

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**INTEGRACIÓN Y MODULACIÓN DE LA ENTRADA
CÓRTICO-ESTRIATAL EN LA RATA NORMAL Y
EN UN MODELO DE RATA HEMIPARKINSONIANA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M.C. EDÉN FLORES BARRERA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO

MÉXICO D.F., 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar

Secretario: Dra. Elvira Galarraga Palacio

Vocal: Dr. Fernando Peña Ortega

Vocal: Dr. Iván Velasco Velázquez

Vocal: Dr. Stefan Mihailescu

Tutora: Dra. Elvira Galarraga Palacio

Sustentante: M. C. Edén Flores Barrera

Comité tutorial:

Dra. Elvira Galarraga Palacio

Dr. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

Dr. Román Vidal-Tamayo Ramírez

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

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

El presente trabajo fue financiado por: CONACyT: 49484, 98004, DGAPA-UNAM: IN201607, IN201507, IN205610, IN206010.

Dedico el presente trabajo de tesis

A mis padres

A mi abuela Nico

A mi esposa Judith

A mis hermanos

A mis sobrinos

Agradecimientos

A mis padres por todo lo que me han dado.

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

A mi esposa Judith el amor de mi vida, gracias por el apoyo incondicional, por todos los momentos, por hacerme muy feliz. ¡TE AMO!

A la Sra. Catalina García Flores por permitirme ser parte de su familia, por sus consejos, apoyo...

A Lourdes Sánchez García por sus consejos, apoyo incondicional... Ah! Y como quiera... ¡Gracias comadre Lulu!

A Ana María López, por su amistad y apoyo ¡Gracias tía!

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

A la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray quien con sus comentarios ayudó al desarrollo del presente trabajo de investigación.

A los sinodales de esta tesis: Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar, Dra. Elvira Galarraga Palacio, Dr. Fernando Peña Ortega, Dr. Iván Velasco Velázquez, Dr. Stefan Mihailescu, por sus comentarios y sugerencias para el buen término de este trabajo de tesis.

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

A todas las personas que han formado parte de mi vida.

Gracias por todos los momentos compartidos.

ÍNDICE	PÁGINA
ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Ganglios Basales.....	1
1.1.1 Poblaciones neuronales del neostriado.....	2
1.1.2 Microcircuito córtico-estriatal.....	8
1.2 Patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas.....	12
1.3 Corrientes de calcio.....	14
1.4 Clases de receptores a dopamina.....	15
1.4.1 Farmacología de los receptores a dopamina.....	16
1.4.2 Localización de los receptores dopaminérgicos en el neostriado.....	18
1.5 Vías de señalización intracelular asociadas a la activación de receptores dopaminérgicos.....	19
1.5.1 Vía de señalización asociada a receptores dopaminérgicos de la clase D ₁	19
1.5.2 Vía de señalización asociada a receptores dopaminérgicos de la clase D ₂	21
1.6 Efectos dopaminérgicos sobre el disparo de las neuronas espinosas medianas.....	23
1.7 Modulación dopaminérgica de las respuestas sinápticas.....	26

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Respuestas córtico-estriatales.....	32
3.2 Visualización celular y confirmación de la identidad celular.....	33
3.3 Lesión con 6-hidroxi-dopamina.....	33
3.4 Fármacos.....	35
3.5 Procesamiento de los datos.....	36

CAPÍTULO 4

RESULTADOS.....	38
4.1 Algunas características electrofisiológicas de las neuronas espinosas medianas.....	38
4.2 Las neuronas espinosas medianas D ₁ y D ₂ difieren en su respuesta córtico-estriatal supraumbral.....	39
4.3 La contribución de la inhibición sináptica difiere en la respuesta córtico-estriatal de las neuronas de la vía directa e indirecta.....	42
4.4 El modelo apoya el papel del microcircuito estriatal durante el potencial en meseta.....	50
4.5 Las respuestas córtico-estriatales son modificadas por la depleción de dopamina.....	52
4.6 La contribución de la inhibición en las respuestas supraumbrales es modificada después de la depleción de dopamina.....	57

4.7 Contribución de la corriente de calcio Ca_v1 durante las respuestas córtico-estriatales.....	60
4.8 Modulación dopaminérgica de la respuesta córtico-estriatal en las neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta.....	63
4.9 La modulación dopaminérgica es ocluida cuando son bloqueados los canales de calcio Ca_v1	66
CAPÍTULO 5	
DISCUSIÓN.....	68
5.1 La respuesta córtico-estriatal es diferente en las neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta.....	69
5.2 Diferentes papeles de la inhibición en la respuesta córtico-estriatal de las neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta.....	70
5.3 Papel del microcircuito estriatal durante el potencial en meseta.....	71
5.4 Las respuestas córtico-estriatales reflejan una pérdida en la inhibición después de la depleción de dopamina.....	72
5.5 Participación de la conductancia de calcio tipo L (Ca_v1) en la respuesta supraumbral.....	74
5.6 La modulación dopaminérgica de la respuesta córtico-estriatal es diferente en las neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta.....	76
CONCLUSIONES.....	79
REFERENCIAS.....	80
ANEXOS.....	93

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
AMPC	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAC	Cromosoma artificial bacteriano, del inglés <i>bacterial artificial chromosome</i>
Ca²⁺	calcio
Ca-CaM	Proteína calcio-calmodulina
Ctx	Corteza
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por AMPC y dopamina de 32,000 daltones, del inglés <i>Dopamine and cAMP Regulated Phospho Protein of 32kDa</i>
E_{Cl⁻}	Potencial de equilibrio del ión cloro
EPSPs	Potenciales postsinápticos excitadores, del inglés <i>excitatory postsynaptic potentials</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
eGFP	Proteína verde fluorescente, del inglés <i>enhanced green fluorescent protein</i>
GB	Ganglios basales
Gpe	Globo pálido externo
Gpi	Globo pálido interno
IP₃	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
IPSPs	Potenciales postsinápticos inhibidores, del inglés <i>inhibitory postsynaptic potentials</i>
K_D	Constante de afinidad
LCA	Líquido cerebroespinal artificial
μm	micrómetro
μM	micromolar
μs	microsegundo

mM	milimolar
ms	milisegundo
MSNs	Neuronas espinosas medianas, principales o de proyección, del inglés <i>medium spiny neurons</i>
mV	milivoltio
NSt	Neocóstriado
NST	Núcleo subtalámico
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RMP	Potencial de membrana en reposo, del inglés <i>resting membrane potential</i>
PP1c	Proteína fosfatasa 1c
PP-2B	Proteína fosfatasa 2 B o calcineurina
PPH	Postpotencial hiperpolarizante
R_N	Resistencia de entrada
scRT-PCR	Transcriptasa inversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa en célula única
SNpc	Sustancia negra parte compacta
SNpr	Sustancia negra parte reticular
ZCPN	zona de conductancia con pendiente negativa

RESUMEN

Los modelos actuales del funcionamiento de los ganglios basales se basan en la segregación de las neuronas de proyección del estriado (MSNs) en la vía “directa” o estriato-nigral e “indirecta” o estriato-palidal, las cuales actúan en sentidos opuestos para controlar el movimiento. El presente trabajo experimental realizado en rebanadas de cerebro in vitro, utilizando ratones transgénicos BAC (*bacterial artificial chromosome*) para identificar a las MSNs de las vías directa e indirecta, muestra que las respuestas córtico-estriatales supraumbrales son una huella electrofisiológica que distingue a las MSNs. Las neuronas de la vía indirecta son más excitables que las neuronas de la vía directa. Más importante aún, estas diferencias revelan distintos procesos de integración de las entradas inhibitoras estriatales. A partir de estos resultados, demostramos que después de la depleción de DA en ratas, las diferencias en la respuesta córtico-estriatal de las MSNs están alteradas, hay una reducción en la respuesta córtico-estriatal de las MSNs de la vía directa, mientras que existe un aumento en la respuesta de las MSNs de la vía indirecta, explicado parcialmente por una disminución en las conexiones sinápticas GABAérgicas entre las MSNs y la acción dopaminérgica diferencial sobre cada MSN. La corriente intrínseca de calcio Cav1 (L) contribuye a la integración córtico-estriatal en ambos tipos de MSNs; incluyendo la respuesta autorregenerativa característica de las MSNs de la vía indirecta. La activación de receptores dopaminérgicos de la clase D₁ incrementó la respuesta córtico-estriatal en las MSNs de la vía directa mientras que la activación de receptores dopaminérgicos clase D₂ disminuyó la respuesta córtico-estriatal en las MSNs de la vía indirecta reduciéndose la amplitud y duración de la respuesta autorregenerativa de calcio registrada en estas neuronas. Esta modulación dopaminérgica es ejercida a través de la regulación de la corriente de calcio tipo L.

ABSTRACT

Current models of basal ganglia function are based on the segregation of striatal projection neurons (MSNs) in "direct" or striato-nigral and "indirect" or striato-pallidal pathway, which act in opposite directions for control movement. This experimental work in brain slices *in vitro*, using bacterial artificial chromosome (BAC) transgenic mice, to identify the direct and indirect pathways MSNs, shows that the suprathreshold cortico-striatal responses are an electrophysiological footprint distinguishes MSNs. The indirect pathway neurons are more excitable than neurons of the direct pathway. More importantly, these differences reveal different processes of integration of striatal inhibitory inputs. From these results, we show that after DA depletion in rats, the differences in the cortico-striatal response of MSNs are altered, there is a reduction in the cortico-striatal response of direct pathway MSNs, while there is an increase in the response of indirect pathway MSNs, partially explained by a decrease in GABAergic synaptic connections between MSNs and differential dopaminergic action on each MSN. Intrinsic calcium current Cav1 (L) contributes to the cortico-striatal integration in both types of MSNs, including autorregenerative response characteristic of indirect pathway MSNs. The activation of D₁ class dopamine increased cortico-striatal response of direct pathway MSNs while activation of D₂ class dopamine receptors decreased cortico-striatal response of indirect pathway MSNs, reduced the amplitude and duration of calcium autorregenerative response recorded in these neurons. This dopaminergic modulation is exerted through the regulation of L-type calcium current.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB) son núcleos funcionalmente interconectados distribuidos en el telencéfalo, diencéfalo y mesencéfalo de peces pulmonados, reptiles, aves y mamíferos (Reiner et al., 1998). Están relacionados con el control motor, el aprendizaje y la memoria de procedimientos, además, están involucrados en la activación de programas motores durante la realización de movimientos (Mink, 1996; Bolam, et al., 2000; Kravitz et al., 2010). Están constituidos por núcleos de entrada de información de la corteza como el caudado, el putamen (que forman el Neostriado, NSt), el accumbens y el subtálamo (NST) y núcleos de salida de información hacia otras estructuras como el globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra parte reticular (SNpr). Hay núcleos intrínsecos como el globo pálido externo (GPe) y la sustancia negra parte compacta (SNpc) (Wilson, 2004; Calabresi et al., 1996; Mink, 1996; Bargas y Galarraga, 2000). El papel funcional de los GB se ha inferido a partir de la observación de diferentes enfermedades, entre las que se encuentra la Enfermedad de Parkinson, un desorden neurodegenerativo progresivo de los GB, caracterizado clínicamente por movimientos involuntarios (discinesia), movimientos lentos (bradicinesia), rigidez muscular, inestabilidad postural, entre otros (Mink, 1996; Rao et al., 2003).

Los modelos del funcionamiento de los GB se basan en la segregación de las neuronas espinosas medianas de proyección del inglés *medium spiny neurons* o MSNs, del NSt en la vía “directa” o estriato-nigral e “indirecta” o estriato-palidal, las cuales actúan en sentidos opuestos para controlar el movimiento (DeLong, 1990; Obeso et al., 2004; Kravitz et al., 2010). En estudios de hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y activación de genes tempranos se ha propuesto que las neuronas GABAérgicas de la vía directa están caracterizadas por la alta expresión de receptores a dopamina (DA) de la clase D₁ (D₁R), sustancia P (SP) y dinorfina (MSNs-D₁), mientras que las neuronas GABAérgicas de la vía indirecta se

caracterizan por la alta expresión de receptores a DA de la clase D₂ (D₂R) y la coexpresión de encefalinas (ENK, MSNs-D₂) (Gerfen y Young, 1988; Le Moine y Bloch, 1995; Le Moine et al., 1991). Sin embargo, una manera inequívoca para diferenciar electrofisiológicamente estas neuronas no ha sido descrita. Han sido reportadas diferencias en la latencia para el disparo inicial, el umbral de disparo, los subtipos de rectificación entrante, la frecuencia de los eventos sinápticos espontáneos, su capacidad para desarrollar plasticidad sináptica de largo plazo después de la estimulación córtico-estriatal, y la composición de la subunidad de sus receptores GABAérgicos (Kreitzer y Malenka, 2007; Shen et al., 2007; Ade et al., 2008; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Valjent et al., 2009). Desafortunadamente, ninguna de estas diferencias puede ser usada para identificar fácil e inequívocamente la vía a la que pertenece una MSN durante su registro.

1.1.1 Poblaciones neuronales del neostriado

El principal núcleo de entrada a los GB es el NSt, cuyas neuronas principales o de proyección son las MSNs, las cuales se caracterizan por liberar el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA). Las MSNs constituyen el 77 % y 95 % de la población neuronal del NSt en el primate y en la rata, respectivamente (Bennett y Wilson, 2000). Tienen un soma de 12 a 20 μm de diámetro del cual emergen entre 3 y 6 troncos dendríticos, los cuales se ramifican en dos procesos, que pueden dividirse una o dos veces más, abarcando un volumen esférico de 300 a 500 μm y presentan gran número de espinas, **ver figura 1** (Bolam y Bennett, 1995; Wilson, 2004; Bennett y Wilson, 2000). Las cabezas de las espinas forman una especialización sináptica de tipo asimétrico con terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza y del tálamo. Se estima que cada MSN recibe entre 12,500 y 15,000 aferencias glutamatérgicas (Bennett y Wilson, 2000), y que hasta 10,000 pueden provenir de la corteza (Wickens y Oorschot, 2000), por lo que las aferencias restantes vienen del tálamo. Además, se sabe que cada MSN recibe de

1 a 2 contactos sinápticos de una neurona cortical (Wilson, 2004; Bennett y Wilson, 2000).

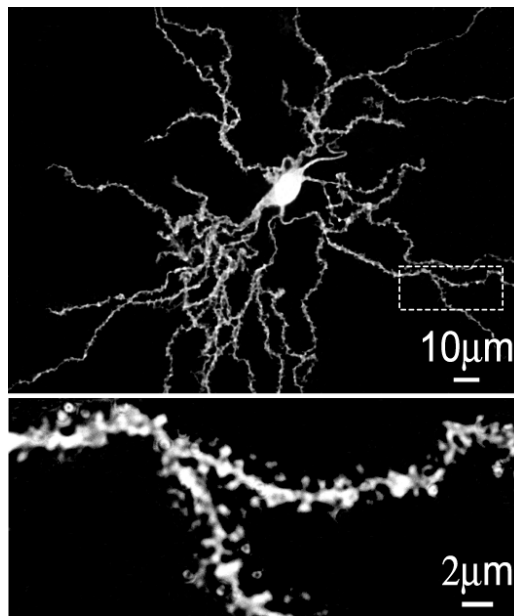


Figura 1. Neurona espinosa mediana (MSN) del NSt. Neurona marcada intracelularmente con biocitina y revelada con diaminobenzidina. El recuadro inferior muestra una ampliificación de un tronco dendrítico. Note el gran número de espinas (modificada de: Flores-Barrera et al., 2009).

Las neuronas espinosas de proyección de la vía directa e indirecta se han descrito como una población homogénea. Son similares en número e indistinguibles en tamaño, forma y propiedades electrofisiológicas somáticas.

El NSt se divide en una región sensorio-motriz y otra asociativa, de acuerdo a la información cortical que recibe. La región sensorio- motriz, localizada en el putamen, recibe proyecciones bilaterales de la corteza motriz que controla el cuerpo y las extremidades. La región asociativa, localizada en el caudado, recibe proyecciones homolaterales de las cortezas frontal, parietal, occipital y temporal (Flaherty y Graybiel, 1991). Una aferencia muy importante para el funcionamiento de los GB la constituyen las proyecciones dopaminérgicas provenientes de la SNpc (vía nigro-estriatal) (Smith et al., 1998; Wilson, 2004; Kita, 1996). La degeneración de la vía nigro-estriatal es la causa de la Enfermedad de Parkinson.

Las fibras dopaminérgicas forman varicosidades y establecen sinapsis *en passant* en todo el NSt. La SNpc de la rata contiene aproximadamente 8,000 neuronas dopaminérgicas, mientras que cada NSt contiene 2.8 millones de MSNs (Oorschot, 2000), revelando un factor de divergencia importante de 300-400 contactos sinápticos (Schultz, 1998). Cada MSN recibe en promedio entre 750-900 sinápsis dopaminérgicas (Bennett y Wilson, 2000).

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

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

finalmente a un aumento o disminución de la tasa de disparo de los núcleos de salida.

Por otro lado, existe una segunda vía directa hacia los núcleos de salida, que va de la corteza hacia el NST y de ahí al GPi y la SNpr. También existe una segunda vía indirecta, que va de la corteza al NSt, de ahí al GPe y finalmente al GPi y la SNpr (Albin et al., 1989; Mink, 1996). En realidad no sabemos cuál de las vías predomina en un momento dado. Además, el NST y el GPe mantienen conexiones recíprocas, mientras que el GPe manda fibras hacia las interneuronas del NSt (Mink, 1996).

