



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Fisiología Celular

MODULACIÓN GABAÉRGICA NEOESTRIATAL
EN UN MODELO DE RATA
HEMIPARKINSONIANA

T E S I S

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Violeta Gisselle López Huerta

Directora de Tesis: Dra. Elvira Galarraga Palacio

México DF , 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencia Cognitiva del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Elvira Galarraga. Durante el doctorado conté con la beca del consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT).

Agradecimientos

- Al CONACyT, que otorgo una beca completa para la realización de mis estudios de posgrado.
- A la Dra. Elvira Galarraga Palacio, tutora principal del presente trabajo de tesis.
- Al Dr. José Bargas Díaz y la Dra. María Corsi, miembros de mi comité tutor.
- A los revisores de la presente tesis: Dra. Elizabeth Hernández, Dra. Magda Giordano, Dr. Arturo Hernández Cruz y Dr. Ranulfo Romo.
- Al Biol. Dagoberto Tapia, al Fis. Antonio Laville y a la M en C. Xochitl Pérez, por su asistencia técnica.
- Al Dr. Fatuel Tecuapetla y al Dr. Luis Carrillo, por la orientación, aportes y tiempo prestado a esta tesis.
- Al Dr. Eduardo Blanco Hernández por su apoyo en la parte de biología molecular.
- A la unidad de biología molecular y de microscopía del Instituto del Fisiología Celular, UNAM.
- A todos mis compañeros de laboratorio y personas que ayudaron a que esta tesis se llevará a cabo.

Índice

Abreviaturas.....	1
Resumen/Abstract.....	2
1. Introducción	4
1.1. Estriado.....	5
1.1.1. Población neuronal.....	9
1.1.1.1. Neuronas Espinosas medianas (MSNs).....	9
1.1.1.2. Interneuronas.....	11
1.2. Microcircuito.....	14
1.2.1. Inhibición colateral.....	14
1.2.2. Inhibición por interneuronas.....	16
1.3. Moduladores.....	16
1.3.1. Dopamina.....	16
1.3.2. Acetilcolina.....	18
1.3.3. Somatostatina.....	20
1.4. Enfermedad de Parkinson.....	23
1.4.1. Patología.....	25
1.4.2. Modelo de 6-OHDA.....	26
Planteamiento del problema.....	29
Hipótesis.....	30
Objetivos.....	31
2. Resultados.....	32
2.1. Parte I: Inhibición colateral.....	32
2.1.1. Caracterización de neuronas espinosas medianas.....	32
2.1.2. Activación selectiva de múltiples MSNs.....	33
2.1.3. Análisis de circuitos neuronales identificados.....	38
2.1.4. Impacto de la inhibición colateral en el microcircuito estriatal.....	44

2.2. Parte II: Patofisiología.....	47
2.2.1. Modelo de Parkinson.....	47
2.2.2. Inhibición colateral en el modelo de Parkinson.....	48
2.2.3. Modulación somatostatinérgica.....	52
2.2.4. Modulación somatostatinérgica en el modelo de Parkinson.....	55
2.2.5. Modulación diferencial de las vías directa e indirecta por somatostatina...58	
2.2.6. Efecto potenciado de la somatostatina en el animal hemiparkinsoniano....59	
2.2.7. Identificación farmacológica de los receptores SSTérgicos implicados....59	
2.2.8. Cuantificación de ARNm de los receptores SSTérgicos en el modelo de parkinson.....	61
3. Discusión.....	62
3.1. Inhibición colateral.....	62
3.2. Cambios en el modelo de la enfermedad de Parkinson.....	66
3.3. Modulación somatostatinérgica.....	69
Material y métodos.....	74
Bibliografía.....	84
Apéndice I.....	98

Presynaptic Modulation by Somatostatin in the Neostriatum

Striatum Presynaptic Modulation by Somatostatin is Altered in a Rodent Model of Parkinsonism

GABAergic Transmission Among Medium Spiny Neurons: Impact on the Neuronal Population

Abreviaturas

MSN	Neurona espinosa mediana (Medium Spiny Neuron)
Ctx	Corteza
GB	Ganglios Basales
GP	Globo Pálido
Str	Estriado
GFP	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
DA	Dopamina
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
SNc	Sustancia nigra compacta
SNr	Sustancia nigra reticulata
TPP	Tasa de pulso pareado
SST	Somatostatina
rtPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SP	Sustancia P
Enk	Encefalina
FS	Fast spiking
LTS	Low threshold spike
ACh	Acetilcolina
IPSC	Corriente post-sináptica inhibitora
IPSP	Potencial post-sináptico inhibitor
I-V	Relación corriente-voltaje
I-A	Relación intensidad-amplitud
NST	Núcleo subtalámico
GABA	Ácido gama amino butírico
EP	Enfermedad de Parkinson

Resumen

Las neuronas espinosas medianas (MSNs) son la principal población neuronal del núcleo estriado. El procesamiento que llevan a cabo es fundamental para la selección de programas motores. Se ha propuesto que la inhibición colateral que ejercen las MSNs sobre las neuronas vecinas es decisiva para que el microcircuito compute la información cortical, pero aun no se tienen datos conclusivos de su eficiencia. En este estudio se abordaron los siguientes problemas: a) ¿es la inhibición colateral capaz de controlar la excitabilidad de las neuronas vecinas?, b) ¿está alterada la inhibición colateral y su modulación en la enfermedad de Parkinson? Usando electrofisiología, imagenología de calcio con resolución de célula única y estimulación de campo se respondió a tales preguntas. En todos los casos se activaron múltiples MSNs estimulando los axones estriofugales en el globo pálido. Se obtuvieron registros ópticos antes y después de bloquear la transmisión GABAérgica y se observó un incremento del 60% de las neuronas sincronizadas por el estímulo antidrómico. Indicando que las nuevas células activadas estaban siendo activamente inhibidas por aquellas activadas en el estímulo control. Al realizar esta misma estrategia en un modelo de la enfermedad de Parkinson no se obtuvo cambio en el número de neuronas reclutadas, lo cual sugiere que en esta patología se pierde la inhibición colateral lo que podría explicar la falta de dinámica del circuito y la imposibilidad de seleccionar los programas motores. Se evaluó la modulación presináptica de las colaterales en este modelo. Se registraron las corrientes evocadas por la liberación de GABA y se observó que al aplicar somatostatina (un modulador liberado por neuronas locales) se inhibía fuertemente la liberación en una población y se incrementaba en otro grupo de neuronas. En su conjunto estos datos proveen información acerca del funcionamiento del circuito estriatal en condiciones normales y en una patología.

Abstract

Medium spiny neurons (MSNs) constitute the principal neuronal population in the neostriatum. The processing they achieve is thought to select motor programs. Collateral inhibition exerted by MSNs was proposed decisive to the microcircuit compute cortical inputs, but there is no direct evidence of its efficiency. In this study two questions was addressed: a) is the collateral inhibition able to control excitability in neighboring neurons? b) Is collateral inhibition and its modulation altered in Parkinson's disease? In order to answer these questions we used electrophysiology, calcium imaging and field stimulation. In every case we activated multiple MSNs by stimulating striofugal axons in the globus pallidus (GP). We got optical recordings stimulating GP before and after the blockage of GABAergic transmission and there was a 60% increase in the responsive neurons, indicating that new activated cells were actively inhibited by neurons stimulated in the control condition. The range distance in which new neurons appear after bicuculline treatment was 10-240 μm (median=40 μm). We did the same experiment in a model of Parkinson's disease and we found no increase in recruited neurons after addition of bicuculline, suggesting the disruption of MSNs communication during this pathology. Also we evaluated the presynaptic modulation by somatostatin (a local modulator) during the disease and we observed two different responses in one case somatostatin induced decrease of GABA release and in the other case the same concentrations of the drug elicited increase in GABA release. Taken all together these data are the first information at synaptic level of the MSNs GABAergic parkinsonian circuit.

1. Introducción

El sistema nervioso juega un rol central en la vida de los organismos, siendo su principal función transmitir y procesar información, el cerebro permite percibir, aprender y finalmente responder con conductas motoras que permiten la sobrevivencia del individuo (Kandel 2000).

El buen funcionamiento de los múltiples núcleos que componen al sistema subyace en el equilibrio de todos sus elementos. En el cerebro del mamífero los circuitos inhibidores juegan un papel preponderante en la correcta función. Muy lejos de la visión clásica de la inhibición como atenuante de la excitabilidad neuronal a la fecha existen descritas funciones mucho más complejas para el **GABA**, por ejemplo despolarizando a ciertos grupos de neuronas, participando en el desarrollo o incluso promoviendo la sincronización de poblaciones neuronales (Gulledge *et al* 2003, Sohal *et al* 2009).

GABA: ácido gama amino butírico, principal neurotransmisor inhibitor del SNC

Más aun existen circuitos completamente inhibidores que se encargan de funciones tan complejas como el control motor y el sistema de recompensa. Estos son los Ganglios Basales (GB) un conjunto de núcleos en su mayoría GABAérgicos que están asociados a las funciones antes descritas (Wilson 2004, Graybiel 1995, Barnes *et al.*, 2005, Groves 1988).

Los ganglios basales son estructuras altamente conservadas a lo largo de la filogenia, participan en la generación, aprendizaje y control de los movimientos voluntarios. Los núcleos que los componen son: el estriado, el globo pálido en su porción interna y externa (GPi y GPe), la sustancia nigra en su parte reticulata y

compacta (SNr y SNc) y el núcleo subtalámico (STN); mismos que forman circuitos recurrentes cuya función es seleccionar los movimientos antes de ser ejecutados (Figura 1) (Alexander y Wickens 1993, Wilson 2004, Graybiel 1995, Barnes *et al.*, 2005).

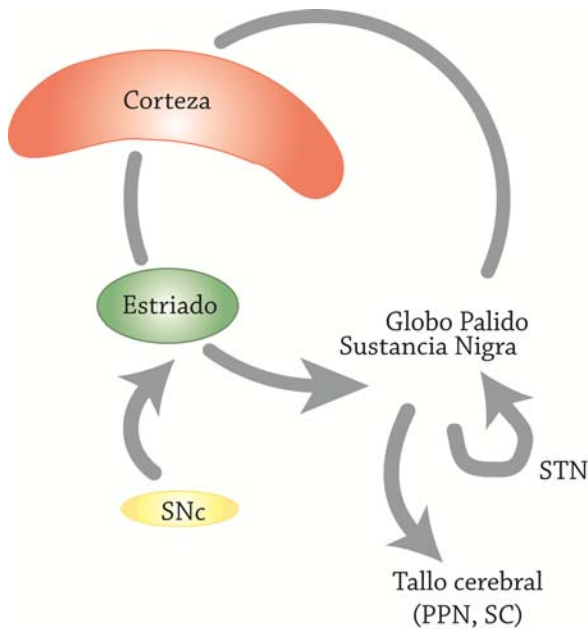


Figura 1. Asa cortico-basal. Esquema de los principales núcleos de los ganglios basales y su interacción. La corteza (rojo) envía eferentes al estriado (verde) el cual procesa dicha información para enviarla a los núcleos de salida que controlaran la actividad talámica y cortical para la selección de los comandos motores o a núcleos del tallo cerebral para controlar la postura y el centro de masa.

1.1. Estriado

El núcleo estriado es el principal de los núcleos de los GB, está situado estratégicamente en el prosencéfalo y es un punto de convergencia para las aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza y el tálamo, así como las terminales que llegan de la *Sustancia Nigra compacta* (SNc) (Tepper y Plenz, 2000, Wilson 2004). En el estriado desemboca información de las áreas de la corteza sensorial, motora y de asociación. Con ello recibe copias de perceptos y programas motores en ejecución (Bargas y Galarraga, 2000).

Las neuronas principales en el estriado son las neuronas GABAérgicas espinosas medianas que se dividen clásicamente en dos grandes poblaciones: las MSNs de la vía directa que conectan mono sinápticamente a los núcleos de salida de los GB (GPi y SNr) y expresan sustancia P y receptor a **dopamina** (DA) tipo D1 y las neuronas espinosas de la vía indirecta que mandan sus axones a uno de los núcleos intermedios de los GB (GPe) y expresan encefalinas y el receptor a DA tipo D2 (Gerfen y Surmeier 2010, Gerfen *et al.*, 1990; Gerfen y Young, 1988).

De manera simplificada el modelo tradicional del funcionamiento de los GB se basa en que la información que llega al estriado es procesada a través de la vía directa y la vía indirecta, dos vías paralelas con funciones antagónicas (Albin *et al.*, 1989, DeLong, 1990; Obeso *et al.*, 2004, Kravitz *et al.* 2010, Bateup *et al.*, 2010). Lo cual fue comprobado recientemente de manera experimental mediante **optogenética**, activando selectivamente una u otra población por la expresión de canales sensibles a luz en las neuronas de interés. Por un lado la activación de neuronas de la vía directa promueve la inhibición de los núcleos de salida y libera al tálamo y la corteza, contrariamente la activación de neuronas de la vía indirecta aumenta la actividad en los núcleos de salida y de esta manera se inhibe fuertemente al tálamo y la corteza (Figura 3).

Dopamina: Principal neuromodulador de los ganglios basales, realiza sus funciones a través de 5 receptores acoplados a proteínas G nombrados D1-5

Optogenética: Manipulación genética en la que se expresa un canal iónico (para el paso de cationes o aniones) activado por luz para controlar la excitabilidad neuronal selectiva de poblaciones de interés.

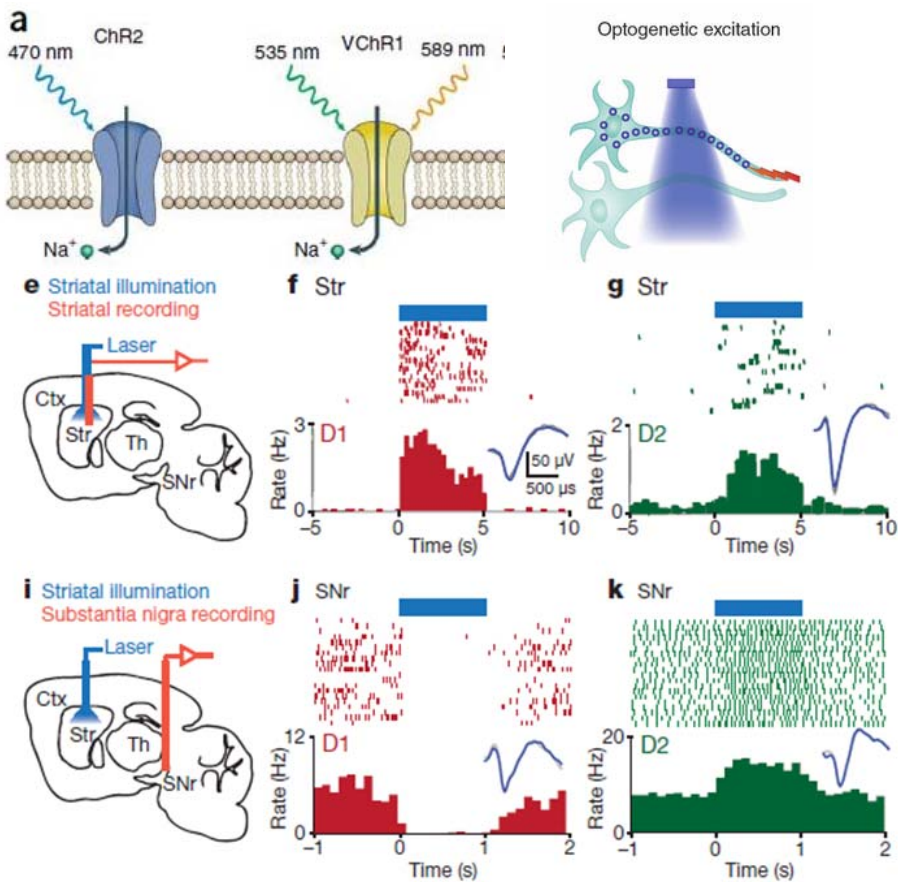


Figura 2. Efecto de la activación selectiva de las vías directa e indirecta en los núcleos de salida de los GB. A. canal de rodopsina expresado selectivamente en neuronas espinosas medianas de las vías directa e indirecta que es activado por luz. E. Representación esquemática del protocolo de estimulación y registro en el estriado. F. Gráfica tipo raster e histograma de la actividad en el estriado al prender el láser y activar selectivamente a las neuronas de la vía directa. G. Gráfica tipo raster e histograma de la actividad estriatal al estimular selectivamente a las neuronas de la vía indirecta. I. Esquema de estimulación en el estriado y registro en la SNc. J. Raster e histograma de la actividad en la sustancia nigra al activar selectivamente a MSNs de la vía directa en el estriado. K. Raster e histograma de la actividad en la sustancia nigra al activar selectivamente a MSNs de la vía indirecta en el estriado. (Tomado de Kravitz et al 2010)

Por lo tanto la activación de la vía directa promueve el movimiento mientras que la vía indirecta lo reprime y el balance entre las dos vías permite la ejecución de programas motores (Figura 4) (Kravitz *et al*, 2010; Bateup *et al* 2010). A pesar de estos contundentes hallazgos es innegable la existencia de otras vías de la información que implican más elementos de los GB y complican el panorama. Tal es el caso de la **vía hiperdirecta** y las múltiples conexiones intrínsecas (e.g. entre el GPe y el núcleo subtalámico, la SNc y el GPe, el GP y el estriado) que deben considerarse en el estudio de los GB (Ver Obeso *et al*, 2010).

Vía hiperdirecta:
 Conexión directa de la corteza con el núcleo subtalámico.

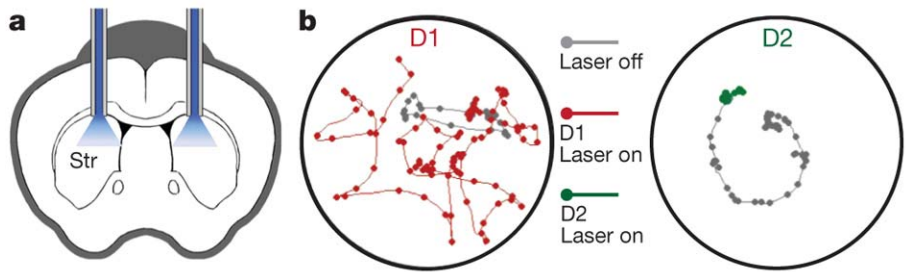


Figura 3. Efecto de la activación selectiva de las vías directa e indirecta en el movimiento. A. esquema de estimulación bilateral. B. Diagrama del patrón de movimiento de un animal al activar de manera bilateral selectivamente las neuronas de la vía directa en rojo y en control en color gris. C. Diagrama del patrón de movimiento de un animal al activar de manera bilateral selectivamente las neuronas de la vía indirecta en verde y en control en color gris (Tomado de Kravitz et al 2010).

El estriado exhibe una apariencia relativamente uniforme. Sin embargo en los primates existe una clara división debida a la cápsula interna por lo que se distingue una parte lateral: el núcleo caudado y una parte medial: el putamen (Joel y Weiner 1994, Parent y Hazrati 1995, Yin y Knowlton 2006). En roedores las fibras descienden de manera uniforme sin dividir al núcleo. A pesar de ello tanto en primates como en roedores existen diferencias funcionales de las porciones

dorso medial y dorso lateral del estriado, ya que reciben información de distintas partes de la corteza. El estriado dorso medial se encarga preferentemente de la información proveniente de las cortezas de asociación, mientras que el estriado dorso lateral recibe los comandos de la corteza somato sensorial (Figura 4) (Goldman y Nauta 1977, McGeorge y Faull 1989, Ragsdale y Graybiel 1981).

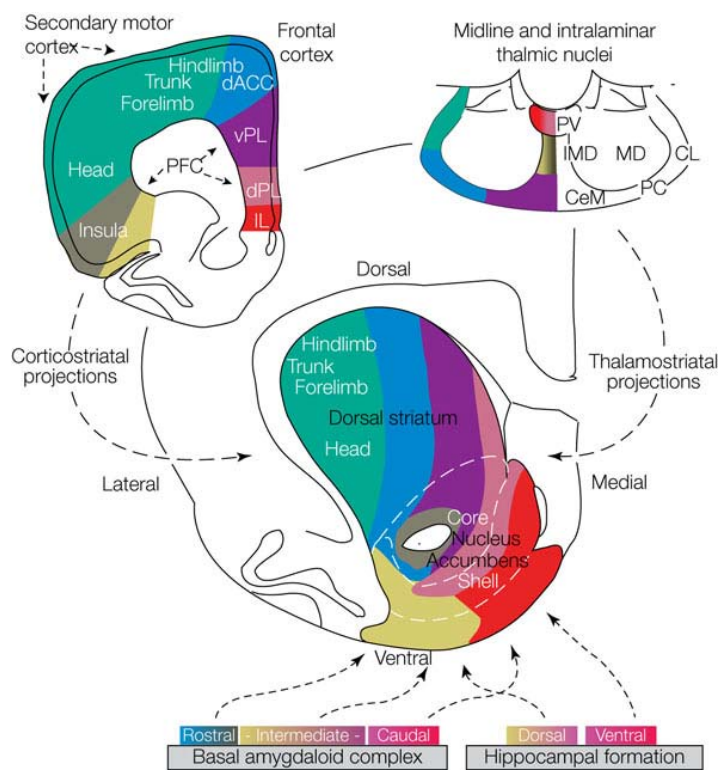


Figura 4. Inervación de la corteza sobre el estriado. Se muestra la regionalización de la corteza, el estriado y el tálamo. Existe una preferencia topográfica de inervación de las diferentes áreas corticales al estriado (tomado de Pennartz *et al* 2004).

1.1.1. Población Neuronal

El estriado está compuesto de varios tipos neuronales, pero siempre se han reconocido un gran número de neuronas de tamaño medio (15-25 μm) con morfología variable y unas pocas neuronas de tamaño grande (30-50 μm). Actualmente se acepta que el estriado se compone de un 80-95% de neuronas de proyección (MSNs) y de un 5-20% de interneuronas (Bolam *et al.*, 2000 y Tepper y Plenz, 2005, Kubota y Kawaguchi, 2000, Bennett y Wilson 2000).

1.1.1.1. Neuronas Espinosas Medianas (MSNs)

Las neuronas espinosas medianas son las más abundantes en el estriado, representan un 95% de la población y son las encargadas de recibir, procesar y transmitir los comandos corticales y la información talámica (Wilson 2004). Durante el aprendizaje, selección, iniciación y ejecución de los movimientos las neuronas estriatales responden con episodios de ráfagas de potenciales de acción, indicando su participación inequívoca en la función motora (Hikosaka *et al* 1989). Todas las espinosas medianas comparten una morfología similar, presentan un soma mediano (10-20 μm) y ramificación dendrítica moderada que forma un árbol esférico de 300 μm de diámetro, este comienza con unas 5 dendritas principales que rápidamente comienzan a ramificarse y a exhibir abundantes espinas dendríticas (figura 5), una característica notable es que tienen extensos axones colaterales que se intercalan y extienden por su profuso árbol dendrítico antes de dejar el núcleo (Kawaguchi *et al*, 1987). Las MSNs exhiben un patrón de actividad que oscila entre dos potenciales de membrana,

uno relativamente hiperpolarizado *down state* cercano a su potencial de reposo -80 mV y otro despolarizado -50 mV donde se pueden presentar ráfagas de potenciales de acción que duran hasta segundos conocido como *up state*. Las transiciones entre el *down* y *up states* se correlacionan con la presencia de movimiento cuando se realizan registros electrofisiológicos in vivo (Plenz y Kitai, 1998; Wilson, 2004).

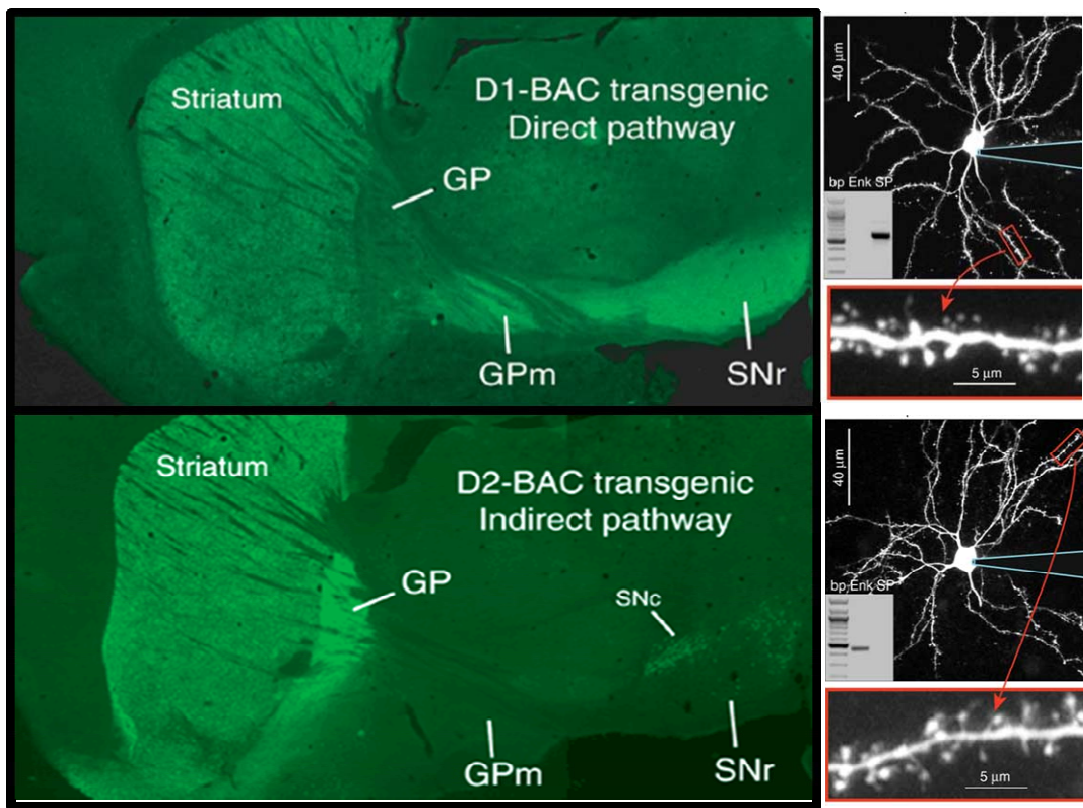


Figura 5. Vías directa e indirecta de los ganglios basales. Imágenes panorámicas de rebanadas sagitales de cerebro de ratón transgénico *Drd1-EGFP* (arriba) y *Drd2-EGFP* (abajo). Cuando el reportero es asociado al receptor a DA tipo D1 la señal fluorescente resalta el núcleo estriado, la SNr y el GP en su parte medial, a diferencia de la señal obtenida en los animales *Drd2-EGFP* donde se marca además del estriado la parte externa del globo pálido. A la derecha se presentan neuronas espinosas medianas pertenecientes a la vía directa (arriba) y a la vía indirecta (abajo). No hay diferencias morfológicas.

1.1.1.2. Interneuronas

Las neuronas locales representan un número pequeño de la población estriatal, se dividen en dos grandes grupos: las neuronas gigantes colinérgicas y las interneuronas GABAérgicas (Tepper y Bolam, 2004, Tepper *et al*, 2010).

Las neuronas colinérgicas son identificadas fácilmente por su sobresaliente tamaño, fueron tempranamente descritas a principios del siglo XIX por Kölliker y posteriormente por Ramón y Cajal. Inicialmente se les asignó como las neuronas de proyección estriatales y fue hasta 1970 cuando se reconoció que eran neuronas locales (Grofova 1979, Kimura *et al*, 1980). Representan el 2-5% del total de las neuronas del núcleo. El tamaño del soma de estas neuronas es de 20 a 50 μm , emiten 2-4 dendritas primarias, que dan lugar a un árbol dendrítico que se expande hasta un área de más de 1 mm de diámetro (Figura 6D). El axón de la interneurona colinérgica forma una densa arborización, extendiéndose el campo axonal más allá de las dendritas. Su blanco sináptico son principalmente las neuronas estriatales de proyección (Bolam *et al*.1984, Izzo & Bolam 1988, Phelps *et al*. 1985), pero también hacen sinapsis sobre las interneuronas *fast spiking*. Reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza y el tálamo y DAérgicas de la SNc (Koós y Tepper, 1999).

Fisiológicamente las neuronas colinérgicas se distinguen por sus potenciales despolarizados y altas resistencias de entrada, además de tener disparo espontáneo repetitivo de potenciales de acción (Kawaguchi 1992). De esta manera las neuronas colinérgicas tienen una batería de corrientes intrínsecas para ser un marcapasos y proveer continuamente al núcleo de [acetilcolina](#).

Acetilcolina: Es el primer neurotransmisor identificado, media su acción a través de receptores nicotínicos y muscarínicos

Interneuronas GABAérgicas

Las interneuronas *fast spiking* (FS) o neuronas **parvalbúmina** positivas son un porcentaje bajo de la población estriatal, sin embargo se le atribuyen funciones críticas para regular la salida funcional del núcleo (Koos y Tepper 1999). Estas neuronas carentes de espinas fueron observadas por primera vez en la década de los 80's, se mostraron como neuronas con una fuerte tinción a **GAD**. La mayoría de estas neuronas están clasificadas como neuronas medianas (Kita et al 1990, Kawaguchi 1993), pero existe un subtipo que presenta un tamaño del soma similar al de la gigante colinérgica (Bennet y Bolam 1994). Existe un gradiente medio lateral para la distribución de estas células siendo más abundantes en la región dorso lateral (Wu *et al* 2000). Tienen una arborización dendrítica pobre, presentan de 5-8 dendritas que se extienden menos de 300 μm más allá del soma. En cambio el axón está altamente ramificado y es uno de las arborizaciones axonales más densas de las células estriatales que alcanzan una distribución de hasta 1mm de diámetro (Kawaguchi 1993). Estas neuronas hacen contacto sináptico con las dendritas primarias y soma de las espinosas medianas, controlando de manera eficaz el disparo de las mismas (Koos y Tepper 1999). Reciben sinapsis glutamatérgicas corticales y se conectan con otras FS vía sinapsis eléctricas (Kita 1993).

Su marca electrofisiológica es inconfundible y es a lo que deben su nombre, ya que estas células pueden alcanzar frecuencias de disparo de hasta 400 Hz. y puede generar disparos en ráfaga (Koos y Tepper 1999, Bracci et al 2002). Es

Parvalbumina: Proteína queladora de calcio de alta afinidad.

GAD: Descarboxilasa de ácido glutámico, enzima encargada de sintetizar GABA

modulada por DA vía receptores D2 y D5, y excitada por ACh a través de receptores nicotínicos.

Una segunda población de interneuronas GABAérgicas son aquellas no espinosas que expresan somatostatina, oxido nítrico sintasa, NADPH diaforasa y neuropéptido Y, las cuales ocupan menos del 1% del neostriado. Tienen un diámetro de 12-25 μm y en comparación con las FS presentan menos ramificaciones dendríticas (Tepper y Plenz, 2005).

