998). Basal Ganglia. En: The synaptic organization of the brain, ed. Shepherd GM, 4<sup>th</sup> Edition, pp. 329-375. Oxford University Press, Oxford.

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

Wilson CJ (2004). Basal ganglia. En: The synaptic organization of the brain, ed. Shepherd GM, 5<sup>th</sup> Edition, pp. 361-414. Oxford University Press, Oxford.

Woodruff AR, Monyer H, and Sah P (2006). GABAergic Excitation in the Basolateral Amygdala. *J Neurosci*, 26: 11881–11887.

Wu J, Dougherty JJ, Nichols RA (2006). Dopamine receptors regulation of Ca<sup>2+</sup> levels in individual isolated nerve terminals from rat striatum: comparison of presynaptic D1-like and D2-like receptors. *J Neurochem.* 98 (2): 481-94.

Yin HH, Lovinger DM (2006). Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (21): 8251-6.

Zhou Z, Xiong W, Masurkar AV, Chen WR and Shepherd GM (2006). Dendritic Calcium Plateau Potentials Modulate Input–Output Properties of Juxtglomerular Cells in the Rat Olfactory Bulb. *J Neurophysiol.* 96: 2354-63.