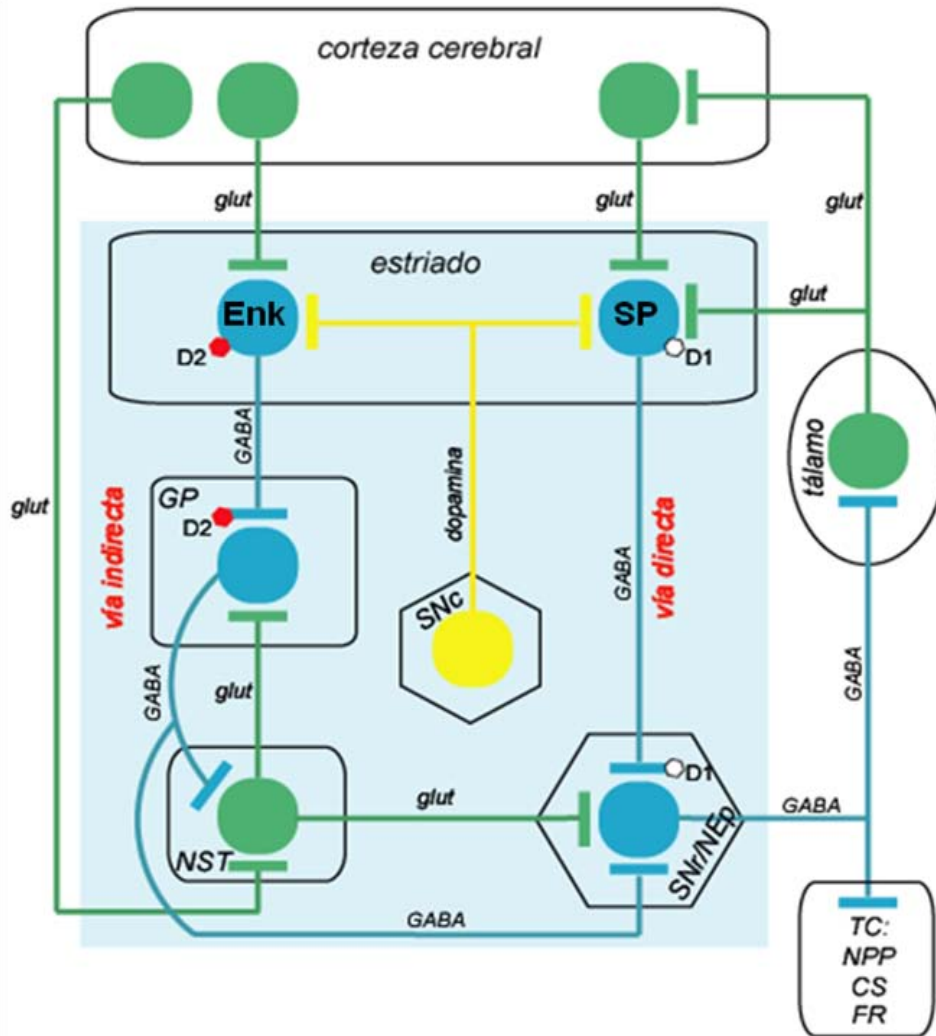


Figura 2. Esquema simplificado del modelo actual de los circuitos de los ganglios basales. En el estriado convergen aferencias glutamatérgicas de la corteza y del tálamo, y dopaminérgicas de la sustancia negra parte compacta (SNpc). Las MSNs o de proyección del neostriado (NSt, núcleos caudado y putamen), envían proyecciones a otros núcleos de los GB: núcleos de salida como el globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra parte reticular (SNpr). Así, la información procesada regresa a la corteza motora, a través del tálamo, o es enviada a través del colículo superior (CS) a las vías descendentes del tallo cerebral (TC), como los núcleos pedúnculo pontinos (NPP) y el tectum y la formación reticular (FR). Otra parte de las eferencias glutamatérgicas del núcleo subtalámico (NST) son enviadas al globo pálido externo (GPe), que establece conexiones recíprocas con el núcleo subtalámico (NST). El NST proyecta a los núcleos de salida (GPi y SNpr) y también recibe aferencias de la corteza. Las conexiones en color verde indican las proyecciones excitatorias, las conexiones en color rojo las inhibitorias y la conexión en color amarillo (SNpc-NSt) indica el efecto excitador e inhibitorio de la DA sobre las neuronas del NSt.

Además de las MSNs, se localizan varios tipos de interneuronas en el NSt, las cuales representan el 5% de la población neuronal del núcleo en el roedor. Se han descrito tres clases de interneuronas: 1) Colinérgicas gigantes, que son las de mayor tamaño dentro del NSt, su soma es elongado, mide entre 50 y 60 μm de largo y entre 12 y 15 μm de ancho. Sus dendritas son lisas o ligeramente espinosas. 2) Las interneuronas GABAérgicas, fast spiking (FS) que son inmunorreactivas a parvalbúmina, proteína quelante de calcio (Ca^{2+}), su soma mide entre 10 y 30 μm . Sus dendritas son lisas en las regiones proximales y presentan varicosidades en zonas distales y 3) Las interneuronas GABAérgicas, low-threshold spiking (LTS) que son inmunorreactivas a somatostatina y al neuropéptido Y, además, expresan la enzima óxido nítrico sintetasa que se encarga de la síntesis de óxido nítrico. Son de tipo bipolar y su soma mide entre 10 y 12 μm de diámetro. Las tres clases de interneuronas muestran propiedades anatómicas y electrofisiológicas distintas, que se ilustran en la **figura 3** (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi et al., 1995; Bolam y Bennett, 1995; Bennett y Wilson, 2000).

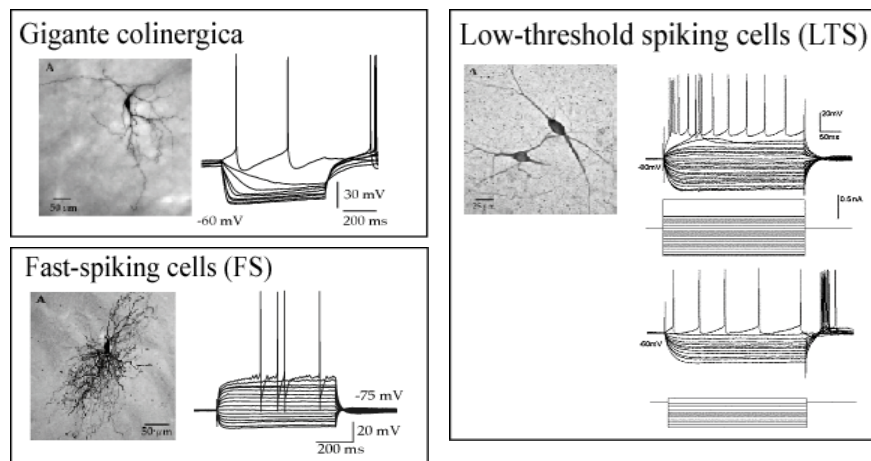


Figura 3. Características morfológicas y propiedades electrofisiológicas de los tres tipos de interneuronas presentes en el NSt.

1.1.2 Microcircuito córtico-estriatal

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

La principal aferencia sináptica a las MSNs proviene de las neuronas piramidales de las cortezas (sensorial, motora y de asociación). Es mediada por el neurotransmisor excitador ácido glutámico o glutamato, que actúa a través de receptores a NMDA y no-NMDA. Los receptores ionotrópicos N-metil-D-Aspartato (NMDA) y no NMDA α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiónico (AMPA) y kainato, median la respuesta postsináptica excitadora rápida del glutamato en la MSN. Los receptores a NMDA han sido implicados en la amplificación de respuestas sinápticas y oscilaciones del potencial de membrana de las MSNs a potenciales de membrana despolarizados (Galarraga et al., 1997; Cepeda et al., 1998; Flores-Barrera et al., 2009). Los receptores-canal AMPA/Kainato dan las respuestas sinápticas rápidas, mientras que los receptores a NMDA, contribuyen a la generación de potenciales en meseta y dendríticos (Bargas et al., 1991; Vergara et al., 2003; Flores-Barrera et al., 2009) pues activan conductancias dependientes de voltaje.

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

Los potenciales postsinápticos excitadores, del inglés *excitatory postsynaptic potentials* o EPSPs, se originan por la activación sináptica química de receptores glutamatérgicos, pero pueden ser amplificados por conductancias de Ca^{2+}

dependientes de voltaje situadas en las dendritas de las MSNs. Este fenómeno fue demostrado registrando la actividad sináptica en presencia de QX-314 aplicado intracelularmente, un bloqueador de canales de sodio (Na^+), en estas condiciones se presentaron respuestas sinápticas despolarizantes lentas y potenciales en meseta (Bargas et al., 1991), que disminuyen al bloquear a los canales de Ca^{2+} tipo L o Ca_v1 (Galarraga et al., 1997). Los componentes dependientes de Ca^{2+} de los EPSPs, relacionados con respuestas sinápticas lentas son: potenciales de acción dependientes de Ca^{2+} , prepotenciales rápidos y espigas parciales. La sustitución de Ca^{2+} por estroncio (Sr^{2+}) favorece el incremento en la duración de la respuesta lenta, además, se presentan potenciales de acción lentos debido a que el Sr^{2+} permea a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, por lo que las respuestas sinápticas lentas y los potenciales de acción lentos son dependientes de Ca^{2+} (Bargas et al., 1991).

Las MSNs también reciben conexiones sinápticas inhibitoras de las colaterales axónicas de otras MSNs y de interneuronas, las cuales son mediadas por el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) (Buchwald et al., 1973; Jiang y North, 1991; Guzmán et al., 2003; Wilson, 2004). Los potenciales postsinápticos inhibitorios, del inglés *inhibitory postsynaptic potentials* o IPSPs, tienen una duración corta (< 50 ms), son bloqueados con bicuculina, antagonista de receptores GABA_A , y están asociados a la apertura de canales de cloro (Misgeld et al., 1982; Kita et al., 1985; Jiang y North, 1991). La respuesta GABAérgica en las MSNs muestra un potencial de inversión alrededor de -65mV , por lo que la respuesta sináptica mediada por receptores GABA_A y registrada en las MSNs a potenciales de membrana de reposo de aproximadamente -85mV es despolarizante o excitadora, y sólo a potenciales de membrana más despolarizados es hiperpolarizante o inhibitora, **ver figura 4** (Jiang y North, 1991; Kita, 1996).

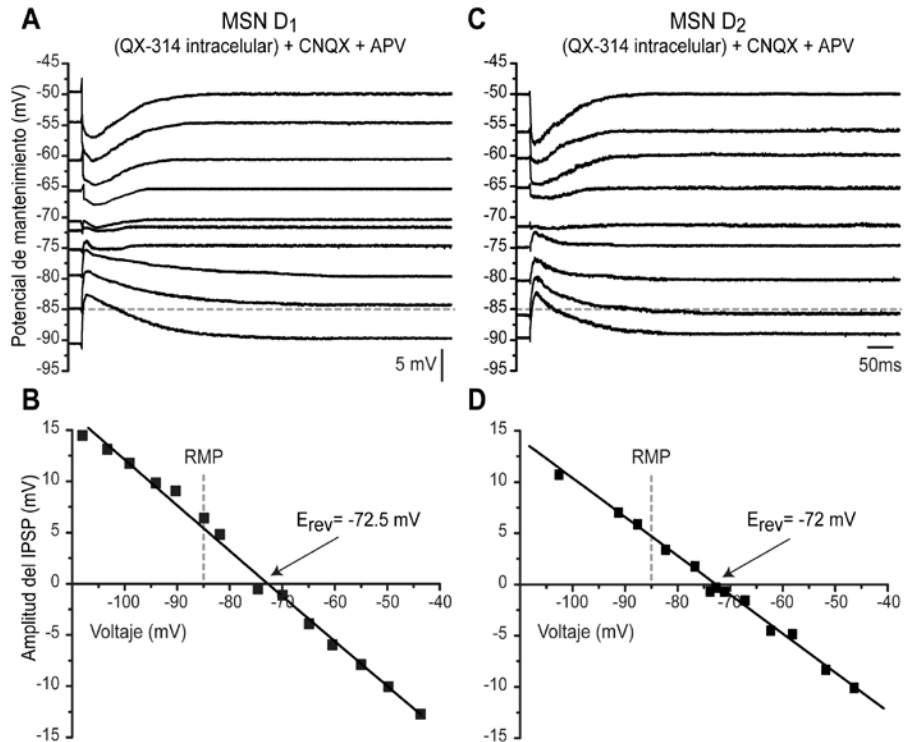


Figura 4. Potencial de inversión de la respuesta GABAérgica en MSNs de ratones *Drd1* y *Drd2*. Respuesta GABAérgica evocada por estimulación córtico-estriatal, en presencia de QX-314 y antagonistas glutamatergicos CNQX y APV. (A y C) Registros intracelulares en fijación de corriente de IPSPs a diferentes potenciales de mantenimiento. (B y D) Gráficas de la amplitud del IPSP en función del potencial de mantenimiento de los registros de A y C, respectivamente. Note que los IPSPs se invierten alrededor de -70 mV (flechas). Se muestra el potencial de membrana en reposo (RMP, línea punteada). Fuente directa.

Dado que las aferencias glutamatergicas provenientes de la corteza cerebral hacen contactos monosinápticos con las MSNs y las interneuronas del NSt (e.g., Kawaguchi et al., 1995), la respuesta córtico-estriatal involucra la activación de las MSNs, de las interneuronas (que a su vez tienen respuestas sinápticas sobre las MSNs) y de colaterales axónicas de otras MSNs activadas por la corteza. Como resultado de estas aferencias mono- y di-sinápticas, la estimulación córtico-estriatal puede generar respuestas sinápticas que duran cientos de milisegundos, capaces de disparar trenes de potenciales de acción (Bargas et al., 1991; Kita,

1996). Estas respuestas sinápticas incluyen entradas polisinápticas o reverberantes además de respuestas autorregenerativas intrínsecas, como se ilustra en la **figura 5B** (Wilson, 1986; Bargas et al., 1991; Kita, 1996; O'Donnell, 2003; Vergara et al., 2003; Tseng et al., 2007; Flores-Barrera et al., 2009) y son el primer paso para el procesamiento e integración del microcircuito estriatal (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a).

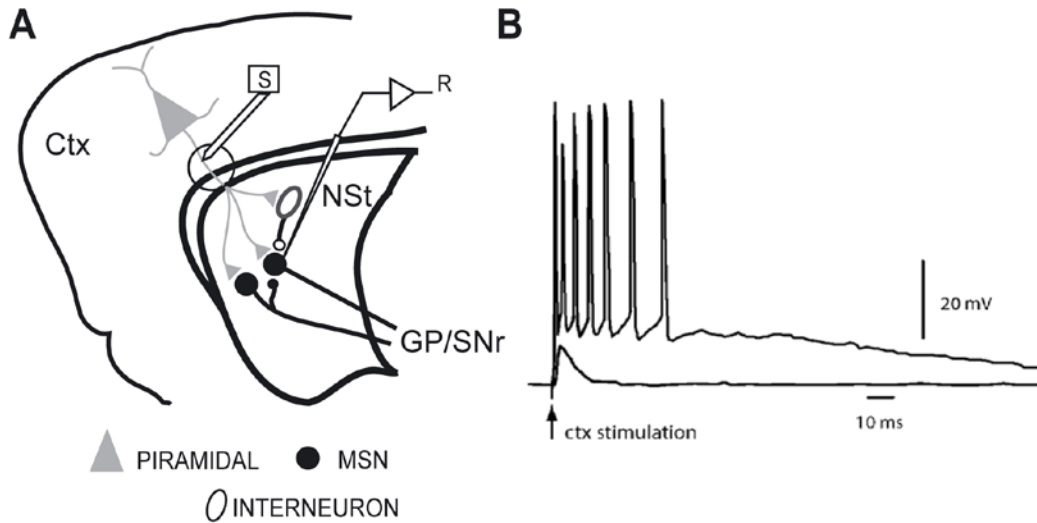


Figura 5. Microcircuito y respuesta córtico-estriatal. (A) Esquema de los componentes del microcircuito córtico-estriatal. Los triángulos representan las aferentes provenientes de la corteza (**Ctx**) dentro del neostriado (**NSt**), los círculos representan a las MSNs. Observe que se conectan entre sí constituyendo una entrada inhibitoria para la neurona que se registra. El óvalo simboliza a los diferentes tipos de interneuronas GABAérgicas presentes en el microcircuito y que también hacen contacto con las MSNs. Se muestran los electrodos de estimulación (S) colocado a nivel de la corteza cerebral y de registro (R) situado en el NSt, registrando una MSN (Flores-Barrera et al., 2009). (B) Respuesta sináptica a un estímulo subumbral y supraumbral en corteza de una MSN del NSt. Note el potencial en meseta con disparo repetitivo después del estímulo supraumbral (modificada de: Vergara et al., 2003).

1.2 Patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas

Se ha demostrado que las MSNs aumentan su tasa de disparo durante la realización de movimientos voluntarios y durante la presentación de pistas sensoriales que indican al animal el momento de realizar una conducta (Wilson, 1993; Cepeda y Levine, 1998; Nicola et al., 2000; Kravitz et al., 2010).

Los registros intracelulares de MSNs *in vivo*, han mostrado dos estados funcionales en la excitabilidad de las MSNs (**ver figura 6**): uno activo, en donde se observa disparo neuronal a potenciales despolarizados (≈ -50 mV) denominado *up-state* y un estado inactivo o silente, a potenciales hiperpolarizados (≈ -80 mV) llamado *down-state* (Wilson, 1993; Stern et al., 1998).