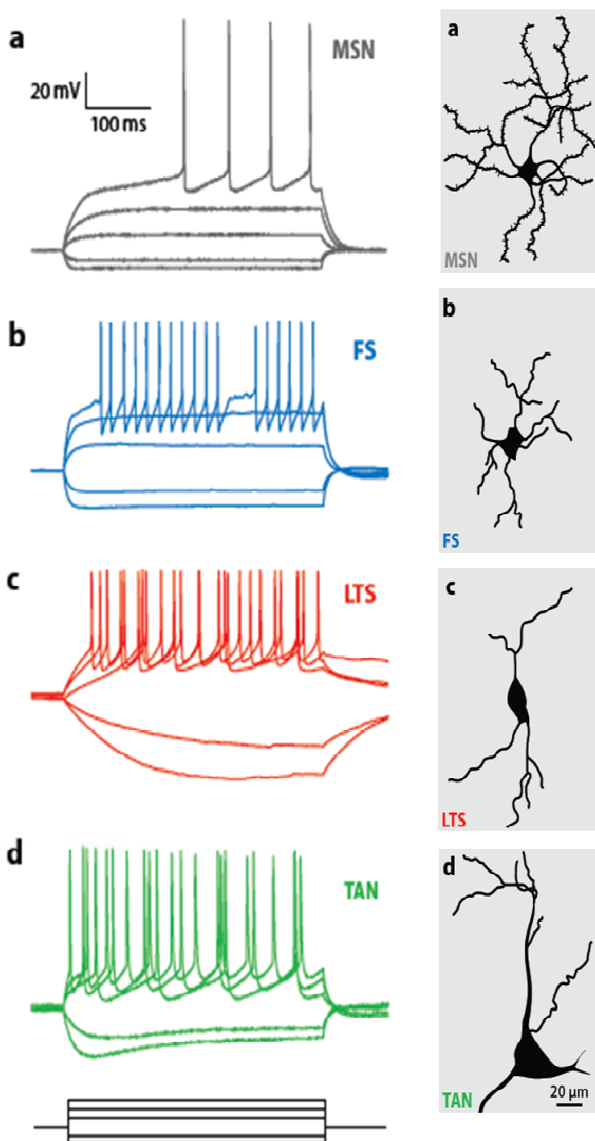


Figura 6. Características electrofisiológicas y morfológicas de las neuronas estriatales. Respuestas de voltaje ante la inyección de pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes en las neuronas espinosas medianas en A, *Fast Spiking* en B, *Low Threshold Spike* en C y colinérgica en D a la izquierda reconstrucciones anatómicas de cada una de las neuronas mencionadas (Tomado de Kreitzer 2010).

Los axones de estas interneuronas se extienden hasta 1 mm del soma; sus terminales hacen sinapsis por toda la periferia dendrítica del neostriado que incluye a las neuronas espinosas medianas (Bennet y Wilson, 2000). Reciben información de la corteza así como del tálamo y el globo pálido (Kawaguchi et al., 1995; Vuillet et al., 1992), además de recibir inervación colinérgica y dopaminérgica. Exhiben un potencial de membrana en reposo relativamente despolarizado -56 mV aproximadamente, y debido a las características de disparo (de bajo umbral) se conocen como *low-threshold-spike* (Tepper y Bolam, 2004).

1.2. Microcircuito

Los diferentes tipos neuronales interactúan de tal forma que proveen al circuito de dinámica, en la cual subyacen sus funciones; en el estriado se han descrito dos tipos de conexiones que juegan un papel fundamental en el entendimiento de los ganglios basales: La inhibición colateral y la inhibición por interneuronas.

1.2.1. Inhibición colateral

Históricamente, la interacción local entre neuronas espinosas medianas participa de manera fundamental en los modelos sobre el funcionamiento del estriado y los ganglios basales (Plenz 2003). Esta idea se basó en las descripciones anatómicas y el hecho de que la estimulación intraestriatal produjera potenciales sinápticos inhibitorios, la observación de la densa red de axones colaterales permitía ver al estriado como un circuito con la dinámica de [winner-take-all](#), la

Winner-take-all:
Dinámica en la cual las neuronas que tienen una entrada excitadora más fuerte inhiben a las vecinas y con ello seleccionan su salida a otros núcleos.

cual se ajusta a las redes neuronales de toma de decisiones (Wickens *et al.* 1991, Kristan *et al.*, 2008; Pennartz *et al.*, 2009; Wang 2008).

El primer traspie que tuvo esta hipótesis se presentó en los primeros experimentos y fue el fracaso para encontrar las sinapsis funcionales, a pesar del gran número de neuronas de proyección, al realizar registros de pares de neuronas no se encontraban conectadas (Jaegger *et al.*, 1994), proponiendo que la interacción entre MSNs era inexistente. Posteriormente se logró evidenciar la existencia de tal conexión, pero la respuesta era pobre y la probabilidad de éxito era sumamente baja (10-30%) (Tunstall *et al.*, 2002; Czubayko & Plenz, 2002; Venance *et al.*, 2004; Taverna *et al.*, 2004; Tecuapetla *et al.*, 2007; Chuhma *et al.*, 2011). Con estos datos la sinapsis individuales entre las MSNs no cumplía con los requisitos para formar una red con inhibición lateral y se han tenido que replantear los modelos del funcionamiento de los GB sin tener clara la función de las colaterales axónicas de espinas medianas (Tepper *et al.*, 2008).

Actualmente el control de la salida funcional del estriado se le ha asignado a la inhibición por interneuronas delegando a un segundo plano a la inhibición colateral, aunque no se tiene clara su función se piensa que regula la entrada glutamatérgica ya que se encuentran cerca de las dendritas distales y espinas dendríticas (Figura 7) (Plenz 2003, Tepper *et al.*, 2008).

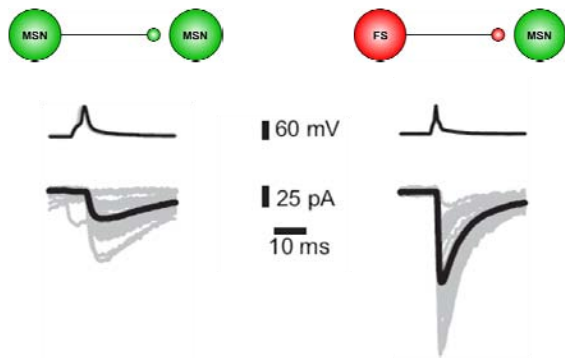
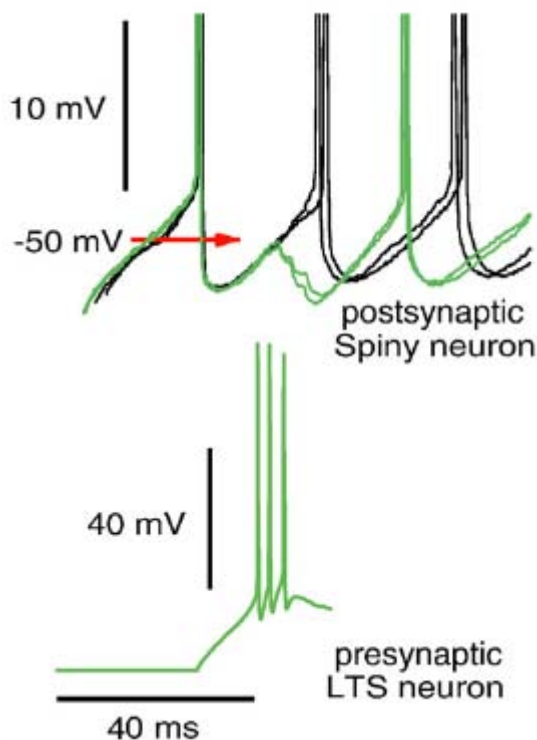


Figura 7. Inhibición colateral vs. Inhibición por interneuronas. A. esquema de conexión entre espinosas medianas. B Registro de voltaje de potenciales de acción en la célula presináptica (arriba) que producen una corriente inhibitoria en la célula postsináptica. C. Esquema de conexión entre una interneurona y una MSN. D. Registro de voltaje de potenciales de acción en la célula presináptica (arriba) que producen una corriente inhibitoria en la célula postsináptica (Tomado de Tecuapetla *et al* 2007).

1.2.2. Inhibición por interneuronas

A diferencia de la inhibición colateral la inhibición que ejercen las interneuronas sobre las MSNs es bastante robusta. Las neuronas que participan en este proceso son las interneuronas FS y las LTS (Koos y Tepper 1999, Gustafson et al 2006). La conexión de una sola de estas neuronas con la neurona de proyección es capaz de retrasar el disparo teniendo un fuerte control sobre la excitabilidad y



salida funcional de las MSNs (Figura 8) (Koos y Tepper 1999,

Wilson 2004).
Figura 8. Inhibición por interneuronas. Trazos de voltaje de una célula espinosa mediana (arriba) y de una interneurona LTS abajo. Obsérvese que cuando se activa a la interneurona existe un desfase en el disparo de potenciales de acción en la MSN cuando se activa a la interneurona.

Wilson 2004).

1.3. Moduladores

La interacción entre los diferentes componentes del microcircuito puede ser modulado finamente por neurotransmisores que pueden cambiar los pesos de las conexiones sinápticas o la excitabilidad de las células, con ello la salida funcional puede pasar de un estado a otro solo con un modulador o en ocasiones tener una desregulación total por falta de ellos.

1.3.1. Dopamina

La dopamina es un neurotransmisor elemental en los ganglios basales. Este transmisor lleva a cabo sus efectos a través de 5 **receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)** (Figura 9) divididos en dos familias: los receptores de tipo D1 (D1 y D5) y los de tipo D2 (D2, D3 y D4), teniendo típicamente efectos antagónicos sobre sus blancos (Ungersted et al, 1985). El estriado está densamente innervado por fibras DAérgicas provenientes de la SNc y del área ventral tegmental. Desde las neuronas espinosas de proyección hasta las interneuronas gigantes colinérgicas todos los elementos del estriado expresan receptores DAérgicos modulando el circuito a varios niveles (Surmeier *et al* 1996, Centonze *et al* 2003, Rivera 2002, Yan *et al* 1997). Los axones de las neuronas DAérgicas arborizan extensivamente el estriado, siendo la distancia entre botones vecinos cercanos $\approx 1.87 \mu\text{m}$ dan lugar al 10% de las sinapsis que se forman en el núcleo (Groves *et al* 1994, Arbuthnott y Wickens 2007).

GPCRs: Receptores metabotrópicos cuya activación promueve el desencadenamiento de cascadas de señalización intracelulares con diversos blancos finales como canales iónicos, de esta manera modulan la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisores.

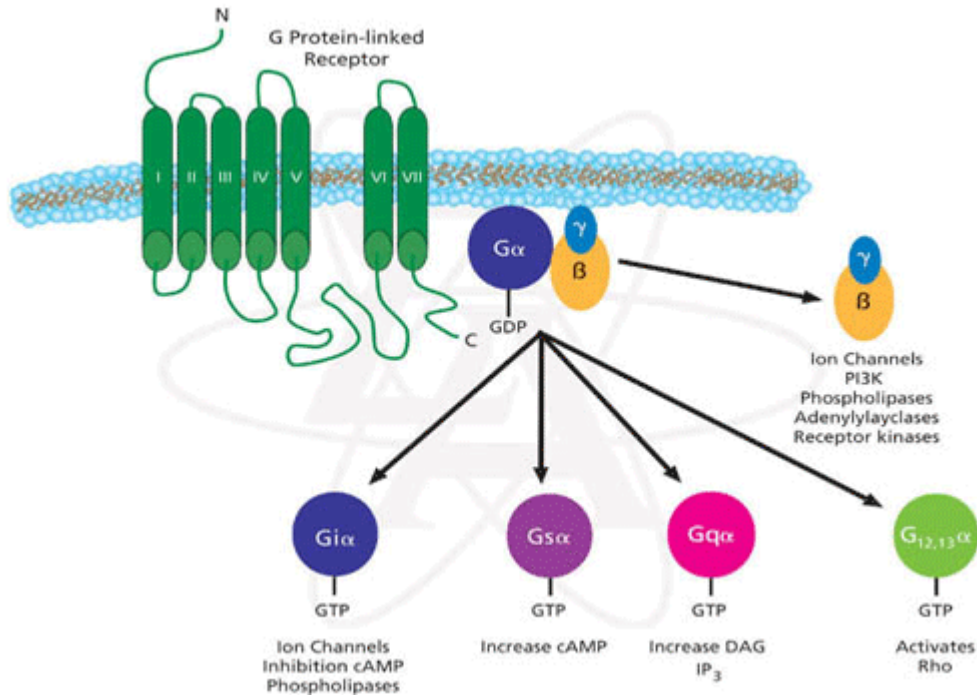


Figura 9. Representación esquemática de los receptores acoplados a proteínas G y las diversas proteínas G con sus respectivos efectos.

Ya que las neuronas DAérgicas tienen actividad espontánea con disparo tónico (1-8 Hz) se mantiene un tono de DA (Shultz *et al* 2007). En respuesta a un estímulo relevante las neuronas de la SNc generan disparo en ráfagas elevando los niveles de DA fásicamente. De manera importante los receptores a DA tienen diferentes afinidades al ligando por lo que durante la ausencia de estímulos el tono DAérgico activa preferentemente a receptores acoplados a proteínas G tipo D2 y el aumento en las concentraciones de DA promueve la activación de los receptores de tipo D1, convirtiéndose la DA en un contrastador de señales (Shultz *et al* 2007).

Sí bien todos los elementos estriatales expresan receptores a DA, la distribución de estos es diferente para los distintos tipos neuronales. Las neuronas de

proyección que pertenecen a la vía directa solo expresan preferentemente el receptor D1, mientras que las de la vía indirecta el receptor D2 (Surmeier *et al* 1996). Por su parte las interneuronas colinérgicas expresan el receptor D2 y D5 y las interneuronas GABAérgicas expresan preferentemente receptores D5 (Centonze *et al* 2003).

1.3.2. Acetilcolina

La acetilcolina es sin duda igual de importante que la DA en la función estriatal. El estriado es el único núcleo que presenta su propia fuente de este transmisor, además de los niveles más altos de las enzimas encargadas de sintetizar y degradarlo en todo el cerebro (Calabresi *et al* 2000, Zhou *et al* 2002). A pesar de que las interneuronas colinérgicas representan solo el 1% del núcleo su extensa arborización axonal permite la correcta transmisión en todo el estriado. Modula la actividad de las espinosas medianas a través de sus receptores metabotrópicos muscarínicos y a las interneuronas FS a través de sus receptores ionotrópicos nicotínicos (Ince *et al* 1997, Yan *et al* 2001).

Las interneuronas colinérgicas se encuentran disparando tónicamente a frecuencias bajas por lo que mantienen un nivel de ACh en el núcleo (Bolam *et al* 1984, Wilson *et al* 1990), interesantemente cuando se presenta un estímulo relacionado con una tarea motora las estas neuronas presentan una pausa en el disparo; por lo tanto la ACh se ha relacionado fuertemente con la memoria y el aprendizaje (Graybiel 2004, Zhou *et al* 2002).

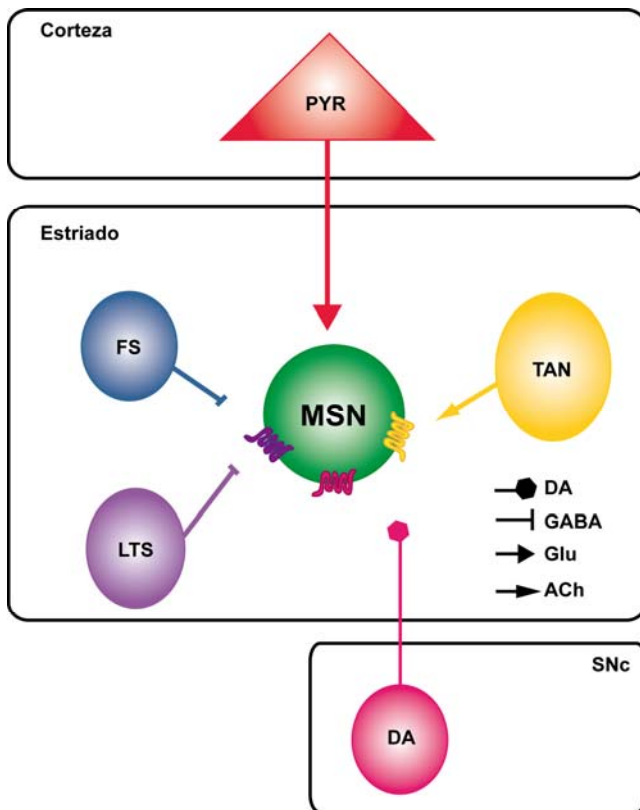


Figura 10. Microcircuito estriatal. Esquema de los elementos del núcleo en verde la neurona principal, en azul la interneurona FS, en morado la interneurona LTS y en amarillo la neurona gigante colinérgica. Se muestran las principales aferencias al núcleo: glutamatergica de la corteza y Daérgica de la SNc. (Modificado de Fino y Venance 2010).

1.3.3. Somatostatina

Además de la DA y la ACh existe toda una batería de transmisores que modulan la función del núcleo. Muchos de ellos son liberados localmente por interneuronas o por las colaterales de las MSNs por ejemplo: sustancia P, encefalinas, neuropéptido Y y somatostatina. Esta última es liberada por la interneurona LTS y está fuertemente relacionada con el sistema DAérgico y colinérgico (Tepper *et al* 2010, Chesselet y Reisine 1983).

La somatostatina (SST) es un péptido cíclico que lleva a cabo diversos papeles funcionales en el organismo (Krantic *et al.*, 2004; Viollet *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2000; Patel, 1999). Se describió en los años 70's en el hipotálamo y ahora se sabe que tiene una amplia distribución por todo el SNC (Brazeau *et al.*, 1972,

Schulz *et al.*, 2000). El péptido es producido en distintas proporciones por células somatostatinérgicas y actúa como neurotransmisor modulador (Bassant *et al* 2005, Patel, 1999 y Gillies, 1997). El que la somatostatina se localice en varias zonas del cerebro no es fortuito ya que existen datos de que esta interviene en procesos conductuales complejos como las funciones cognitivas, motoras y sensoriales (Viollet *et al.*, 2000).

Diferentes trabajos tanto conductuales como electrofisiológicos y bioquímicos describen a la somatostatina como un modulador de la liberación de algunos transmisores como la acetilcolina, dopamina y el GABA en el estriado (Meyer *et al.*, 1989; Chesselet y Reisine, 1983; Rakovska *et al.*, 2003), y GABA y glutamato en el cerebro anterior (Momiya y Zaborsky, 2006). En el estriado esta reportado que la somatostatina aumenta la liberación de dopamina en el núcleo (Chesselet y Reisine, 1983; Rakovska *et al.*, 2003; Hathway *et al.*, 1999; Hathway *et al.*, 2003).

Existen dos isoformas biológicamente activas la somatostatina-14 y su equivalente extendida en el extremo amino terminal la somatostatina-28 (Gillies, 1997). Ambos péptidos son sintetizados a partir de un único precursor de 116 residuos de aminoácidos la preprosomatostatina que es codificado a partir de un único gen localizado en el cromosoma 3q28 en humanos (Krantic *et al.*, 2004 y Patel *et al.*, 1999).

La forma más abundante es la somatostatina-14 pero la somatostatina-28 también es encontrada en el cerebro y representa del 20 % al 30 % de

inmunoreactividad a somatostatina en el sistema nervioso (Patel, 1999). Se ha mostrado que en algunos casos ambos péptidos tienen efectos fisiológicos similares y en otros incluso el mismo puede tener acciones contrarias debido a que activan receptores ligados a cadenas de señalización heterogéneas (Bohem y Betz, 1997). En el estriado se localizan los dos tipos de somatostatina tanto la 28 como la 14 sin embargo, se observa en mayor proporción la somatostatina-14 (Widmann *et al.*, 1988).

Las funciones biológicas que lleva a cabo la somatostatina son mediadas por cinco receptores acoplados a proteínas G de siete dominios transmembranales nombrados sstr1-5 (Schulz *et al.*, 2000; Herviu y Emson, 1997).

Los receptores a somatostatina se caracterizan por tener de 3 a 8 sitios de fosforilación por la proteína cinasa A (PKA), la cinasa C (PKC) y la calmodulina cinasa II en el carboxilo terminal y en la segunda y tercera asa intracelular (Vilchis, 2002).

En base a su homología y a su afinidad a los agonistas los receptores a somatostatina se dividen en dos familias: la SRIF-1 que comprende a los receptores sst2, sst3 y sst5 y SRIF-2 en la que se agrupan los subtipos sst1 y sst4 (Krantic *et al.*, 2004). Entre sus blancos de encuentra la inhibición de la adenilato ciclasa, unión a canales de Ca^{2+} y K^+ , bomba de Na^{2+}/H , guanilato ciclasa, activación de fosfolipasa C, fosfolipasa A2, MAP cinasa, serina/treonina, proteína fosfotirosil fosfatasa. Además los SSTR están ligados a varios de los canales de K^+ , como el rectificador tardío, el rectificador entrante,

canales de K^+ sensibles a ATP, y los BK dependiente de Ca^{2+} (Krantic et al., 2004, Hervieu y Emson 1998; Chesselet y Graybiel., 1986; Reisine y Bell, 1995).

En el estriado los receptores somatostatinérgicos están relacionados con la inhibición de la entrada de calcio a través de canales de Ca^{2+} N/P (Vilchis et al., 2002), el aumento de la actividad de canales de K^+ dependiente de Ca^{2+} BK e inhibición de los canales SK (Vilchis et al., 2000), además de abrir el rectificador entrante de K^+ (Hernández-Echegaray et al., 2005). Estudios previos muestran que todos los subtipos de receptores somatostatinérgicos están presentes en el estriado gracias a técnicas de RT-PCR tanto en el núcleo como en célula única; demostrando este último que el receptor predominante en las MSNs es el SSTR2 (Figura 11) (Allen *et al* 2003, Hernández-Echegaray *et al.*, 2005).

BK y SK: Canal de potasio dependientes de calcio de gran conductancia (*big*) y pequeña (*small*) que participan en modular la excitabilidad neuronal.

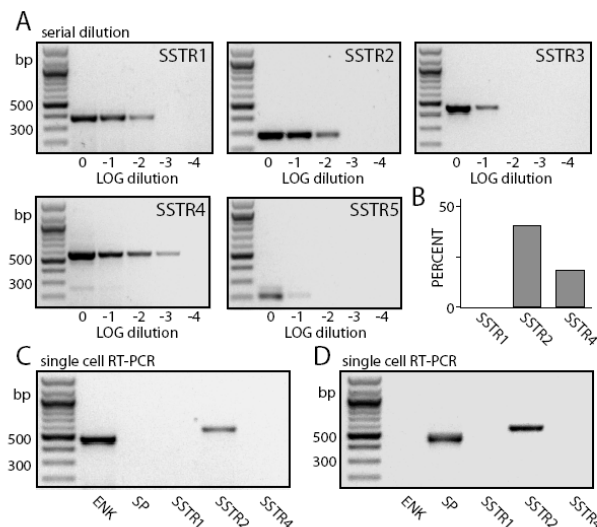


Figura 11. Receptores a somatostatina presentes en el estriado y MSN. En A) se distinguen las concentraciones de los distintos tipos de receptores a somatostatina en el núcleo total. Los subtipos SSTR2 y SSTR4 son los más abundantes. En C) subtipos de receptores presentes, utilizando la técnica de single cell RT-PCR, en una neurona espinosa mediana Enk positiva, En D) Subtipo de receptores a somatostatina presentes en una neurona SP positiva, (Tomado de Galarraga et al, 2009).

1.4. *Enfermedad de Parkinson*

Todos los elementos mencionados están relacionados en una red intrincada. La falta de alguno de ellos promueve el desbalance y malfuncionamiento del microcircuito, tal es la enfermedad de Parkinson en la que la ausencia de DA conlleva a cambios en los niveles de otros transmisores, cambios en las sinapsis y finalmente un remodelamiento del circuito implicado en el movimiento.

La EP es un trastorno multifactorial descrito por James Parkinson en 1817 afecta aproximadamente 1% la población, convirtiéndose en la segunda enfermedad progresiva más común después del Alzheimer (Dauer y Przedborski, 2003).

La principal distinción de este padecimiento es el llamado síndrome parkinsoniano el cual se presenta en enfermedades que cuenten con una deficiencia cerebral de dopamina (DA) o daño directo del núcleo estriado (NE) (Dauer y Przedborski, 2003). A pesar de existir varias causas de parkinsonismos, la EP provee aproximadamente el 80% de los casos.

Este síndrome se caracteriza por manifestaciones motoras que incluyen, temblor, mismo que decrece al iniciar los movimientos y se presenta solamente durante el reposo; rigidez, la cual se refiere a la resistencia para realizar movimientos pasivos con las extremidades; pérdida de los movimientos voluntarios, postura inestable, *freezing* y bradicinesia (Parkinson, 2002; Dauer y Przedborski, 2003; Melrose et al., 2006). La bradicinesia, acinesia e hipocinesia pueden

manifestarse de diferentes maneras, entre ellas: pausas en las expresiones faciales normales (hipomimia), disminución del tono de voz (hipofonia), reducción en la talla corporal (micrografia), así como lentitud al escribir y caminar, y adopción de una postura inclinada, asimismo de pérdida del equilibrio (Dauer y Przedborski, 2003; Langston, 2006).

Además de los síntomas motores hay manifestaciones no motoras de la enfermedad, encerrando desordenes del sueño, disfunciones en la olfacción, denervación simpática del corazón y constipación (Langston, 2006). Agregándose también anormalidades emocionales, afectivas y cognitivas (Dauer y Przedborski, 2003; Cools et al., 2006).

1.4.1 Patología

Es bien conocido que la pérdida de neuronas dopaminérgicas y por tanto la disminución de DA y sus metabolitos el ácido homovanílico (HVA) y el 3,4-dihidroxifenilacetato (DOPAC) (Beal, 2001), así como la reducción en el nivel de expresión del ARNm del transportador de DA (DAT) son la principal característica de la EP (Uhl et al., 1994). Con ello se da la pérdida de la importante modulación que la DA tiene sobre la salida funcional del núcleo (Guzmán et al., 2003; Tecuapetla et al., 2007). La mayor pérdida de axones dopaminérgicos se da en la parte del estriado denominada putamen, mientras que el caudado tiene un deterioro menos extensivo, debido quizá a que también recibe entradas dopaminérgicas provenientes del área tegmental ventral (VTA), núcleo que es menos dañado en la EP (Beal, 2001; Dauer y Przedborski, 2003;

Melrose et al., 2006). A esto se le puede añadir la muerte de neuronas catecolaminérgicas y serotoninérgicas de núcleos del tallo cerebral, neuronas hipotalámicas, neuronas corticales y del núcleo basal de Meynert el principal proveedor cortical de acetilcolina (Beal, 2001; Melrose et al., 2006).

Dentro de la EP también se puede notar la aparición de inclusiones intracitoplásmicas de origen proteico conocidas como cuerpos de Lewy (LB) en las neuronas remanentes (Dewar et al., 1997; Dauer y Przedborski, 2003). Los LB son agregados esféricos que cuentan con varias proteínas incluyendo la α -sinucleína, la ubiquitina, *parkin* y neurofilamentos (Feany y Bender, 2000; Chesselet, 2007). Estos se presentan en todas las zonas afectadas del sistema nervioso tanto central como periférico: la corteza cerebral, bulbo olfatorio, hipotálamo y sistema autónomo. Así mismo en sistemas noradrenérgicos (*Locus coeruleus*) serotoninérgicos (*Rafe*) y colinérgicos (núcleo dorsal motor del nervio vago y el núcleo basal de *Meynert*) (Langston, 2006).

La etiología de la EP es aún desconocida siendo el principal factor de riesgo la edad, se observa que pueden estar implicados agentes ambientales y genéticos. En cuanto a los factores ambientales se han relacionado varios agentes con la degeneración específica de células de la SNpc incluyendo la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, toxinas exógenas, la acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, infecciones virales, excitotoxicidad (Lozano et al. 1998). Por otro lado la reciente identificación de algunas proteínas implicadas en la EP como la α -sinucleína y el *parkin* que se encuentran mutadas en varios casos de Parkinson familiar. Como también el advenimiento de los modelos

basados en alteraciones genéticas de la enfermedad, proveen nuevas pistas en el conocimiento de las causas de la EP (Chen y Feany 2005).

1.4.2. 6-OHDA

La generación de modelos para el estudio de la EP ha permitido el desarrollo de nuevos tratamientos y conocer los cambios fisiológicos que subyacen a este padecimiento. Uno de los modelos más usados ha sido el modelo de lesión con la toxina **6-hidroxidopamina** (6-OHDA) en roedores.

Los animales con lesión bilateral mostraban serios problemas en el comportamiento como disrupción motora, afagia, adipsia y acinesia lo que resultaba en la muerte del animal. El anterior hecho condujo a la inyección unilateral de la toxina produciendo el conocido modelo de rata **hemiparkinsoniana**, las ratas lesionadas de esta forma no muestran complicaciones motoras importantes. La principal característica desarrollada por estos animales es la conducta de giro inducida con agonistas dopaminérgicos o incluso desplegada sin estimular de alguna manera a la rata (Ungersted 1968, Shwartzing y Huston 1996, Dewar *et al* 1997, Simola *et al* 2007).

En el hemisferio dañado a parte de la pérdida de DA, se puede observar un aumento en la cantidad de acetilcolina estriatal, así como la pérdida de espinas dendríticas en una parte de la población de las neuronas espinosas medianas en el mismo núcleo (Day *et al*, 2006). Otra característica es la reducción de las sinapsis asimétricas sobre las neuronas espinosas medianas que provienen principalmente de la corteza y en alguna medida del tálamo y existen pruebas de

6-OHDA: Toxina con estructura similar a la DA, por lo que elimina selectivamente a las neuronas que contienen el transportador para este neurotransmisor. De esta manera ingresa a las células DAérgicas y por estrés oxidativo produce la muerte neuronal crónica.

que la transmisión excitadora se ve aumentada en el sitio ipsilateral a la lesión (Arbuthnott 2009). También se ven afectados los receptores GABAérgicos, glutamatérgicos, adenosinérgicos y dopaminérgicos (Alfinito *et al* 2003, Gerfen *et al*, 2002, Shwartzing y Huston 1996).

En el caso de los receptores GABAérgicos se percibe una *down-regulation*, es decir, el total de receptores con respecto al cerebro del animal normal se ve disminuido (Araki *et al* 2002).

Entre otros neurotransmisores los niveles de dinorfina y sustancia P se ven alterados disminuyendo sus valores en el estriado junto con el aumento en encefalinas y la enzima ácido glutámico descarboxilasa-67(GAD67) (Pollack *et al*, 1992, Taylor *et al* 1992).

En el NE del lado lesionado se generan severos cambios en la sensibilización de los receptores dopaminérgicos dando una *up-regulation* en la cantidad de receptores (Gerfen 2003, Gerfen *et al* 2002, Savasta *et al* 1988, Breese *et al* 1987). Los receptores de la clase D1 sufren una supersensibilización: en diferentes estudios se ha visto que hay una mayor unión de ligando en el animal lesionado con respecto al control, no así en la cantidad de ADNc y ARNm del receptor (Breese *et al* 1987). También en el caso de los receptores de la clase D2 se da una hipersensibilización del receptor utilizando agonistas radioactivos se ha visto un aumento en la cantidad de receptores de tipo D2, además de un incremento en los niveles de ARNm del mismo (Savasta *et al* 1987). Aunado a

up-regulation: Cambio homeostático en el que la disminución en los niveles de ligando promueve un aumento en el número de receptores funcionales. Puede darse por aumento neto en los receptores o por sensibilización de la cadena de señalización asociada.

ello se observa un aumento en la dimerización del receptor adenosinérgico A_{2A} y el receptor de DA tipo D2 (Criswell et al 1988).

A pesar de los avances que se han realizado en la conocer las alteraciones en la enfermedad de Parkinson, en el ámbito de la fisiología de los circuitos neuronales implicados la información es escasa y están abiertas varias áreas para investigar tanto el funcionamiento de los ganglios basales en condiciones control como en esta y otras patologías.

Planteamiento del problema

La inhibición colateral que existe entre las neuronas espinosas medianas de proyección en el estriado son un punto esencial para entender cómo se lleva a cabo la selección de comandos motores por los ganglios basales (Groves 1983 y Wickens *et al* 1991) y durante la enfermedad de Parkinson hay pérdida de la inhibición y de la dinámica estriatal (Flores-Barrera *et al* 2011, Jáidar *et al* 2010). Sin embargo hasta ahora no se ha probado el impacto real de esta conexión en el microcircuito quizá debido a la falta de las herramientas correctas y no se ha evaluado que sucede en la enfermedad de Parkinson en esta conexión. En el presente estudio se utilizará una aproximación poblacional para estudiar este fenómeno. Se analizará que sucede en el circuito patológico y si existen alteraciones en la modulación de dicha sinapsis por el péptido somatostatina.

Hipótesis

Hipótesis 1. La inhibición colateral será capaz de inhibir el disparo de Neuronas Espinosas Medianas

Hipótesis 2. La inhibición colateral se verá modificada en un modelo de la enfermedad de Parkinson

Hipótesis 3. La inhibición colateral será modulada por somatostatina de manera diferente en un modelo de la enfermedad de Parkinson

Objetivos

Estudiar el impacto de la inhibición colateral y su modulación en la población del microcircuito estriatal, en condiciones control y en un modelo de la enfermedad de Parkinson.

Objetivos particulares

- a) Estudiar el impacto de la transmisión GABAérgica entre espinosas medianas en la población estriatal.
- b) Estudiar la modulación somatostatinérgica de esta sinapsis
- c) Observar si existen cambios en la transmisión GABAérgica en un modelo de la enfermedad de Parkinson
- d) Observar si existen diferencias de modulación por somatosatina en un modelo de la enfermedad de Parkinson

Resultados

Parte I

Inhibición colateral

Caracterización de Neuronas Espinosas Medianas

Se registraron neuronas estriatales mediante la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula entera. Las células fueron identificadas utilizando registros de fijación de corriente donde se corroboraron sus características fisiológicas. Ante la inyección de pulsos de corriente despolarizante las células dispararon potenciales de acción a un potencial de -45 mV (Figura 12A), mientras que mostraron rectificación entrante al inyectar pulsos de corriente hiperpolarizante, misma que se observó claramente en los registros en la modalidad de fijación de voltaje, estas son propiedades reportadas previamente para neuronas espinosas medianas que se pueden observar en la relación corriente-voltaje (I-V) que se construye a partir de los registros electrofisiológicos (Figura 12C). Posteriormente se comprobó con una tinción post-hoc que las características morfológicas también correspondían a las de MSNs, se realizaron reconstrucciones de las neuronas registradas y todas exhibieron espinas dendríticas y un soma de 15-20 μm de diámetro (Figura 12D).

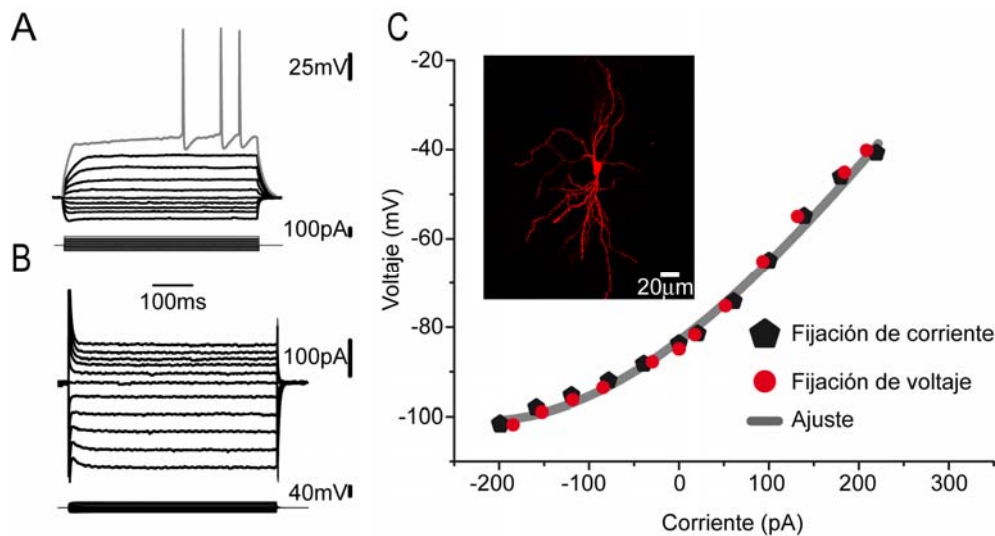


Figura 12. Caracterización de neuronas espinosas medianas. A. Trazos de voltaje en respuesta a pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante. B. Trazos de corriente en respuesta a comandos de voltaje. C. Curva corriente-voltaje construida a partir de los registros en A y B. Nótese que las curvas obtenidas a partir de los registros de fijación de corriente y de voltaje se superponen, indicando una buena fijación de voltaje. Inserto. Imagen de la neurona registrada en A marcada con biocitina se notan las características morfológicas típicas de las MSNs: soma de 10-20 μm y presencia de espinas dendríticas.

Activación selectiva de múltiples MSNs

Una vez identificadas las neuronas de interés se estimuló con un electrodo bipolar concéntrico de 12.5 μm en el globo pálido (Figura 13A), esta estrategia fue efectiva para activar selectivamente a las MSNs evocando potenciales de acción **antidrómicos**. Para confirmar que los potenciales de acción eran producidos desde el axón se hizo el protocolo de colisión, en el cuál se abole el PA antidrómico produciendo un PA en el soma milisegundos antes de la estimulación como se puede ver en la figura 13; nótese en B dos potenciales de

Antidrómico: Conducción del potencial de acción desde el axón al soma.

acción producidos con inyección de corriente en el soma y el PA antidrómico evocado por la estimulación del axón estriofugal, mismo que se cancela al activar primero el soma en el trazo presentado en C.

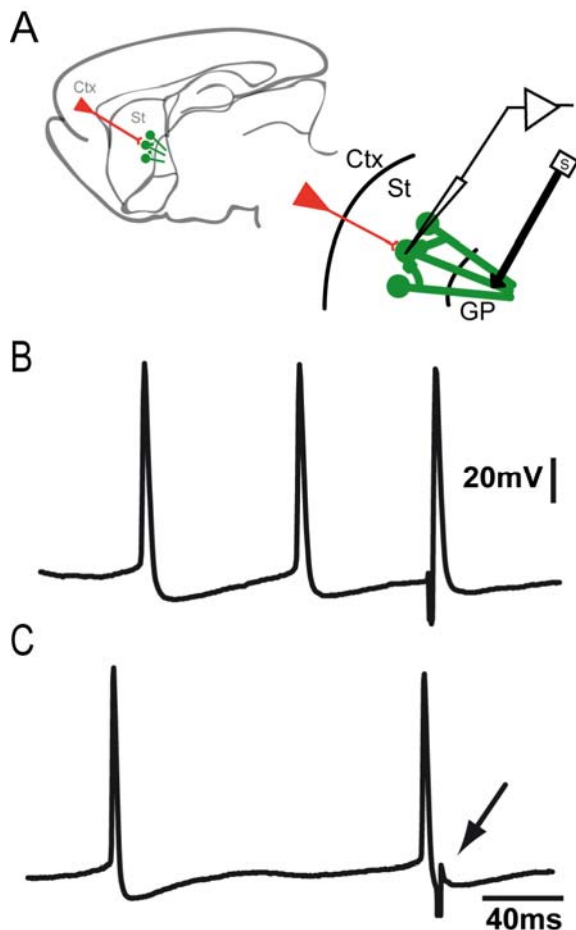


Figura 13. Activación antidrómica de MSNs. A. Esquema del protocolo de estimulación. B. Potenciales de acción evocados con un pulso despolarizante en el soma seguidos de un potencial de acción producido por estimulación de los axones estriofugales en el GP. C. Protocolo de colisión. Potenciales de acción evocados en el soma, cuando el PA somático antecede en pocos milisegundos a la estimulación antidrómica se evita el disparo PA.

Se llevaron a cabo registros en la modalidad de fijación de voltaje para observar las corrientes postsinápticas mediadas por GABA. La activación antidrómica de las neuronas estriales de proyección evocó corrientes postsinápticas inhibitoras en las MSNs. Se registró con una solución interna con alta concentración de Cl^- para evidenciar las corrientes postsinápticas GABAérgicas. En presencia de CNQX y APV para bloquear los receptores a glutamato de AMPA y NMDA respectivamente; se aplicó bicuculina (antagonista de

receptores GABA_A) y las corrientes evocadas por estimulación antidrómica se bloquearon reversiblemente. En la figura 14 se muestra el curso temporal de la amplitud de las IPSCs durante el experimento, se observa que las corrientes se bloquean en presencia de bicuculina o gabazina [10μM] y que al lavar el fármaco las corrientes se recuperan, lo que se puede ver en los trazos representativos de cada momento del experimento (figura 14C).

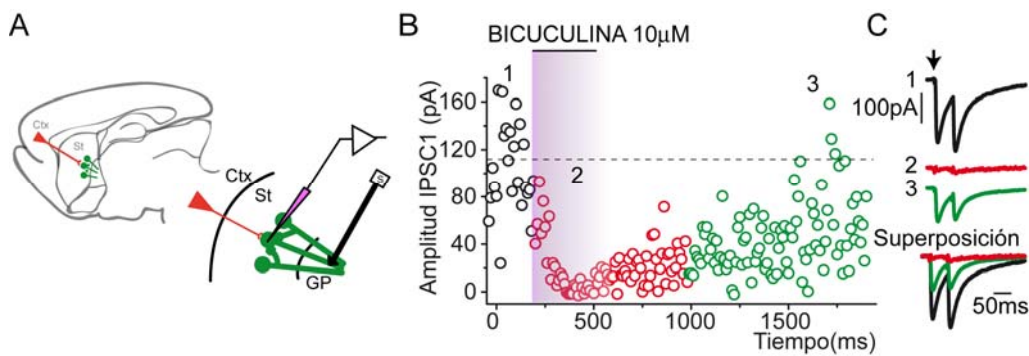


Figura 14. Inhibición colateral. A. Esquema de estimulación en este caso la pipeta de registro contiene un bloqueador de canales de sodio para evitar el disparo. B. Curso temporal del experimento. Se evocaron corrientes postsinápticas inhibitoras con estimulación en el GP. En presencia de antagonistas de receptores a glutamato (CNQX 10 μM y APV 50 μM) la aplicación de bicuculina 10 μM para bloquear la transmisión GABAérgica elimina las IPSCs de manera reversible. C. Trazos de corriente representativos de cada fase del experimento.

Para conocer cuantas sinapsis se podían reclutar con este protocolo se realizaron curvas intensidad-amplitud. Se detecto la intensidad mínima para evocar IPSCs de la menor amplitud y se tomo como intensidad umbral, posteriormente se fue duplicando la intensidad hasta llegar a un máximo. Con ello se construyeron las curvas I-A, se observa que el reclutamiento de sinapsis tiene un comportamiento de tipo sigmoidea. Llegando a amplitudes máximas de 157 ± 11 pA para el

electrodo de estimulación utilizado (punta de lápiz 12.5 μ m de diámetro) (Figura 15; Tecuapetla et al 2005) señal de que se reclutan varias células con esta táctica.

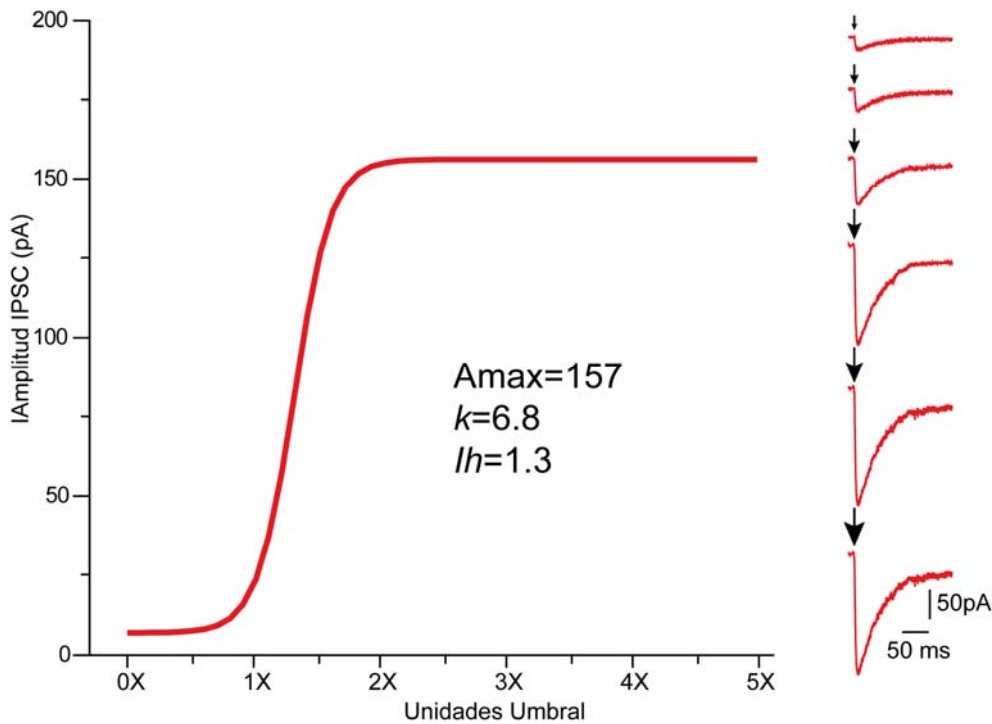


Figura 15. Curva Intensidad-amplitud de las IPSCs evocadas con estimulación antidrómica. A. Ajuste a la curva I-A obtenida de una serie de experimentos. B. Trazos representativos de las amplitudes registradas ante intensidades crecientes de estimulación (Tecuapetla et al, 2005).

Con el fin de conocer qué tipo neuronal se recluta con la estimulación antidrómica en el GP se obtuvieron rebanadas de animales transgénicos que expresan el gen reportero GFP asociado a los receptores dopaminérgicos que caracterizan la separación de las dos vías, es decir, al receptor D1 (Drd1-EGFP) o al receptor D2 (Drd2-EGFP). Se hizo una tinción retrograda colocando **biocitina** en el sitio donde se sitúa el electrodo de estimulación como se observa en la imagen panorámica de una rebanada sagital de ratón Drd2-EGFP, donde además se observa delimitado el estriado y GP con la señal de GFP (Figura

Biocitina: Vitamina soluble con alta afinidad a la avidina. La avidina puede ser conjugada con una gran cantidad de anticuerpos y fluoroforos lo que permite hacer tinciones post-hoc

16A). Con ello los axones de espinosas medianas que pasan por el GP toman el marcador y se observan los somas en el estriado. Como se esperaba las células marcadas retrogradamente en color rojo co-localizan con neuronas GFP positiva en color verde y negativas en animales Drd1-EGFP y Drd2-EGFP (Figura 16B y C), indicando que al colocar el electrodo de estimulación en el globo pálido se reclutan neuronas de ambas vías.

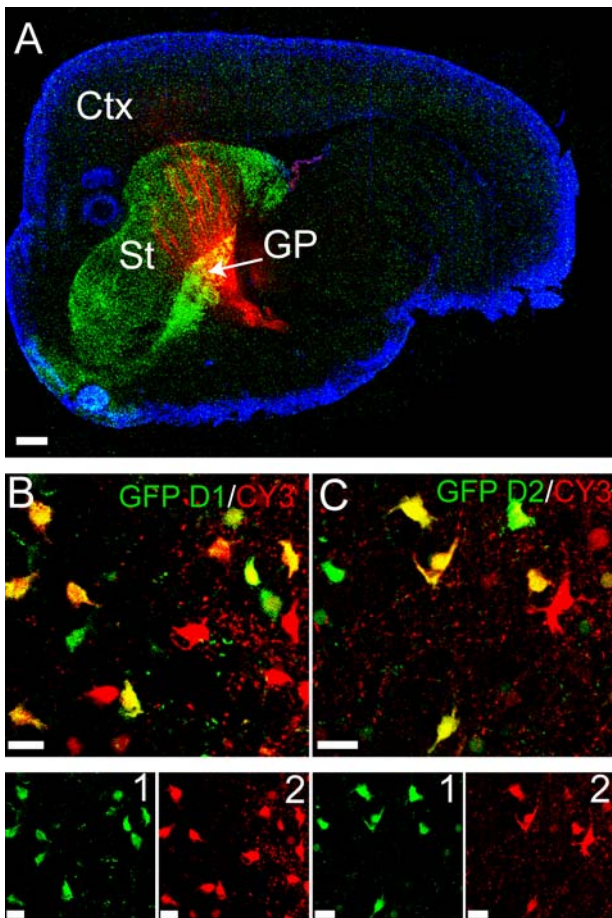
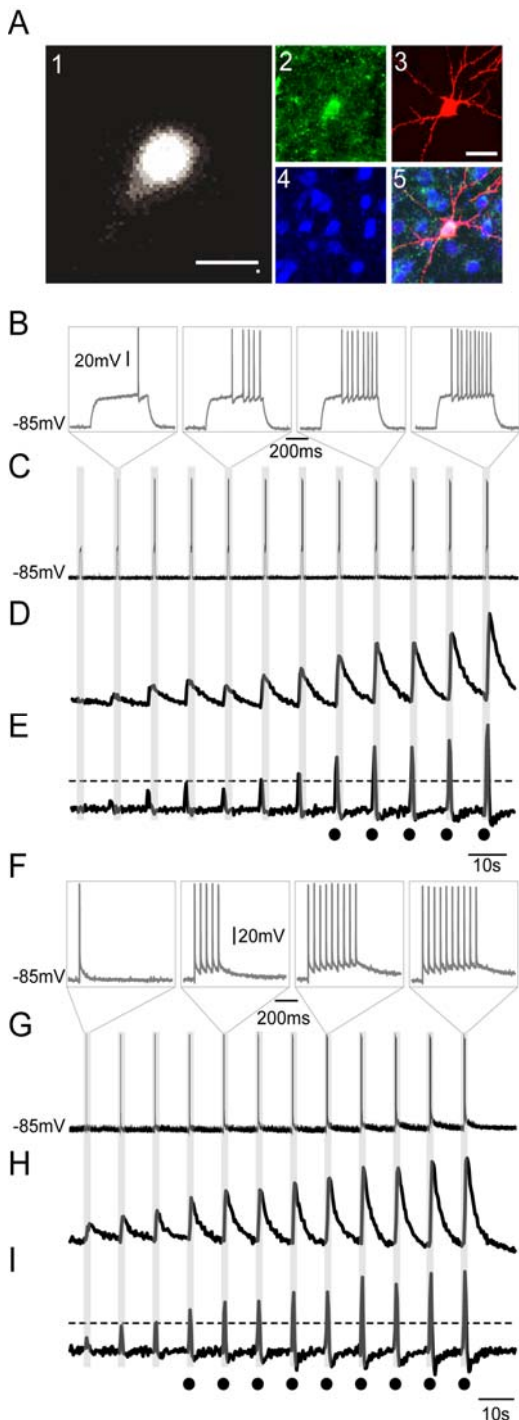


Figura 16. Marcado retrogrado de MSNs. A. imagen panorámica de una rebanada sagital de ratón Drd2, se sitúa el marcador en el GP en el sitio de estimulación y este se transporta retrógradamente al estriado. B. Imagen 40X de un experimento de marcado en ratón Drd1-EGFP en verde se muestra la señal de GFP, y en rojo el marcado con biocitina, en 1 y 2 imágenes de GFP y biocitina sobrepuestas en B. C. Imagen 40X de un experimento de marcado en ratón Drd2-EGFP en verde se muestra la señal de GFP, y en rojo el marcado con biocitina, en 1 y 2 imágenes de GFP y biocitina sobrepuestas en C. Escala 100µm en A, 20µm en B (1 y 2) y C (1 y 2).

Análisis de circuitos neuronales identificados

Se evaluó el papel que juega la inhibición colateral en el microcircuito utilizando registros ópticos de la población neuronal con resolución de célula única, de esta manera se observó la actividad de cientos de neuronas de manera simultánea.



Para lograrlo se utilizó la técnica de imagenología de calcio. Se cargaron las rebanadas con Fluo-4 y se observaron con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia.

Figura 17. Correlación electrofisiológica con el fluoróforo de calcio fluo-4. A1. Imagen de la célula al momento de hacer los registros electrofisiológicos y ópticos simultáneamente. A2. Señal de fluo-4 de la célula registrada fijada para su identificación posterior. A3. Imagen de biocitina. A4. Inmunofluorescencia contra SP. A5. Sobre posición de todas las anteriores, nótese que la SP co-localiza con la célula registrada. B. Amplificación de trazos de voltaje en respuesta a pulsos de corriente despolarizante inyectados en el soma. C. Trazos mostrados en B. D. Cambio de fluorescencia asociado a la entrada de Ca²⁺ que produce el disparo de PA. E. Primera derivada del cambio de fluorescencia mostrado en D. F. Amplificación de trazos de voltaje en respuesta a la estimulación antidrómica en el GP. G. Trazos mostrados en F. H. Cambio de fluorescencia asociado a la entrada de Ca²⁺ que produce el disparo de PA. I. Primera derivada del cambio de fluorescencia mostrado en H. Escala 20μm. 40

Fluo-4: Indicador verde-fluorescente sensible a calcio, en su forma éster es permeable a la membrana plasmática permitiendo cargar rebanadas de tejido.

Se midió la actividad eléctrica de las células de manera indirecta como un cambio en la fluorescencia. Lo cual se puede comprobar al realizar registros electrofisiológicos paralelamente a la captura imágenes de los cambios en fluorescencia. En la figura 17 se muestran registros de voltaje ante pulsos de corriente de intensidad creciente inyectados en el soma, con ello se produjeron diferente número de potenciales de acción y se observó el cambio de fluorescencia asociado. Se puede ver la sensibilidad del fluoróforo que presenta un cambio desde dos potenciales de acción y va incrementando de manera proporcional a la cantidad de disparos de la neurona. De manera interesante al obtener la primera derivada del trazo de cambio en la fluorescencia notamos que la duración de la misma es aproximada a la duración del evento eléctrico. En el mismo sentido los potenciales de acción antidrómicos tienen un efecto similar en la dinámica del calcio y el cambio en la fluorescencia (Figura 17F y G).

Se obtuvieron registros ópticos en rebanadas de animales transgénicos Drd1-EGFP o Drd2-EGF con el propósito de tener identificadas las poblaciones de neuronas activadas durante la activación de espinosas medianas y así evaluar que tan selectivo es el método de estimulación antidrómica. Ya que el fluo-4 y la GFP tienen la misma longitud de onda de excitación y emisión se condujeron los experimentos como se describe a continuación.

Se estableció el área de interés previo al cargado con fluo-4, en la figura 18 se observa una imagen fluorescente previa al cargado con fluo-4 de un ratón Drd2-EGFP. Se puede observar la gran cantidad de células positivas (500 ± 120 en un área de $670 \times 860 \mu\text{m}$, $n=30$), en D y E se tienen las imágenes de contraste de

interferencia diferencial (DIC) donde se nota que las coordenadas x , y y z de varios puntos de referencia siguen siendo cualitativamente idéntica antes y después del cargado, lo cual es mucho más evidente en un acercamiento con el objetivo de 40X donde se nota que estamos siguiendo a las mismas células después del cargado (Figura 18 B y C). En F se muestra una representación esquemática del área registrada en la que se observan las células GFP positivas en círculos vacíos y las células que tuvieron actividad espontánea durante el experimento en colores, obsérvese en trazos verdes ejemplos de neuronas GFP positivas activas durante el experimento (representadas en puntos verdes en F) y células GFP negativas con actividad en trazos rojos (representadas en puntos rojos en F). De esta forma seguimos la actividad de neuronas identificadas.

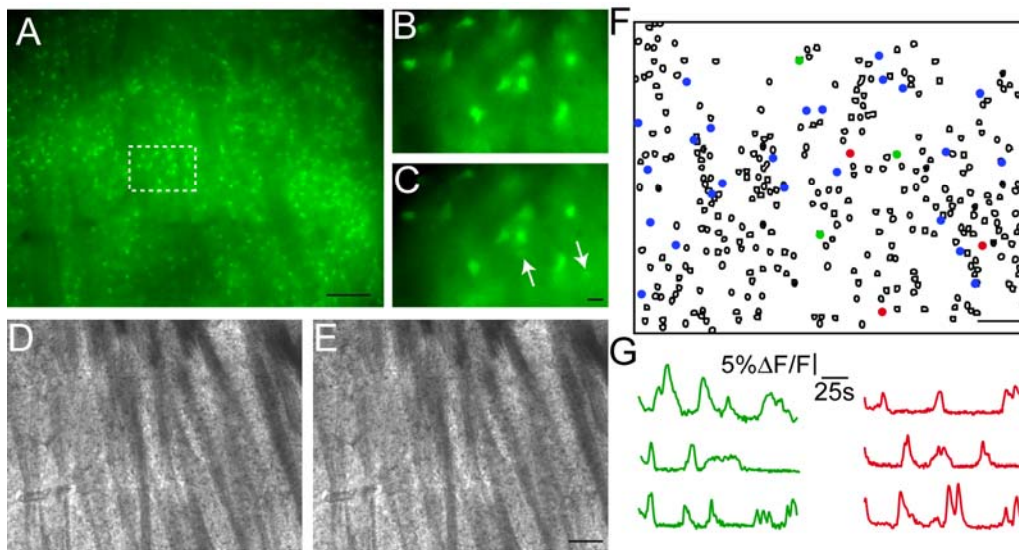


Figura 18. Registros ópticos de poblaciones neuronales identificadas. A. Imagen de la señal emitida por la GFP en un ratón *Drd2*. B. Acercamiento (40X) de la región indicada con línea punteada en A antes del cargado con fluo-4. C. Misma área mostrada en C después del cargado con fluo-4. D y E. Imágenes con microscopía DIC antes y después del cargado para asegurar que se tiene la misma área pixel a pixel. F. Mapa espacial de las neuronas GFP + (círculos vacíos) y células activas durante el experimento (verde: ejemplos de células GFP+ activas, rojo: ejemplos de células GFP- activas y azul células activas restantes) en. G. Trazos de fluoerescencia de las células indicadas en F. En verde actividad de células GFP+ y en rojo actividad de células GFP-. Barra de escala 100µm.

Una vez establecido el protocolo para observar poblaciones de neuronas e identificarlas, se procedió con la estimulación antidrómica para observar el poder de reclutamiento de esta técnica. En la figura 19 B se muestra una gráfica tipo **raster** con su respectivo histograma de un experimento representativo, se aprecia que existe poca actividad basal y que la mayoría de células activas a lo largo del experimento respondieron al estímulo aplicado (puntos y línea roja), hecho que se hace más evidente en el mapa de correlación donde las neuronas presentan un alta correlación (rojo en el mapa de pseudocolor) demostrando que la estimulación es consistente y activa de manera similar a todas las células, además de que existen pocas células que no siguen el estímulo antidrómico (líneas azules en el mapa de pseudocolor) (Figura 19E). Cuando analizamos que tipo de células estamos estimulando en los ratones transgénicos (Drd1-EGFP o Drd2-EGFP) podemos ver que de las neuronas presentes durante la estimulación antidrómica aproximadamente 50% son GFP positivas si se hace un pool de todos los experimentos realizados en los dos tipos de ratones (Figura 19C, n=14), un ejemplo de ello se observa en el mapa espacial de un experimento representativo en D donde se observan en círculos vacíos las células GFP+ totales presentes en el área de registro y en círculos de color la células GFP+ (verde) y GFP – (rojo) que se sincronizaron al estimular antidromicamente en el globo pálido, conjuntamente de esta manera corroboramos que la estimulación en el GP activa selectivamente a MSNs.

Raster: Gráfica de la actividad de varias células, cada fila representa una célula activa durante el experimento y cada columna es un periodo de tiempo. Los puntos representan ráfagas de PAs

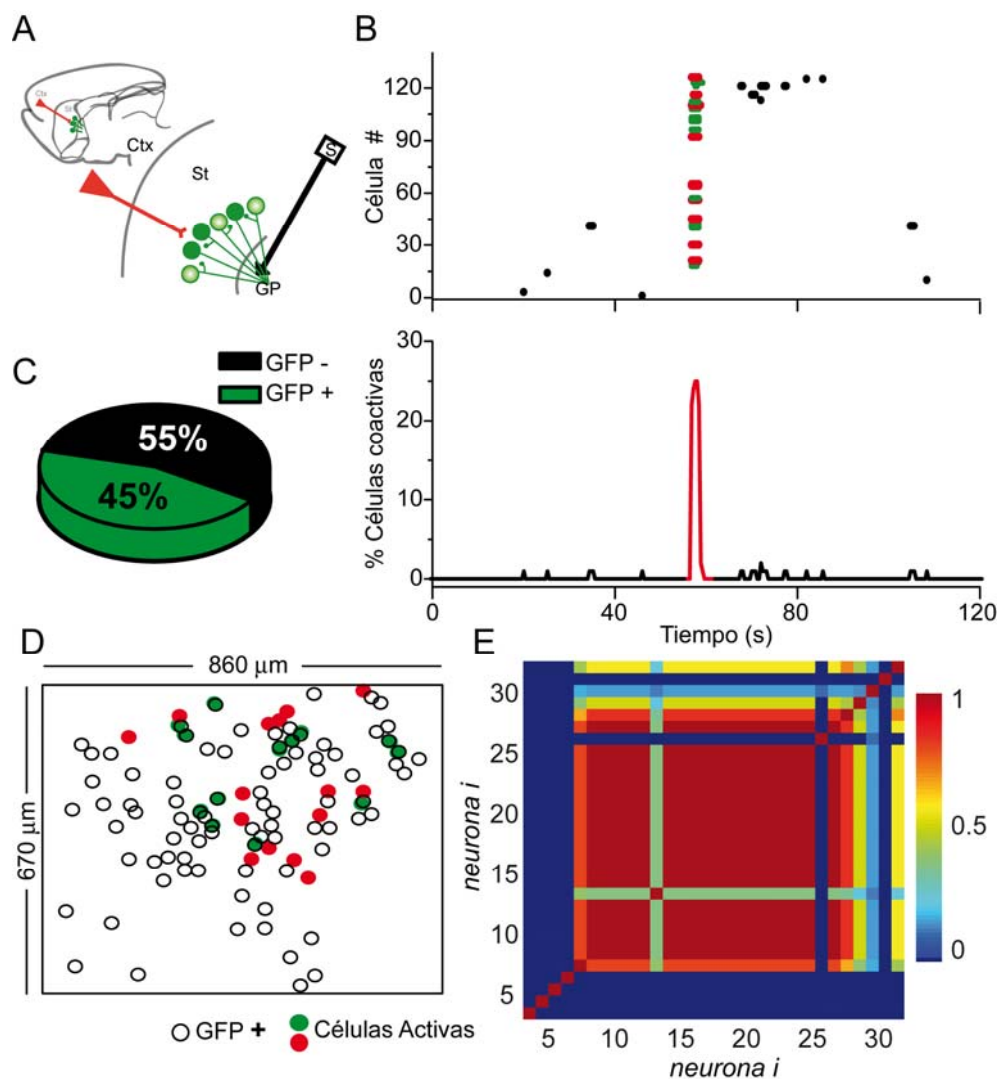


Figura 19. Activación antidrómica de poblaciones de neuronas identificadas. A. Representación esquemática del protocolo experimental. B. Gráfica tipo raster de la actividad global del microcircuito estriatal durante la estimulación antidrómica. Cada fila representa una célula y su actividad a través del tiempo. En la parte inferior histograma de dicha actividad. Nótese que al estimular en el GP existe sincronización (evocada) de varias células. C. Resumen de varios experimentos en ratones transgénicos de la identidad de las células activadas por la estimulación antidrómica, la gráfica de pastel muestra que aproximadamente 50% de las células activadas con esta estrategia son GFP+ ya sea en ratones *Drd1* o *Drd2-EGFP* ($n=11$). D. Mapa de la ubicación espacial de las células activas del experimento mostrado en B. E. mapa de correlación de las células activas en B.