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

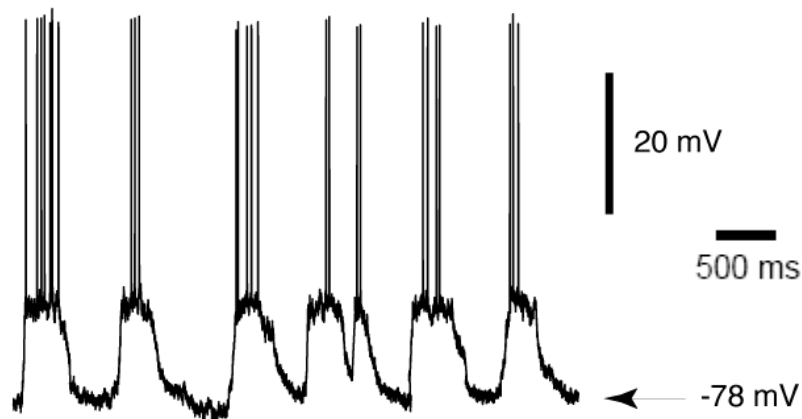


Figura 6. Registros intracelulares de las fluctuaciones espontáneas en el potencial de membrana y el disparo de una MSN *in vivo*. La generación de potenciales de acción ocurre durante los *up-states*. Los estados despolarizados son interrumpidos por cambios hacia el *down-state* cercano al potencial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

Despolarizaciones similares pueden acontecer durante la ejecución de movimientos (Mahon et al., 2006) y después de administrar NMDA, agonista de receptores a glutamato tipo NMDA, en preparaciones *in vitro* (Vergara et al., 2003).

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

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

motores o procedimientos. Lo relevante de este esquema o modelo, a nivel celular, es cómo la entrada sináptica cortical se combina con las conductancias iónicas intrínsecas para dar un *up-state*.

1.3 Corrientes de calcio

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

En las MSNs se han identificado varios tipos de canales de Ca^{2+} : L, N, P/Q y R. Los cuales son dependientes de voltaje y se activan a diferentes potenciales de membrana (Bargas et al., 1994; Mermelstein et al., 1998). Las corrientes de Ca^{2+} generadas por estos canales, confieren diferentes características al patrón de disparo de la MSN. Las corrientes de Ca^{2+} de tipo L, contribuyen con una despolarización lenta que facilita el disparo repetitivo de la MSN (Hernández-López et al., 1997; Pérez-Garci et al., 2003b), **ver figura 7**. En cambio, el Ca^{2+} que fluye por los canales N y P/Q, activa corrientes salientes de potasio de tipo SK y BK, lo que determina el postpotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue a un potencial de acción (Vilchis et al., 2000; Pérez-Garci et al., 2003b), y por tanto reprimen el disparo. Así que el Ca^{2+} que fluye a través de los distintos canales de Ca^{2+} presentes en las MSNs, puede excitar o inhibir dependiendo de cual sea su función fisiológica asociada.

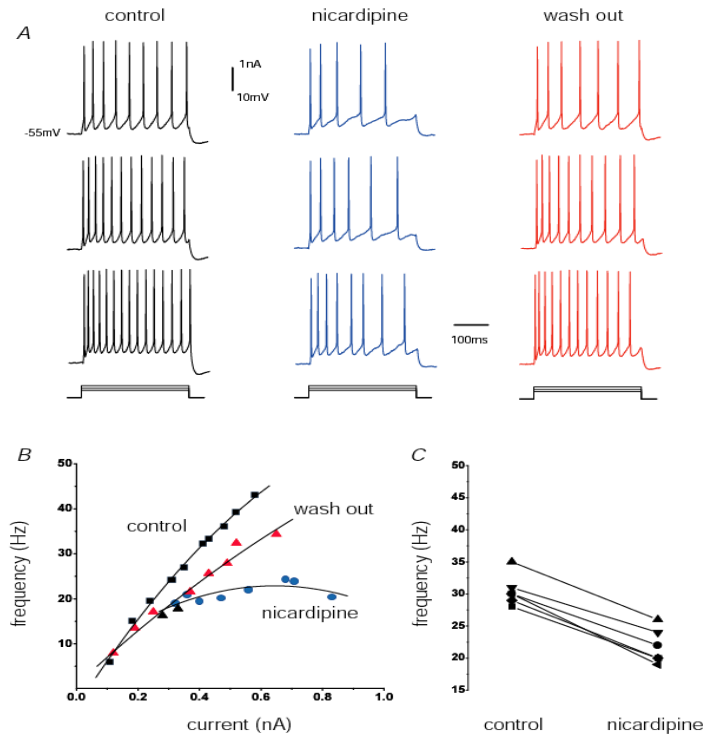


Figura 7. Participación de canal de calcio tipo L en el disparo de la MSN. (A) Trenes de potenciales de acción evocados por la inyección de pulsos de corriente de intensidad creciente, en condición control (columna izquierda), en presencia de nicardipina (antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo L, columna central) y la recuperación de la frecuencia después del lavado (wash out, columna derecha). (B) Curva intensidad-frecuencia (I-F). Note la reducción en la frecuencia de disparo después del bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L, y su recuperación después del lavado. (C) Muestra experimental de MSNs graficando la frecuencia a la mitad de la curva I-F, en control y en presencia de nicardipina (Pérez-Garci et al., 2003a).

1.4 Clases de receptores a dopamina

Los sistemas dopaminérgicos han sido el foco de atención desde hace varias décadas, debido a que diversas condiciones patológicas han sido relacionadas principalmente a una desregulación de la transmisión dopaminérgica. Estas son: la Enfermedad de Parkinson, la Enfermedad de Huntington (HD), el déficit de atención con desorden hiperactivo (ADHD), la esquizofrenia, el síndrome de Tourette, la hiperprolactinemia, así como los efectos psicomotores generados por el abuso de drogas (opiáceos, cocaína, anfetaminas y alcohol) entre otros (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000).

Existen al menos cinco genes que codifican para los receptores dopaminérgicos de las clases D_1 y D_2 y todos son expresados en el NSt. Las MSNs son el blanco principal de las aferentes dopaminérgicas provenientes de la SNpc. A pesar de la importancia de esta inervación, el impacto de la DA sobre la excitabilidad de las MSNs ha sido controversial, debido a la carencia de agonistas y antagonistas específicos que han impedido discriminar entre los efectos producidos por los miembros de una misma clase.

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

En 1979 Keabian y Calne, por medio de estudios bioquímicos y farmacológicos, propusieron la existencia de dos clases de receptores a DA: el D_1 acoplado positivamente a la enzima adenilato ciclasa (AC) y el D_2 acoplado negativamente. Posteriormente, mediante técnicas de clonación se pudieron caracterizar distintos tipos de receptores a DA pertenecientes a éstas dos clases, por sus características fisiológicas, farmacológicas y su secuencia aminoacídica. La clase D_1 está formada por los receptores de los tipos D_1 y D_5 que estimulan a la AC. La clase D_2 está constituida por los receptores de los tipos D_2 , D_3 y D_4 que inhiben a la AC (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000; Sealfon y Olanow, 2000).

1.4.1 Farmacología de los receptores a dopamina

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

Los ligandos dopaminérgicos existentes permiten discriminar entre los receptores a DA de las clases D_1 y D_2 . Sin embargo, no son lo suficientemente selectivos

para discriminar entre los miembros de la misma clase (Vallone et al., 2000). Esto ha llevado a conclusiones contradictorias, por ejemplo, en estudios de hibridación *in situ* se muestra la segregación de las clases de receptores a DA en diferentes poblaciones neuronales (Gerfen et al., 1990; Le Moine y Bloch, 1995). Sin embargo, los estudios farmacológicos encuentran respuestas a las dos clases de receptores en la misma célula (Surmeier et al., 1996; Pérez-Garci et al., 2003a; Salgado et al., 2005).

La afinidad de la DA es mayor para los receptores de la clase D_2 con una constante de afinidad (K_D) menor a 50 nM. Mientras que la K_D está entre 0.5 y 5 μ M para los D_1 (Missale et al., 1998). Además, no ha sido posible diferenciar farmacológicamente a los receptores D_1 de los D_5 , aún cuando se ha descrito que los receptores D_5 son 10 veces más afines por la DA que los D_1 (Seeman y Van Tol, 1994). Por otra parte, los receptores D_2 , D_3 y D_4 presentan afinidades muy similares por la DA (Vallone et al., 2000) y sólo muy recientemente han aparecido ligandos selectivos.

El quinpirole y quinolorane se encuentran entre los agonistas más selectivos para los receptores a DA de la clase D_2 . El quinpirole tiene una K_D de 576 nM para la isoforma D_2 y una K_D de 5.1 nM para la isoforma D_3 , además posee una K_D de 46 nM para la isoforma D_4 (Sokoloff et al., 1990). El quinolorane por otro lado tiene una K_D de 341 nM para el receptor D_2 y de 3.6 nM para el receptor D_3 (Foreman et al., 1989; Sokoloff et al., 1992). Estos dos agonistas presentan hasta 100 veces mayor afinidad por los receptores D_3 en comparación con la isoforma D_2 . Dentro de la familia de las benzazepinas se encuentran los agonistas selectivos para los receptores D_1 , uno de los más potentes es el SKF81297, que posee una K_D de 2.2 nM y en ensayos farmacológicos una EC_{50} de 18 nM para estimular a la enzima AC. Este mismo agonista posee una K_D de aproximadamente 10 μ M para los receptores D_2 (Andersen y Jansen, 1990).

1.4.2 Localización de los receptores dopaminérgicos en el neostriado

Por medio de la distribución del ARNm de los receptores dopaminérgicos sensado con técnicas de hibridación, se ha determinado la localización de los distintos tipos de receptores a DA en el sistema nervioso central (Sokoloff y Schwartz, 1995). La hibridación *in situ* realizada en el NSt mostró que las MSNs de la vía directa o estriato-nigral, contienen grandes cantidades del ARNm que codifica para el receptor tipo D₁. Sólo el 17% de estas neuronas expresa ARNm para el receptor tipo D₂. Por otra parte, neuronas de la vía indirecta o estriato-palidal, expresan ARNm para el receptor tipo D₂ y un bajo porcentaje para el receptor tipo D₁ (Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1991). A partir de estos resultados se sugirió que los receptores dopaminérgicos están segregados: los receptores D₁ en MSNs de la vía directa y los receptores D₂ en MSNs de la vía indirecta.

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

1.5 Vías de señalización intracelular asociadas a la activación de receptores dopaminérgicos

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

Una vez que la DA se une a sus receptores promueve la activación de proteínas G heteroméricas ($G_{\alpha\beta\gamma}$) a las cuales se encuentran acoplados. La hidrólisis de GTP en GDP en la subunidad G_{α} ocasiona la separación de las subunidades G_{α} y $G_{\beta\gamma}$, estas últimas activan o inhiben diferentes proteínas hasta llegar a sus efectores, que pueden ser regulados por fosforilación a través de proteínas cinasas y desfosforilación por proteínas fosfatasas (Missale et al., 1998).

Los receptores a DA de la clase D_1 acoplados a proteínas G_s , G_{olf} activan a la AC y aumentan los niveles de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) en MSNs. Por otra parte, los receptores de la clase D_2 , acoplados a proteínas $G_{i/o}$ (sensibles a la toxina pertusis) inhiben a la AC y por lo tanto reducen los niveles de AMPC intracelular (Missale et al., 1998). Los receptores dopaminérgicos también activan la vía de fosfoinosítidos a través de proteínas G_q (Hernández-López et al., 2000).

1.5.1 Vía de señalización asociada a receptores dopaminérgicos de la clase D_1

La vía de señalización activada al estimular los receptores dopaminérgicos de la clase D_1 aumenta las corrientes de Ca^{2+} tipo L en las MSNs. El receptor dopaminérgico de la clase D_1 está acoplado a una proteína G_s o G_{olf} , capaces de estimular a la AC. La activación de la AC eleva los niveles de AMPC citosólicos, los cuales activan a la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) para promover su disociación en las subunidades reguladora y catalítica (Snyder et al., 1998). La PKA activa tiene varios efectos, entre ellos, la fosforilación del canal de Ca^{2+} tipo L. Además fosforila y activa a un inhibidor endógeno de fosfatasas, el

DARPP-32 (fosfoproteína regulada por AMPc y dopamina de 32,000 daltones, del inglés *Dopamine and cAMP Regulated Phospho Protein of 32kDa*) (Svenningsson et al., 2004; Nishi et al., 1997; Greengard et al., 1998; Fienberg et al., 1998). Una vez activo, el DARPP-32 fosforila e inhibe a la proteína fosfatasa 1c (PP1c). La inhibición de la PP1c permite a los diferentes efectores (como por ejemplo el canal de Ca^{2+}) permanecer más tiempo fosforilados, por la PKA, **ver figura 8** (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 2000). Si las fosfatasas están activas, la fosforilación por PKA es transitoria y rápidamente revertida, pues PKA también fosforila y activa a varias fosfatasas (Nishi et al., 1997; Hernández-López et al., 2000). Así, PKA comienza y también termina o revierte su propia acción, a menos que active al DARPP-32 para retardar sus efectos. El DARPP-32 es la proteína del cerebro que más se fosforila por la acción de la DA y la concentración más alta se encuentra en las MSNs, que cuantitativamente, pueden considerarse los principales blancos de acción de éste neurotransmisor modulador (Greengard et al., 1998; Svenningsson et al., 2004; Greengard P, 2001). El efecto de la fosforilación de los canales de Ca^{2+} tipo L es el de amplificar los estímulos despolarizantes y por lo tanto facilitar el disparo de las MSNs. Sin embargo, como estos canales se activan a potenciales despolarizados y cercanos al umbral de disparo éste efecto no se observa cuando la célula está en el potencial de reposo (-85 mV), sólo se observa si la neurona ha sido previamente despolarizada (Hernández-López et al., 1997; Galarraga et al., 1997).

La vía de señalización de los receptores D_1 , también actúa sobre canales de potasio activados a potenciales de membrana hiperpolarizados (< -80mV), los cuales median la rectificación entrante en las MSNs (Pacheco-Cano et al., 1996; Mermelstein et al., 1998). Por lo tanto, la DA disminuye la frecuencia de disparo cuando su acción se observa desde un nivel hiperpolarizado, donde los canales rectificadores de potasio están activos (Hernández-López et al., 1997). Así tenemos el caso de un neurotransmisor que es inhibitor a potenciales hiperpolarizados y excitador a niveles despolarizados. Además, la DA disminuye las corrientes de sodio en las MSNs, a través de la vía AMPc-PKA-canal debido a

la fosforilación directa del canal (Nicola et al., 2000). En neuronas piramidales de la corteza prefrontal la activación de receptores D_1 disminuye las corrientes transitorias de sodio, pero no las corrientes persistentes del mismo (Maurice et al., 2001), a través de la misma vía. Las acciones dopaminérgicas sobre ciertas corrientes tienden a dificultar el disparo, mientras que otras tienden a facilitarlas.

1.5.2 Vía de señalización asociada a receptores dopaminérgicos de la clase D_2

La vía de señalización activada al estimular los receptores dopaminérgicos de la clase D_2 reduce la corriente de Ca^{2+} tipo L, produciendo la disminución en la excitabilidad neuronal (Hernández-López et al., 2000). Éste es un efecto contrario al de los receptores D_1 , por lo que el mismo neurotransmisor puede tener efectos opuestos sobre el mismo efector molecular dependiendo de cual receptor se active. Esta modulación es mediada por la activación del complejo $\beta\gamma$ de la proteína Gq, que activa a la isoforma $\alpha 1$ de la fosfolipasa C (PLC). La activación de la PLC aumenta los niveles intracelulares del segundo mensajero Inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3), que promueve la movilización de Ca^{2+} de las pozas intracelulares así como del diacilglicerol (DAG). El aumento del Ca^{2+} intracelular activa a la proteína calcio-calmodulina (Ca-CaM) que a su vez activa a la proteína fosfatasa 2 B (calcineurina o PP-2B). Esta fosfatasa es la que desfosforila al canal de Ca^{2+} tipo L (Hernández-López et al., 2000). Por otro lado, el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC). La activación de receptores D_2 reduce corrientes de sodio en las interneuronas colinérgicas neostriatales a través de la fosforilación por PKC (Maurice et al., 2004).

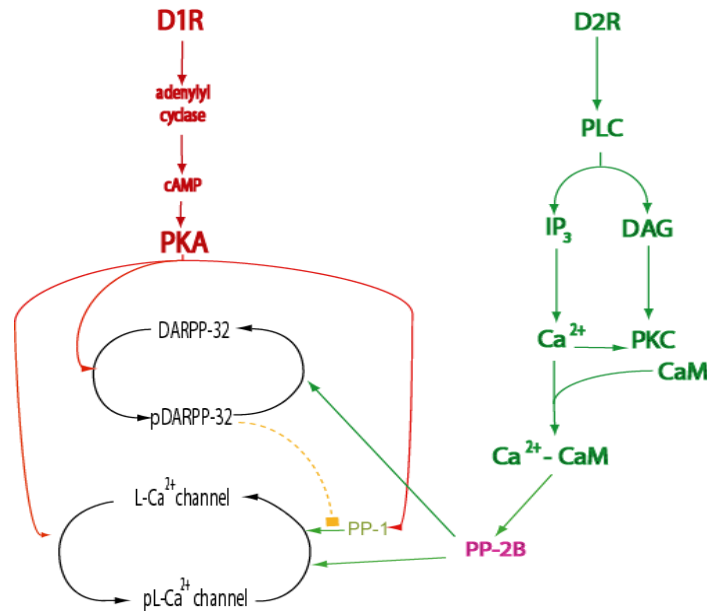


Figura 8. Vías de señalización relacionadas con la activación de receptores a dopamina de las clases D_1 y D_2 . Los receptores de la clase D_1 , a través de la vía AMPc/PKA, estimulan la fosforilación de diferentes proteínas efectoras (e.g., canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc.). Pero la PKA también fosforila a proteínas fosfatasas, como la PP-1, que acaban la acción de la misma PKA, haciendo que la misma sea transitoria. Sin embargo, cuando la PKA activa a DARPP-32, este se convierte en un potente inhibidor de la PP-1, manteniendo el canal en el estado fosforilado. Así, sólo si se inhiben las fosfatasas hay acción de la DA sobre los canales de Ca^{2+} y por tanto se facilita el disparo. En contraste, la activación de receptores D_2 comienza con la activación de PLC, que a su vez produce IP_3 , DAG y aumento del Ca^{2+} intracelular. Este último activa a la Ca-CaM, que a su vez activa a la PP-2B, misma que desfosforila directamente al canal de Ca^{2+} y a DARPP-32, desinhibiendo a PP-1 y reduciendo aún más la corriente de Ca^{2+} lo que reprime el disparo (Nishi et al., 1997; Hernández-López et al., 2000).