Análogamente a los experimentos de curvas I-A con las IPSCs se realizaron curvas de reclutamiento con imagenología de calcio. Se estudió el número de

células que respondían ante intensidades de estimulación crecientes. En la figura 20 se ejemplifica un experimento. Podemos observar en el raster y con mayor claridad en el histograma como se van reclutando las neuronas con un comportamiento sigmoideo. En la curva formada a partir de varios experimentos se observa que el número máximo de neuronas que se puede reclutar es 25% del total de células cargadas en el área con los mismos parámetros de estimulación que en los experimentos electrofisiológicos (n=5) (Figura 20 B). Abajo en C y D el correspondiente en IPSCs para las mismas intensidades de estimulación.

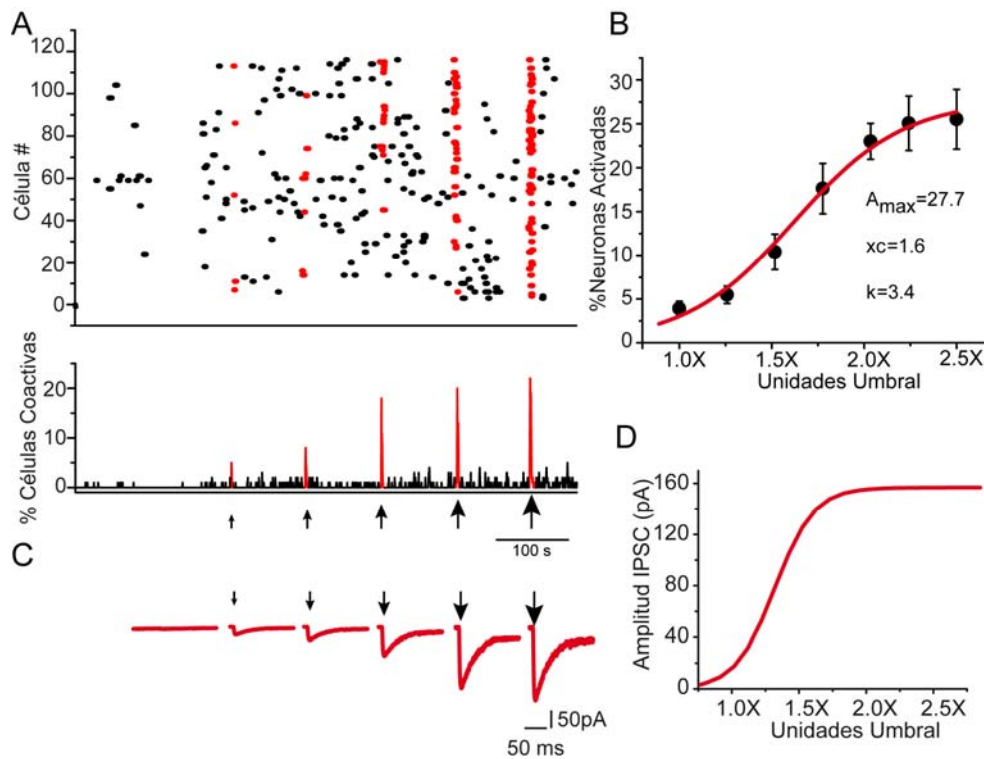


Figura 20. Curva de reclutamiento de MSNs. A. Actividad del microcircuito estriatal ante intensidades crecientes estimulación antidrómica (denotadas por las flechas). Raster e histograma de un experimento representativo B. Curva de reclutamiento, donde se promediaron 5 experimentos. C y D. Curva I-A correspondiente a las mismas intensidades de estimulación.

Impacto de la inhibición colateral en el microcircuito estriatal

Una vez que se conoció la efectividad del protocolo de estimulación antidrómica y su correlación con los experimentos electrofisiológicos se estudio el impacto de la inhibición colateral en la población estriatal. Se tomaron series de imágenes de rebanadas de rata y ratón transgénico cargadas con fluo-4 estimulando antidrómicamente en el GP en condición control y en presencia de un antagonista del receptor GABA_A. Al estimular a la intensidad media determinada en la curva de reclutamiento se observa la activación de 30 células en promedio cantidad que se duplica al añadir bicuculina [10μM] al baño como se nota en el raster e histograma de un ejemplo en la figura 21A (n=30, p≤0.005). Indicando que con la aplicación del antagonista GABAérgico se revelaron células que estaban siendo activamente inhibidas por las neuronas del estímulo control.

Se analizó la distancia de los vecinos más cercanos de las nuevas células reclutadas en presencia de bicuculina (Figura 22B). Esta exploración dejo ver que las células activamente inhibidas aparecían en un rango de 10-90 μm de lejanía con respecto a las neuronas en el estímulo control (n=10), distancia reportada para encontrar pares de MSNs conectadas. Fuerte sugerencia de que lo que estamos viendo es la inhibición mediada por las neurona estriatales de proyección. Se observo la identidad de los vecinos cercanos, es decir si pertenecían a las vías directa o indirecta y no se registro ninguna preferencia. En las gráficas de pastel de la figura 22D observamos que los porcentajes son muy

cercanos y no presentan diferencias significativas (n=8). Apuntando a que no existen reglas específicas de conexión entre las MSNs.

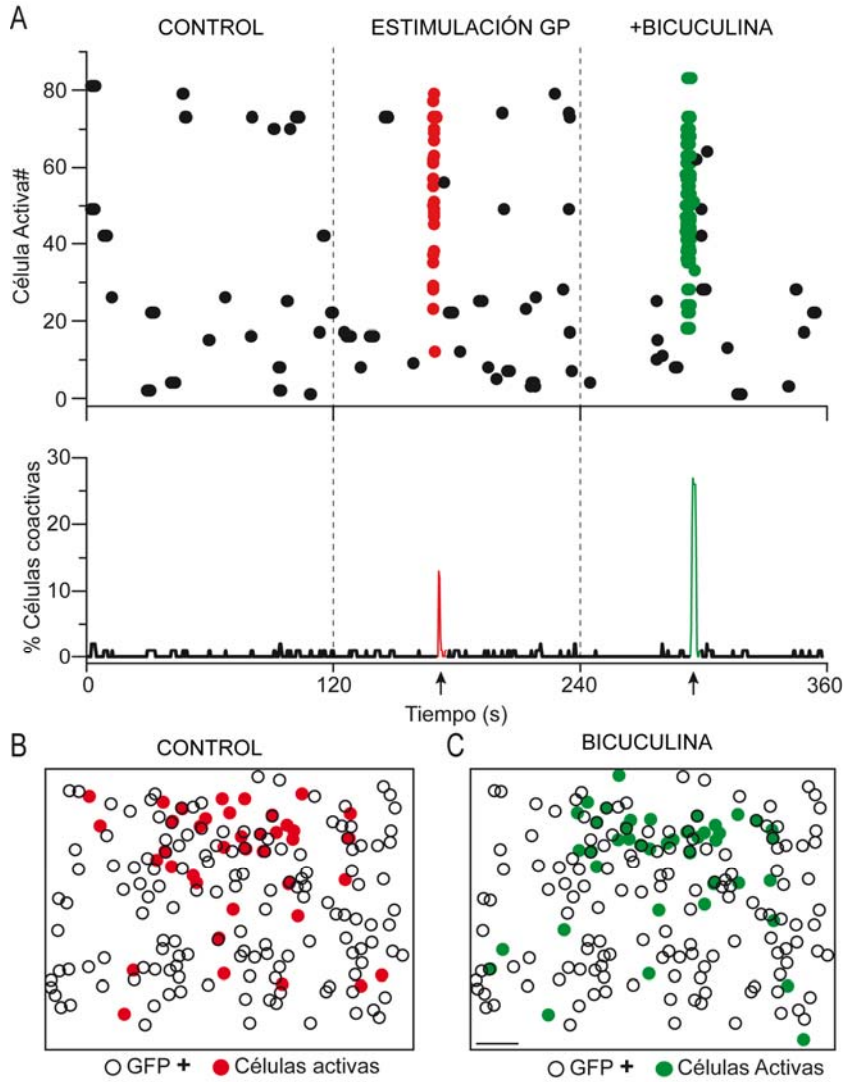


Figura 21. Impacto de la inhibición colateral en el microcircuito estriatal. A. Raster con su respectivo histograma de un experimento representativo. Se estimula en una situación control (rojo) y en presencia de bicuculina 10 μ M (verde). Se muestra: i) baja actividad basal antes de la estimulación, ii) con el estímulo se activan y sincronizan varias células e incrementan de manera significativa en presencia del bloqueador de los receptores GABA_A. B. Células GFP positivas presentes en el plano focal elegido para el experimento. Células respondivas ante la estimulación control (1/2 de la intensidad máxima de estimulación) son representadas en verde. En presencia de bicuculina más neuronas responden a la estimulación antidrómica ante la misma intensidad (rojo), casi doblando el número de células en el control (n=21).

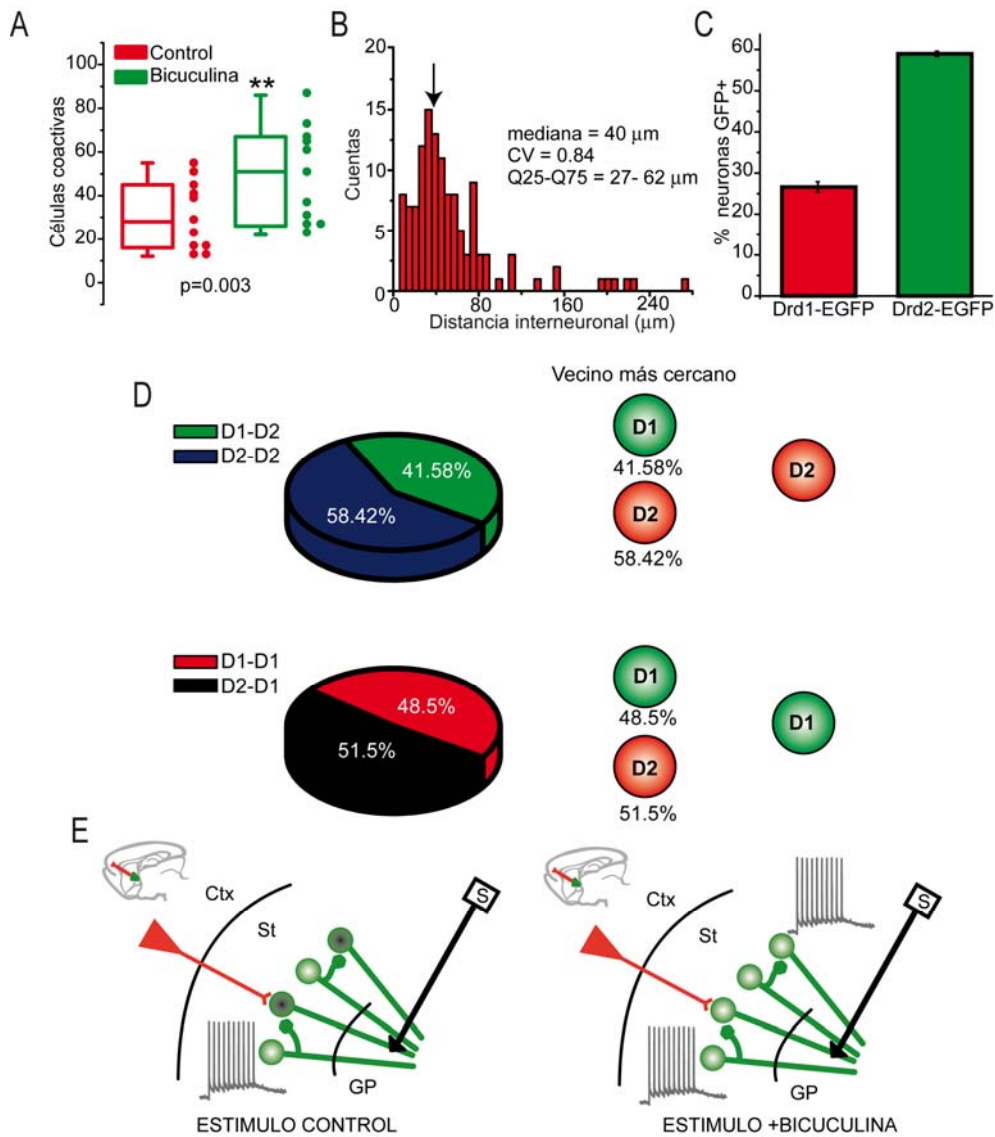


Figura 22. A. Las gráficas de cajas y bigotes resumen varios experimentos en los que se observó el incremento de células al aplicar bicuculina en ratas y ratones. B. Distribución de las distancias a las que aparecen las nuevas células reclutadas después de la aplicación de bicuculina, mostrando que esta se encuentra dentro de las 80 μm . C. Histograma de la identidad de las neuronas que aparecieron con la aplicación de bicuculina. D. Identificación del vecino más cercano de las nuevas células reclutadas en presencia del antagonista GABA_A . E. Representación esquemática del fenómeno de inhibición colateral.

Parte II

Patofisiología

Modelo de Parkinson

Se comparó el circuito control con una patología conocida de los Ganglios Basales: la enfermedad de Parkinson. Para ello se generó el modelo de roedor hemiparkinsoniano. Se eliminaron selectivamente a las neuronas de la SNc en ratas o ratones por medio de cirugía esterotáxica depletando la DA estriatal de un solo hemisferio (Ver métodos). Se corroboró el éxito de la cirugía por medio de la evaluación de la conducta de giro y solo los animales con un desbalance motor de más del 95% fueron usados para los experimentos posteriores (Figura 23B), complementariamente se realizó una inmunohistoquímica de TH en algunas rebanadas para observar la falta de esta enzima en el hemisferio tratado y la falta de neuronas DAérgicas en la SNc (Figura 23A). Se realizaron registros de actividad espontánea en fijación de corriente en neuronas estriatales. En condiciones control las neuronas se encuentran silentes y en el modelo de enfermedad de Parkinson se pueden encontrar neuronas que exhiben disparos espontáneos en ráfaga como se observa en la figura 23C donde se compara un registro de un animal *naïve* con los registros obtenidos del estriado depletado de DA, como ya ha sido reportado anteriormente confirmando que la lesión lleva a cambios en la actividad del núcleo (Jáidar et al, 2010).

TH: Tirosina hidroxilasa, enzima que participa en la síntesis de dopamina.

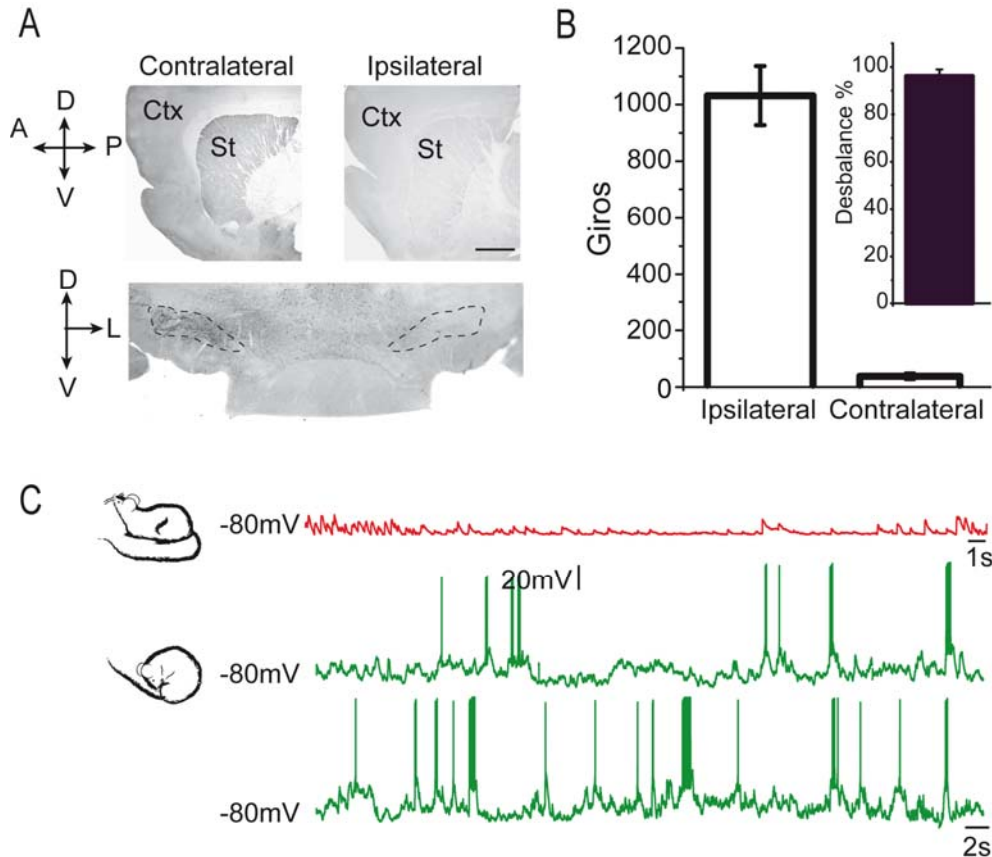


Figura 23. Modelo de enfermedad de Parkinson de 6-OHDA. A. Inmunohistoquímica contra TH. Se muestra señal en el lado contralateral a la lesión y carencia de esta enzima en el lado ipsilateral a la lesión. Abajo corte coronal a la altura de la SNc donde se observa la falta de células DAérgicas en el lado lesionado. B. Desbalance motor ante la inyección de amfetamina. En la prueba de giro los animales mostraron un mayor número de giros ipsilaterales al sitio de inyección con un desbalance de más del 95%. C. Registros de voltaje de la actividad espontánea en control y en animales tratados con la toxina.

Inhibición colateral en el modelo de Parkinson

Se realizaron registros de IPSCs evocados con estimulación antidrómica en el GP en las neuronas principales del estriado. Al igual que en los animales *naive* se lograron registrar corrientes mediadas por GABA al estimular los axones estriofugales en el globo pálido en la figura 24B se muestra un curso temporal de

las amplitudes de los IPSCs evocados durante el experimento al aplicar bicuculina [10 μ M] las corrientes se bloquean de manera reversible como se ve en los trazos representativos de cada fase del experimento en C. A pesar de lograr evocar los IPSCs hubo una probabilidad de éxito menor, mientras que en los animales naïve se tiene un porcentaje de éxito del 96% en los animales lesionados este porcentaje baja a 66% evidenciando una pérdida en las conexiones de colaterales axónicas (Figura 24C). De igual manera la eficiencia sináptica se ve afectada, al realizar un histograma con la intensidad de estimulación mínima se puede observar que el número de fallas incrementa 5 veces en los animales tratados y disminuye el número de eventos evocados (Figura 24D).

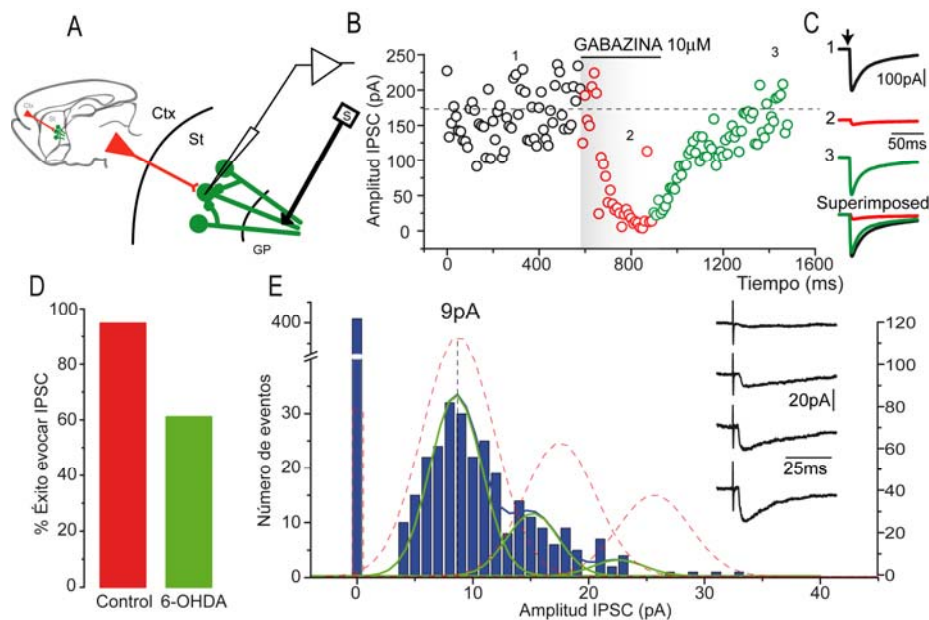


Figura 24. Inhibición colateral en el modelo de enfermedad de Parkinson. A. Esquema del protocolo de estimulación. B. Curso temporal de las IPSCs evocadas con estimulación antidrómica. 10 μ M de bicuculina bloquea completamente las corrientes evocadas denotando su naturaleza GABAérgica. C. Trazos representativos de cada momento del experimento. D. histograma del éxito para evocar IPSCs en el animal control y en el animal tratado con 6-OHDA. E. Histograma de fallas de las IPSCs evocadas con la intensidad de estimulación mínima. Barras solidas animal hemiparkinsoniano, línea punteada animal control.

Cuando se realizan las curvas intensidad-amplitud podemos observar una reducción significativa de la amplitud máxima en el 50% de las neuronas registradas que paso de 157 ± 11 a 54.3 ± 6 , y en 50% de los casos restantes a pesar de conservar la misma amplitud máxima que en el caso control; la pendiente de la curva que refleja la tasa de reclutamiento se hace más grande manifestando que hay menos sinapsis disponibles (Figura 25).

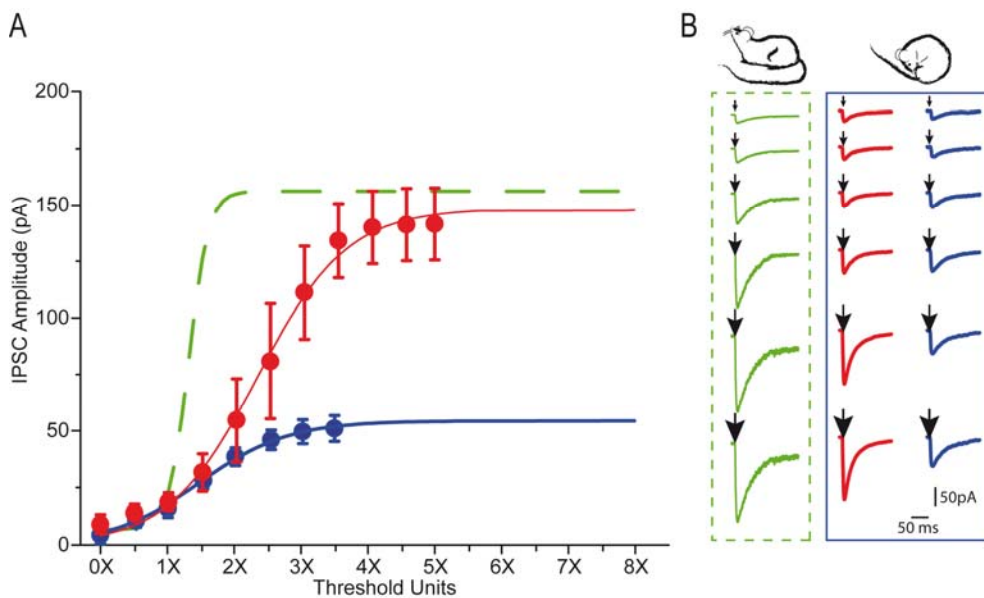


Figura 25. Curva Intensidad-amplitud de las IPSCs evocadas con estimulación antidrómica control vs 6-OHDA. A. Ajuste a la curva I-A obtenida de una serie de experimentos en animales control (línea punteada verde) y animales depletados de DA (líneas sólidas rojo y azul) (n=14). B. Trazos representativos de las amplitudes registradas ante intensidades crecientes de estimulación.

Al realizar el experimento con imagenología de calcio para ver la población en el circuito patológico se pudo reproducir el aumento en la actividad del estriado reportado anteriormente. En presencia de antagonistas glutamatérgicos se estímulo antidrómicamente para reclutar MSNs en condición control y

bloqueando la transmisión GABAérgica con bicuculina [10 μ M]. Al igual que en los animales naïve se sincronizaron varias neuronas ante la estimulación en el GP, pero en presencia del antagonista GABA_A no se registro ningún aumento en el número de neuronas activadas por el estímulo. En la figura 26 se ilustra un ejemplo se observa en el raster e histograma correspondiente que el número de células reclutadas es el mismo antes y después el tratamiento farmacológico. En el resumen de varios experimentos se confirma que la transmisión GABAérgica de colaterales axónicas en el modelo de enfermedad de Parkinson está disminuida siendo incapaz de controlar la excitabilidad de las neuronas vecinas (n=13) (Figura 26C).

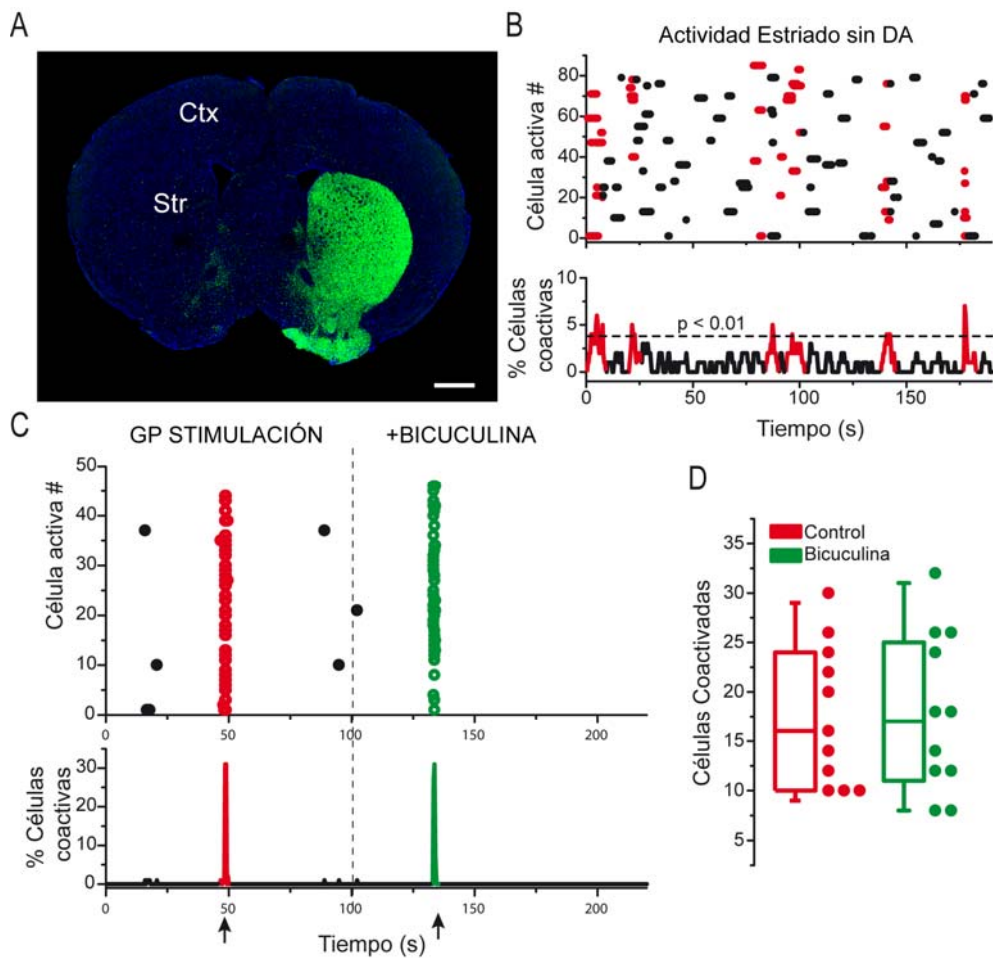


Figura 26. Impacto de la inhibición colateral en el microcircuito estriatal depletado de DA. A. Imagen panorámica de una inmunohistoquímica contra TH (verde), corte coronal, escala 100 μ m. B. Raster e histograma de la actividad observada en el circuito parkinsoniano. Nótese la sincronización de neuronas sin aplicación de ningún estímulo o fármaco. C. Raster con su respectivo histograma de un experimento representativo. Se estimula en una situación control (rojo) y en presencia de bicuculina 10 μ M (verde). Se muestra: con el estímulo se activan y sincronizan varias células que no incrementan de manera significativa en presencia del bloqueador de los receptores GABA_A, sugiriendo la pérdida de la efectividad de la inhibición colateral en la enfermedad de Parkinson. C. Cajas mostrando el resumen e varios experimentos donde se observo el mismo efecto (n=11, NS).

Modulación Somatostatinérgica

Se realizaron registros electrofisiológicos en la modalidad de fijación de voltaje de un total de 145 células que presentaron las características típicas de neuronas espinosas medianas (ver figura 12), ya sea en condición control o en animales hemiparkinsonianos para analizar la modulación de la liberación de GABA de las terminales de las neuronas de proyección en el estriado.

Se evocaron corrientes postsinápticas inhibitoras con estimulación antidrómica de los axones estriofugales en el globo pálido de animales *naïve*. Al aplicar somatostatina [1 μ M] en presencia de antagonistas glutamatérgicos y DAérgicos se obtuvo una reducción promedio de la amplitud de las IPSCs del 34% en todos los casos registrados. El cambio en la amplitud estuvo acompañado de un cambio promedio en la tasa de pulso pareado del 50% a facilitación, indicando un cambio a nivel presináptico (n=7, $p \leq 0.005$). En la figura 27 se muestra el curso temporal de un experimento típico y los trazos representativos del mismo.

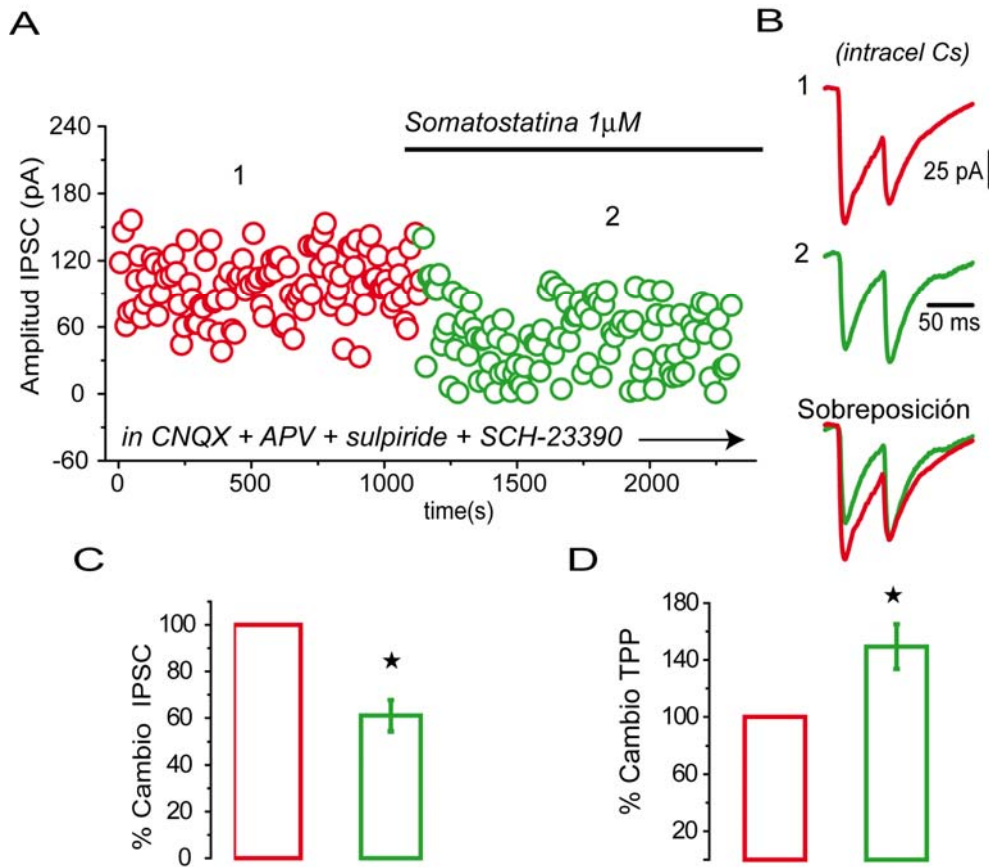


Figura 27. Modulación de la inhibición colateral por somatostatina. A. Curso temporal de las amplitudes de las IPSCs evocadas con estimulación antidrómica en el GP. La somatostatina modula presinápticamente a las MSNs. La aplicación de SST [1 μ M] disminuye la amplitud de las corrientes registradas. B. Trazos representativos de cada momento del experimento. C. Resumen de varios experimentos mostrando que el efecto promedio es un 34% de inhibición de la respuesta sináptica. D. el cambio en la amplitud está asociado a un cambio en la tasa de pulsos apareados que incrementa 50% (n=7, $p \leq 0.05$).

Por otro lado se evocaron IPSCs con estimulación intraestriatal a 1mm de distancia de la neurona de proyección registrada (Figura 27), con esta estrategia se observa preferentemente la conexión de interneuronas sobre MSNs, al aplicar bicuculina [10 μ M] se bloqueó completamente la corriente evocada (Figura 28B). Con este protocolo se estudió el efecto de la SST sobre la liberación GABAérgica de interneuronas. Se puede notar en el curso temporal mostrado en la figura 28C que al aplicar SST [1 μ M] al baño las IPSCs no sufren cambio

alguno. En los trazos representativos de cada momento del experimento se observa que tanto la amplitud como la TPP permanecen sin modificarse en presencia del fármaco (n=8, ns).

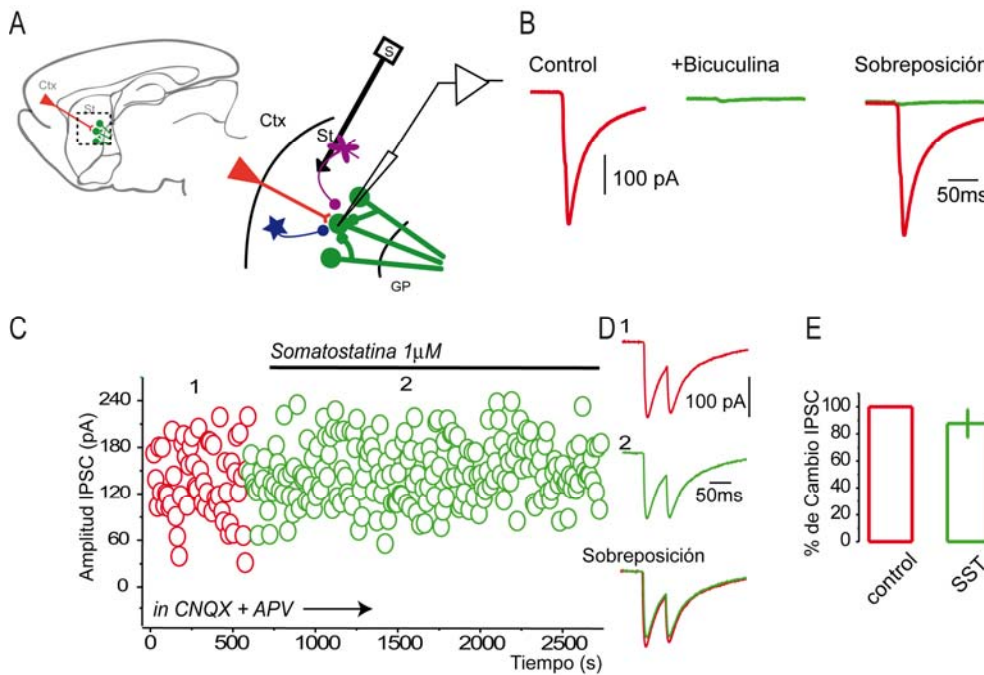


Figura 28. La somatostatina no modula la inhibición por interneuronas. A. Esquema del protocolo experimental. B. IPSCs evocadas con estimulación intraestriatal. Al aplicar bicuculina dichas corrientes desaparecen denotando su naturaleza GABérgica. C. Curso temporal de las amplitudes de las IPSCs evocadas con estimulación intraestriatal. La aplicación de SST [1 μ M] no tiene ningún efecto sobre la amplitud de las corrientes registradas. D. Trazos representativos de cada momento del experimento. E. Resumen de varios experimentos mostrando que no hay efecto sobre la respuesta sináptica (n=8, ns).

Modulación somatostatinérgica en el modelo de enfermedad de Parkinson

Se analizó la modulación por SST sobre la inhibición colateral en el animal con depleción crónica de DA. La presencia de SST [1 μ M] produjo reducción de la

amplitud de las IPSCs en 57% de la población e incremento la amplitud en el restante 43% (Figura 29I). En la figura 29 se muestra un experimento representativo de ambas condiciones. Se obtuvieron IPSCs de una amplitud promedio de 49 ± 9.3 pA y después de la aplicación de SST amplitud cayó a 18.9 ± 3.1 pA obteniendo un efecto neto de reducción de 59.2 ± 10.6 % (Figura 29 A, B y C $n=8$, $p \leq 0.01$). Contrariamente en un experimento típico de aumento se obtuvo una amplitud promedio de las IPSCs en control de 60.7 ± 11.2 pA que en presencia de SST incremento a 111 ± 24 pA, mostrando un efecto promedio de 82 ± 24 % de incremento ($n=6$, $p \leq 0.05$) (Figura 29 C, D y F).

Para evaluar si ambos efectos eran sobre la liberación de GABA, es decir, a nivel presináptico se evaluó la tasa de pulso pareado, tanto en el caso de disminución como en el de aumento el cambio de las amplitudes estuvo asociado a un cambio significativo en la TPP en el primer caso el promedio de la TPP en control fue de 0.83 ± 0.1 y después de la aplicación del fármaco se facilitó presentando una TPP de 1.37 ± 0.2 ($p \leq 0.01$) (figura 29G). En el mismo sentido cuando la SST produjo una depresión de la TPP pasando de 0.93 ± 0.1 , en condición control, a 0.70 ± 0.15 después de SST ($p \leq 0.05$) (Figura 29H).

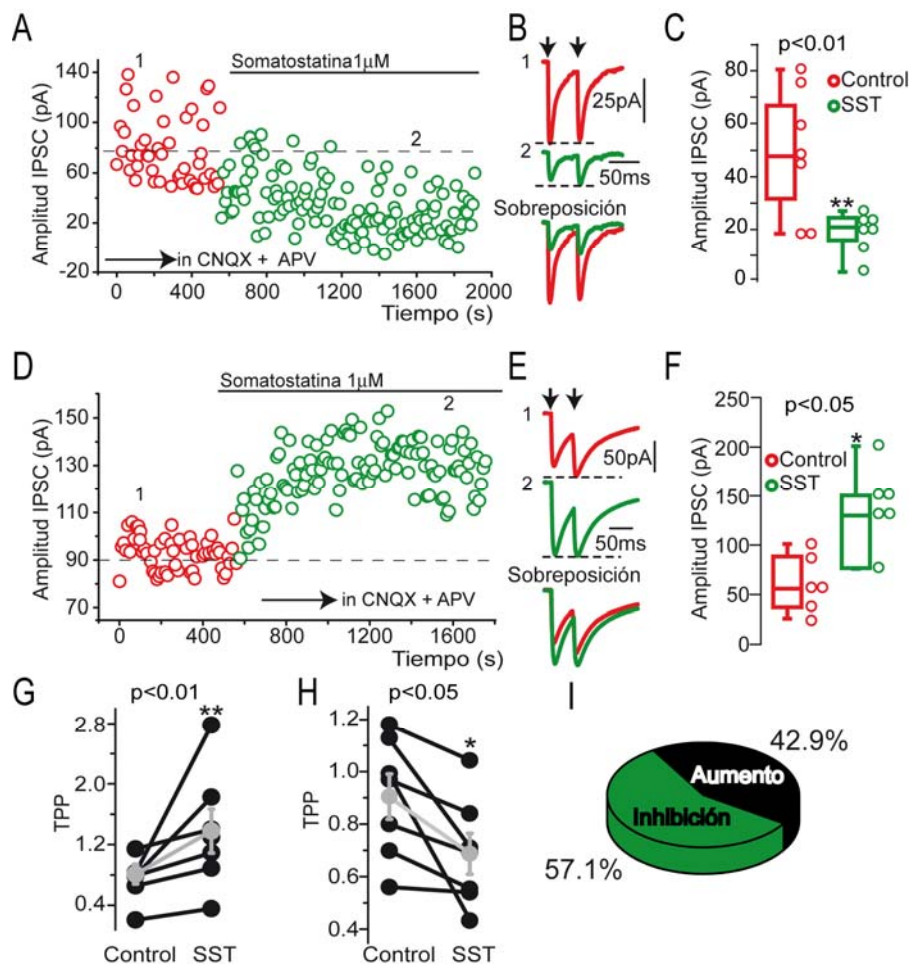


Figura 29. Modulación de la inhibición colateral por somatostatina en el modelo de rata hemiparkinsoniana. A. Curso temporal de las amplitudes de las IPSCs evocadas con estimulación antidrómica en el GP en un experimento representativo la amplitud cae después de la aplicación de SST. B. Promedio de 25 IPSCs consecutivos en condición control (1), durante la aplicación de SST (2) y los trazos sobrepuestos abajo. C. Gráfica de cajas resumiendo el efecto inhibitor de la SST (n=8). El promedio de la amplitud en control fue de 49 ± 9.3 pA y después de SST cayó a 18.9 ± 3.1 pA. D. Nuevo efecto de la SST revelado en los animales tratados con 6-OHDA. La SST incrementa la amplitud de las IPSCs. Curso temporal de un experimento representativo la amplitud de las corrientes evocadas aumenta al aplicar SST. E. Promedio de 25 trazos consecutivos en diferentes condiciones. F. Gráfica de cajas resumiendo el nuevo efecto de la SST (n=8). El promedio de la amplitud en control fue de 60.7 ± 11.2 pA y después de SST aumento a 111 ± 24 pA (n=7). G y H. Cambio en la tasa de pulso pareado en el primer caso la TPP pasa de 0.83 ± 0.1 a 1.37 ± 0.2 y en el caso de aumento la TPP pasa de 0.93 ± 0.1 a 0.7 ± 0.15 . I. El tratamiento farmacológico con SST revela dos poblaciones de MSNs después de la depleción DAérgica. Las gráficas de pastel muestran que aproximadamente 60% del total de células registradas a las que se les aplico SST presentan el efecto inhibitor mientras que el 40% restante tiene un efecto contrario.

Adicionalmente se realizó un análisis de media-varianza, de esta manera se calcularon tres parámetros de la sinapsis: la amplitud promedio de la respuesta postsináptica ante un paquete de neurotransmisor (Q), el número de sitios de liberación independientes que hacen contacto sináptico (N) y la probabilidad promedio de liberación de transmisor (P). En ambos casos se obtuvo cambio en los parámetros que representan a la presinapsis. Se observó un cambio en la probabilidad de liberación de 0.22 a 0.14 para la reducción y a 0.42 para el aumento, además de una modificación en los sitios de liberación de 14 a 10 para el efecto inhibitor de la SST y a 49 en el caso potenciador del fármaco (Figura 30).

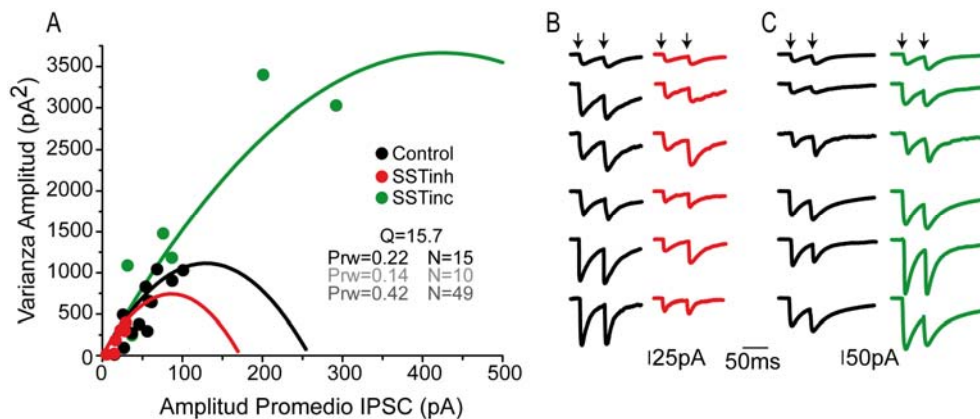


Figura 30. Ambos efectos de la SST son presinápticos. Análisis media-varianza de los experimentos con distintas intensidades de estimulación. A. El promedio de las amplitudes de las IPSCs tomadas de varios experimentos en los que se utilizó diferente intensidad de estimulación se graficaron contra su correspondiente varianza en condición control (círculos negros). Una parábola de la forma $y = Ax - Bx^2$ (Clements and Silver 2000) fue ajustada a los datos (línea negra continua). De este ajuste, se obtuvo una aproximación de la amplitud del cuanto sináptico (Q_w) que resultó ser 15.7 pA. También se graficaron los promedios de las amplitudes de las IPSCs en presencia de SST contra sus correspondientes varianzas en los dos casos: los que inhibieron la respuesta sináptica (círculos rojos) y los que la aumentaron (círculos verdes). En estos casos el tamaño del cuanto ponderado fue 15.78 pA y 15.79 pA respectivamente (ns), ya que los ajustes comparten la misma pendiente inicial se puede apoyar que el efecto del fármaco es a nivel presináptico. B y C. Familia de experimentos obtenidos con estimulación antidrómica en el GP.

Possible modulation differential por SST de las vías directa e indirecta

Para saber si los dos resultados de la acción SSTérgica estaban asociados a la división clásica de las neuronas estriatales de proyección se identificó a las células con una tinción post-hoc. Se realizaron inmunofluorecencias contra SP y Enk para en las células registradas con uno u otro efecto para poder correlacionarlas. Las células en donde la SST inhibió la liberación de GABA co-localizaron con SP, indicando que la SST disminuye la transmisión GABAérgica sobre neuronas de la vía directa (Figura 31A y B). Por otra parte las neuronas en las que se observó un aumento de la amplitud de las IPSCs fueron encefalinas positivas (Figura C y D), mostrando que la SST está aumentando la liberación de GABA sobre las MSNs de la vía indirecta en el estriado depletado de DA.

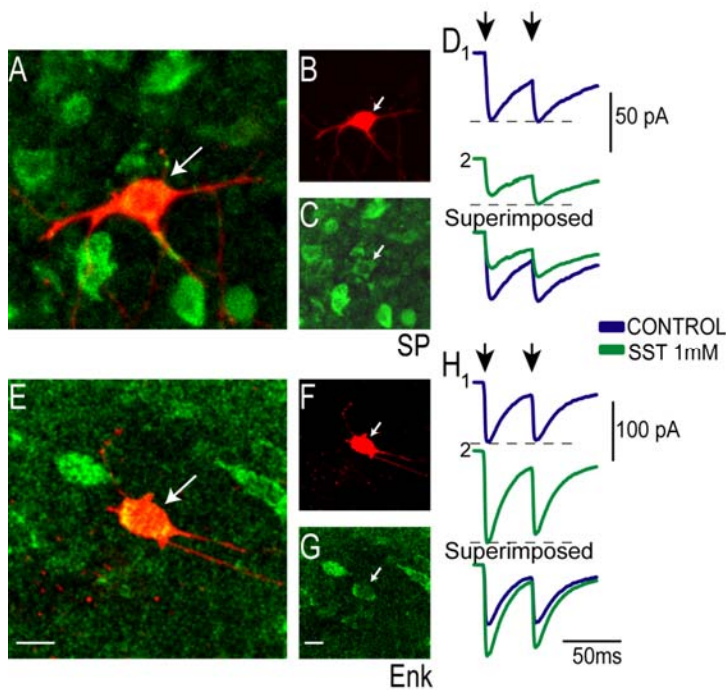


Figura 31. Identificación de MSNs. A. Inmunofluorescencia contra sustancia P en una neurona marcada con biocitina durante el registro, note que el soma (rojo) co-localiza con la marca de producida por el anticuerpo de SP (verde). B. Neurona registrada sobrepuesta en A. C. Inmunofluorescencia contra SP. D. Registros de la neurona mostrada en A. E. Inmunofluorescencia contra encefalinas en una neurona marcada con biocitina durante el registro, note que el soma (rojo) co-localiza con la marca de producida por el anticuerpo de Enk (verde). B. Neurona registrada sobrepuesta en A. C. Inmunofluorescencia contra Enk. D. Registros de la neurona

Efecto potenciado de la somatostatina en el animal hemiparkinsoniano

De manera interesante al comparar el efecto de la SST en animales naïve contra animales depletados de DA, no solo se observa la aparición del nuevo efecto aumentador de la SST, también se observa que la acción típica de la SST (inhibición de la liberación) se encuentra potenciada en el animal hemiparkinsoniano. Mientras que el efecto de reducción promedio en animales no tratados es de $34 \pm 11\%$ en el estriado sin DA la acción SSTérgica registrada es de $59.2 \pm 10.6\%$, casi doblando el porcentaje de reducción de la liberación de GABA con dosis idénticas del fármaco ($p \leq 0.05$) (Figura 32).

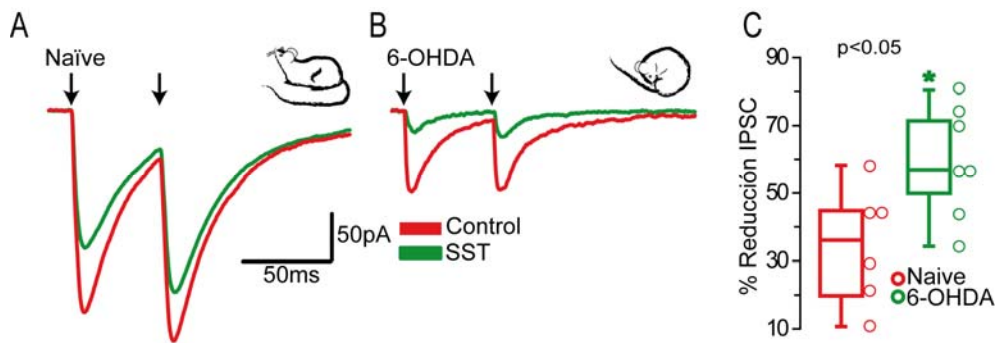


Figura 32. El efecto inhibidor de la SST está potenciado en los animales depletados de DA. A. Trazos representativos de los efectos producidos por la SST en neuronas registradas en animales no tratados. B. Trazos representativos del efecto inhibidor producido por la SST en animales inyectados con 6-OHDA. C. Gráficas de cajas mostrando la potenciación en la modulación SSTérgica durante la depleción crónica de DA.

Identificación farmacológica de los receptores SSTérgicos implicados

Se logró identificar los receptores mediante los cuales la SST ejercía sus acciones inhibitoras. A pesar de la falta de ligandos específicos para todos los receptores SSTérgicos, existen algunos agonistas específicos para los tipos sstr3

y sstr4: octreotido (OCT) y L-803 087 Trifluoroacetate (TFA) respectivamente. La aplicación de OCT siempre indujo una reducción de la amplitud de las IPSCs evocadas de $35.6 \pm 3.7 \%$ ($p \leq 0.05$, $n=6$) con su respectivo cambio de la tasa de pulso pareado que presento una facilitación del $31 \pm 11 \%$ ($p \leq 0.05$). Así mismo la presencia de TFA disminuyó la amplitud de las corrientes evocadas un $47.7 \pm 5.6 \%$, mientras que produjo una facilitación de la TPP del $45.16 \pm 22.15 \%$ ($n=7$, $p \leq 0.05$) (Figura 33).

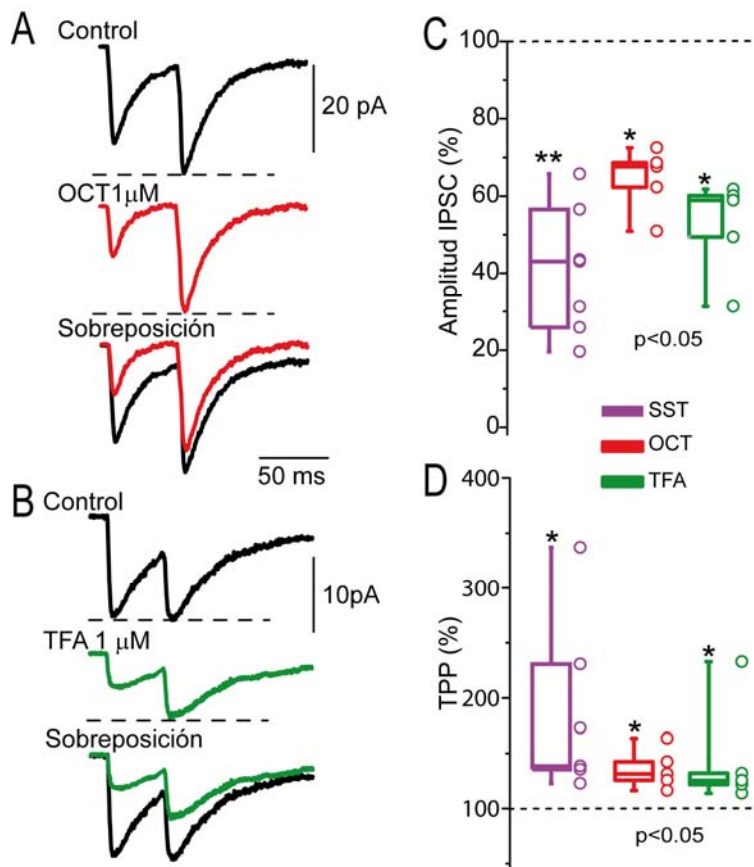


Figura 33. El efecto inhibitor de la SST esta mediado por los receptores SSTR3 y SSTR4. A. Trazos representativos de los efectos producidos por el agonista de los receptores SSTR3 OCT ($1\mu\text{M}$), se ilustran el promedio de 30 trazos consecutivos en la fase control (rojo), en presencia de OCT (verde) y sobrepuestos abajo ($n=6$). B. Trazos representativos de los efectos producidos por el agonista de los receptores SSTR4 TFA ($1\mu\text{M}$), se ilustran el promedio de 30 trazos consecutivos en la fase control (rojo), en presencia de TFA (verde) y sobrepuestos abajo ($n=8$). C. Gráficas que resumen el efecto de ambos fármacos sobre la amplitud comparados con SST. D. Cambios en la tasa de pulso pareado asociados al cambio en la amplitud.

Cuantificación de ARNm de los receptores SSTérgicos en el modelo de Parkinson

Con el objetivo de conocer si las acciones modificadas de la SST se debían a un cambio en sus receptores en el animal hemiparkinsoniano se realizó cuantificación del ARN mensajero por PCR en tiempo real. Se observó una disminución del mensajero de la SST del 50%, mientras que los receptores también sstr1, sstr4, sstr5 y sstr3 presentaron un significativo, disminuyendo los tres primeros y aumentando el último (Figura 34B). El patrón de expresión cambia en el animal lesionado volviéndose más significativa la participación del receptor sstr3 (Figura 34 C y D). Con estos resultados podemos ver que es posible que los cambios fisiológicos observados se deban a este re-arreglo de los receptores.

PCRrt: es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Esto se logra midiendo el cambio de intensidad de un intercalador de hebras de ADN fluorescente.

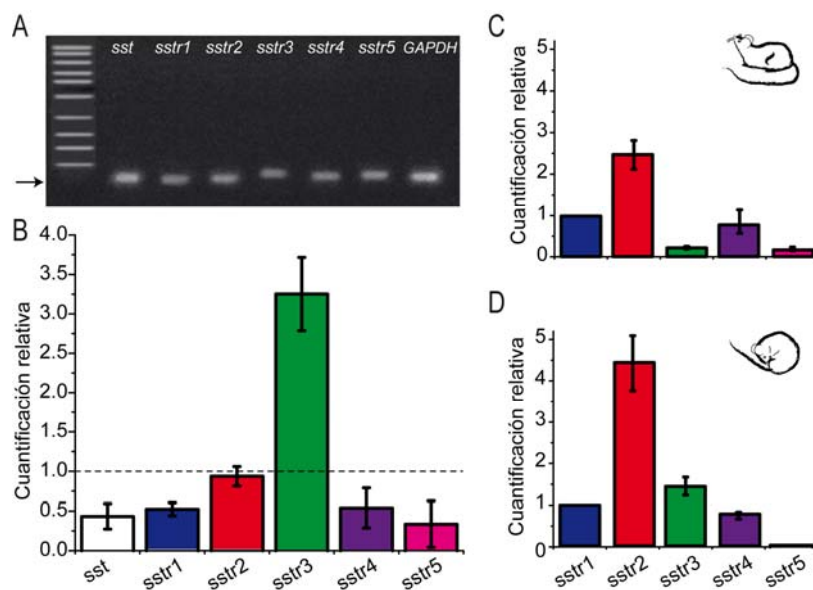


Figura 34. Cuantificación de receptores por RT-PCR. A. PCR en tiempo final para los oligos utilizados. B. Cuantificación relativa del transmisor SST y sus receptores con respecto al animal control. C. Cuantificación relativa de los receptores con respecto al receptor sstr1 para ver el patrón de expresión en control. D. Cuantificación relativa de los receptores con respecto al receptor sstr1 para ver el patrón de expresión en el hemisferio depletado de DA.

Discusión

La forma en que el núcleo estriado procesa la información cortical es aun una pregunta sin contestar en el funcionamiento de los ganglios basales. Una pieza clave en los modelos del circuito estriatal ha sido por mucho tiempo la inhibición que ejercen las colaterales axónicas que interconectan a las MSNs como mecanismo de selección de los comandos motores (Groves 1983, Wickens *et al* 1991). Sin embargo no se había podido evidenciar la importancia de esta conexión en el microcircuito y se le ha relegado a un segundo plano dándole mayor significancia a la inhibición que proveen las interneuronas (Koos y Tepper 1999, Mallet *et al*, 2005, Wilson *et al*, 2008). El principal objetivo del presente estudio fue establecer el impacto de la inhibición colateral implementando técnicas de frontera que permitieran reclutar y ver poblaciones neuronales, además de observar que sucedía en un circuito patológico.

Los principales hallazgos del presente trabajo son los siguientes: a) La inhibición colateral en el núcleo estriado es capaz de inhibir el disparo de neuronas espinosas medianas vecinas, b) La inhibición colateral se encuentra disminuida en un modelo de la enfermedad de Parkinson, c) La modulación somatostatinérgica de las colaterales axónicas de MSNs está alterada en el modelo de Parkinson.

Inhibición colateral

La manera en que el estriado lleva a cabo la computación de la información proveniente de la corteza y el tálamo es un punto clave en el funcionamiento de

las asas cortico-basales para la elección y ejecución de programas motores (Wilson 2004, Graybiel 1995, Barnes et al., 2005). Por mucho tiempo la hipótesis predominante de cómo se lleva a cabo esta selección se basó en un circuito con inhibición lateral, de tal forma que las colaterales axónicas proveían al estriado de una dinámica del tipo winner-take-all (Wickens *et al.* 1991, Kristan *et al.*, 2008; Pennartz *et al.*, 2009; Wang 2008). Como ya se mencionó anteriormente esta hipótesis fue insostenible con las observaciones experimentales que indicaban que la conexión colateral entre neuronas estriatales de proyección era incapaz de inhibir el disparo de las células vecinas ya que era débil. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la inhibición entre MSNs tiene un impacto mucho mayor en el circuito del que se pensaba.

Hasta ahora la estrategia para ver la conexión entre espinosas medianas fue el registro simultáneo de pares de neuronas conectadas, al comparar pares de MSN-MSN con pares de interneurona-MSN se nota una clara diferencia observándose una sinapsis mucho más robusta y por lo tanto una inhibición mucho más eficiente provista por interneuronas contra una conexión débil y con baja probabilidad por parte de las MSNs (Koos y Tepper 1999, Gustafson *et al.* 2006). No obstante ha de considerarse el número de cada tipo neuronal, mientras que las interneuronas son apenas un 5% del estriado, las MSNs representan el 95% del núcleo y por lo tanto es intuitivo pensar que ocuparan estrategias diferentes en sus conexiones sinápticas. Por tal razón se hizo imperante utilizar

una táctica para estudiar la influencia de varias MSNs y así tener el impacto real de la inhibición colateral en el microcircuito.

Para ello se conjugaron varias técnicas: se utilizó estimulación de campo para activar múltiples MSNs simultáneamente, imagenología de calcio para observar la población con resolución de célula única y animales transgénicos para identificar las neuronas activadas.

La estimulación antidrómica de los axones estriofugales en el GP fue eficaz para activar selectivamente espinosas medianas (Guzmán *et al*, 2003, Tecuapetla *et al*, 2005 y 2007). Trabajos previos muestran que el uso de este protocolo permite aislar las corrientes mediadas por la transmisión GABAérgica entre espinosas medianas y que las corrientes obtenidas tienen la misma dinámica y características que las que se registran con pares de neuronas (Guzmán *et al*, 2003, Tecuapetla *et al*, 2007). Las IPSCs que se obtienen con este protocolo pueden alcanzar hasta más de 100 pA como se puede ver en las curvas I-A (ver figura 14) y en experimentos recientes utilizando optogenética donde la activación masiva de botones de espinosas medianas produce corrientes sinápticas similares a las que se obtienen con la estimulación de campo de 100 pA o más (Chuhma *et al*, 2011), lo cual sugiere que se reclutan sinapsis de varias células y que la conexión es más robusta de lo que dejan ver los experimentos de pares (Jaegger *et al*, 1994, Tunstall *et al*, 2002; Czubayko & Plenz, 2002; Venance *et al*, 2004; Taverna *et al*, 2004; Tecuapetla *et al*, 2007).

La imagenología de calcio ya se ha usado extensivamente en la literatura para estudiar dinámica de circuitos neuronales (Sasaki *et al*, 2006 & 2007; Ikegaya *et al*, 2004 & 2005; Carrillo-Reid *et al*, 2008 & 2009, Jáidar *et al*, 2010), pues permite observar la actividad simultanea de cientos de neuronas. Esto apoyado en que la señal fluorescente esta directamente correlacionada con el disparo de potenciales de acción (ver figura 16) y el hecho de que la derivada del trazo de fluorescencia dura lo mismo que el evento eléctrico. Gracias a estas características se pueden construir gráficas tipo *raster* y ver la sincronización de varias células a la vez (Carrillo-Reid *et al*, 2008).

De manera importante las células que se activan con la estimulación antidrómica pertenecen tanto a la vía directa como a la vía indirecta, al colocar el electrodo de estimulación en el GP (el núcleo al que llegan los axones de la vía indirecta) es posible pensar que exista un sesgo y que se estimule preferentemente a neuronas de la vía indirecta que expresan receptor a dopamina D2 (Feger y Crossman 1984, Beckstead y Cruz 1986). Para descartar esta posibilidad se utilizaron animales transgénicos con la tecnología BAC (Heintz 2001), los cuales tienen asociada la proteína verde fluorescente como reportero al receptor D1 o al receptor D2, de tal manera que las neuronas con la maquinaria para expresar los receptores asociados a la GFP emiten fluorescencia verde ante la aplicación de la onda de excitación (Gerfen 2003). Gracias a su uso logramos identificar las células que estaban siendo activadas. Cuando se analizó que tipo de células se sincronizaban ante la estimulación antidrómica se observó que se reclutaban aproximadamente el 50% de neuronas GFP positivas en ratones *Drd1*

y Drd2-EGFP, indicando que no hay preferencia de activación de neuronas de la vía indirecta, ya que los axones de neuronas de ambas vías pasan por el GP y que las neuronas responsivas son preferentemente MSNs ya que no hay un porcentaje significativo de células activadas que no exprese GFP (indicador exclusivo de MSNs) (Gerfen 2003). Esto se corroboró al realizar el marcado retrogrado desde el GP de células estriatales, donde nuevamente se reporta el marcado de neuronas de ambas vías en porcentajes similares (Wu *et al*, 2000; Wilson 2004).