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

1.6 Efectos dopaminérgicos sobre el disparo de las neuronas espinosas medianas

En registros intracelulares de MSNs obtenidos a potenciales de mantenimiento despolarizados (-55mV) la activación de receptores a DA de la clase D_1 produce un incremento en la frecuencia de disparo que es revertido por la nicardipina, antagonista de canales de Ca^{2+} tipo L, **ver figura 9**, (Hernández-López et al., 1997).

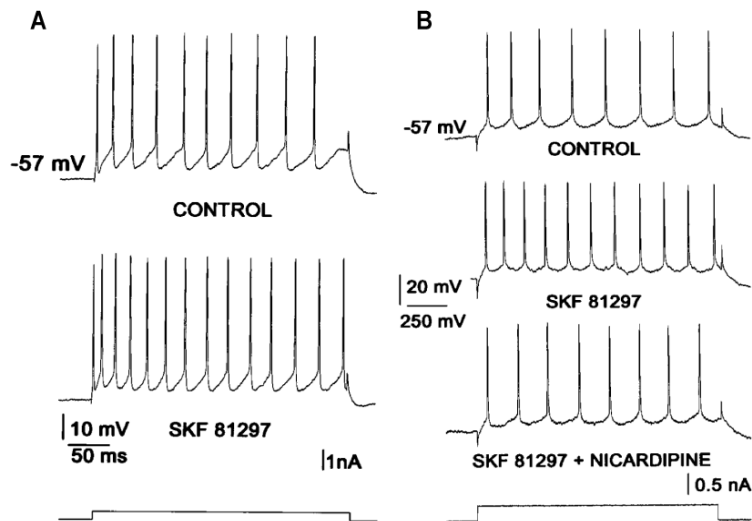


Figura 9. Aumento en la frecuencia de disparo por activación de receptores a DA tipo D_1 . (A) Trenes de potenciales de acción producidos por un pulso rectangular de corriente despolarizante a un potencial de membrana de -57mV en condición control y después de la aplicación de SKF81297, agonista dopaminérgico D_1 , (trazo inferior de A), en la misma neurona. Note el aumento en el número de potenciales de acción ante el mismo estímulo. (B) El efecto del agonista dopaminérgico D_1 (comparar trazos superior y medio) se revierte al administrar nicardipina (trazo inferior) (Modificada de: Hernández-López et al., 1997).

El incremento en la frecuencia de disparo se explica por aumento en la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 2000), que generan despolarizaciones lentas persistentes durante la estimulación a -60 mV; donde la influencia de la rectificación entrante de potasio es mínima. La corriente de Ca^{2+} tipo L acerca el potencial de membrana hacia el umbral de disparo del potencial de acción y por lo tanto

aumenta la frecuencia de disparo. Esto ocurre aún cuando los receptores D_1 aumentan ligeramente la amplitud del PPH. El efecto puede ser ocluido por el agonista del canal de Ca^{2+} tipo L, BAY-K 8644 (Hernández-López et al., 1997). Los análogos de AMPc mimetizan el efecto producido por el agonista D_1 . La calciseptina, la nicanidipina y otras dihidropiridinas, bloqueadores de los canales de Ca^{2+} tipo L, bloquean el efecto dopaminérgico D_1 .

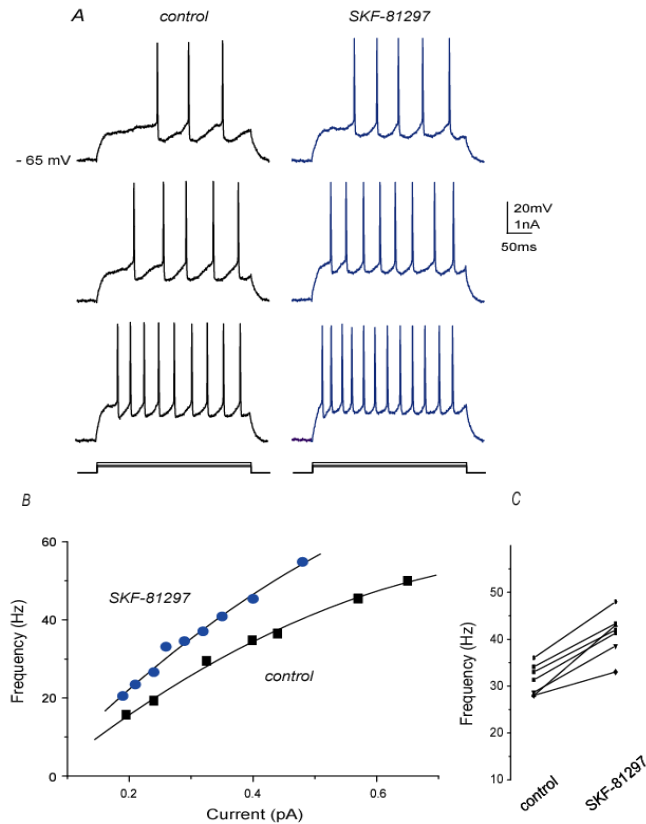


Figura 10. La activación de receptores dopaminérgicos D_1 incrementa la frecuencia de disparo de la MSN. (A) Trenes de potenciales de acción evocados por la inyección de corriente de intensidad creciente, en condición control (columna izquierda) y en presencia de SKF81297, agonista D_1 , (columna de la derecha). (B) Curva intensidad-frecuencia (I-F). Note el aumento en la frecuencia de disparo. (C) Muestra experimental de MSNs graficando la frecuencia a la mitad de la curva I-F, en control y en presencia del SKF81297 (Pérez-Garci et al., 2003a).

A diferencia de los receptores D_1 , la activación de los receptores de la clase D_2 provoca la disminución de las corrientes de Ca^{2+} tipo L, en los potenciales de Ca^{2+} inducidos por tetraetilamonio (TEA, bloqueador de canales de potasio) y en

corrientes de Ca^{2+} aisladas registradas en MSNs disociadas. Esto disminuye la frecuencia de disparo (**figura 11**) y las despolarizaciones persistentes a potenciales despolarizados; aún cuando la amplitud del PPH se reduce ligeramente en algunas células (Pérez-Garci et al., 2003b), ya que los agonistas D_2 reducen las corrientes de Ca^{2+} tipo P/Q (Salgado et al., 2005), necesarias para facilitar las corrientes de potasio activadas por Ca^{2+} que generan el PPH. Se requiere bloquear a las corrientes P/Q y N para realmente reducir el PPH (Pérez-Garci et al., 2003b).

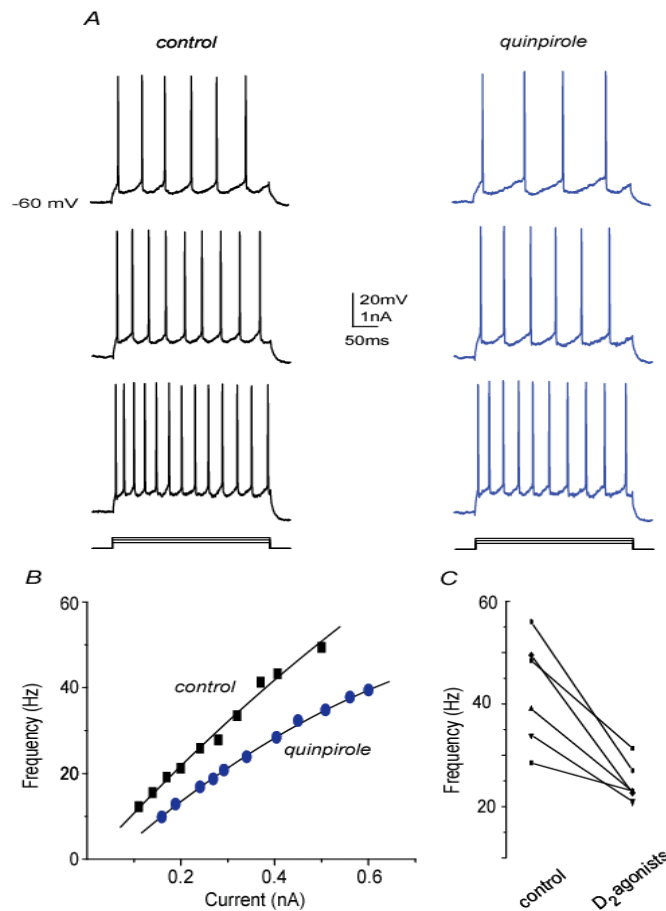


Figura 11. La activación de receptores dopaminérgicos D_2 disminuye la frecuencia de disparo de la MSN. (A) Trenes de potenciales de acción evocados por la inyección de corriente de intensidad creciente, en condición control (columna izquierda) y en presencia de quinpirole, agonista D_2 , (columna de la derecha). (B) Curva intensidad-frecuencia (I-F). Note la reducción en la frecuencia de disparo. (C) Muestra experimental de MSNs graficando la frecuencia a la mitad de la curva I-F, en control y en presencia de quinpirole (Pérez-Garci et al., 2003a).

1.7 Modulación dopaminérgica de las respuestas sinápticas

La localización de los diferentes receptores a DA en las MSNs pertenecientes a la vía directa e indirecta de los GB (Gerfen, 2000) ha llevado a la idea de que la actividad balanceada en estas dos vías es regulada por acciones opuestas de la DA de acuerdo a la “hipótesis de las dos vías de salida” (Albin et al., 1989; Mink, 2003; Redgrave et al., 2010). Los registros en fijación de corriente y de voltaje en células individuales han confirmado parcialmente esta hipótesis. La activación del receptor de la clase D_1 (D_1R) facilita el disparo, aumentando la corriente de Ca^{2+} Ca_v1 (L) en MSNs de la vía directa, mientras que la activación del receptor de la clase D_2 (D_2R) reprime el disparo, por la disminución de la misma corriente en MSNs de la vía indirecta (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 1997; 2000). Por tanto, la DA promueve el movimiento facilitando la vía directa y previniendo la actividad en la vía indirecta (Bateup et al., 2010; Kravitz et al., 2010). Los receptores a DA usan diferentes cascadas de señalización cuyo blanco son los canales de Ca^{2+} Ca_v1 (L) (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 1997; 2000).

Sin embargo, aunque en experimentos de estimulación somática pueden registrarse diferencias claras en las acciones de la DA (Surmeier et al., 1995; 2007; Galarraga et al., 1997; Hernández-López et al., 1997; 2000; Salgado et al., 2005), éstas no han sido observadas en condiciones fisiológicas como las respuestas sinápticas córtico-estriatales (Flores-Barrera et al., 2010), es decir, cuando las neuronas están embebidas en su abundante red polisináptica donde pueden derivarse efectos indirectos (Albin et al., 1989; Mink, 2003; Flores-Barrera et al., 2009; Bateup et al., 2010; Kravitz et al., 2010; Redgrave et al., 2010).

Se sabe que entre los principales efectores moleculares de la señalización dopaminérgica se encuentran los canales de Ca^{2+} (Surmeier et al., 1996; Hernández-López et al., 1997, 2000; Pérez-Garci et al., 2003a; Salgado et al., 2005), de sodio, los de potasio dependientes de voltaje y distintos receptores-canal de tipo ionotrópico como los glutamatérgicos (AMPA/KA y NMDA) y GABAérgicos ($GABA_A$) (Cepeda et al., 1993; Pisani et al., 2000; Tseng y

O'Donnell, 2004; Guzmán et al., 2003). Así es que las acciones de un neurotransmisor de este tipo pueden ser muy complejas; no pueden verse simplemente como excitación o inhibición.

Finalmente, la activación de receptores dopaminérgicos tiene acciones diferenciales sobre las respuestas glutamatérgicas (Cepeda et al., 1993; Levine et al., 1996; Cepeda y Levine, 1998; Flores-Hernández et al., 2002). La activación de receptores D_1 potencia las respuestas NMDA y AMPA aisladas o provocadas por estimulación de las aferentes córtico-estriatales. Este aumento puede ser amplificado por la activación de canales de Ca^{2+} , particularmente del tipo L (Galarraga et al., 1997; Cepeda y Levine, 1998; Flores-Hernández et al., 2002). La aplicación de forskolina (activador de la AC) y ácido okadaico (inhibidor de proteínas fosfatasas) aumentan la respuesta NMDA de manera similar a la activación de los receptores D_1 (Galarraga et al., 1997; Cepeda y Levine, 1998).

Por el contrario, la administración de quinpirole, agonista de receptores a DA de la clase D_2 también disminuye selectivamente los EPSPs mediados por AMPA, así como los provocados por la aplicación iontoforética de AMPA y glutamato (Cepeda y Levine, 1998; Hernández-Echeagaray et al., 2004).

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los modelos actuales del funcionamiento de los GB se basan en la segregación de las neuronas espinosas medianas de proyección (*medium spiny neurons* o MSNs) en la vía “directa” e “indirecta”, las cuales actúan en sentidos opuestos para controlar el movimiento (DeLong, 1990; Obeso et al., 2004; Kravitz et al., 2010). A la fecha no se ha descrito alguna diferencia electrofisiológica que pueda ser usada para identificar fácil e inequívocamente, durante el registro, la vía a la que pertenece la MSN registrada (Kreitzer and Malenka, 2007; Shen et al., 2007; Ade et al., 2008; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Valjent et al., 2009). Tampoco se han estudiado las acciones de la DA en las MSNs en condiciones fisiológicas como las respuestas sinápticas córtico-estriatales (Flores-Barrera et al., 2010, Surmeier et al., 1995; 2007; Galarraga et al., 1997; Hernández-López et al., 1997; 2000; Salgado et al., 2005), cuando las neuronas están embebidas en su abundante red polisináptica, (Albin et al., 1989; Mink, 2003; Flores-Barrera et al., 2009; Bateup et al., 2010; Kravitz et al., 2010; Redgrave et al., 2010).

En esta tesis se plantearon las siguientes preguntas

- (1) ¿Las respuestas córtico-estriatales de las MSNs de la vía directa (D₁-SP+) e indirecta (D₂-ENK+) son iguales o diferentes?
- (2) ¿Qué tanto interactúan las entradas sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas, con conductancias intrínsecas de calcio de las MSNs para generar la respuesta sináptica provocadas por la estimulación cortical?
- (3) ¿Qué cambios se pueden observar en las respuestas córtico-estriatales después de la depleción de DA estriatal?
- (4) ¿Cómo modula la dopamina la respuesta córtico-estriatal de las MSNs de la vía directa e indirecta?
- (5) ¿Puede la DA balancear la excitabilidad de las neuronas de proyección del estriado al actuar simultáneamente en ambas vías?

HIPÓTESIS

- La integración de la respuesta sináptica córtico-estriatal es diferente en neuronas espinosas medianas de las vías directa e indirecta.
- La respuesta sináptica córtico-estriatal se verá modificada en el modelo de rata hemiparkinsoniana.
- La integración de la entrada sináptica es modulada diferencialmente por la dopamina en las neuronas de proyección.

OBJETIVOS:

Comparar la respuesta sináptica al estimular la vía córtico-estriatal en el animal control con la obtenida en el animal hemiparkinsoniano en ambos tipos de MSNs.

- a) Estudiar la participación GABAérgica en la respuesta sináptica, al estimular la vía córtico-estriatal en el animal control con la obtenida en el animal hemiparkinsoniano.
- b) Estudiar la participación de la conductancia de calcio tipo L en la respuesta sináptica córtico-estriatal.
- c) Estudiar la modulación dopaminérgica sobre la respuesta ortodrómica supraumbral.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron registros intracelulares en la modalidad de fijación de corriente de MSNs del NSt dorsal, utilizando rebanadas sagitales de 350 μm de grosor de cerebro de ratones transgénicos con tecnología BAC (cromosoma artificial bacteriano, del inglés *bacterial artificial chromosome*) que expresan eGFP (proteína verde fluorescente, del inglés *enhanced green fluorescent protein*) bajo el control del promotor del receptor a DA tipo D₁ o D₂ (ratón BAC *Drd1*-eGFP o *Drd2*-eGFP) entre 60-90 días (PD 60-90) o de ratas macho Wistar de 90 días de edad (PD 90).

Para obtener las rebanadas se decapitó al animal para extraer el cerebro. Éste fue sumergido en líquido cerebroespinal artificial (LCA) a 4° C, constituido por (en mM): 127.5 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 11 glucosa (pH 7.4, 300mOsm/l), burbujeado continuamente con una mezcla gas carbógeno, 95% de O₂ y 5% de CO₂. Una vez transcurrido un minuto, al cerebro se le extrajo el cerebelo y el bulbo olfatorio. Mediante un corte sagital en la línea media se separaron los hemisferios. Cada hemisferio se adhirió por separado con cianocrilato al piso de una caja Petri colocada en un vibratomo (PELCO 101), y se obtuvieron rebanadas sagitales. Se seleccionaron las rebanadas con NSt dorsal y se incubaron en LCA burbujeado con carbógeno a temperatura ambiente por un periodo de 1 h para su recuperación (Bargas et al., 1991). Las rebanadas se colocaron en una cámara inmersión para el registro y se perfundieron por gravedad con LCA a una tasa de 1 ml/min a una temperatura de 33-35°C. Las neuronas fueron empaladas con microelectrodos de vidrio (borosilicato Frederick Haer & Co, Bowdoinham ME), llenados previamente con acetato de potasio 3M y biocitina al 1% (la resistencia d.c. fue de 80-120 M Ω). Los electrodos se elaboraron con un estirador de micropipetas horizontal (Sutter Instruments Co. P-87).