El uso conjunto de las dos estrategias: imagenología de calcio y estimulación de campo, nos permitió observar la participación de la inhibición colateral masiva sobre el microcircuito. Con la construcción de curvas de reclutamiento se logro observar que con la estimulación de campo se puede sincronizar hasta el 27% del total de células en el área de interés, al utilizar una intensidad de estimulación media se recluto al 15% de neuronas en el campo. Con esta última intensidad se realizaron los experimentos de bloqueo de la inhibición. De manera contundente la aplicación de bicuculina provocó un mayor reclutamiento de neuronas que en condición control, incrementando el número de neuronas responsivas un 60%. En todos los experimentos realizados se observo este fenómeno que es una fuerte sugerencia de que las neuronas activadas en condición control estaban inhibiendo activamente a las células que se revelaron después del bloqueo del receptor GABAérgico. Ya que las células activadas en control eran preferentemente MSNs, la inhibición capaz de inhibir el disparo de las nuevas células reclutadas es **la inhibición colateral**. Para apoyar esta idea se

analizaron las distancias de las neuronas vecinas más cercanas de las nuevas células sincronizadas con bicuculina, estando el 90% de neuronas a una distancia menor de 80 μm este resultado confirmó firmemente que la sinapsis observada era la de colaterales cuya probabilidad de conexión decrece con la distancia y que más allá de 100 μm es prácticamente inexistente (Tunstall *et al*, 2002; Czubayko & Plenz, 2002; Venance *et al*, 2004; Taverna *et al*, 2004; Tecuapetla *et al*, 2007).

Un punto importante dentro de la inhibición colateral es la existencia de reglas de conectividad entre neuronas pertenecientes a las vías directa e indirecta. Recientemente se ha reportado que las neuronas de la vía directa reciben sinapsis de células de ambas vías, mientras que las neuronas de la vía indirecta solo conectan con células de la misma vía (Taverna *et al*, 2008). Con la oportunidad de identificar a las neuronas activadas que nos brindó el uso de animales transgénicos se evaluaron estas observaciones. Se analizó la identidad de los vecinos más cercanos de las nuevas neuronas reclutadas en presencia del bloqueador GABA_A en los ratones *Drd1* y *Drd2-EGFP*. Se encontró que no existía una preferencia de células GFP⁺ o GFP⁻ en los vecinos cercanos de las neuronas de interés (de la vía directa o indirecta) encontrando porcentajes muy similares para ambos casos. Estos datos sugieren que no existen reglas de conexión, sin embargo ya que los vecinos más cercanos pueden o pueden no estar conectados a la célula de interés no podemos afirmarlo.

Cambios en el Modelo de la Enfermedad de Parkinson

Uno de los puntos cardinales de la sintomatología en la enfermedad de Parkinson es la dificultad para comenzar los movimientos. Cuando se observa un circuito en condición control existe actividad alternada, sincrónica y recurrente de grupos neuronales específicos en el estriado (Carrillo-Reid *et al*, 2009), en cambio en el modelo de enfermedad de Parkinson se registra un aumento considerable en la actividad neuronal y se pierde la alternancia entre los grupos de neuronas (Jáidar *et al*, 2010). Tal efecto es emulado en el animal control al bloquear la transmisión GABAérgica denotando que una de las posibles razones para la pérdida de dinámica estriatal en el modelo de Parkinson es la pérdida de la inhibición en el núcleo. Por lo que se genera una pregunta si existen dos fuentes de inhibición en el estriado ¿Cuál de ellas es la que está modificada en la enfermedad de Parkinson? La literatura apuntaba a que la transmisión GABAérgica afectada era la inhibición colateral (Taverna *et al*, 2008). Nuevamente con ayuda de técnicas de electrofisiología e imagenología de calcio se comprobó esta hipótesis. Se observó que la probabilidad de evocar IPSCs con estimulación antidrómica en las neuronas de proyección decaía de 0.9 a 0.6 señalando que desaparece una tercera parte de las sinapsis. En este sentido las sinapsis remanentes también disminuyeron su eficacia al aumentar 5 veces el número de fallas en los IPSCs evocados con la estimulación mínima. Al realizar curvas I-A para analizar qué pasaba con la amplitud de las corrientes mediadas por GABA se descubrieron dos poblaciones: en aproximadamente el 50% de las células a las que se les aplicó este protocolo presentaron una disminución

significativa de la amplitud cayendo de 153 pA a 54 pA, en la otra mitad de los casos la amplitud máxima se modificó levemente de 153 pA a 145 pA la tinción post-hoc de dichas células revelo que esta división correspondía a neuronas de la vía directa (SP positivas) o a la vía indirecta (Enk positivas) respectivamente; estos datos concuerdan perfectamente con los resultados encontrados con registros de pares de neuronas (Taverna et al, 2008).

Se estudio con imagenología de calcio si las sinapsis remanentes eran capaces de controlar la excitabilidad de células vecinas, para ello se siguió la misma estrategia que en el animal control. Al estimular antidrómicamente se reclutaron varias MSNs en el animal tratado y al bloquear la transmisión GABAérgica NO se observó aumento en el número de neuronas activadas por el estímulo. Por lo tanto la fuente de inhibición que se pierde en los modelos de la enfermedad de Parkinson es la **inhibición colateral**. Los datos obtenidos con imagenología de calcio y la información que nos aporta el modelo de la patología apuntan a la importante función de la inhibición colateral en regular la dinámica del circuito y dar la salida funcional de los ganglios basales. La ausencia de la inhibición colateral lleva a cambios en la integración de la entrada cortical (Flores-Barrera *et al*, 2010) y pérdida de la alternancia en la actividad de grupos neuronales (Jáidar *et al*, 2010) que probablemente sean los responsables de algunos de los síntomas de la enfermedad. Por lo anterior el buscar una alternativa terapéutica que regule la inhibición colateral se vuelve imperante, es por ello que en el presente estudio se analizó un posible modulador de esta sinapsis: la somatostatina.

Modulación somatostatinérgica

El control fino de la transmisión sináptica se da gracias a la neuromodulación, las sinapsis entre MSNs son el blanco de múltiples neurotransmisores que cambian la probabilidad de liberación de las distintas terminales y por lo tanto modifican la salida funcional del núcleo. Uno de los neurotransmisores con más impacto en la función estriatal es la DA, hecho que se manifiesta durante la enfermedad de Parkinson, sin embargo existen otros transmisores en el núcleo cuyo balance es fundamental en el procesamiento de la información. Uno de esos transmisores es la somatostatina (SST), este péptido es liberado por la interneurona LTS dentro del núcleo y se han descrito diversas acciones dentro del estriado como la modulación de corrientes de calcio y fuera del estriado aumentando o inhibiendo la liberación de neurotransmisor a través de sus receptores (sstr1-5). El sistema somatostatinérgico interactúa íntimamente con el sistema DA, cambios en las concentraciones de DA llevan a la modificación de los niveles de SST y de expresión de sus receptores y viceversa (Chowdhury *et al.* 1985; Thermos *et al.* 1996; Hathway *et al.* 1999, Rodríguez-Sánchez *et al.*, 1997, Izquierdo *et al.* 1999). Por tal motivo la SST parecía un buen candidato de estudio en la enfermedad de Parkinson.

Primero se decidió observar si la SST modulaba la liberación de GABA en condiciones control, para ello se evocaron IPSCs con estimulación en el GP, al aplicar SST la amplitud de las corrientes inhibitoras se reduce un 34% cambio asociado a un aumento en la tasa de pulso pareado. Por otro lado se estudió si existía un efecto similar en corrientes inhibitoras evocadas por la estimulación

de interneuronas, encontrando que en este caso la aplicación del fármaco no producía cambio alguno en la amplitud de las IPSCs. Así se tenía un modulador que específicamente modulaba la inhibición colateral (López-Huerta *et al*, 2008).

Se probó la acción somatostatinérgica en el animal parkinsoniano para sorpresa del presente estudio la SST tuvo efectos contrarios dividiendo a la población en dos. Se registraron IPSCs estimulando en el GP al agregar SST se obtuvo en el 57% de la población una reducción de la amplitud del 60%, pero en el 43% restante la aplicación del modulador produjo un incremento de la amplitud del 80%. Ambos efectos son a nivel pre-sináptico ya que se correlacionan con un cambio en la TPP y al realizar el análisis media-varianza se observa un cambio en el número de sitios de liberación y probabilidad de liberación y no en el tamaño del cuanto sináptico (Silver y Clements, 2000).

Los datos obtenidos sugieren fuertemente que la inhibición colateral sobre neuronas estriatales de proyección de la vía directa e indirecta es diferencialmente modulada por SST en el modelo de enfermedad de Parkinson de 6-OHDA. Se demostró que la somatostatina reduce la liberación de GABA sobre neuronas de la vía directa mientras que la aumenta sobre neuronas de la vía indirecta a diferencia de lo que se observa en el animal control donde siempre existe una reducción de la liberación (López-Huerta *et al*, 2008).

Ya que la acción de la SST es sobre la liberación de GABA se deben considerar algunos puntos con los resultados obtenidos. Taverna y cols. reportaron que la

depleción DAérgica promueve una disminución dramática de las conexiones de neuronas de la vía directa dejando una población cuasi-homogénea de terminales de neuronas de la vía indirecta. Una posible explicación para los resultados obtenidos es que con la estimulación de campo se logren reclutar sinapsis de neuronas D1 que no se logran distinguir con los registros de pares (Taverna *et al*, 2008) y que los axones de las neuronas D1 expresen un receptor de SST diferente al que expresan las terminales D2.

También ha de considerarse que existen dos tipos de conexiones de las neuronas de la vía indirecta (Tecuapetla *et al* 2009) se demostró que las sinapsis de neuronas D2 son moduladas diferencialmente por DA y es posible que este fenómeno se acentúe en el modelo de enfermedad de Parkinson, y explique de alguna manera los datos del presente trabajo.

Un hipótesis alternativa es la modulación célula blanco-especifica, este mecanismo ya ha sido descrito en muchos circuitos del SNC (Shigemoto *et al.*, 2001; Scanziani *et al*, 2002; Markram *et al*, 2004; Koester & Johnston 2002, Sun & Dobrunz 2005). Consiste en la expresión de diferentes factores presinápticos en distintas terminales incluso de la misma célula dependiendo de la postsinapsis. Experimentos posteriores con registros pareados o tripletes son necesarios para esclarecer este punto.

Adicionalmente se debe considerar que en existen otros transmisores que también podrían estar alterados, tales como la acetilcolina y podrían estar interactuando con la SST modificando las acciones somatostatinérgicas.

Dichos cambios fisiológicos registrados estuvieron correlacionados con un cambio en los niveles de mensajero del transmisor y sus receptores (Asinina *et al*, 1991). Al realizar la cuantificación relativa por PCR en tiempo real se observó una severa disminución de los niveles de ARNm de la SST, esto sugiere una baja en el nivel del neurotransmisor; lo cual explicaría el observar un efecto potenciado con las mismas concentraciones del fármaco, ya que normalmente cuando hay una reducción en los niveles de ligando se da un fenómeno de *up-regulation* de los receptores (Autor *et al*, 1991). Por tal motivo se midieron los niveles de ARNm de todos los receptores, se encontró que solo el receptor sstr3 estaba aumentado. Sin embargo los fenómenos de *up-regulation* pueden incluir sensibilización en las cascadas de señalización lo que llevaría también a un efecto potenciado del transmisor, puede ser que esto aplique a los otros receptores. Adicionalmente, el nivel de mensajero no siempre se correlaciona con la cantidad de proteína final expresada y funcional, estudios de *western blot* son necesarios para saber si esto sucede.

Considerando estos datos podemos ver a los receptores SSTérgicos como blancos terapéuticos de la enfermedad de Parkinson, ya que proveen una modulación diferencial sobre las vías directa e indirecta con un solo ligando. Y más importante ofrece nuevas perspectivas en la fisiopatología de la enfermedad.

Western Blot:

Cuantificación relativa o identificación de proteínas por medio del uso de anticuerpos específicos y electroforesis.

Material y Métodos

Animales

Se utilizaron ratas Wistar albinas o ratones BAC-GFP de 20-30 días después del nacimiento, sin distinción de sexo. Los animales se mantuvieron en cajas de plástico en un ciclo estable de luz/oscuridad 12:12 a temperatura ambiente (22°C), con libre acceso a alimento y agua. Se usó el mínimo número de animales para obtener significancia estadística y todos los procedimientos utilizados durante la presente tesis fueron aprobados por la comisión de cuidado animal del Instituto de Fisiología Celular.

Tejido

Tanto para los registros electrofisiológicos como para las imágenes de calcio se obtuvieron rebanadas sagitales de cerebro de roedor de la siguiente manera. Se anestesió al animal con una mezcla de ketamina y xilacina (i.p. 85ml/15ml por kg de peso) y se perfundió trans-cardialmente con una solución salina modificada con la siguiente composición (en mM): 225 sacarosa, 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 28 NaHCO₃, 7 glucosa, 1 ácido ascórbico y 3 piruvato (pH 7.4 con NaOH; saturado con 95% O₂ y 5% CO₂). Posteriormente se obtuvo el cerebro mediante decapitación. Se colectaron rebanadas parasagitales de 250 µm de espesor a 4° C con ayuda de un vibratomo. Las rebanadas adquiridas se incubaron a temperatura ambiente de 40-60 minutos para el restablecimiento del tejido en solución salina (composición en mM: 123.0 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 1.0 CaCl₂, 25.0 NaHCO₃ y 11.0 glucosa). Las soluciones se saturaron con 95% O

y 5% CO₂ en todo momento, a continuación se trasladaron a una cámara a temperatura ambiente para realizar los registros. Durante los experimentos se mantuvo la velocidad de perfusión constante 3 ml/min, además de que todos los fármacos se aplicaron diluidos en solución salina para alcanzar la concentración final por este medio.

Registros electrofisiológicos

Para el registro electrofisiológico de las células se empleó la técnica de patch clamp en la modalidad de célula entera ya sea en fijación de corriente o voltaje. Para ello se observaron las neuronas con un objetivo de inmersión de 40X e iluminación infrarroja conectada a una cámara y un monitor. Se eligieron las neuronas con las características reportadas para espinosas medianas. Los registros se realizaron con un amplificador *Axoclamp-2B* (Axon instruments, Foster city, CA) y se almacenaron en un software para su análisis *offline*.

Se usaron pipetas de borosilicato con una resistencia de 3-6 MΩ para el registro, que contenían una solución interna compuesta de (en mM): 72 KH₂PO₄, 36 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na₂ATP, 0.2 Na₃GTP y 0.5% de biocitina. Se utilizaron electrodos de tungsteno concéntricos (12.5 μm de diámetro, 50 +/- 8 kΩ resistencia DC) (FHC, Bowdoinham, ME) para la estimulación de campo.

Imágenes de Calcio

El tejido fue incubado en la oscuridad a temperatura ambiente 20 minutos en presencia de Fluo-4 10-20 μM (Tef Labs, Austin, TX) en 0.1% de Dimetil

sulfóxido. Posteriormente las rebanadas se trasladaron a una cámara con superfusión constante de la solución salina control especificada anteriormente. Con ayuda de un microscopio equipado con epifluorescencia (Eclipse E600FN; Nikon, Melville, NY) y un objetivo 10X de inmersión. La muestra fue iluminada con pulsos de 50-100 ms con una longitud de onda de 488 nm con una lámpara Lambda LS (Sutter instruments, Novato CA) mediante una fibra óptica conectada al microscopio.

La serie de imágenes fueron obtenidas con una cámara digital (coolSNAP ES2, Photometrics, roper scientific, Tucson AZ). La tasa de muestreo fue de 250-500 ms/imagen. La captura de las imágenes se hizo con un programa comercial para análisis de imágenes (Image Pro). Se adquirieron videos con una duración de 3 minutos de un área de 860 X 600 μm , donde se observaron cientos de neuronas. Los videos se separaron por intervalos de 5-10 minutos entre cada condición experimental para evitar el blanqueo de la muestra.

El número de neuronas totales cargadas con el fluoróforo (activas o no durante el experimento) se determinó al final del experimento con la adición de KCl (50mM) para promover la despolarización generalizada.

Protocolos experimentales

Durante los experimentos se utilizaron dos protocolos experimentales. Uno de ellos consistió en estimular a las colaterales axónicas de neuronas espinosas medianas de forma antidrómica desde el globo pálido, para registrar corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) provenientes de varios botones sinápticos

(Chang 1991). Para obtener la transmisión GABAérgica preferentemente de interneuronas se estimulo intraestriatalmente aproximadamente a un milímetro del registro donde según los reportes sería difícil encontrar espinosas medianas conectadas y se favorecería la estimulación de interneuronas que tienen una arborización axónica más profusa. Se eliminaron las entradas excitadoras aplicando CNQX (10 μ M, antagonista a receptores AMPA/Kainato) y APV (50 μ M, antagonista a receptores NMDA) de manera que se observaron solo corrientes sinápticas GABAérgicas (Guzmán et al., 2003).

Evaluación de los eventos presinápticos

Para evaluar si los efectos observados tenían un blanco presináptico se utilizo el protocolo de pulsos pareados que consiste en aplicar dos pulsos de igual intensidad separados por una ventana corta de tiempo. Este se basa en la hipótesis del calcio residual de la facilitación sináptica descrita por Katz y Miledi (1968). Según la cuál, el influjo de calcio del primer estímulo no es totalmente amortiguado por lo que al momento del segundo estímulo existe un residual que aunado a la nueva entrada de calcio aumentan la probabilidad de liberación (P) (Thomson, 2000).

Las terminales sinápticas tienen diferentes probabilidades de liberación que dependen de la concentración basal de calcio en los botones presinápticos. Lo que permite que pequeños cambios en la concentración del ion tenga efectos importantes en la liberación (Thomson, 2000).

Si se analizan los cambios en la tasa de las amplitudes del segundo evento sináptico (S2) con respecto al primer evento (S1) se obtiene la tasa de pulsos pareados (TPP) y las variaciones en ella nos permiten evaluar a qué nivel está actuando el fármaco. Veamos los siguientes casos: si estimulamos una terminal con pulso pareado en una solución con una concentración de Ca^{2+} normal o baja. Observaremos que en el primer evento se liberará cierto número de vesículas por el incremento del Ca^{2+} interno, pero este cambio no es suficiente para liberar todas las vesículas disponibles, así que cuando se dé el segundo estímulo el Ca^{2+} no amortiguado del primer evento se sumará a la nueva entrada del ión provocando la liberación de más vesículas que en el primer caso y observaremos un fenómeno llamado facilitación del pulso pareado ($\text{TPP} > 1$). Ahora si esta vez hacemos el registro en una solución con altas concentraciones de calcio obtendremos algo diferente ya que el primer estímulo da una entrada masiva del ión producirá la liberación de la mayor parte de las vesículas disponibles, con el segundo estímulo se sumara aun más Ca^{2+} pero en esta ocasión ya no habrán vesículas disponibles por lo que observaremos una depresión del pulso pareado ($\text{TPP} < 1$). De esta manera cambios en la TPP muestran que el blanco del fármaco es presináptico y probablemente esté afectando el mecanismo de liberación.

Adicionalmente se realizó un análisis de promedio vs varianza, el cual nos permitió evaluar que variables sinápticas estaban cambiando con la aplicación de los fármacos. Son tres parámetros los que describen la transmisión de una sinapsis típica: la amplitud promedio de la respuesta post-sináptica ante un paquete de neurotransmisor (Q), el número de sitios de liberación independientes

que hacen contacto sináptico (N) y la probabilidad promedio de liberación de transmisor (P). Juntos estas medidas definen la fuerza de una conexión sináptica. P resume la eficiencia presináptica y Q la postsináptica. Gráficamente es posible extraer estos parámetros de la fluctuación de las amplitudes de los eventos sinápticos registrados.

Procesamiento de los datos

El análisis y graficado de los datos se llevo a cabo con un software comercial (Origin v. 6.; Microcal, Northampton, MA). Las IPSCs se midieron desde la línea basal hasta el pico de máxima amplitud para el primer evento, para el segundo se resto de la basal la sobreposición del primer estímulo. Para la comparación de las amplitudes antes y después del fármaco solo se considero el IPSC1. Se obtuvo la tasa de pulso pareado (TPP) en control y en presencia del fármaco. La amplitud y TPP fue variable en los experimentos. Para las pruebas estadísticas se aplicó una T de Wilcoxon.

Análisis de imágenes

El procesamiento de las imágenes se realizó en programas escritos en Image J, IDL y MatLab. Las neuronas activas se identificaron semiautomáticamente, y su fluorescencia promedio se midió en función del tiempo. Las señales de fluorescentes calcio-dependientes se procesaron como $(F_i - F_o)/F_o$, donde F_i es la intensidad de fluorescencia en cualquier imagen, y F_o es la fluorescencia basal del tejido calculada como el promedio de las primeras 4 imágenes del video.

Los registros fueron inspeccionados manualmente para remover artefactos. Las señales de calcio evocadas por potenciales de acción tomadas en cuenta para la siguiente fase del análisis fueron detectadas sobre un valor umbral dado por su primer derivada (2.5 veces la desviación estándar del valor del ruido).

Para los experimentos con ratones GFP-BAC se siguió una estrategia adicional. Ya que la longitud de onda de excitación y emisión de la GFP y el Fluo-4 son indistinguibles en un microscopio de epifluorescencia se determinaron las coordenadas de las células GFP positivas antes del cargado del tejido. Primero se obtuvo una imagen en microscopia infrarroja para observar las características anatómicas del área de interés, de esta manera se determinaron coordenadas x , y y z para varios puntos de referencia. Se adquirió una imagen de fluorescencia para evidenciar las células GFP positivas ya sea de ratones con fenotipo *Drd1-GFP* o *Drd2-GFP*. Después se continuó con el cargado normal de la muestra. Después del cargado con fluo-4 se tomó una nueva imagen en infrarrojo para posicionar a la rebanada en el área de interés inicial con las mismas coordenadas x , y y z para los puntos de referencia elegidos. Una vez teniendo la misma región y el mismo plano focal se prosiguió con el experimento.

Para garantizar la co-localización de la rebanada antes y después del cargado y evitar el surgimiento de falsos positivos o falsos negativos de células GFP durante el experimento, se realizó una cuidadosa comparación pixel a pixel de las dos imágenes en infrarrojo obtenidas, con ello se obtuvo el coeficiente de solapamiento, solamente rebanadas con coeficientes arriba de 0.95 (máximo 1) se consideraron para análisis futuros.

Las coordenadas de las células GFP positivas se determinaron offline usando Image J (v.1.36, National Institutes of Health) e IDL, posteriormente se hizo la correlación con las células activas durante el experimento.

Lesión con 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)

Se obtuvo el modelo de enfermedad de Parkinson mediante la lesión unilateral con 6-OHDA, se utilizaron ratas Wistar de 13 ó 14 días postnatales o ratones BAC de 21 días postnatales. Mediante el uso de un aparato estereotáxico se ubicaron las coordenadas de la sustancia *Nigra Pars Compacta* Coordenadas a partir de Bregma: Antero-posterior 3.8, Medio-lateral 2 y Dorso-ventral 7.1. Con Bregma y Lambda horizontales, para el caso de la rata neonata y antero-posterior 2.58, medio-lateral 0.7 y dorso-ventral 4.5 para los ratones transgénicos. Por medio de una cánula se inyectó 0.3 μ l 6-OHDA (8 μ g/ml) disuelta en solución salina isotónica con ácido ascórbico al 0.03 % a una velocidad de 0.1 μ l/min. Ocho días después del día de la lesión se procedió a evaluar a los animales por medio de la prueba de giro. Se administró amfetamina (4mg/Kg., i.p.) disuelta en solución salina isotónica. Debido al desbalance de terminales DAérgicas entre los hemisferios se obtuvo un desequilibrio motor manifestado como giros ipsilaterales al hemisferio tratado, mismos que fueron medidos por un girómetro. Los roedores se evaluaron alrededor de 90 minutos mostrando \approx 10 giros/minuto, indicando la pérdida de más del 95% de las neuronas nigroestriatales.

Inmunohistoquímica

Durante el registro las neuronas se llenaron con biocitina para caracterizarlas anatómicamente, considerándose solo las rebanadas con una sola célula registrada. Inmediatamente después del experimento las rebanadas se colocaron en fijador compuesto de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 1% en buffer salino de fosfatos, pH 7.4 (PBS) durante toda la noche. Posteriormente se hicieron tres lavados de diez minutos cada uno y se perfundi6 el tejido en sacarosa al 10 %. Para seccionar las rebanadas en otras de menor grosor se colocó en agar al 6% y se cortó en un vibratomo colectándose en PBS para enjuagar. El tejido se incubó en CY3 ligado con el complejo avidina-biotina (ABC) (Horikawa et al, 1988). Finalmente se observaron en microscopio de fluorescencia. Y se realizó una reconstrucción.

Se realizaron inmunocitoquímicas con anticuerpos específicos para identificar la expresión de péptidos en las neuronas registradas. Las rebanadas incubaron 40 minutos en suero de albúmina bovina al 2% para bloquear sitios de unión no específicos y después se incubaron con el anticuerpo de interés por 24 horas. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón para encefalinas y un anticuerpo policlonal de ratón para SP en PBS tritón al 1% (1:100 Chemicon y 1:200 Peninsula Lab., respectivamente). Posteriormente se lavó el tejido tres veces y se incubó con anticuerpos de cabra contra ratón o conejo conjugados con FITC. Finalmente las rebanadas se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector laboratorios, Burlingame, CA) y observadas en un microscopio de epifluorescencia confocal (Olympus Fv-1000).

Fármacos

Se utilizaron los siguientes fármacos: somatostatina (SST) (Peninsula Laboratory, Inc., San Carlos, CA, USA), antagonista SST ciclo (γ -aminoheptanoyl-phe-D-try-lys-O-benzyl-thr) acetato (CicloSST) (ICN Pharmaceuticals, México), CYN 154806 (CYN), N²-[4-(5,7-Difluoro-2-phenyl-1H-indol-3-yl)-1-oxobutyl]-L-arginine metil éster trifluoroacetato L-803 087 Trifluoroacetato (TFA) y Octreotido (OCT) (Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri), 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline disodio sal (CNQX), ácido D-(γ)-2-amino-5-phosphonovaleric (APV), QX-314 y bicuculina (Sigma-Aldrich-RBI, St Louis, MO, USA). Las soluciones stock se prepararon y se añadieron al medio de perfusión para alcanzar la concentración final indicada. La SST se disolvió en DMSO (0.01%).

Bibliografía

1. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12: 366-375, 1989.
2. Alexander M. E. y Wickens J. R. 1993. Analysis of Striatal Dynamics: The Existence of Two Modes of Behaviour. *J Theor Biol.* **163**(4):413-38.
3. Alfinito PD, Wang SP, Manzino L, Rijhsinghani S, Zeevalk GD, Sonsalla PK (2003) Adenosinergic protection of dopaminergic and GABAergic neurons against mitochondrial inhibition through receptors located in the substantia nigra and striatum, respectively. *J Neurosci* 23:10982-10987.
4. Allen J. P. , Hathway G. J., Clarke N. J., Jowett M. I., Topps S., Kendrick K. M., Humphrey P. P., Wilkinson L. S., Emson P. C. 2003. Somatostatin receptor 2 knockout/lacZ knockin mice show impaired motor coordination and reveal sites of somatostatin action within the striatum. *Eur J Neurosci.* **17**(9):1881-95.
5. Araki T, Matsubara M, Fujihara K, Kato H, Imai Y, Itoyama Y. (2002) Gamma-aminobutyric acid A and benzodiazepine receptor alterations in the rat brain after unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle. *Neurol Res.* 24(1):107-12.
6. Arbuthnott GW, Wickens J. 2007. Space, time and dopamine. *Trends Neurosci.* 30:62–69.
7. Asanuma M, Ogawa N, Sora YH, Pongdhana K, Haba K, Mori A. Alterations of somatostatin and its modulation by levodopa in MPTP-treated mouse brain. *J Neurol Sci* 100:155-160, 1991.
8. Augood SJ, Kiyama H, Faull RL, Emson PC. Dopaminergic D1 and D2 receptor antagonists decrease prosomatostatin mRNA expression in rat striatum. *Neuroscience* 44: 35-44, 1991.
9. Bassant M-H., Simon A., Poindessous-Jazat F., Csaba Z., Epelbaum J. y Dournaud P. (2005): Medial septal GABAergic neurons express the somatostatin sst2A receptor: functional consequences on unit firing and hippocampal theta. *J Neurosci* **25**,2032-2041.
10. 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.
11. Bateup HS, Santini E, Shen W, Birnbaum S, Valjent E, Surmeier DJ, Fisone G, Nestler EJ, Greengard P (2010): Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad* 17; 107(33):14845-50.
12. Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325-334.
13. Bennett BD, Bolam JP. (1994) Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neuroscience* 62:707–19

14. Bennett BD, Wilson CJ. (1998) Synaptic regulation of action potential timing in neostriatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 18:8539–49.
15. Bennett, B.D. y Wilson, C.J. (2000): Synaptology and Physiology of Neostriatal Neurones In: Brain Dynamics and the Striatal Complex. R. Miller and J. Wickens (eds.) Harwood Academic Publishers.
16. Bezard E, Brotchie JM, Gross CE (2001) Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci* 2:577-588.
17. Boehm S. y Betz H. (1997): Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J Neurosci.* **17**, 4066-4075.
18. Bolam J. P., Hanley J. J., Booth P. A. C., y Bevan M. D. (2000): Synaptic organization of the basal ganglia. *J. Anat.* **196**: 527-542.
19. Bracci E, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P. (2002) Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J. Neurophysiol.* 87:2190–94
20. Brown, S.L., Joseph, J., and Stopfer, M. (2005). Encoding a temporally structured stimulus with a temporally structured neural representation. *Nat Neurosci* 8,1568-1576.
21. Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2:484-494.
22. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Rivier J. y Guillemin R. (1972): Hypothalamic polipeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science.* **129**: 77-79.
23. Breese G R, Duncan G E, Napier T C, Bondy S C, Iorio L C, Mueller R A. (1987) 6-hydroxydopamine treatments enhance behavioral responses to intracerebral microinjection of D1- and D2-dopamine agonists into nucleus accumbens and striatum without changing dopamine antagonist binding. *J Pharmacol Exp Ther.* 240(1):167-76.
24. Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernandez-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., and Bargas, J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435-1450.
25. Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibañez-Sandoval, O., Hernandez-Cruz, A., Galarraga, E., and Bargas, J. (2009). Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 101, 737-749.
26. Carman LS, Gage FH, Shults CW. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Res* 553: 275-283, 1991.
27. Centonze D, Bracci E, Pisani A, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P. 2002. Activation of dopamine D1-like receptors excites LTS interneurons of the striatum. *Eur. J. Neurosci.* 15:2049–52.
28. Chan CS, Glajch KE, Gertler TS, Guzman JN, Mercer JN, Lewis AS, Goldberg AB, Tkatch T, Shigemoto R, Fleming SM, Chetkovich DM, Osten P, Kita H, Surmeier DJ. HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 14(1):85-92. 2011.

29. Chang, H.T. et al. (1981) Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Science* 213, 915–918
30. Chesselet M. F. y Graybiel A. M. (1986): Striatal neurons expressing somatostatin-like excitatory synaptic transmission between periventricular and arcuate hypothalamic nuclei in vitro.
31. Chesselet M.F., Reisine T.D. 1983. Somatostatin regulates dopaminergic release in striatal slices and caudate nuclei, *J. Neurosci.* **3**: 232–236.
32. Chowdhury M, Steardo L, Fillenz M. Protein kinase C mediates the stimulation by somatostatin of dopamine synthesis in the rat striatum and nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 82: 196-200, 1987.
33. Chuhma N, Tanaka KF, Hen R, Rayport S. (2011). Functional connectome of the striatal medium spiny neuron. *J Neurosci.* 26;31 (4):1183-92.
34. Clements JD, Silver RA. Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends Neurosci* 23: 105-113, 2000.
35. Cools R, Altamirano L, D'Esposito M (2006) Reversal learning in Parkinson's disease depends on medication status and outcome valence. *Neuropsychologia* 44:1663-1673.
36. Cossart, R., Aronov, D., and Yuste, R. (2003). Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423, 283-288.
37. Coulson DTR, Brockbank S, Quinn JG, Murphy S, Ravid R, Irvine GB, Johnston JA. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC Mol boil.* 9:46 (8): ,2008.Cole S. L. y Shindler M. 2000. Characterizations of somatostatin sst2 receptors splice variants. *J. Physiol.* **94**. 217–237
38. Connor M., Bagley E. E., Mitchell V. A., Ingram S. L., Christie M. J., Humphrey P. P. A. y , Vaughan C. W. 2004. Cellular actions of somatostatin on rat periaqueductal grey neurons in vitro. *British Journal of Pharmacology.* **142**, 1273–1280.
39. Criswell H, Mueller RA, Breese GR. (1988) Assessment of purine-dopamine interactions in 6-hydroxydopamine-lesioned rats: evidence for pre- and postsynaptic influences by adenosine. *J Pharmacol Exp Ther.* 244(2):493-500.
40. Czubayko U. y Plenz D. (2002): Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 15764–15769,
41. Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
42. Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9: 251-259, 2006.

43. Dehorter N, Guigoni C, Lopez C, Hirsch J, Eusebio A, Ben-Ari Y, Hammond C. Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *J Neurosci* 29:7776–7787, 2009.
44. Delfino MA, Stefano AV, Ferrario JE, Taravini IR, Murer MG, Gershanik OS (2004) Behavioral sensitization to different dopamine agonists in a parkinsonian rodent model of drug-induced dyskinesias. *Behav Brain Res* 152:297-306.
45. DeLong, M.R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281-285.
46. DeLong MR, Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64: 20-24, 2007.
47. Dewar KM, Paquet M, Reader TA (1997) Alterations in the turnover rate of dopamine D1 but not D2 receptors in the adult rat neostriatum after a neonatal dopamine denervation. *Neurochem Int* 30:613-621.
48. Di Figlia M, Aronin N. Ultrastructural features of immunoreactivity somatostatin neurons in the rat caudate nucleus. *J Neurosci* 2: 1267-1274, 1982.
49. Espino A, Llorens J, Calopa M, Bartrons R, Rodriguez-Farré E, Ambrosio S. Cerebrospinal dopamine metabolites in rats after intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Brain Res* 669:19-25, 1995.
50. Fernandez A, de Ceballos ML, Rose S, Jenner P, Marsden CD. Alterations in peptide levels in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Brain* 119: 823-830, 1996.
51. Fino E, Venance L.(2011) Spike-timing dependent plasticity in striatal interneurons. *Neuropharmacology.* 60(5):780-8.
52. Flores-Barrera E, Laville A, Plata V, Tapia D, Bargas J, Galarraga E. Inhibitory contribution to suprathreshold corticostriatal responses: an experimental and modeling study. *Cell Mol Neurobiol.* 29(5):719-31, 2009.
53. Flores-Barrera E, Vizcarra-Chacón BJ, Tapia D, Bargas J, Galarraga E. Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front Syst Neurosci* 4:15, 2010.
54. Galarraga E, Vilchis C, Tkatch T, Salgado H, Tecuapetla F, Pérez-Rosello T , Pérez-Garci E, Hernández-Echeagaray E, Surmeier DJ, Bargas J. Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neurosci* 146: 537-554, 2007. Gerfen C. R. y Wilson C. J. (1996): The basal ganglia, In: L. W. Swanson, A. Bjorklund y T. Hokfelt (Eds.) *Handbook of chemical neuroanatomy Vol. 12: Integrated systems of CNS, part III*, Elsevier science BV, pp 371-468.
55. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 7;250(4986):1429-32.
56. Gerfen CR. (2003) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum animal model of Parkinson's disease. *Neuroscientist.* 9(6):455-62.

57. Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P. (2002) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci.* 15; 22(12):5042-54.
58. Gerfen CR, Surmeier DJ. (2010) Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu Rev Neurosci.* En prensa.
59. Gerfen, C.R., and Young, III W.S. (1988). Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460, 161-167.
60. Gillies G. (1997): Somatostatin the neuroendocrine story. *Trends in pharmacology.* **18**:87-95.
61. Gittis AH, Nelson AB, Thwin MT, Palop JJ, Kreitzer AC. (2010) Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *J Neurosci.* 10;30(6):2223-34.
62. Goldman PS, Nauta WJ. 1977. An intricately patterned prefronto-caudate projection in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 72:369–86
63. Graybiel AM (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol.* 5:733 -741.
64. Grillner S, Hellgren J, Ménard A, Saitoh K, Wikström MA. Mechanisms for selection of basic motor programs: roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28: 364-370, 2005.
65. Groves PM (1983). A theory of the functional organization of the neostriatum and neostriatal control of voluntary movement. *Brain Res.* 5: 109-132.
66. Groves PM, Linder JC, Young SJ. 1994. 5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum. *Neuroscience* 58:593–604
67. Gullledge A. T. y Stuart G. J. 2003. Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* **37**: 299–309.
68. Gustafson N., Gireesh-Dharmaraj E., Czubayko U., Blackwell K. T. y Plenz D. 2006. A Comparative Voltage and Current-Clamp Analysis of Feedback and Feedforward Synaptic Transmission in the Striatal Microcircuit In Vitro. *J Neurophysiol.* **95**: 737–752,
69. Guzman JN, Hernandez A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J, and Vargas J. (2003): Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci.* **23**: 8931– 8940.
70. Hathway G. J., Humphrey P. P. A. y Kendrick K. M. (1999): Evidence that somatostatin sst₂ receptors mediate striatal dopamine release. *Br. J. Pharmacol.* **128**: 1346-1352.
71. Hathway G. J., Humphrey P. P. A. y Kendrick K. M. 2003. Somatostatin induces striatal dopamine release and contralateral turning behavior in the mouse. *Neuroscience Letters.* **358**: 127–131.

72. Heintz N. (2001) BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nat Rev Neurosci.* 2(12):861-70.
73. Hernández-Echeagaray E, Tecuapetla F., Carrillo-Reid L. y Bargas J. 2005. Dopamine-somatostatine interactions on neostriatal projection neurons. Program 298.4. Washington D.C: Society for Neuroscience.
74. Hervieu G. y Emson P. C. (1998): The localization of somatostatin receptor 1 (sstr1) immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience* **17**, 547-571.
75. Hikosaka, O. et al. (1989) Functional properties of monkey caudate neurons I. Activities related to saccadic eye movements. *J. Neurophysiol.* **61**, 780–798.
76. Horikawa, K. y Armstrong, W. E. (1988): A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. of Neurosciences Methods.* **25**, 1-11
77. Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626: 167-174, 1993.
78. Ikegaya, Y., Le Bon-Jego, M., and Yuste, R. (2005). Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci Res* 52:132-138, 2005.
79. Ikegaya Y, Aaron G, Cossart R, Aronov D, Lampl I, Ferster D, Yuste R (2004) Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science* 304, 559-564.
80. Ince E, Ciliax BJ, Levey AI. 1997. Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse* 27:357–66
81. Izzo PN, Bolam JP. 1988. Cholinergic synaptic input to different parts of spiny striatonigral neurons in the rat. *J. Comp. Neurol.* 269:219–34
82. Izquierdo-Claros RM, Boyano-Adánez MC, Larsson C, Gustavsson L, Arilla E. Acute effects of D1- and D2-receptor agonist and antagonist drugs on somatostatin binding, inhibition of adenylyl cyclase activity and accumulation of inositol 1,4,5-trisphosphate in the rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 47: 99-107, 1997.
83. Jaegger D, Kita H, and Wilson CJ. (1994) Surround inhibition among projection neurons is weak or nonexistent in the rat neostriatum. *J Neurophysiol* 72: 2555–2558.
84. Jáidar O, Carrillo-Reid L, Hernández A, Drucker-Colín R, Bargas J, Hernández-Cruz A. (2010). Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J Neurosci.* 2010 Aug 25;30(34):11326-36.
85. Javoy F, Agid Y, Bouvet D, Glowinski J. In vivo estimation of tyrosine hydroxylation in the dopaminergic terminals of the rat neostriatum. *J Pharm Pharmacol* 26: 179-85, 1974.

86. Ji T. H., Grossman M. y Ji I. 1998. G Protein-coupled Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (28): 17299–17302.
87. Joel D, Weiner I. 1994. The organization of the basal ganglia-thalamocortical circuits: open interconnected rather than closed segregated. *Neuroscience* 63:363–79
88. Kandel E. R., Scheartz J. H., y Jessell T. M. (2000): Principles of neural science. Mc Graw-Hill. E. U. A. pp 1350.
89. Kawaguchi Y. 1993. Physiological, Morphological, and Histochemical Characterization of Three Classes of Interneurons in Rat Neostriatum. *The Journal of Neuroscience*. **13**(11): 4908-4923.
90. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 18:527–35
91. Kincaid AE, Zheng T, Wilson CJ (1998): Connectivity and convergence of single corticostriatal axons. *J Neurosci* **18**:4722-4731
92. Kim S. J., Chung W. H., Rhim H., Eun S. Y., Jung S. J. Y Kim J. al., 2002 Postsynaptic actino mecanism of somatostatin on the membrane excitability in spinal substantia gelatinosa neurons of juvenile rats. *Neurosci* **114**:1139-1148.
93. Kita H (1993) GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99:51-72.
94. Kita H and Kita T. (2001): Number, origins, and chemical types of rat pallidostriatal projection neurons. *J Comp Neurol* 437: 438–448.
95. Kita T, Kita H, Kitai ST. 1984. Passive electrical membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res*. 300:129–39
96. Koester HJ, Johnston D. Target cell-dependent normalization of transmitter release at neocortical synapses. *Science*. 6;308(5723):863-6. 2005.
97. Koós T. y Tepper J. M. (1999): Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nature neuroscience*. **2**(5): 467-472.
98. Koos T., Tepper J. M., y Wilson C. J. (2004). Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci*. **24**: 7916–7922.
99. Krantic S., Goddard I., Saveanu A, Giannetti N., Fombonne J., Cardoso A., Jaquet P. and Enjalbert A. 2004. Novel modalities of somatostatin actions *European Journal of Endocrinology* 151 643–655
100. Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC. (2010): Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*. 29;466(7306):622-6.
101. Kristan WB (2008): Neuronal decision-making circuits. *Curr Biol*. 14;18(19):R928-32.
102. Kubota Y. y Kawaguchi Y. (2000): Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. *J neurosci*. **20**(1):375-386.
103. Kubota Y, Mikawa S, Kawaguchi Y. 1993. Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin. *Neuroreport* 5:205–8.

- 104.Langston JW (2006) The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol* 59:591-596.
- 105.Lanneau C., Peineau S., Petit F. y Epelbaum J. (2000): Somatostatin modulation of excitatory synaptic transmission between periventricular and arcuate hypothalamic nuclei in vitro. *J Neurophysiol.* **84**:1464-1474.
- 106.Lemus-Aguilar, I., Bargas, J., Tecuapetla, F., Galarraga, E., and Carrillo-Reid, L. (2006). Diseño modular de instrumentación virtual para la manipulación y el análisis de señales electrofisiológicas. *Rev. Mex. Ing. Biomed.* 27, 82-92.
- 107.Leresche N., Asproдини E., Emri Z., Cope D. W., y Crunelli V. (2000). Somatostatin inhibits GABAergic transmission via presynaptic receptors. *Neuroscience.* **98**(3): 513-522.
- 108.Lopez-Huerta VG, Tecuapetla F, Guzman JN, Bargas J, Galarraga E. (2008). Presynaptic modulation by somatostatin in the neostriatum. *Neurochem Res.* 33(8):1452-8.
- 109.Lu JQ, Stoessl AJ. Somatostatin modulates the behavioral effects of dopamine receptor activation in parkinsonian rats. *Neuroscience* 112: 261-266, 2002.
- 110.Mallet N, Ballion B, Le Moine C, Gonon F. 2006. Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J. Neurosci.* 26:3875–84
- 111.Mallet N, Le Moine C, Charpier S, Gonon F. 2005. Feedforward inhibition of projection neurons by fastspiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. *J. Neurosci.* 25:3857–69.
- 112.Mao, B.Q., Hamzei-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R.C., and Yuste, R. (2001). Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* 32, 883-898.
- 113.Markram H, Wang Y, Tsodyks M. Differential signaling via the same axon of neocortical pyramidal neurons. *PNAS.* 28;95(9),1998.
- 114.Meyer D. K., Conzelmann U. y Shultheiss K. (1989). Effects of somatostatin-14 on the in vitro release of [3H] GABA from slices of rat caudate-putamen. *Neuroscience.* **28**(1): 61-68.
- 115.Molina-Holgado E, Van Gelder NM, Dewar KM, Reader TA (1995) Dopamine receptor alterations correlate with increased GABA levels in adult rat neostriatum: effects of a neonatal 6-hydroxydopamine denervation. *Neurochem Int* 27:443-451.
- 116.Molina-Holgado E, Dewar KM, Grondin L, van Gelder NM, Reader TA (1993) Amino acid levels and gamma-aminobutyric acidA receptors in rat neostriatum, cortex, and thalamus after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *J Neurochem* 60:936-945.
- 117.Momiyama T. y Zaborszky L. (2002): Somatostatin-induced presynaptic inhibition of excitatory and inhibitory transmission onto cholinergic neurons in the rat basal forebrain. *Neurosci Res Suppl.* **26**, S101.

118. Morelli M, Fenu S, Cozzolino A, Di Chiara G (1991) Positive and negative interactions in the behavioural expression of D1 and D2 receptor stimulation in a model of Parkinsonism: role of priming. *Neuroscience* 42:41-48.
119. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G. (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med.* 16(6):653-61.
120. Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M., Marin, C., Alonso, F., Zamarrubide, I., Lanciego, J.L., and Rodriguez-Diaz, M. (2004). The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. *Neurology* 62, S17-S30.
121. Parent A, Hazrati LN. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamocortical loop. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 20:91-127
122. Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:223-236; discussion 222.
123. Patel Y. C. (1999), Somatostatin and Its Receptor Family. *Frontiers in Neuroendocrinology* **20**, 157-198.
124. Pennartz CM, Berke JD, Graybiel AM, Ito R, Lansink CS, van der Meer M, Redish AD, Smith KS, Voorn P (2009). Corticostriatal Interactions during Learning, Memory Processing, and Decision Making. *J Neurosci.* 14; 29 (41):12831-8.
125. Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman JN, Galarraga E. y Bargas J. 2005. Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca²⁺-channels. *J Neurophysiol.* **93**(5):2507-19.
126. Piwko C, Thoss VS, Probst A, Hoyer D. Localization and pharmacological characterization of somatostatin recognition sites in the human cerebellum. *Neuropharmacology.* 35(6):713-23, 1996.
127. Planert H, Szydlowski SN, Hjorth JJ, Grillner S, Silberberg G. (2010) Dynamics of synaptic transmission between fast-spiking interneurons and striatal projection neurons of the direct and indirect pathways. *J Neurosci.* 3;30(9):3499-507.
128. Plenz D. (2003): When inhibition goes incognito: feedback interaction between spiny projection neurons in striatal function. *Trends Neurosci.* **26**: 436-443.
129. Plenz D. y Kitai S. T. (1998): 'Up' and 'down' states in striatal medium spiny neurons simultaneously recorded with spontaneous activity in fast-spiking interneurons studied in cortex-striatum-substantia nigra organotypic cultures. *J Neurosci.* 18: 266-283.
130. Pollack A E, Wooten G F. (1992) Differential regulation of striatal preproenkephalin mRNA by D1 and D2 dopamine receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 12 (1-3):111-9.

- 131.Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*. 4;459(7247):698-702.
- 132.Ragsdale CW Jr, Graybiel AM. 1988. Fibers from the basolateral nucleus of the amygdala selectively innervate striosomes in the caudate nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 269:506–22.
- 133.Rakovska A., Javitt D., Raichev P., Ang R., Balla A., Aspromonte J., Vizi S. (2003): Physiological release of striatal acetylcholine (in vivo): effect of somatostatin on dopaminergic–cholinergic interaction. *Brain Research Bulletin*. **61**: 529–536.
- 134.Ramirez JL, Mouchantaf R, Kumar U, Otero Corchon V, Rubinstein M, Low MJ, Patel YC. Brain somatostatin receptors are upregulated in somatostatin deficient mice. *Mol Endocrinol* 16: 1951-1963, 2002.
- 135.Reader TA, Dewar KM (1999) Effects of denervation and hyperinnervation on dopamine and serotonin systems in the rat neostriatum: implications for human Parkinson's disease. *Neurochem Int* 34:1-21.
- 136.Reid CA, Clements JD. Postsynaptic expression of long-term potentiation in the rat dentate gyrus demonstrated by variance-mean analysis. *J Physiol*. 1;518 (Pt 1):121-30, 1999.
- 137.Reisine T. y Bell G. I. (1995): Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev*; **16**:427–442.
- 138.Rodríguez-Sánchez M.N., Puebla L., López-Sanudo S., Rodríguez-Martín E., Martín-Espinosa A., Rodríguez-Pena M.S., Juarranz M.G., and Arilla E.1997. Dopamine Enhances Somatostatin Receptor-Mediated Inhibition of Adenylate Cyclase in Rat Striatum and Hippocampus. *Journal of Neuroscience Research* 48:238–248.
- 139.Sanudo-Pena MC, Patrick SL, Khen S, Patrick RL, Tsou K, Walker JM (1998) Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 248:171-174.
- 140.Savasta M, Dubois A, Benavidés J, Scatton B. (1988) Different plasticity changes in D1 and D2 receptors in rat striatal subregions following impairment of opaminergic transmission. *Neurosci Lett*. 15;85(1):119-24.
- 141.Savasta M, Dubois A, Feuerstein C, Manier M, Scatton B. (1987) Denervation supersensitivity of striatal D2 dopamine receptors is restricted to the ventro- and dorsolateral regions of the striatum. *Neurosci Lett*. 24;74(2):180-6.
- 142.Sasaki, T., Kimura, R., Tsukamoto, M., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2006). Integrative spike dynamics of rat CA1 neurons: a multineuronal imaging study. *J. Physiol*. 574, 195-208.

- 143.Sasaki, T., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2007). Metastability of active CA3 networks. *J. Neurosci.* 27, 517-528.
- 144.Schindler M., Humphrey P.P.A., Emson P.C. 1996. Somatostatin receptors in the central nervous system, *Prog. Neurobiol.* 50: 17–20.
- 145.Schulz S., Händel M., Schreff M., Schmidt H. y Höllt V. (2000): Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *J. Physiol.* 94:259-264.
- 146.Schultz W. (2000) The Reward Signal of Midbrain Dopamine Neurons. *News Physiol Sci.* 1999 Dec;14:249-255.
- 147.Schultz W. 2007a. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci.* 30:203–10
- 148.Schwartz, T.H., Rabinowitz, D., Unni, V., Kumar, V.S., Smetters, D.K., Tsiola, A., and Yuste, R. (1998). Networks of coactive neurons in developing layer 1. *Neuron* 20, 541-552.
- 149.Schwartzing RK, Huston JP. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50: 275-331, 1996.
- 150.Schober A (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318:215-224.
- 151.Selmer I. S., Schindler M., Humphrey P., Waldvogel H. J., Faull R. y Emson P. (2000): First localisation of somatostatin sst receptor protein in selected 4 human brain areas: an immunohistochemical study. *Molecular Brain Research.* 82: 114–125.
- 152.Shigemoto R, Kulik A, Roberts JD, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T, Somogyi P. Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 6: 523-525, 1996.
- 153.Simola N, Morelli M, Carta AR (2007) The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 11:151-167.
- 154.Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86: 353–387, 1998.
- 155.Soghomonian JJ, Chesselet MF. Lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway alter preprosomatostatin messenger RNA levels in the striatum, the entopeduncular nucleus and the lateral hypothalamus of the rat. *Neuroscience* 42: 49-59, 1991.
- 156.Sun HY, Lyons SA, Dobrunz LE. Mechanisms of target-cell specific short-term plasticity at Schaffer collateral synapses onto interneurons versus pyramidal cells in juvenile rats. *J Physiol.* 568: 815-40, 2005.
- 157.Sun Q-Q., Huguenard J. R. y Prince D. A. (2002): Somatostatin inhibits thalamic network oscillations *in vitro*: actions on the GABAergic neurons of reticular nucleus. *J Neurosci.* 22, 5374-5386.

158. Tallent M. K. y Siggins G. R. (1997): Somatostatin depresses excitatory but not inhibitory neurotransmission in rat CA1 hippocampus. *J Neurophysiol.* **78**, 3008-3018.
159. Tatsuoka Y, Riskind PN, Beal MF, Martin JB. The effect of amphetamine on the in vivo release dopamine, somatostatin y neuropeptide Y from rat caudate nucleus.
160. Taverna, S. et al. (2004). Direct physiological evidence for synaptic connectivity between medium-sized spiny neurons in rat nucleus accumbens in situ. *J. Neurophysiol.* **91**: 1111-1121.
161. Taverna S, Ilijic E, Surmeier DJ. (2008). Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* **21**;28(21):5504-12.
162. Taylor MD, De Ceballos ML, Rose S, Jenner P, Marsden CD. (1992) Effects of a unilateral 6-hydroxydopamine lesion and prolonged L-3,4-dihydroxyphenylalanine treatment on peptidergic systems in rat basal ganglia. *Eur J Pharmacol.* **25**;219(2):183-92.
163. Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzmán JN et al (2005) Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol* **93**:1119-1126.
164. Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Vargas J et al (2007) Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:10258-10263.
165. Tecuapetla F, Koos T, Tepper JM, Kabbani N, Yeckel MF. (2009) Differential dopaminergic modulation of neostriatal synaptic connections of striatopallidal axon collaterals. *J Neurosci* **29**: 8977– 8990, 2009.
166. Tepper J. M. y Bolam J. P. (2004): Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current opinion in neurobiology.* **14**:685-692.
167. Tepper J. M., Koos T., y Wilson CJ. (2004): GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci.* **27**: 662–669.
168. Tepper J. M. y Plenz D. (2005): Microcircuits in the striatum—striatal cell types and their interaction. In: *Microcircuits: The interface between neurons and global brain function*, Dahlem Workshop Report 93. Edited by Grillner S, Graybiel A. Cambridge, MA: The MIT Press.
169. Tepper JM, Wilson CJ, Koós T. (2008): Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. *Brain Res Rev*; **58**(2):272-81.
170. Thermos K, Radke J, Kastellakis A, Anagnostakis Y, Spyraiki C. Dopamine-somatostatin interactions in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Synapse* **22**: 209-216, 1996.
171. Thomson A. M. (2000): Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends Neurosci.* **23**(7):305-12. Review.

172. Tunstall M. J., Oorschot D. E., Kean A., y Wickens J. R. (2002) Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J. Neurophysiol.* **88**: 1263-1269.
173. Uhl GR, Walther D, Mash D, Faucheux B, Javoy-Agid F (1994) Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann Neurol* 35:494-498.
174. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5: 107-110, 1968.
175. Ungerstedt U, Herrera-Marschitz M, Ståhle L, Tossman U, Zetterström T. (1985) Functional classification of different dopamine receptors. *Psychopharmacology Suppl.* 2:19-30.
176. Vasilaki A, Pappasava D, Hoyer D, Thermos K. The somatostatin receptor (sst1) modulates the release of somatostatin in the nucleus accumbens of the rat. *Neuropharmacol* 47: 612-618, 2004. Barnes TD, Kubota Y, Hu D et al (2005) Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature* 437:1158-1161.
177. Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galvan E, Galarraga E. 2000. Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience.*; **95**(3):745-52.
178. Vilchis C., Bargas J., Pérez-Roselló T., Salgado H. y Galarraga E. (2002): Somatostatin modulates Ca²⁺ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience.* **109**: 555-567.
179. Venance L, Glowinski J, and Giaume C. Electrical and chemical transmission between striatal GABAergic output neurones in rat brain slices. *J Physiol.* **559**: 215–230, 2004.
180. Viollet C., Videau C. y Epelbaum J. (2000): Somatostatin and behaviour: the need for genetically engineered models. *J Physiol Paris.* **94**(3-4):179-83.
181. Vuillet J., Dimova R., Nieoullon A. y Goff LK-L. (1992). Ultrastructural relationships between choline acetyltransferase- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum. *Neuroscience* **46**: 351–360.
182. Walter P., Gilmore R. y Blobel G. (1984): Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell.* **38**: 5-8.
183. Wang XJ (2008): Decision making in recurrent neuronal circuits. *Neuron.* 23; 60 (2):215-34.
184. Widmann R., Maas D. y Sperk G. 1988. Effect of local injection of cysteamine and cystamine on somatostatin and neuropeptide Y levels in the rat striatum. *J Neurochem.* **50**(6):1682-6.
185. Wilson C. J. (2004): Basal ganglia In: G. M: Shepherd (ed.) *The synaptic organization of the brain*, 5th Edition. Oxford University Press, Oxford, pp. 361-414.

186. Wilson C. J. (2000): Striatal Circuitry: Categorically Selective, or Selectively Categorical? In: Brain Dynamics and the Striatal Complex. R. Miller and J. Wickens (eds.) Harwood Academic Publishers.
187. Wu Y, Richard S, Parent A (2000) The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci Res* 38:49–62.
188. Yan Z, Surmeier DJ. 1997. D5 dopamine receptors enhance Zn²⁺-sensitive GABA(A) currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron* 19:1115–26.
189. Yin HH, Knowlton BJ. 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:464–76.
190. Zigmond MJ, Stricker EM (1984) Parkinson's disease: studies with an animal model. *Life Sci* 35:5-18.
191. Zhou FM, Wilson CJ, Dani JA. 2002. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J. Neurobiol.* 53:590–605.

Apéndice I

Los datos obtenidos y descritos a lo largo del presente estudio resultaron en tres artículos:

- **López-Huerta VG**, Tecuapetla F, Guzmán JN, Bargas J. y Galarraga P. (2008) Presynaptic modulation by somatostatin in the neostriatum. *Neurochemical Research*. 33(8):1452-8.
- **López-Huerta VG**, Carrillo-Reid L, Tapia D, Bargas J y Galarraga E. GABAergic transmission among médium spiny neurons: impacto neuronal population.
- **López-Huerta VG**, Bargas J y Galarraga E. Somatostatinergic modulation of collateral inhibition is altered in Parkinson's disease model.

El primero publicado y los dos siguientes en proceso de publicación.

A continuación se presentan las caratulas de cada uno de ellos.

Apéndice I

Los datos obtenidos y descritos a lo largo del presente estudio resultaron en tres artículos:

- **López-Huerta VG**, Tecuapetla F, Guzmán JN, Bargas J. y Galarraga P. (2008) Presynaptic modulation by somatostatin in the neostriatum. *Neurochemical Research*. 33(8):1452-8.
- **López-Huerta VG**, Carrillo-Reid L, Tapia D, Bargas J y Galarraga E. GABAergic transmission among médium spiny neurons: impacto neuronal population.
- **López-Huerta VG**, Bargas J y Galarraga E. Somatostatinergic modulation of collateral inhibition is altered in Parkinson's disease model.

El primero publicado y los dos siguientes en proceso de publicación.

A continuación se presentan las caratulas de cada uno de ellos.

Presynaptic Modulation by Somatostatin in the Neostriatum

Violeta Gisselle Lopez-Huerta · Fatuel Tecuapetla ·
Jaime N. Guzman · Jose Bargas · Elvira Galarraga

Accepted: 21 December 2007 / Published online: 13 February 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Medium spiny projection neurons (MSNs) are the main neuronal population in the neostriatum. MSNs are inhibitory and GABAergic. MSNs connect with other MSNs via local axon collaterals that produce lateral inhibition, which is thought to select cell assemblies for motor action. MSNs also receive inhibitory inputs from GABAergic local interneurons. This work shows, through the use of the paired pulse protocol, that somatostatin (SST) acts presynaptically to regulate GABA release from the terminals interconnecting MSNs. This SST action is reversible and not mediated through the release of dopamine. It is blocked by the SST receptor (SSTR) antagonist ciclo-somatostatin (cicloSST). In contrast, SST does not regulate inhibition coming from interneurons. Because, SST is released by a class of local interneuron, it is concluded that this neuron helps to regulate the selection of motor acts.

Keywords Neostriatum · Somatostatin ·
Presynaptic inhibition · GABA · Medium spiny neurons

Introduction

The main input stage of the basal ganglia is the neostriatum (NSt) which receives major inputs from the cortex and thalamus [1]. The NSt processes cortico-thalamic inputs to choose and activate sequences of voluntary movements,

innate behavioral routines, and procedural memories [2–4]. This work demonstrates that somatostatin modulates this neostriatal processing.

The main neuronal population in the NSt is constituted by medium spiny projection neurons (MSNs) which connect with each other via local axon collaterals to produce lateral (feedback) inhibition [5–7]; a process thought to be important in selecting cell assemblies in charge of motor actions, sequences, or programs (synergies) [8]. MSNs also receive inhibitory synapses from local interneurons [7, 9]. One class of these interneurons synthesizes and releases the peptide somatostatin (SST) [10, 11]. SST mediates its actions via G-protein coupled receptors (GPCRs termed SSTR1–5) [12]. This peptidic neurotransmitter and hormone is ubiquitous in the peripheral and central nervous system [13]. Some post-synaptic actions of SST have been described in the NSt, such as the modulation of calcium and calcium-activated potassium currents present on MSNs [14, 15]. These actions change the temporal structure of MSNs firing from an “integrator” to a “resonator” type of firing pattern [15, 16].

However, presynaptic actions of SST have also been reported in several synapses [17–22]. Therefore, it is logical to think that presynaptic actions mediated by SST should also be present at the NSt. Accordingly, we here use the paired pulse protocol to document a presynaptic somatostatinergic modulation of the inhibitory synapses that interconnect MSNs.

Experimental Procedures

Brain Slices

Animals were deeply anaesthetized with isoflurane and decapitated. Rat brains were removed into ice-cold saline

Special issue article in honor of Dr. Ricardo Tapia.

V. G. Lopez-Huerta · F. Tecuapetla · J. N. Guzman · J. Bargas
(✉) · E. Galarraga
Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),
PO Box 70-253, Mexico City, DF 04510, Mexico
e-mail: jbargas@ifc.unam.mx

(4°C) containing (in mM): 123 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 25 NaHCO₃, and 11 glucose (pH 7.4 with NaOH, 298 mOsm/l with glucose; saturated with 95% CO₂ and 5% O₂). Sagittal slices (300 μm) were prepared from 15- to 25-day-old Wistar rats as previously described [23–26]. Slices were transferred to a custom Plexiglas recording chamber and were continuously superfused with oxygenated saline (3 ml/min). Individual neurons were visualized (40× water immersion objective) under differential interference contrast (DIC) enhanced visual guidance using infrared videomicroscopy.

Electrophysiological Recording

Whole-cell patch-clamp recordings were performed with micropipettes made with borosilicate glass, fire polished for d.c. resistances of about 3–6 MΩ. Internal solution had a high Cl⁻ concentration so that inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) are seen as inward currents (in mM): 72 KH₂PO₄, 36 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2

Na₂ATP, 0.2 NA₃GTP, 5 QX-314, and 0.5% biocytin (pH 7.2, 275 mOsm/l). QX-314 prevented action potentials from occurring and allowed for stable voltage-clamp recording at depolarized membrane potentials.