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

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

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

3.1 Respuestas córtico-estriatales

La estimulación cortical se realizó con un electrodo bipolar concéntrico (25–50 μm en la punta) colocado sobre la superficie de la rebanada a nivel de la corteza cerebral. La distancia entre los electrodos de registro y de estimulación fue entre 0.5 y 1 mm (**Figura 5**). Las respuestas sinápticas fueron evocadas por un pulso único de 0.1 ms de duración y de intensidad variable (8-30 V) a una frecuencia de 0.1Hz, producido por un estimulador (S-8800; Grass, West Warwick, RI, USA). La intensidad fue controlada mediante una unidad de aislamiento (Digitimer LTD, DS2A). El potencial de membrana fue mantenido a -80 mV mientras las respuestas córtico-estriatales fueron registradas. Una serie de pulsos de corriente de intensidad creciente fueron usados para determinar el umbral (15 ± 4 V) del potencial sináptico evocado y la amplitud de la respuesta a diferentes intensidades de estimulación. Una serie de estímulos (0.5x, 0.75x, 1x, 1.25x, 1.5x, 1.75x, 2.0x de corriente umbral) se utilizó para comparar las amplitudes de la respuesta, así como los efectos de los fármacos utilizados.

3.2 Visualización celular y confirmación de la identidad celular

Las MSNs del NSt dorsal de la vía directa e indirecta fueron identificadas por la expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP) usando microscopia de fluorescencia (expresión del receptor a DA tipo D₁ o D₂ en ratones *Drd1*-eGFP o *Drd2*-eGFP). Debido a que las respuestas electrofisiológicas de neuronas eGFP negativas de ratones *Drd1*-eGFP no pueden diferenciarse de las respuestas registradas de neuronas eGFP positivas de ratones *Drd2*-eGFP, y viceversa, sus mediciones fueron agrupadas. Por otra parte, la respuesta córtico-estriatal identificada como procedente de las MSNs de la vía directa e indirecta fue también confirmada en neuronas de rata. En todos los casos las neuronas fueron inyectadas con biocitina y muestras de neuronas fueron reaccionadas con anticuerpos para SP o ENK. Las preparaciones inmunocitoquímicas fueron visualizadas en un microscopio confocal (Guzmán et al., 2003). De acuerdo a lo establecido por inmunocitoquímica para SP o ENK y a su respuesta córtico-estriatal, se calculó la probabilidad de determinar la identidad de una neurona de rata, para la vía correspondiente (directa o indirecta). Para comprobar si la respuesta córtico-estriatal de las MSNs de la vía directa e indirecta cambian como resultado de la depleción de DA utilizamos un modelo de la Enfermedad de Parkinson, que consiste en la inyección unilateral de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) en la SNpc (ratas hemiparkinsonianas).

3.3 Lesión con 6-hidroxi-dopamina

Las ratas macho Wistar (PD 60-90) fueron anestesiadas con ketamina (85 mg/kg, i.p.) y xylazina (15 mg/kg, i.p) e inyectadas estereotáxicamente con 4 μ g de 6-OHDA (Sigma, St. Louis, MO, USA) en la sustancia negra parte compacta del hemisferio izquierdo (SN: 4.8 mm caudal, 1.6 mm lateral a bregma, y 8.2 mm ventral a la superficie del cráneo). La solución de 6-OHDA (4 μ g/ μ l salina con 0.2 mg/ml de ácido ascórbico) fue inyectada a una velocidad de 0.1 μ l/min. Los animales fueron seleccionados después de dos semanas, basados en su

comportamiento rotacional (anfetamina: 4 mg/kg i.p.; >500 giros ipsilaterales estereotipados) (Dunnett et al., 1981; Inaji et al., 2005). El número de animales utilizados en las muestras experimentales fue el mínimo posible para alcanzar la significancia estadística en los diversos paradigmas experimentales. En todos los procedimientos empleamos anestesia para evitar el sufrimiento de los animales.

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

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

3.4 Fármacos

Los siguientes fármacos fueron utilizados para la caracterización de la respuesta sináptica córtico-estriatal:

Antagonista de receptores-canal GABA_A: bicuculina metil-iodinada (10 μ M; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Antagonista de receptores-canal GABA_A: gabazina (10 μ M; Tocris, Ellisville, MO, USA).

Agonista selectivo inverso de receptores-canal GABA_A que contienen la subunidad α 5: L655-708 (10 μ M; Tocris, Ellisville, MO, USA).

Antagonistas de canales de calcio tipo L: nifedipina (2.5 μ M; RBI-Sigma St. Louis, MO) y calciseptina (400nM; Alomone Labs. Jerusalem-Israel).

Agonista del canal de calcio de tipo L o Ca_v1: Bay K 8644 (2.5 - 5 μ M; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Agonista de receptores a dopamina de la clase D₁: SKF-81297 (1-5 μ M; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Agonista de receptores a dopamina de la clase D₂: quinlorane (1-5 μ M; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Antagonista de receptores a dopamina de la clase D₁: SCH 23390 (1 μ M; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Antagonista de receptores a dopamina de la clase D₂: sulpiride (1 μ M; RBI-Sigma St. Louis, MO).

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

3.5 Procesamiento de los datos

Análisis de datos y estadística

El área bajo las respuestas sinápticas, se obtuvo por integración numérica y fue normalizada a la respuesta umbral. Se reportan los porcentajes de cambio de esta área. Los resultados son reportados como promedios \pm ESM. En las mismas células se compararon las muestras control y experimental con la estadística de distribución libre (Prueba T de Wilcoxon), con una significancia de $P < 0.05$. Se ajustó la siguiente función logística a los datos del área de la respuesta de voltaje o duración X la despolarización.

$$A(i) = \frac{A_{\max}}{1 + \exp(-k(i - ih))}$$

Donde $A(i)$ es la magnitud de la respuesta en función de la intensidad del estímulo normalizada a nivel umbral = 1, A_{\max} es el nivel de saturación o respuesta máxima, k es la pendiente de la función, i es la intensidad del estímulo en unidades umbral y normalizada al umbral = 1, e ih es la intensidad del estímulo necesaria para alcanzar la mitad de la respuesta máxima. Las diferencias entre los parámetros y sus errores de estimación se compararon con la prueba T de Student.

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

Los resultados obtenidos son pareados, es decir, en cada neurona registrada se compararon las respuestas en condición control y después de la adición de alguno o algunos de los fármacos. Por ello se utilizó la prueba no paramétrica de rangos asignados: T de Wilcoxon de dos colas (Siegel y Castellan 1995; Systat v.7.SPSS Inc., Chicago IL). Para obtener el componente sensible a cada droga utilizamos la substracción digital. Además utilizamos la prueba no paramétrica de X^2 de

Pearson, para determinar la variabilidad de las respuestas sinápticas (Downie y Heath, 1973).

Se realizó un modelo simplificado de una MSN en NEURON version 6.0 (Hines y Carnevale 1997, 2001) con las siguientes características, para simular la anatomía: un soma (longitud (L) = 16 μm , diámetro (diam) = 12 μm), con siete árboles dendríticos hechos de compartimientos cilíndricos. Cada árbol dendrítico formado por un tronco principal construido con 22 secciones (L, 40 μm ; con un diámetro disminuyendo de 5.5 a 1 μm en los primeros 4 μm y un diámetro liso disminuyendo de 1 a 2.4 μm hasta L), dos ramas secundarias construidas con ocho secciones (L, 73 μm ; con un diámetro decayendo de 2.4 a 1.68 μm), y cuatro ramas terciarias construidas con nueve secciones (L, 73 μm ; con un diámetro disminuyendo de 1.68 a 0.88 μm).

Para la simulación de la **figura 16F** se conectaron cuarenta y seis espinas dendríticas en las dendritas secundarias y terciarias, en los sitios de modelado de los contactos sinápticos glutamatérgicos. Cada espina consistió de dos compartimientos: el cuello (L, 1 μm ; diámetro 0.3 μm) y la cabeza (L, 1 μm ; diámetro 0.9 μm). Para las espinas no representadas el área fue compensada aumentando el diámetro y la longitud de los compartimientos dendríticos (Stratford et al., 1989), con el fin de coincidir con la superficie total dendrítica y de la espina en función de la distancia desde el soma y de acuerdo a estudios microscópicos de alto voltaje (Wilson et al., 1983). La estimulación córtico-estriatal supraumbral fue mimetizada por cierto número de entradas excitadoras e inhibitoras (ver resultados). La resistencia axial fue de 100 Ω/cm . La capacitancia específica de la membrana fue ajustada a 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Todas las simulaciones se realizaron a 35°C. El modelo celular incorpora modelos de canales iónicos que describen las corrientes: de fuga, Na_v1 , Ca_v1 , K_v1 , K_v4 , K_v7 , KCa_1 , KCa_2 , AMPA, NMDA, GABA, y un modelo para las dinámicas de calcio interno. El apéndice en la sección de información suplementaria contiene los detalles de este modelo de NEURON (Flores-Barrera et al., 2009).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Algunas características electrofisiológicas de las neuronas espinosas medianas

Las MSNs registradas presentaron un potencial de membrana en reposo promedio (\pm ESM) de: -83 ± 4 mV con una resistencia de entrada (R_N) de 46 ± 16 M Ω , $n=250$ (**figura 12**). Las neuronas presentan rectificación (es decir, la relación corriente-voltaje o “curva I-V” no es lineal **figura 12 B, D**). El retraso en la aparición del primer potencial de acción, va precedido por una rampa despolarizante en respuesta a la inyección de corriente catódica (cabeza de flecha **figura 12 A, C**). Estas características identifican a las MSNs (Bargas et al., 1989; Galarraga et al., 1989; 1994; Kerr y Plenz, 2002). Las curvas I-V (**figura 12 B, D**) se ajustaron a un polinomio de segundo orden cuya derivada en $I=0$ se tomaba como la R_N . No se encontraron diferencias significativas entre neuronas de la vía directa (**figura 12 A, B**) e indirecta (**figura 12 C, D**).

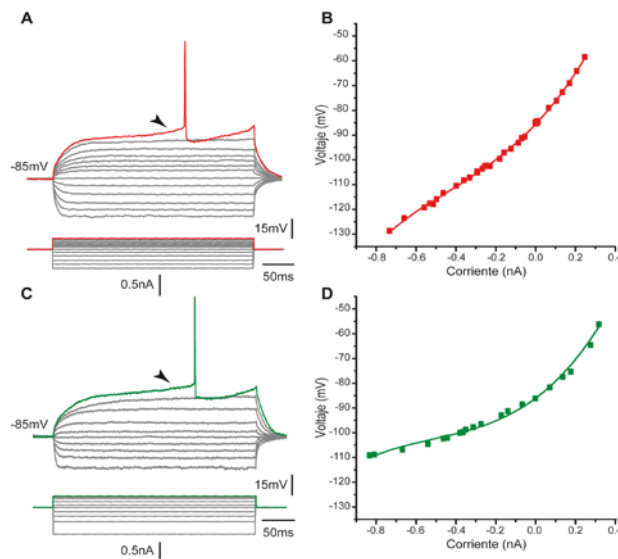


Figura 12. Identificación electrofisiológica de las MSNs. (**A, B**) Neurona de la vía directa. (**C, D**) Neurona de la vía indirecta. Respuestas del potencial de membrana (arriba) a la inyección de corriente somática (abajo) **A, C**. Relación corriente-voltaje o curva I-V. No es lineal, se le ajusta un polinomio de 2^o orden **B, D**.

A pesar de que en las MSNs se han reportado diferencias en la latencia para el disparo inicial, el umbral de disparo, los subtipos de rectificación entrante, la frecuencia de los eventos sinápticos espontáneos, su capacidad para desarrollar plasticidad sináptica de largo plazo después de la estimulación córtico-estriatal, y la composición de la subunidad de sus receptores GABAérgicos (Kreitzer y Malenka, 2007; Shen et al., 2007; Ade et al., 2008; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Valjent et al., 2009), ninguna de estas diferencias puede ser usada para identificar fácil e inequívocamente la vía a la que pertenece una MSN durante su registro.

Una vez identificadas las neuronas como MSN de acuerdo a sus características electrofisiológicas, obtenidas mediante estimulación somática (**figura 12**), se estimuló la corteza cerebral mediante la aplicación de un estímulo único utilizando un electrodo de estimulación bipolar concéntrico (25-50 μm de diámetro en la punta) para obtener las respuestas sinápticas córtico-estriatales (Bargas et al., 1991).

4.2 Las neuronas espinosas medianas D_1 y D_2 difieren en su respuesta córtico-estriatal supraumbral

Como ya se mencionó, las MSNs presentadas en este estudio fueron identificadas como pertenecientes a la vía directa (MSNs D_1 -SP+), basados en la expresión del receptor a DA D_1 identificado por la expresión de GFP (en ratones BAC PD 60-90), y por su inmunorreactividad a sustancia P (SP+; de ratón o rata). Un procedimiento similar se realizó para identificar a las neuronas de la vía indirecta (MSNs D_2 -ENK+): D_2 eGFP (de ratón BAC) e inmunorreactividad a ENK (ENK+; de ratón o rata) (ver materiales y métodos). La **figura 13** muestra las respuestas córtico-estriatales de una MSN *Drd1* eGFP típica (MSN- D_1) (**figura 13A**) y una MSN *Drd2* eGFP típica (MSN- D_2) (**figura 13B**). Son ilustradas las familias de respuestas córtico-estriatales subumbrales y supraumbrales de estas dos clases de neuronas. Se puede observar una diferencia notable entre las

respuestas: La respuesta de las MSNs-D₁ dura más que la de las MSNs-D₂, incluyendo las despolarizaciones subumbrales (gris) y supraumbrales con trenes de potenciales de acción (de color rojo para las MSNs-D₁ y verde para las MSNs-D₂) (**figura 13C** comparar, superior contra inferior). Los mismos resultados se obtuvieron en las neuronas de ratas SP+ o ENK+ de acuerdo a la misma respuesta electrofisiológica (ver materiales y métodos). El promedio de la duración a la amplitud media (duración media) de la respuesta supraumbral fue de: 250 ± 9 ms para las MSNs D₁-SP+ ($n = 55$) y de 124 ± 13 ms para las MSNs D₂-ENK+ ($n = 50$) (**figura 13D** superior e histograma en la **figura 13F**; $P < 0.001$). El promedio de la duración media de la respuesta subumbral también fue diferente, de 29 ± 3 ms para las MSNs D₁-SP+ y de 19 ± 2 ms para las MSNs D₂-ENK+ (**figura 13D** superior e histograma en la **figura 13G**; $P < 0.005$). Por otra parte, el área bajo la respuesta córtico-estriatal fue significativamente mayor en las MSNs D₁-SP+ que en las MSNs D₂-ENK+: $10,546 \pm 331$ mV·ms contra $5,987 \pm 427$ mV·ms, respectivamente (histograma en la **figura 13H**; $P < 0.001$). La **figura 13E1, E2** ilustra las mismas respuestas amplificadas: el tren de potenciales de acción en las MSNs D₁-SP+ dura más, pero alcanza una frecuencia de disparo promedio más baja que el tren de las MSNs D₂-ENK+: 138 ± 8 Hz contra 258 ± 11 Hz, respectivamente (histograma en la **figura 13I**, $P < 0.001$). Finalmente, en el caso de las MSNs D₂-ENK+, la respuesta supraumbral exhibe potenciales autorregenerativos intrínsecos en lugar del tren breve de espigas (en algunos ensayos durante el mismo experimento) (**figura 13E3**), lo que sugiere que esta propiedad intrínseca subyace al tren de potenciales de acción y da forma a la respuesta en las MSNs D₂-ENK+ (Bargas et al., 1991; Kita, 1996; Gruber et al., 2003; Vergara et al., 2003; Carter y Sabatini, 2004; Day et al., 2008; Flores-Barrera et al., 2009). Esta respuesta fue raramente vista en las MSNs D₁-SP+ en estas condiciones, pero fue fácilmente revelada en todas las MSNs D₂-ENK+, cuando se someten a hiperpolarización (Bargas et al., 1991), apoyando hipótesis previas de que la excitabilidad dendrítica, y por lo tanto, la integración córtico-estriatal es diferente en las MSNs D₁-SP+ y D₂-ENK+ (Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008).

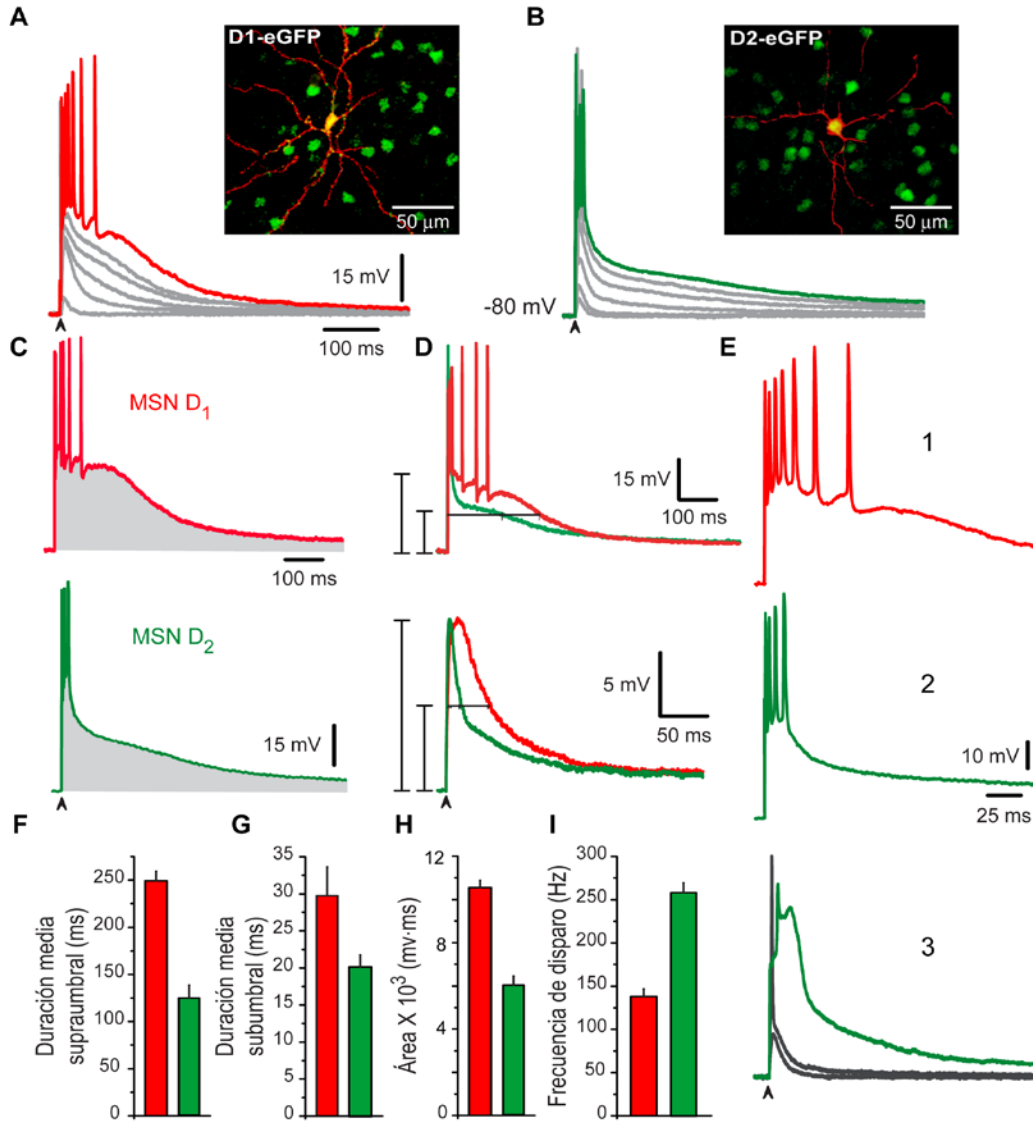


Figura 13. La respuesta córtico-estriatal es diferente en las MSNs-D₁ y D₂ de ratones BAC. (A, B) Familia de respuestas sinápticas subumbrales y supraumbrales de MSNs-D₁ (trazos rojos) y D₂ (trazos verdes) representativas. Los insertos muestran células registradas, marcadas con biocitina y positivas a la proteína verde fluorescente (GFP+). El color amarillo de las células registradas indica la sobreposición de las células D₁ eGFP (A) y D₂ eGFP (B) positivas, respectivamente. Note que la respuesta supraumbrales de las MSNs-D₁ es más prolongada y genera más potenciales de acción, mientras que la respuesta en las MSNs-D₂ sólo muestra una ráfaga inicial con disparo de alta frecuencia. El área bajo la respuesta (C, H) y duración media (D, F, G) son más pequeñas en las MSNs-D₂. Los histogramas resumen las mediciones de la duración media y el área bajo la respuesta sináptica en las muestras de MSNs-D₁ n=55 y MSNs-D₂ n=50, diferencias significativas. (E) Los trazos amplificados (1-3) ilustran la frecuencia de disparo en las MSNs-D₁ (1) y D₂ (2), además de la respuesta autorregenerativa en las MSNs-D₂ (3). (I) La frecuencia de disparo en las MSNs-D₂ fue más alta.

4.3 La contribución de la inhibición sináptica difiere en la respuesta córtico-estriatal de las neuronas de la vía directa e indirecta

Se sabe que las entradas inhibitorias de las colaterales axónicas que interconectan a las MSNs (Tunstall et al., 2002; Guzmán et al., 2003; Koos et al., 2004; Tecuapetla et al., 2005, 2007, 2009; Gustafson et al., 2006; Gertler et al., 2008) y de varios tipos de interneuronas GABAérgicas (Koos et al., 2004; Tecuapetla et al., 2007) contribuyen a la generación de la respuesta córtico-estriatal (dado que las interneuronas también son estimuladas por la corteza). Algunas diferencias en las acciones de las entradas GABAérgicas sobre las MSNs-D₁ y D₂ han sido descritas (Ade et al., 2008; Cepeda et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009; Gittis et al., 2010; Planert et al., 2010). Sin embargo, se desconoce la contribución de estas entradas GABAérgicas en las neuronas de proyección y si estas entradas GABAérgicas pudieran explicar las diferencias observadas en la respuesta córtico-estriatal. La **figura 14** muestra las diferencias funcionales importantes que pueden ser reveladas por la contribución de la inhibición en la respuesta supraumbral de las MSNs D₁-SP+ y D₂-ENK+. Los ejemplos representativos de la respuesta ortodrómica de las MSNs D₁-SP+ y D₂-ENK+ son mostrados en la **figura 14A, E** (control). La **figura 14B, F** muestra que la acción del antagonista del receptor GABA_A, bicuculina 10 μ M, es completamente diferente para cada respuesta: El bloqueo del receptor GABA_A en las MSN D₁-SP+ ($n = 24$) tuvo una acción dual (**figura 14B**): Al inicio de la respuesta produjo un aumento de la despolarización inicial y un incremento en la frecuencia de descarga evocada, sugiriendo que la despolarización inicial y el disparo están siendo restringidos por las entradas GABAérgicas que contribuyen a la respuesta (Flores-Barrera et al., 2009). Sin embargo, en la parte tardía de la respuesta la despolarización en meseta se redujo por el bloqueo del receptor GABA_A, lo que indica que las entradas GABAérgicas ayudan en el mantenimiento de la despolarización (inhibición despolarizante) (Gulledge y Stuart, 2003; Bartos et al., 2007; Mann y Paulsen, 2007; Flores-Barrera et al., 2009).

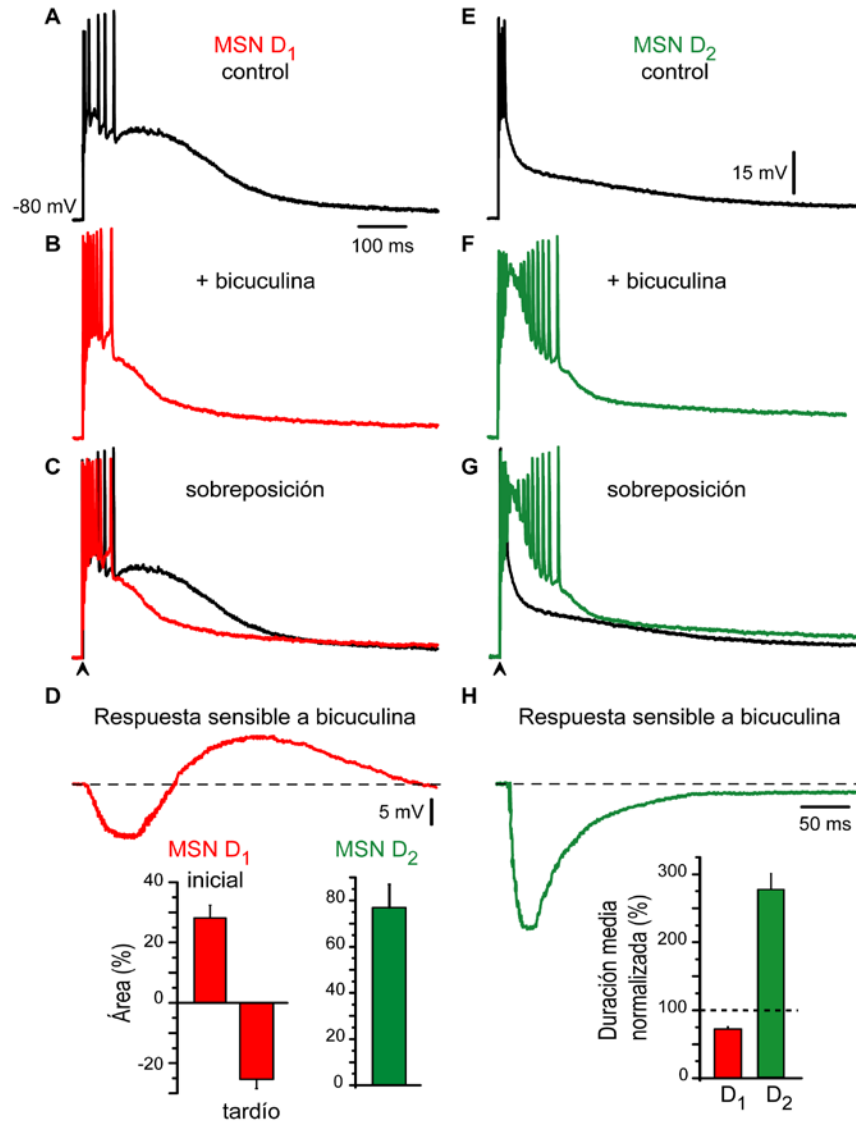


Figura 14. Diferente contribución de la inhibición sináptica en la respuesta córtico-estriatal de las MSNs-D₁ y D₂ de ratones BAC. (A, E) Respuesta córtico-estriatal supraumbral de una MSN-D₁ y D₂, respectivamente. **(B, F)** La adición de 10 μ M de bicuculina cambió las respuestas indicando la participación GABAérgica. **(C, G)** Los registros sobrepuestos muestran que el bloqueo GABAérgico reduce la respuesta en las MSNs-D₁ y aumenta la respuesta en las MSNs-D₂ (comparar **A** con **B** y **E** con **F**). Note la prolongación del tren de potenciales de acción e inactivación de algunas espigas en las MSNs-D₂. **(D, H)** Substracción digital de los registros de **(C)** y **(G)** revela el componente sensible a bicuculina en ambas clases neuronales, respectivamente. El componente sensible a bicuculina restringe la descarga inicial y despolariza a las MSNs-D₁. Los histogramas de los insertos **(D)** muestran que la bicuculina aumenta y deprime la respuesta en las MSN-D₁ (respuesta bifásica, barras rojas, n=24). Por el contrario, solo aumenta la respuesta en las MSNs-D₂ (barras verdes, n=22). De la misma manera, la duración media disminuyó y aumentó para las MSNs-D₁ y D₂ **(H)**, respectivamente.

La sobreposición (**figura 14C**: sobreposición de la **figura 14A, B**) y substracción de los registros (**figura 14D**; resta de la **figura 14A, B**) revela la acción dual del GABA en neuronas de la vía directa: el componente sensible a bicuculina primero hiperpolariza a la neurona con respecto al nivel de disparo, y después, despolariza a la neurona y ayuda en el mantenimiento de la despolarización tardía en la respuesta, los trazos sobrepuestos se cruzan entre sí (**figura 14C**). El porcentaje de la despolarización inicial (antes del cruce) y la hiperpolarización tardía (después del cruce) inducida por la bicuculina en la respuesta sináptica se resumen en el histograma del inserto (barras rojas) de la **figura 14D**: $28 \pm 4\%$ (inicial) y $-25 \pm 3\%$ (tardía) ($P < 0.002$).

Por el contrario, la bicuculina se comporta de manera diferente en la respuesta de las MSNs de la vía indirecta (comparar, **figura 14E, F**): esta despolariza la respuesta en su totalidad. La sobreposición de los registros antes y después de la bicuculina (**figura 14G**), no se cruzan entre sí. Y la substracción de ellos (**figura 14H**; la resta de la **figura E, F**) revela un componente sensible a bicuculina cuya acción persiste durante el trazo completo, es decir, la inhibición disminuye la amplitud de la respuesta todo el tiempo. El porcentaje de aumento en la despolarización después de la bicuculina fue de $76 \pm 10\%$ (**figura 14D** inserto (barras verdes); $n = 22$; $P < 0.002$) en la respuesta de las MSNs D_2 -ENK+. El número de potenciales de acción y la duración del tren también se incrementó. Sin embargo, algunas espigas se inactivaron debido a la cantidad de despolarización alcanzada en las MSNs D_2 -ENK+ después de la bicuculina. Esta gran despolarización refleja la respuesta autorregenerativa intrínseca (**figura 13E3**) que subyace al tren de potenciales de acción en la respuesta control de las MSNs D_2 -ENK+ (Bargas et al., 1991; Carrillo-Reid et al., 2009a, b) que es facilitada por la bicuculina. Por lo tanto, el resultado sugiere que el papel de la inhibición es restringir la excitabilidad dendrítica intrínseca en las MSNs D_2 -ENK+ (**figura 14G**) (Bargas et al., 1991; Carter y Sabatini, 2004; Day et al., 2008). El histograma en el inserto de la **figura 14H** compara la duración media (en porcentaje) de la respuesta de cada clase celular después de la bicuculina, con respecto a sus

propios controles (línea punteada): claramente, la respuesta de las MSNs D₁-SP+ decrecimiento en duración (249 ± 9 ms a 189 ± 2 ms; alrededor de 76%), mientras la respuesta en las MSNs D₂-ENK+ incremento en duración (124 ± 1 ms contra 238 ± 8 ms; aprox. 192%) durante la acción de la bicuculina. La aplicación de picrotoxina o gabazina tuvo las mismas acciones que la bicuculina (no mostrado).

Concluimos que el papel de la inhibición es diferente en la respuesta supraumbral córtico-estriatal de las MSNs de la vía directa e indirecta. En neuronas de la vía directa, la inhibición frena el disparo inicial, pero ayuda a mantener la despolarización en meseta. En neuronas de la vía indirecta, la inhibición tiene la función de suprimir la excitabilidad intrínseca a niveles dendríticos y por lo tanto el disparo de potenciales de acción (Bargas et al., 1991; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Flores-Barrera et al., 2009, 2010).

Si esta conclusión es correcta deberíamos distinguir diferentes funciones de la inhibición en las respuestas subumbrales, porque a intensidades de estimulación más bajas quizá seamos capaces de registrar respuestas intrínsecas despolarizantes no propagadas (Carter y Sabatini, 2004; Day et al., 2008). Para probar esta hipótesis, la contribución del componente sensible a bicuculina en la respuesta córtico-estriatal de neuronas de la vía directa e indirecta fue observado a diferentes intensidades de estimulación.

Los resultados se muestran en la **figura 15** (intensidades subumbral, umbral y supraumbral): a nivel subumbral (comparar, **figura 15A, E**), la bicuculina deprime las entradas sinápticas en las MSNs D₁-SP+, mientras que aumenta las entradas sinápticas en las MSNs D₂-ENK+. Note que los eventos sinápticos subumbrales en control (**figura 15A, E**, trazos negros) fueron despolarizantes para ambos potenciales sinápticos cerca de 10mV por arriba del reposo, no indicando un componente hiperpolarizante, lo que demuestra que la contribución inhibitoria a estos potenciales es despolarizante para ambos tipos de neuronas (es decir, el potencial de inversión para el ión cloro (E_{Cl^-} , -65mV) es menos negativo que el potencial de reposo cercano a -80mV). Esto ha sido corroborado por varios estudios con diferentes técnicas (Misgeld et al., 1982; Jiang y North, 1991; Bennett

y Bolam, 1994; Kita, 1996; Ramanathan et al., 2002; Koos et al., 2004; Bracci y Panzeri, 2006; Dehorter et al., 2009; Flores-Barrera et al., 2009) (ver **figura 4**). Sin embargo, el bloqueo de los receptores GABA_A durante la respuesta subumbral disminuye el potencial sináptico despolarizante en las MSNs D₁-SP+: la inhibición fue bloqueada (**figura 15A**, trazo rojo). Por el contrario, la bicuculina aumenta la respuesta subumbral en las MSNs D₂-ENK+ (**figura 15E**, trazo verde) incluso si la inhibición es también despolarizante. Para explicar cómo el bloqueo de una entrada despolarizante aumenta la despolarización, hay que asumir que la inhibición en las MSNs D₂-ENK+ está restringida a corrientes despolarizantes intrínsecas (shunting inhibition) incluso a nivel subumbral (Carter y Sabatini, 2004; Day et al., 2008) apoyando las hipótesis formuladas anteriormente.

Esta hipótesis se ve apoyada por el análisis de las respuestas umbrales (comparar, **figura 15B, F**; las espigas fueron cortadas).

Notablemente, las sinapsis GABAérgicas ayudan a disparar un potencial de acción en las MSNs D₁-SP+ debido a que la bicuculina evita el disparo (**figura 15B**; trazo rojo); la inhibición es despolarizante y excitadora para estas neuronas a esta intensidad de estimulación (Vida et al., 2006). Al contrario, la bicuculina revela una respuesta local intrínseca durante la respuesta umbral en las MSNs D₂-ENK+ (**figura 15F**; trazo verde). La respuesta local perturba la cinética y duración del potencial sináptico y precedió a la aparición de la respuesta intrínseca autorregenerativa a fuertes intensidades de estimulación (**figura 15G**). Por último, la **figura 15 C, G** ilustra los trazos supraumbrales y la **figura 15Da-c, He-g** las substracciones de los diferentes trazos pareados.