Synaptic events were evoked with field stimulation with the use of a bipolar concentric tungsten electrode (12 μm at the tip; 50 ± 8 kΩ). Paired shock stimulation (45–50 ms of interstimulus interval; 0.2–0.4 ms duration; 1–4 V delivered through the stimulating electrode; at a frequency of 0.1 Hz) was controlled with a computer interface (see below) and isolation units (Digitimer Ltd., Hertfordshire, UK) between the computer and the stimulating electrodes to quickly adjust stimulus parameters during the experiment. The field electrode was positioned in the globus pallidus (GP) or inside the NSt (Figs. 1a and 3a). Distance between recording and stimulating electrode in all configurations was about 500–1,000 μm. All experiments were realized in presence of 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline disodium salt (CNQX) (10 μM) and D-(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) (50 μM).

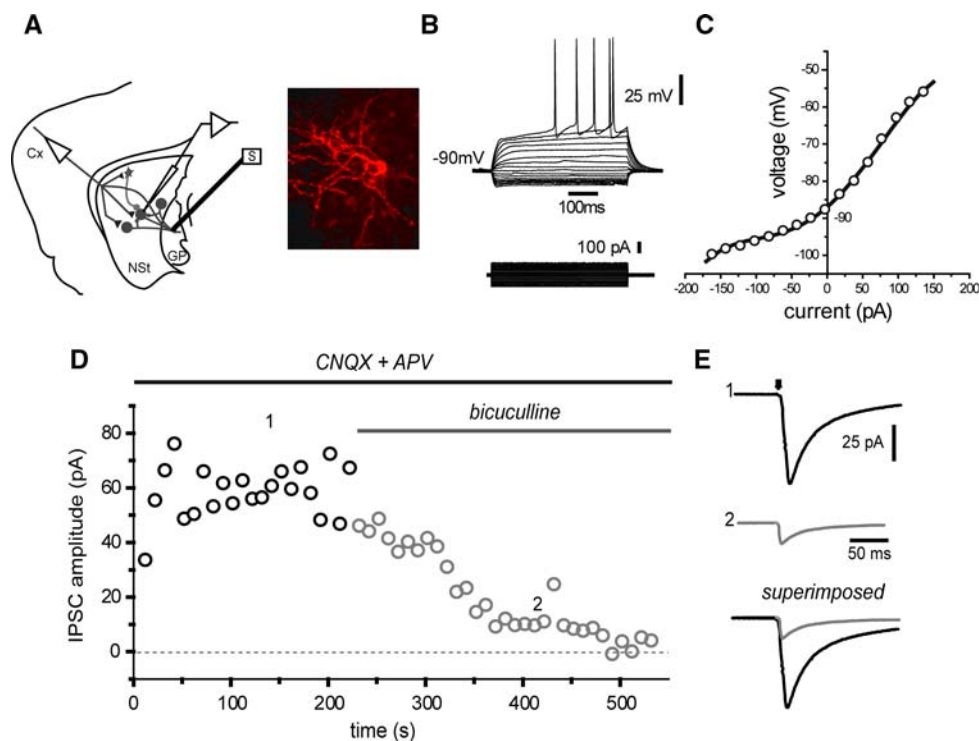


Fig. 1 IPSCs between MSNs. **(a)** Schematic representation of the stimulation protocol (*left*). The synaptic currents were evoked by antidromically stimulating MSN axon collaterals from the globus pallidus. CNQX (10 μM) and APV (50 μM) block AMPA and NMDA excitatory synaptic events. This stimulation protocol has been proven to efficiently isolate the synapses between MSNs and evoked IPSCs are comparable to those obtained with pair recordings [26]. Fluorescent image of a recorded MSN labeled with biocytin (*inset*). **(b)** Voltage records in response to hyperpolarizing and depolarizing current steps. Note inward rectification and long latency to first action

potential-characteristics of these neurons. **(c)** Current–voltage relationship from data shown in **b**. **(d)** Time course of the evoked IPSCs before and during the application of bicuculline (10 μM). Each point in the time course shows amplitude of the evoked IPSC. Bicuculline abolished the IPSC indicating its GABAergic origin. **(e)** Representative traces of IPSCs at different times during the experiment. **e1**. Mean trace of evoked IPSC in control conditions. **e2**. Mean data during bicuculline application showing a moment just previous to total block

Traces shown are the average of near 2 min recordings (10 traces) taken once the amplitude had been stabilized in a given condition. A small hyperpolarizing voltage command (10 mV) was constantly given during the experiment to monitor input conductance. The morphological identity of stained biocytin-filled neostriatal neurons was examined as described previously [23, 26].

Whole-cell access resistances were in the range 5–20 M Ω . Access resistance was continuously monitored and experiments abandoned if changes >20% were encountered. No cell capacitance, series resistance, or liquid junction potential (2 mV) compensations were made. All recordings were filtered at 1–3 kHz and digitized with an AT-MIO-16E10 (National Ins., Austin, TX) DAQ (NI-DAQ) board in a PC clone. On-line data acquisition used custom programs made in the Labview environment (National Ins.). The NI-DAQ board was used to save the data on binary files in the computer hard disk for further off-line analysis.

Digitized data saved on disk was imported for analysis and graphing into commercial graphing software (Origin v. 6. Microcal, Northampton, MA). IPSCs amplitudes were measured from basal line to peak from the first response. The paired pulse ratio was $PPR = IPSC_{second}/IPSC_{first}$.

Statistics

Distribution-free statistical procedures (Systat v.7. SPSS Inc., Chicago, IL) were used to find data significance at the level $P < 0.05$.

Drugs Used

SS-14 (Peninsula Laboratory Inc., San Carlos, CA, USA), SS-antagonist cyclo (γ -7-aminoheptanoyl-phe-D-try-lys-O-benzyl-thr) acetate (cicloSST) (ICN Pharmaceuticals, Mexico), TTX (Alomone, Jerusalem, Israel), SCH-23390, sulpiride, 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoline disodium salt (CNQX), D-(–)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV), QX-314, and bicuculline (Sigma-Aldrich-RBI, St. Louis, MO, USA). Stock solutions were freshly prepared and added to the superfusion during the experiment to give the required final concentration. SST was prepared with dimethylsulfoxide (0.01%).

Results

Isolation of IPSCs Between Spiny Neostriatal Neurons

Figure 1a shows the experimental protocol used [23]. A field stimulus was delivered at the globus pallidus (GP) to

antidromically activate striofugal axons, that is, axons of MSNs projection neurons passing through the GP [24, 25]. This activates intrastriatal axon collaterals antidromically.

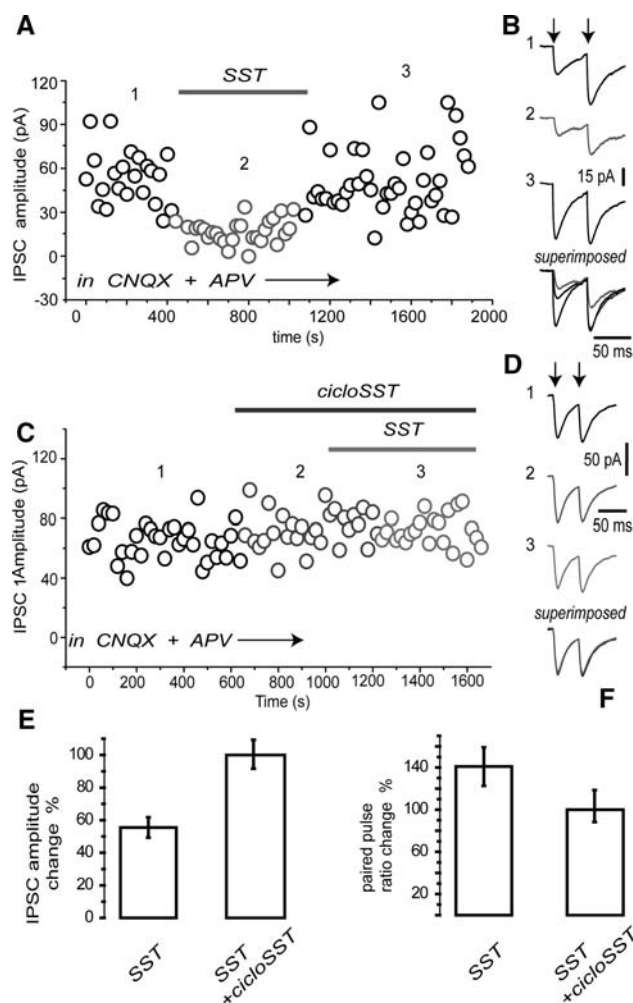


Fig. 2 In MSNs, SST inhibits the IPSCs coming from other MSNs. (a) Time course of the evoked IPSCs obtained with the protocol shown in Fig. 1a. Each point represents amplitude of the first IPSC at different stages during the experiment. Black circles show control conditions. Grey line and circles indicate change in amplitude during SST application. SST reduces significantly IPSC amplitude. (b) Mean IPSC amplitude traces. b1. Paired evoked IPSCs in control condition. b2. Paired evoked IPSC in the presence of SST. The change in the paired pulse ratio suggests that the action occurs presynaptically. Superimposed records are at the bottom. (c) SST effects are specific and mediated by its own receptor. Time course of the first IPSC at different stages during the experiment. In spite of quasiminimal stimulation (see change in amplitude scale and quantal variation), the application of the SST antagonist, cycloSST, prevents the blockage of the IPSC. Lines indicate application times for each drug. (d) Representative averaged traces at different moments during the time course. d1. IPSC amplitude for control conditions. d2. IPSC amplitude during application of SST antagonist. d3. IPSC amplitude during the application of SST in the continuous presence of the antagonist. Mean amplitude of IPSCs was unaffected by SST in presence of cycloSST (superimposed traces). (e) IPSC amplitude change, and (f) Paired pulse ratio percentage change in different conditions in the experimental sample

Careful comparisons between this protocol and paired recordings have demonstrated that this procedure efficiently isolates the synapses that connect MSNs (lateral or feedback inhibition) [26]. The inset in Fig. 1a shows that the majority of neurons which respond postsynaptically to this stimulation are MSNs; as identified by anatomical techniques (see “Experimental Procedures” above).

In addition, electrophysiological techniques (Fig. 1b right) show that the intracellular recorded voltages (top) in response to depolarizing and hyperpolarizing current steps (bottom) exhibit inward rectification and long latency to fire the first action potential [e.g., 27], which are typical characteristics of MSNs. Figure 1c illustrates the current–voltage relationship built from data shown in Fig. 1b, confirming inward rectification. Mean input resistance is about $120 \pm 15 \text{ M}\Omega$ ($n = 15$).

Because corticofugal fibers with intrastriatal axon collaterals may also be stimulated antidromically from the GP (Fig. 1a), glutamatergic transmission is blocked in all experiments with CNQX (10 μM) and APV (50 μM) to

isolate GABAergic currents [23]. Figure 1d and e shows that, in such conditions, all synaptic current (IPSC) isolated with GP stimulation is sensitive to bicuculline (10 μM), confirming its GABAergic origin. Antidromic and orthodromic action potentials are blocked with intracellular QX-314 (see “Experimental Procedures”).

Somatostatin Reduces Inhibition Between Spiny Neurons

Figure 2a and b shows that SST (1 μM) reversibly reduces the IPSC between spiny neurons (black versus gray circles). Representative traces in Fig. 2b show that the IPSC is not only reduced but also the paired pulse ratio (see “Experimental Procedures”) is enhanced, suggesting that the action is presynaptic [24, 25]. IPSC reduction amounts to about $46 \pm 11\%$ ($n = 13$; $P < 0.01$), while the PPR is augmented by about $118 \pm 15\%$ ($n = 13$; $P < 0.05$). Both a lack of change in the input resistance and in the time

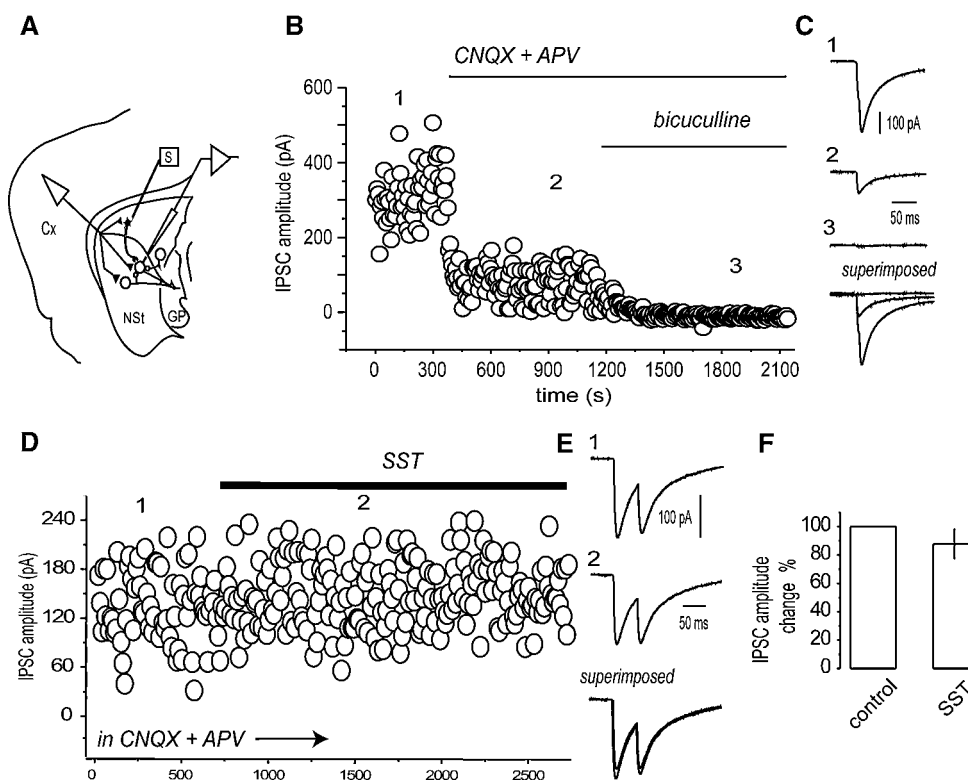


Fig. 3 SST does not affect IPSCs coming from local interneurons. (a) Schematic representation of the stimulation protocol to preferentially activate interneurons innervating the recorded MSN [28]. Intrastriatal stimulation at 500–1,000 mm from the recorded postsynaptic neuron ensures that mainly interneurons connections are stimulated. (b) IPSCs from interneurons are mediated by GABA_A receptors. Time course of the evoked IPSCs. Each point represents IPSC amplitude at different stages during the experiment: Control condition (1) The application of glutamatergic antagonists to the bath

(CNQX + APV) (2) The application of bicuculline (3) c1. Evoked IPSC in the control conditions. c2. Evoked IPSC in the presence of CNQX and APV. c3. Evoked IPSC in presence of bicuculline. Averaged traces. Comparison is shown in the superimposed records at the bottom. (d–e) IPSCs from interneurons are not affected by SST. Time course of the evoked IPSCs. Each point represents IPSC amplitude at different stages during the experiment. Control (1) SST application (2) SST does not reduce IPSC amplitude. Paired pulse ratio remained unchanged

course of the IPSC confirmed this inference. A similar experiment shows that the selective SST receptor antagonist, cycloSST (1 μ M), prevents SST actions ($n = 5$), suggesting a specific receptor-mediated action.

Somatostatin does not Reduce Inhibition from Interneurons

Inhibition mainly coming from local interneurons onto MSNs was isolated with field stimulation inside the neostriatum at a distance from the recording neuron (0.5–1.0 mm) that makes it difficult to recruit a connection between spiny neurons [5–7, 26, 28] and instead favors the GABAergic synapses coming from interneurons [28, 29]. In addition, bath application of 10 μ M CNQX plus 50 μ M APV (Fig. 3b, c) ensured that only GABAergic synapses were being stimulated. Figure 3d–f illustrates that SST had no action on the IPSCs coming from interneurons. IPSCs amplitude was 111 ± 14 pA before and 97 ± 18 pA during SST ($n = 8$; NS). The paired pulse ratio remained unchanged.

Synaptic Connections are Directly Modulated by Somatostatin

Because SST may increase the extracellular levels of dopamine in the NSt [30–33], and because dopamine has presynaptic actions on the synaptic terminals that interconnect MSNs [23, 26], we next tested if the SST actions were independent of dopamine actions (direct). Thus, we applied saturating concentration of dopaminergic D₁- and D₂-class receptor antagonists: SCH-23390 (1 μ M) and sulpiride (1 μ M), respectively [23, 24, 26] (Fig. 4a, b). In addition, intracellular QX-314 was maintained to block intrinsic inward currents and intracellular Cs⁺ was added to block potassium conductances and, as much as possible, any contamination with the intrinsic conductances that mediate the postsynaptic actions of SST [14, 15]. In the above conditions, Figure 4a and b shows that SST still reduces the IPSC between spiny cells, and moreover, that this effect courses with an enhancement of the PPR indicating again that the actions are presynaptic. IPSC reduction is about $34 \pm 11\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$; Fig. 4c) and PPR enhancement is about $131 \pm 15\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$; Fig. 4d). We conclude that

Fig. 4 SST still has an action during dopaminergic receptor blockage. **(a)** Time course of the evoked IPSCs obtained with the protocol shown in Fig. 1a. Each point represents IPSC amplitude at different stages in the experiment. Black circles represent IPSCs amplitude in presence of CNQX, APV, and the dopaminergic antagonists: sulpiride (D₂ class receptor antagonist) and SCH-23390 (D₁ class receptor antagonist). Grey line and circles show that SST still has a significant action. **(b)** Averaged IPSC traces: **b1**. Evoked pair of IPSCs in the presence of dopaminergic antagonists. **b2**. IPSC amplitude in presence of SST. Superimposed records are at the bottom. **(c)** IPSC amplitude decreased in the experimental sample. **(d)** Paired pulse depression in the control was transformed to paired pulse facilitation after SST, confirming a presynaptic effect

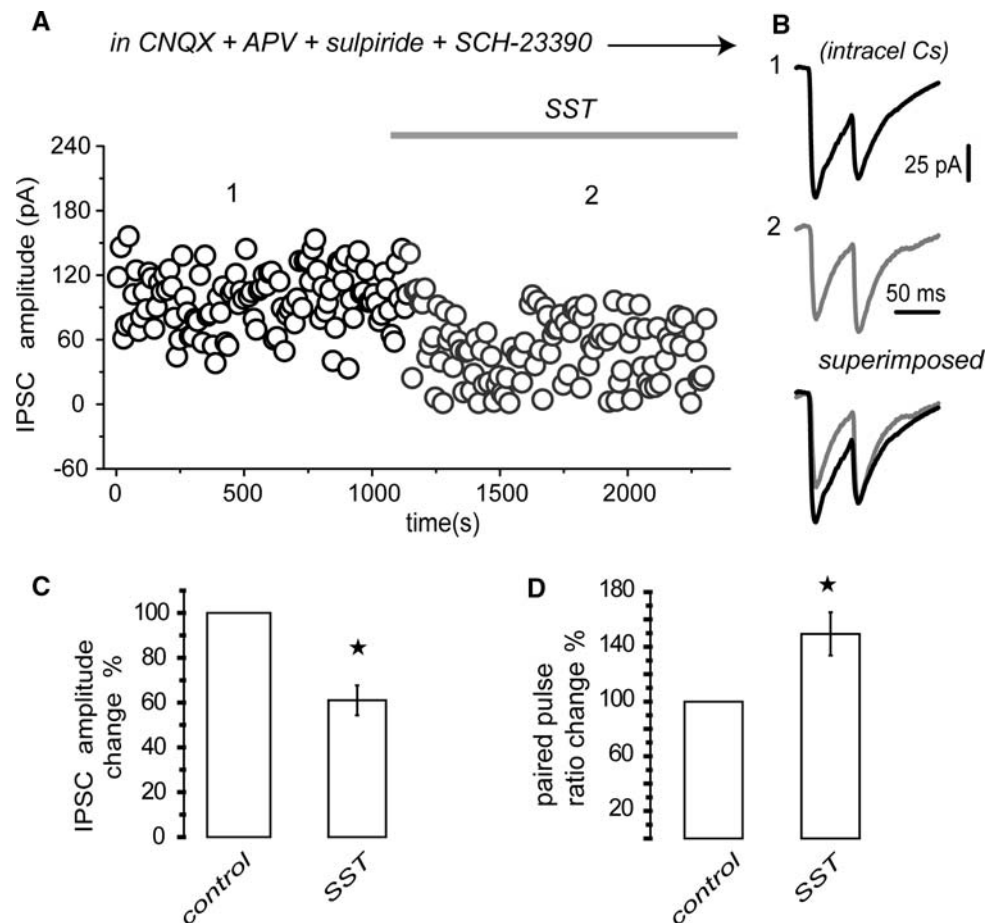
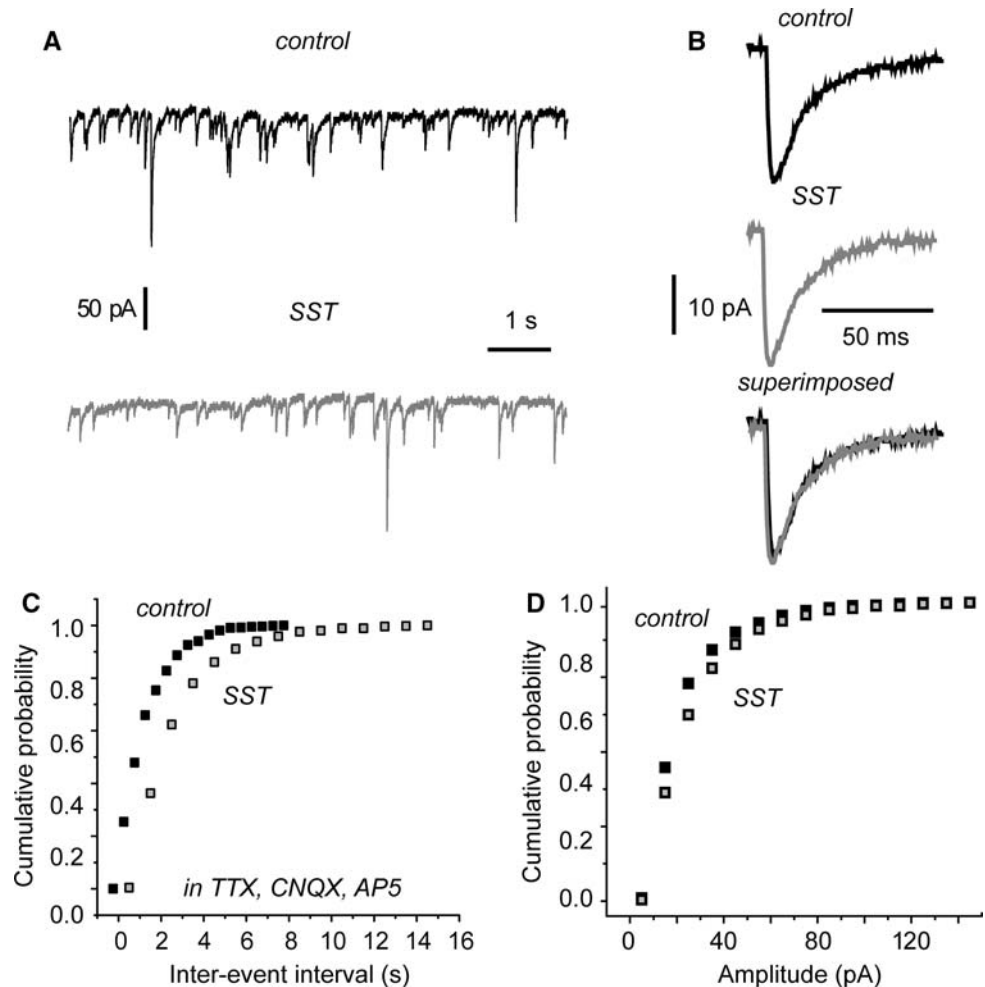


Fig. 5 SST reduced the frequency but not the mean amplitude of miniature spontaneous currents (mIPSCs). **(a)** Spontaneous frequency and amplitude of mIPSCs in the presence of TTX (1 μ M), CNQX (10 μ M), and APV (50 μ M) in control and after SST. **(b)** Representative mIPSCs in control (black traces) and mIPSC amplitude during application of SST (grey traces). Mean amplitude of mIPSCs was unaffected by SST, superimposed traces at bottom. **(c)** Intervent intervals were increased by SST (frequency decrease). Control: black squares. Grey squares: in the presence of SST. **(d)** Mean amplitude of mIPSCs was unaffected by SST



SST has a presynaptic action on MSNs axon collaterals even after dopamine receptor blockage.

Somatostatin Decreases GABA Transmission as Measured with Spontaneous IPSCs

To further discard indirect SST action we recorded the spontaneous frequency and amplitude of miniature currents (mIPSCs) in the presence of tetrodotoxin (TTX 1 μ M), CNQX (10 μ M), and APV (50 μ M). Figure 5 shows that SST reduced the frequency but not the mean amplitude of mIPSCs ($n = 4$). These experiments discard that SST actions were indirect through the release of other transmitter, and confirms that the modulation has a presynaptic origin.

Discussion

The present experiments are a first evidence of the presynaptic actions that SST has on the inhibitory synapses that interconnect MSNs in the NSt. They are a correlate of

previous neurochemical data reporting that endogenous SST may diminish the release of GABA in the NSt [34]. SST actions were direct, mediated by specific receptors, and selective. SST targeted connections between MSNs and spared connections between interneurons and MSNs.

Nevertheless, we did not discard that if dopamine receptors are not blocked, possible indirect effects mediated through dopamine release may ensue [30–33]. In addition, it would be strange that SST-containing interneurons do not possess functional autoreceptors [35]. Being that said, it is not clear why we did not see a modulation of the inhibition coming from interneurons in any case. Either these autoreceptors are not presynaptic, or else, our stimulation protocol favors the inhibition coming from other interneuron classes (fast-spiking interneurons) [29]. Further research is needed to solve these questions.

Functional Consequences

Postsynaptic actions of SST had been reported previously [14, 15] on MSNs. This work reports that also presynaptic

actions are present in the synaptic terminals of these neurons, basically modulating the amount of lateral inhibition between MSNs. Because this inhibition is thought to be indispensable to establish a sequence of motor acts [8], and because SST levels are altered during motor disturbances such as Parkinson and Huntington diseases, the present work shows the possibility that SSTR may be therapeutic targets for treating these diseases.

Acknowledgment We thank D. Tapia and J. A. Laville for technical assistance. L. Carrillo made the acquisition program. This work was supported by CONACyT grants: 42636 to EG and 49484 to JB, DGAPA-UNAM (IN201507, IN201607) and IMPULSA03 grant.

References

- Wilson CJ (2004) Basal ganglia. In: The synaptic organization of the brain. Oxford University Press, Oxford, pp 361–414
- Graybiel AM (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 5:733–741
- Grillner S, Hellgren J, Menard A et al (2005) Mechanisms for selection of basic motor programs—roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28:364–370
- Barnes TD, Kubota Y, Hu D et al (2005) Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature* 437:1158–1161
- Czubayko U, Plenz D (2002). Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc Natl Acad Sci* 99:15764–15769
- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A et al (2002) Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol* 88:1263–1269
- Koos T, Tepper JM, Wilson CJ (2004) Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24:7916–7922
- Bar-Gad I, Bergman H (2001) Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 11:689–695
- Koós T, Tepper JM (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2:467–472
- Di Figlia M, Aronin N (1982) Ultrastructural features of immunoreactivity somatostatin neurons in the rat caudate nucleus. *J Neurosci* 2:1267–1274
- Chesselet MF, Graybiel AM (1982) Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience* 17:107–126
- Ramírez JL, Mouchantaf R, Kumar U et al (2002) Brain somatostatin receptors are upregulated in somatostatin deficient mice. *Mol Endocrinol* 16:1951–1963
- Low MJ (2004) Clinical endocrinology and metabolism. The somatostatin neuroendocrine system: physiology and clinical relevance in gastrointestinal and pancreatic disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18:607–622
- Vilchis C, Bargas J, Pérez-Roselló T et al (2002) Somatostatin modulates Ca^{2+} currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 109:555–567
- Galarraga E, Vilchis C, Tkatch T et al (2007) Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience* 146:537–554
- Izhikevich EM (2007) *Dynamical systems in Neuroscience*. MIT Press, Cambridge
- Boehm S, Betz H (1997) Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J Neurosci* 17:4066–4075
- Tallent MK, Siggins GR (1997) Somatostatin depresses excitatory but not inhibitory neurotransmission in rat CA1 hippocampus. *J Neurophysiol* 78:3008–3018
- Leresche N, Asproдини E, Emri Z, et al (2000) Somatostatin inhibits GABAergic transmission in the sensory thalamus via presynaptic receptors. *Neuroscience* 98:513–522
- Lanneau C, Peineau S, Petit F et al (2000) Somatostatin modulation of excitatory synaptic transmission between periventricular and arcuate hypothalamic nuclei in vitro. *J Neurophysiol* 84:1464–1474
- Momiyama T, Zaborszky L (2006) Somatostatin presynaptically inhibits both GABA and glutamate release onto rat basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurophysiol* 96:686–694
- Sun Q-Q, Huguenard JR, Prince DA (2002) Somatostatin inhibits thalamic network oscillations in vitro: actions on the GABAergic neurons of reticular nucleus. *J Neurosci* 22:5374–5386
- Guzman JN, Hernandez A, Galarraga E et al (2003) Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci* 23:8931–8940
- Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T et al (2005) A reconfiguration of Ca_v2 Ca^{2+} channels current and its dopaminergic D_2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 94:3771–3787
- Pérez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H et al (2005) The cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of $Ca_v2.1$ and $Ca_v2.2$ Ca^{2+} channels. *J Neurophysiol* 93:2507–2519
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J et al (2007) Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10258–10263
- 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* 75:146–156
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzmán JN et al (2005) Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol* 93:1119–1126
- Kita H (1993) GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99:51–72
- Cheselet MF, Reisine TD (1983) Somatostatin regulates dopaminergic release in striatal slices and caudate nuclei. *J Neurosci* 3:232–236
- Beal MF, Martin JB (1984) The effect of somatostatin on striatal catecholamines. *Neurosci Lett* 24:271–276
- Thermos K, Radke J, Kastellakis A et al (1996) Dopamine–somatostatin interactions in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Synapse* 22:209–216
- Hathway GJ, Humphrey PPA, Kendrick KM (1999) Evidence that somatostatin SST_2 receptors mediate striatal dopamine release. *Br J Pharmacol* 128:1346–1352
- Meyer DK, Conzelmann U, Shultheiss K (1989) Effects of somatostatin-14 on the in vitro release of $[3H]GABA$ from slices of rat caudatoputamen. *Neuroscience* 28:61–68
- Vasilaki A, Pappasava D, Hoyer D et al (2004) The somatostatin receptor ($SST1$) modulates the release of somatostatin in the nucleus accumbens of the rat. *Neuropharmacology* 47:612–618

Striatal Presynaptic Modulation by Somatostatin is Altered in a Rodent Model of Parkinsonism

Violeta G López-Huerta, José Bargas and Elvira Galarraga

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional
Autónoma de México, México City DF, México.

Running head: SST presynaptic modulation after dopamine denervation

Abstract= 232 w. Introduction = 439 w. Discussion = 2016 w.

Address for correspondence: Elvira Galarraga.

Instituto de Fisiología Celular – Neurociencias.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

PO Box: 70-253. Tel.: 5255 5622 5621.

e-mail: egalarra@ifc.unam.mx

GABAergic transmission among Medium Spiny Neurons: Impact on the neuronal population

*Violeta G López-Huerta, Luis Carrillo-Reid, Dagoberto Tapia, José Bargas and
Elvira Galarraga*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional
Autónoma de México, México City DF, México.

Running head: Collateral inhibition in neostriatum

Abstract= 232 w. Introduction = 439 w. Discussion = 2016 w.

Address for correspondence: Elvira Galarraga.

Instituto de Fisiología Celular – Neurociencias.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

PO Box: 70-253. Tel.: 5255 5622 5621.

e-mail: egalarra@ifc.unam.mx