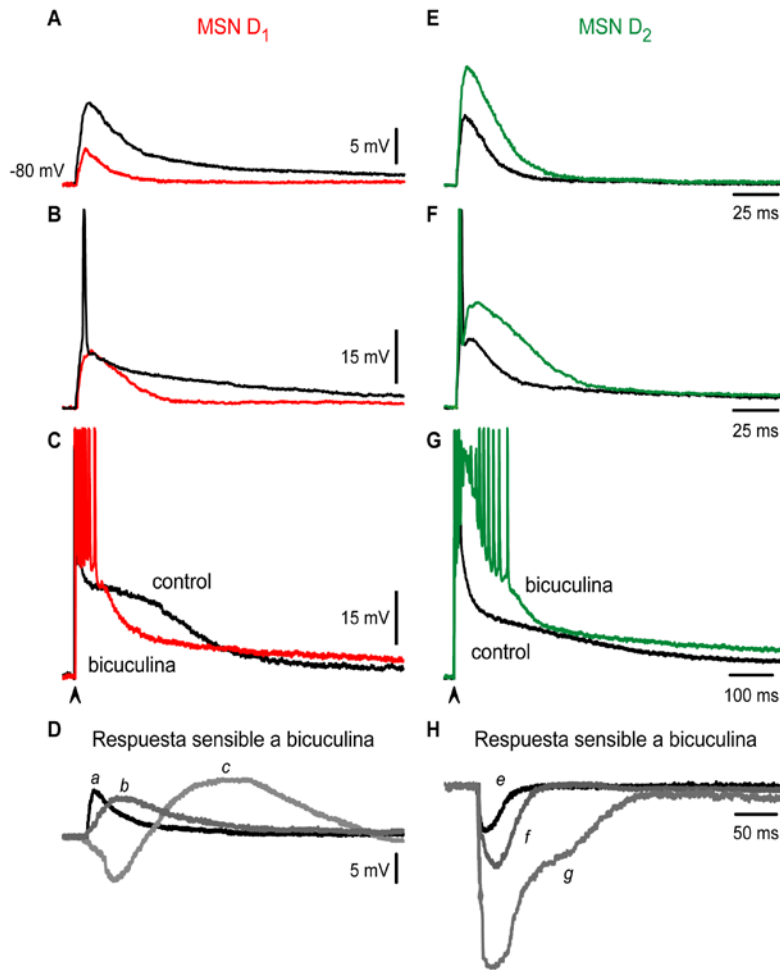


Figura 15. Las acciones de la bicuculina son distintas a diferentes intensidades de estimulación en las MSNs-D₁ y D₂. (A, E) Bloqueo de las sinapsis GABAérgicas durante las respuestas sinápticas subumbrales (control, trazo negro; después de bicuculina, trazo de color), en condiciones control ambas respuestas son despolarizantes y tienen una amplitud similar (aprox. 10mV). Note que el bloqueo GABAérgico reduce las respuestas sinápticas en las MSNs-D₁ (trazo rojo) y aumenta las respuestas sinápticas en las MSNs-D₂ (trazo verde), respectivamente. No hay un componente sináptico hiperpolarizante en las respuestas; la inhibición es despolarizante. (B, F) Bloqueo de las sinapsis GABAérgicas durante la respuesta sináptica umbral. Una disminución y un aumento en las respuestas fueron observados en las MSNs-D₁ y D₂, respectivamente. El bloqueo impide el disparo de potenciales de acción en las MSNs-D₁ (B) y produce una respuesta local que distorsiona las cinética sináptica en las MSNs-D₂ (F). (C, G) Bloqueo de las sinapsis GABAérgicas en la respuesta sináptica supraumbral. Los trazos sobrepuestos se cruzan en las MSNs-D₁ y no en las MSNs-D₂. (D, H) Substracciones digitales de los trazos (A-C; E-G); el componente sensible a bicuculina ayuda a despolarizar todas las respuestas sinápticas en las MSNs-D₁ (Da-c), excepto al comienzo de la respuesta supraumbral. Por el contrario, la bicuculina aumentó las respuestas sinápticas en todas las intensidades de estimulación en las MSNs-D₂ (He-g). La inhibición es despolarizante e incluso excitadora en las MSNs-D₁ mientras que reprime a las MSNs-D₂ (shunting inhibition).

En resumen, aunque el componente sensible a bicuculina (aférentes GABAérgicas) es despolarizante en todas las intensidades de estimulación en ambos tipos de MSNs y contribuye a la despolarización sináptica e incluso al disparo en las MSNs D₁-SP+ (Bracci y Panzeri, 2006), este tiene otra función en las MSNs D₂-ENK+, que es la de restringir la excitabilidad dendrítica intrínseca (Day et al., 2008). Estos resultados demuestran diferentes funciones de la inhibición mediada por receptores GABA_A en neuronas de la vía directa e indirecta. La causa de estas diferentes funciones inhibitorias no puede ser totalmente atribuida a las distintas aférentes inhibitorias (Mallet et al., 2006; Gittis et al., 2010; Planert et al., 2010), que está en debate, sino a diferencias en la excitabilidad dendrítica intrínseca de las neuronas de la vía directa e indirecta (Day et al., 2008).

Finalmente, se ha demostrado que una corriente tónica mediada por receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ esta más expresada en las MSNs-D₂ que en las MSNs-D₁ (Ade et al., 2008). Por lo tanto, quisimos ver si la contribución de esta corriente tónica podía explicar la diferencia observada en la respuesta córtico-estriatal de las MSNs de la vía directa e indirecta (ver **figura 16**). El agonista selectivo inverso de los receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$, L655-708 10 μ M, fue aplicado a la solución salina del baño después de evocar las respuestas, con intensidad de estimulación similar en ambas clases neuronales. La **figura 16** muestra que un porcentaje similar de la respuesta córtico-estriatal aumentó en ambas clases neuronales durante la aplicación del L655-708: aprox. 37% y 35% para las MSNs D₁-SP+ y D₂-ENK+, respectivamente (**figura 16A, B**, n=4). El histograma de la **figura 16C** resume estos resultados. Así, aunque la inhibición tónica puede servir para otros fines (Ade et al., 2008), los presentes experimentos muestran que no es la causa principal de las diferencias encontradas en la respuesta córtico-estriatal de las MSNs D₁-SP+ y D₂-ENK+ adultas (Day et al., 2008).

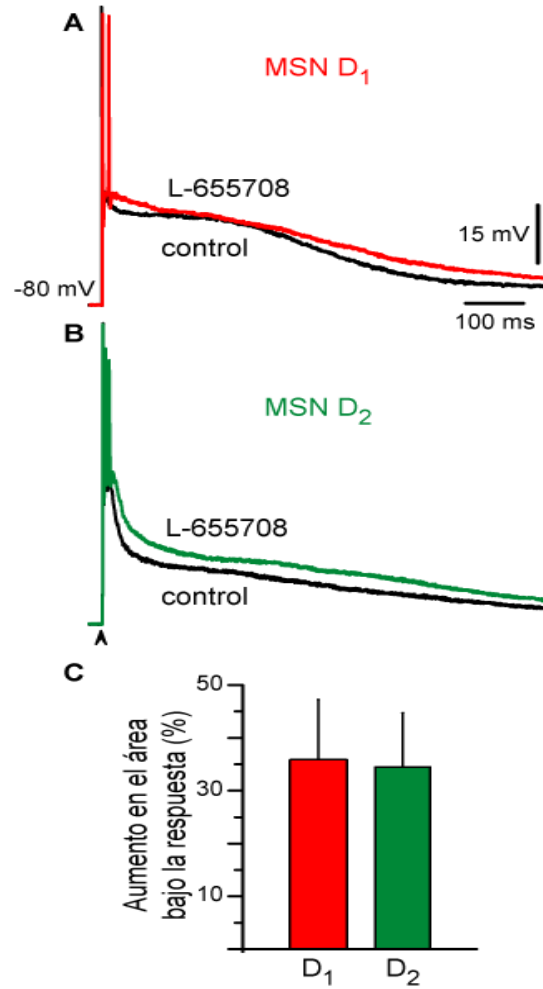


Figura 16. Acción del agonista selectivo inverso de los receptores GABA_A en la respuesta córtico-estriatal de las MSNs-D₁ y D₂. (A) Respuestas córtico-estriatales sobrepuestas en control (trazo negro) y durante 10 μ M de L655-708 (trazo rojo) de las MSNs-D₁. (B) Respuestas córtico-estriatales sobrepuestas en control (trazo negro) y durante 10 μ M de L655-708 (trazo verde) de las MSNs-D₂. (C) El histograma muestra que el L655-708 afectó de manera similar ambas respuestas (n=4).

Debido a que el potencial de inversión de las entradas GABAérgicas en las MSNs es de aprox. -65 mV (Misgeld et al., 1982; Jiang y North 1991; Kita 1996), produce “shunting inhibition” (e.g., Bartos et al., 2007; Sullivan et al., 2008). Nos preguntamos si las entradas inhibitoras di- o poli- sinápticas, presentes en esta respuesta (Kita 1996; Tunstall et al., 2002; Guzmán et al., 2003; Plenz 2003; Koos et al., 2004; Gustafson et al., 2006; Tecuapetla et al., 2007), pueden explicar en parte su larga duración después de un estímulo cortical único. Es decir, si un

comando cortical único es capaz de inducir reverberación en el circuito tiempo después del estímulo. Y si este es el caso, ¿cuál es la cantidad de esta contribución sináptica ?

Para calcular el requerimiento de entradas inhibitoras asincrónicas (Gruber et al., 2009) y reproducir fielmente la respuesta córtico-estriatal supraumbral de las MSNs, implementamos un modelo en NEURON.

4.4 El modelo apoya el papel del microcircuito estriatal durante el potencial en meseta

El modelo de NEURON de una MSN promedio fue construido tomando en cuenta la densidad de espinas característica y sus corrientes intrínsecas reportadas. En la **figura 17A, B** se compara la reconstrucción de una MSN marcada con biocitina con el esquema de su modelo compartamental (ver “**Métodos**”). Los insertos muestran espinas reales y simuladas. Se utilizó un grupo de modelos de corrientes iónicas (corrientes Na_v1 , Ca_v1 , K_v1 , K_v4 , K_v7 , $KCa1$, $KCa2$, AMPA, NMDA, GABA, y un modelo para la dinámica de calcio interno) que se sabe es esencial para el comportamiento biofísico de las MSNs (Bargas et al., 2003; Wolf et al., 2005; Day et al., 2008) para aproximar sus características de disparo a la despolarización de pulsos de corriente y su rectificación entrante durante pulsos de corriente hiperpolarizante (**figura 17C, D**).

La estimulación córtico-estriatal supraumbral fue mimetizada con entradas glutamatérgicas y GABAérgicas para lograr la inhibición persistente como la mostrada en la **figura 15Dc** (sensible a bicuculina) (**figura 17E, F**). Curiosamente, esta correlación particular entre una respuesta córtico-estriatal supraumbral experimental y simulada se logró mediante la activación de 46 sinapsis glutamatérgicas (aprox. 50) en el mismo número de espinas dendríticas (ver métodos), 89 sinapsis GABAérgicas somáticas (aprox. 90), y 142 sinapsis GABAérgicas dendríticas (aprox. 140) distribuidas en las dendritas secundarias y terciarias con diferentes tiempos de llegada. Una disminución en el número de

sinapsis inhibitoras fue compensado con un aumento en la cantidad de corriente de los canales de Ca^{2+} tipo L o NMDA para mantener la misma meseta, y viceversa.

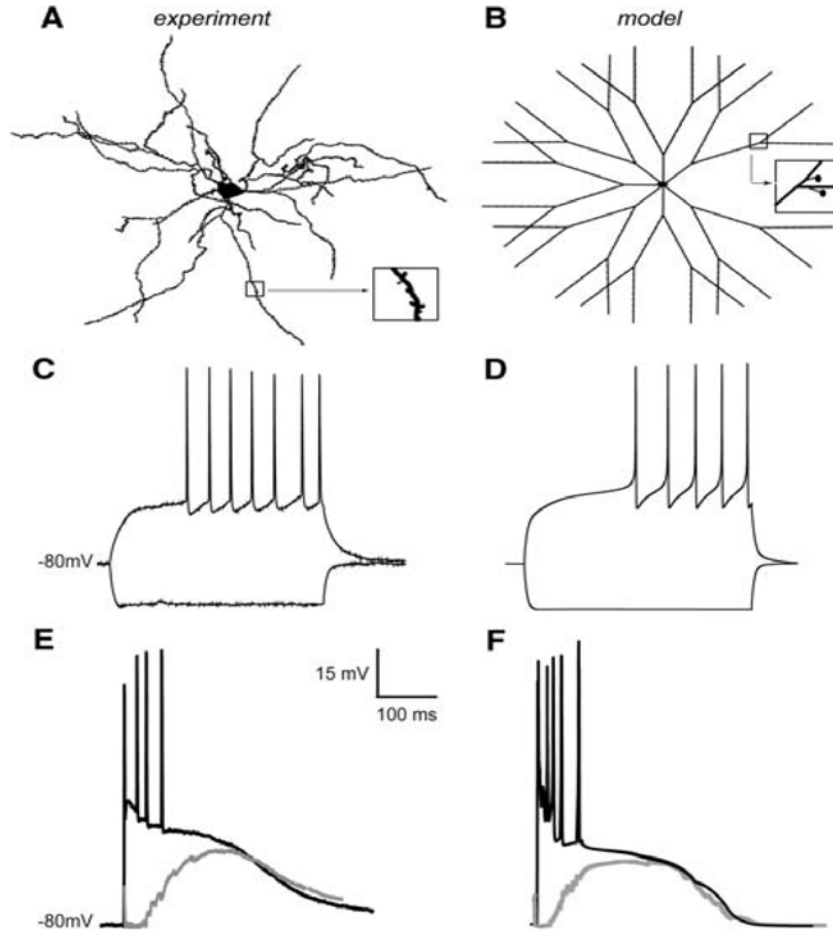


Figura 17. Modelo en NEURON de una neurona espinosa mediana para ilustrar la contribución de la inhibición durante la respuesta córtico-estriatal. (A) Reconstrucción en cámara lúcida de una MSN marcada con biocitina. Inserto: detalles de un tronco dendrítico con espinas. **(B)** Modelo compartamental de una MSN, con las espinas necesarias para agregar entradas sinápticas glutamatérgicas (el resto de la superficie de las espinas fue compensado con la superficie dendrítica para preservar los parámetros pasivos y la longitud electrotonica). **(C)** Retraso característico a la primera espiga, disparo tónico y rectificación entrante a pulsos de corriente intracelular despolarizante e hiperpolarizante de igual intensidad. **(D)** Características similares en el modelo de NEURON. **(E)** La respuesta córtico-estriatal supraumbral muestra un tren de potenciales de acción y una despolarización en meseta que dura cientos de milisegundos (trazo negro). Esta sobrepuesto el componente inhibitor obtenido por substracción de una respuesta córtico-estriatal (trazo gris). **(F)** Respuesta córtico-estriatal similar simulada en el modelo de NEURON (trazo negro) con la substracción del componente inhibitor (trazo gris). Los componentes inhibitoros están escalados para correlacionar con la duración de las respuestas córtico-estriatales.

Encontramos que el potencial en meseta de las MSNs puede ser una manifestación de la actividad recurrente de las neuronas principales (e.g., Bartos et al., 2007; Sullivan et al., 2008) y también, quizá, de las interneuronas (Berke 2008; Gruber et al., 2009), de modo que el número de entradas inhibitoras que llegan de forma asincrónica sobre el árbol dendrítico pueden superar en número a las entradas corticales excitadoras que inician la respuesta. Los resultados sugieren que las colaterales axónicas de las MSNs son importantes en el mantenimiento de eventos persistentes de sincronización entre las MSNs (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a; Pomata et al., 2008).

Sin embargo, el espacio de soluciones parecía restringido. Aunque un análisis más dinámico y una segregación de las MSNs en dos poblaciones (Day et al., 2008) merecen estudios adicionales, actualmente se puede decir que el número de entradas inhibitoras que parecen participar después de un comando cortical supraumbral es relativamente grande en comparación con el número de entradas excitadoras (ver discusión).

4.5 Las respuestas córtico-estriatales son modificadas por la depleción de dopamina

A pesar de que las diferencias en la respuesta córtico-estriatal de las MSNs de la vía directa e indirecta fueron descubiertas en ratones BAC, se corroboraron en ratas mediante predicción electrofisiológica, ¿qué neuronas pertenecen a la vía directa o indirecta mediante doble marcado con biocitina más inmunocitoquímica para el péptido de elección SP o ENK?. La predicción mostró una precisión alta ($P > 0.9$). El porcentaje de neuronas en las que surgieron dudas coincide con el porcentaje de neuronas que colocalizan ambos receptores y péptidos (Wang et al., 2007). Sin embargo, esta correlación debe ser corroborada (por múltiples marcados fuera del alcance del presente trabajo) en un estudio futuro.

Los experimentos anteriores nos permitieron emplear el modelo de rata de la Enfermedad de Parkinson ampliamente utilizado (lesión unilateral con 6-OHDA en

la sustancia negra parte compacta; ver materiales y métodos) para comparar las respuestas córtico-estriatales antes y después de la depleción de DA estriatal. Sólo las lesiones que indujeron <500 giros estereotipados ipsilaterales ($n=55$ ratas) fueron consideradas, para asegurarse de que la mayor parte de la innervación dopaminérgica al estriado ipsilateral a la lesión se perdió. El análisis histológico adicional en un grupo de rebanadas estriatales confirmó una pérdida virtual unilateral de tirosina hidroxilasa en ratas lesionadas. Las respuestas sinápticas córtico-estriatales fueron examinadas en rebanadas de cerebro de ratas (PD90) después de la depleción de DA. Las rebanadas fueron obtenidas 2-3 semanas después de la lesión y la prueba de comportamiento.

En las MSNs-SP+ (comparar, **figura 18A, B**), el área bajo la respuesta sináptica córtico-estriatal se redujo significativamente después de la denervación de DA de $11,533 \pm 663$ mV·ms ($n = 11$) en control, contra $8,769 \pm 527$ mV·ms ($n = 16$) en neuronas depletadas de DA (**figura 18E**, barras rojas; $P<0.025$), además de la duración media: 260 ± 14 ms contra 215 ± 13 ms, respectivamente (**figura 18F**, barras rojas; $P<0.01$).

Lo contrario fue cierto para las MSNs-ENK+ (comparar, **figura 18C, D**), el área bajo la respuesta córtico-estriatal fue significativamente aumentada: comparar, control $5,828 \pm 736$ mV·ms ($n = 9$) contra $8,942 \pm 937$ mV·ms ($n = 13$) en neuronas depletadas de DA (**figura 18E**, barras verdes; $P<0.02$). La duración media también cambió, 130 ± 22 ms contra 226 ± 24 ms, respectivamente (**figura 18F**, barras verdes; $P<0.01$). Como resultado de la depleción de DA no cambiaron el umbral de disparo del potencial de acción ni la frecuencia de disparo ni las propiedades pasivas. Sin embargo, una despolarización persistente predominó durante las respuestas de las MSNs-ENK+ después de la depleción de DA. El resultado general fue que la respuesta córtico-estriatal de las MSNs-SP+ y ENK+ después de la depleción de DA parecen similares, a diferencia de los controles (comparar, **figuras 13 y 18B, D**).

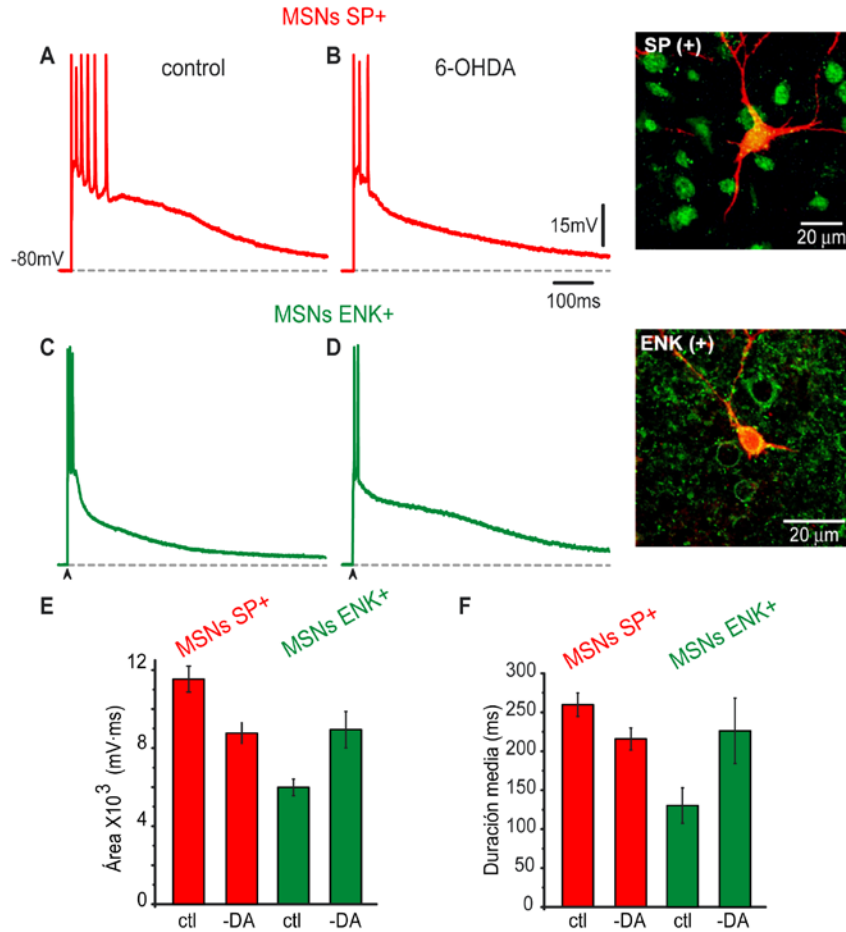


Figura 18. La respuesta sináptica córtico-estriatal de las MSNs-SP+ y ENK+ es modificada por la lesión unilateral de la SNpc con 6-OHDA. (A) Respuesta córtico-estriatal supraumbrales representativa de una MSN-SP+ de rata control (no-lesionada). **(B)** Respuesta córtico-estriatal supraumbrales representativa de una MSN-SP+ de rata lesionada con 6-OHDA. Note una reducción en la duración y amplitud en la respuesta; el tren de potenciales de acción es sustituido por una ráfaga breve. **(C)** Respuesta córtico-estriatal supraumbrales representativa de una MSN-ENK+ de rata control. **(D)** Respuesta córtico-estriatal supraumbrales representativa de una MSN-ENK+ de rata lesionada. Note la despolarización aumentada. Los insertos muestran el doble marcado de las MSNs-SP+ y ENK+. **(E)** Histogramas del área bajo la respuesta sináptica en muestras de neuronas de rata control (ctl) y depletadas de DA (-DA). Note la disminución en el área de la respuesta sináptica de las MSNs-SP+ y el incremento en el área de las MSNs-ENK+. El área de ambas respuestas neuronales no mostró diferencias significativas después de la depleción de DA. **(F)** Histogramas de la duración media de la respuesta córtico-estriatal en neuronas de rata control (ctl) y depletadas de DA (-DA). La duración media disminuyó en las MSNs-SP+ y aumentó en las MSNs-ENK+. Las diferencias fueron significativas cuando se compararon las neuronas de la misma clase en control contra las depletadas de DA y cuando se compararon las respuestas control entre clases neuronales. Las diferencias no fueron significativas cuando se compararon ambas clases neuronales después de la depleción de DA.

La **figura 19** muestra una comparación más a fondo a diferentes intensidades de estimulación (respuestas subumbral, umbral – con espigas recortadas – y supraumbral).

Hay que tener en cuenta que, los potenciales sinápticos se redujeron para intensidades de estimulación similar después de la depleción de DA en las MSNs-SP+ (trazos rojos). La depleción de DA resultó en respuestas córtico-estriatales más pequeñas a cualquier estímulo en neuronas de la vía directa (**figura 19A–C**). Debido a que se ha demostrado que la inhibición contribuye a la respuesta sináptica despolarizante en neuronas control (**figura 15**), surge la hipótesis de que un decremento en la inhibición puede ser la causa de estas diferencias en las respuestas (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009). Por el contrario, intensidades de estimulación similar muestran que la depleción de DA aumentó y prolongó los potenciales sinápticos en las MSNs-ENK+ (trazos verdes), incluso más que en condiciones control, resultando en respuestas córtico-estriatales más grandes a cualquier estímulo en neuronas de la vía indirecta (**figura 19D–F**), como si la inhibición fuera menos capaz de controlar la excitabilidad en las MSNs-ENK+ (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009).

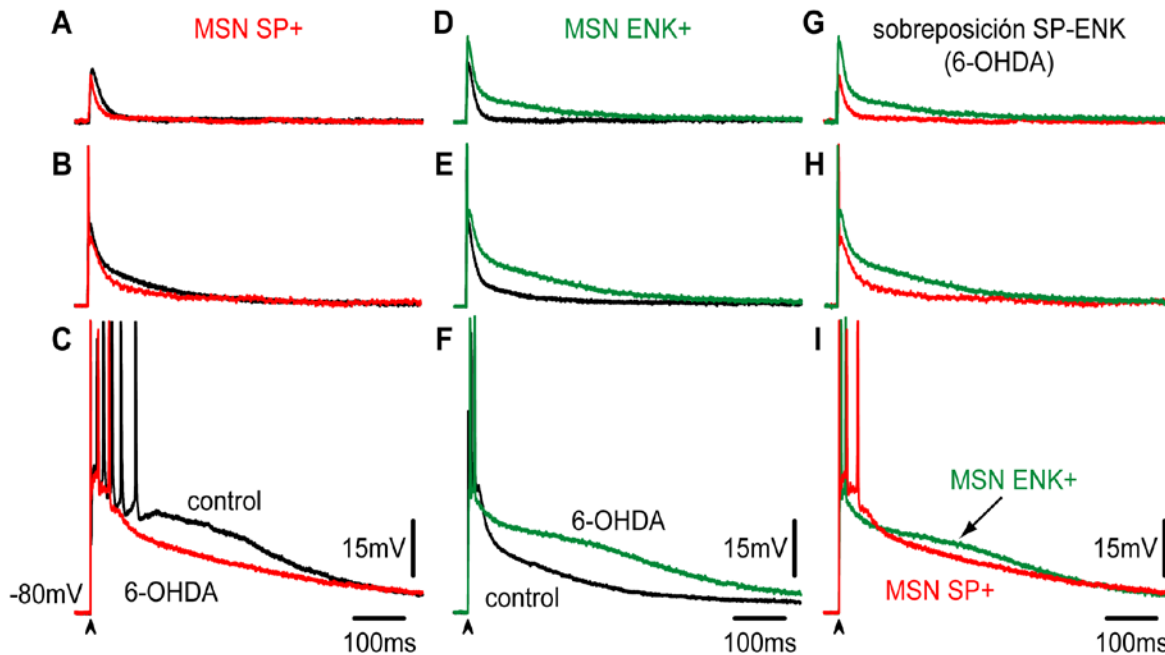


Figura 19. Comparación de la respuesta córtico-estriatal evocada por diferentes intensidades de estimulación en las MSNs-SP+ y ENK+ de animales control (no-lesionados) y lesionados (6-OHDA). (A-C) Sobreposición de las respuestas córtico-estriatales subumbrales, umbrales-con espigas cortadas- y supraumbrales de una MSN-SP+ representativa en control (trazos negros) y de una MSN depletada de DA (trazos rojos). La influencia de la depleción de DA en las respuestas es apenas evidente, con excepción de la respuesta supraumbral. Después de la depleción de DA, la inhibición despolarizante es reducida en la respuesta supraumbral; de manera similar a la acción de la bicuculina (comparar con la **figura 15**). (D-F) Sobreposición de las respuestas córtico-estriatales subumbrales, umbrales-con espigas cortadas- y supraumbrales de una MSN-ENK+ representativa en control (trazos negros) y de una MSN depletada de DA (trazos verdes). Note que las respuestas modifican las cinéticas de las entradas puramente sinápticas, son más despolarizadas y prolongadas que sus controles correspondientes. (G-I) Sobreposición de las respuestas córtico-estriatales de las MSNs-SP+ (trazos rojos) y ENK+ (trazos verdes) después de la depleción de DA. Note respuestas menos prolongadas y más pequeñas en las MSNs-SP+, excepto para las respuestas supraumbrales que parecen similares.

Aunque no se observaron diferencias significativas en el área bajo la respuesta sináptica de las respuestas supraumbrales (**figura 19I**), las comparaciones por debajo del nivel umbral mostraron una clara diferencia: las respuestas córtico-estriatales son más pequeñas en neuronas de la vía directa después de la depleción de DA, estableciendo nuevas pruebas de un decremento funcional en neuronas de la vía directa durante el parkinsonismo, y en segundo lugar, las

respuestas córtico-estriatales son más grandes en neuronas de la vía indirecta después de la depleción de DA, apoyando la hipótesis planteada por largo tiempo: el aumento en la función de la vía indirecta después de la denervación de DA. Además de presentar esta nueva prueba, los resultados muestran que los cambios sufridos después de la depleción de DA se parecen a aquellos obtenidos con el bloqueo del receptor GABA_A (**figura 15**), en el sentido de que una respuesta se reduce y la otra aumenta después de la maniobra experimental. Por lo tanto, decidimos comparar el bloqueo del receptor GABA_A en neuronas de la vía directa e indirecta después de la depleción de DA.

4.6 La contribución de la inhibición en las respuestas supraumbrales es modificada después de la depleción de dopamina

Fueron agregados 10μM de bicuculina mientras se evocaba la respuesta córtico-estriatal en cada clase de neurona sujeta a depleción de DA. Las respuestas sinápticas subumbrales se comportaron de la misma manera que los controles durante el bloqueo del receptor GABA_A: la bicuculina redujo estas respuestas en las MSNs-SP+ y las aumentó en las MSNs-ENK+ (**figura 20A, E**).

Sin embargo, los efectos de la bicuculina fueron más débiles en las MSNs-SP+ comparados con los controles de animales intactos (**figura 20Da**). En realidad, en la respuesta umbral no hubo cambios, mientras que la respuesta supraumbral de neuronas de la vía directa mostró menos inhibición durante la etapa inicial de $16 \pm 3\%$ ($n = 4$) (**figura 20Dc** contra $28 \pm 4\%$ en animales intactos; $P < 0.03$) (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009). Cabe destacar, que el componente despolarizante tardío que prolonga la despolarización en meseta en las MSNs-SP+ fue reducido a $15 \pm 4\%$ (**figura 20Dc** contra $25 \pm 3\%$ en animales intactos; $P < 0.05$) apoyando la idea de que las entradas inhibitorias recurrentes sostienen la despolarización prolongada (Flores-Barrera et al., 2009).

Por otra parte, las acciones de la bicuculina en las MSNs-ENK+ fueron considerablemente aumentadas en comparación con los controles (**figura 20E–H**),

por lo que la excitabilidad dendrítica parecía considerablemente incrementada después de la lesión (Day et al., 2008) y los componentes intrínsecos activos fueron claros a intensidades subumbral y umbral (**figura 20E, F**). El papel de la inhibición en la respuesta supraumbral de las MSNs-ENK+ fue también reducido (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009) y el disparo fue menos reprimido después de la lesión: $39 \pm 7\%$ (contra $76 \pm 10\%$ en animales intactos, $n = 5$: $P < 0.01$) (**figura 20G, H**). No hubo cambios en la duración media de las respuestas después de la bicuculina (**figura 20C, G**, comparar con la **figura 14H**, histograma).

La reducción en la inhibición es una causa principal de los cambios observados en la respuesta córtico-estriatal en ambas clases neuronales después de la depleción de DA: lo más importante, la disminución en la meseta despolarizante de las MSNs-SP+, y una mayor excitabilidad intrínseca en las dendritas de las MSNs-ENK+.

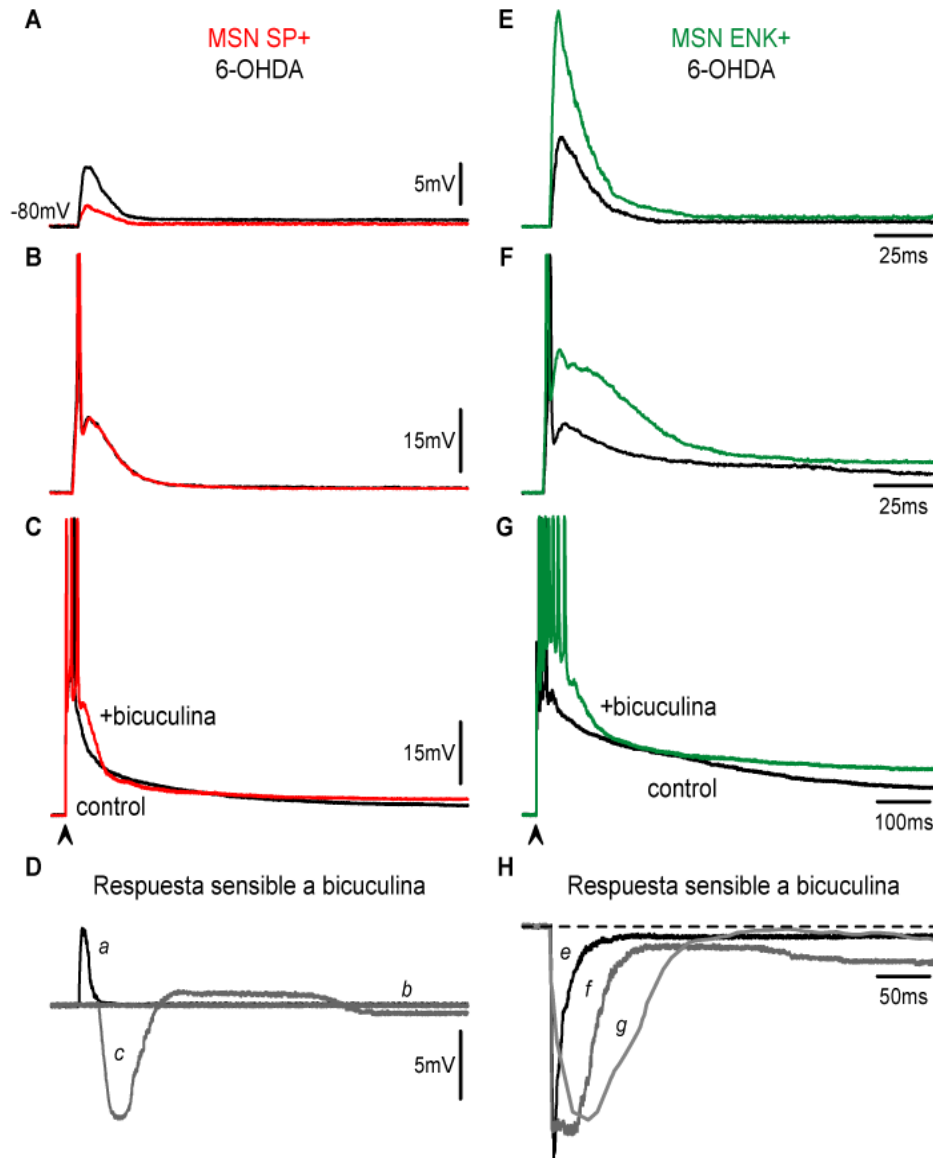


Figura 20. Las acciones de la bicuculina en las respuestas córtico-estriatales son modificadas después de la depleción de DA. (A, E) Respuestas sinápticas subumbrales de las MSNs-SP+ y ENK+ (control, trazos negros). Ambas respuestas son despolarizantes a pesar del componente inhibitor, demostrado por las acciones de la bicuculina (trazos de color). La bicuculina reduce la respuesta en las MSNs-SP+, mientras que aumenta las respuestas en las MSNs-ENK+. Sin embargo, el aumento en la acción de la bicuculina en las MSNs-ENK+ es más grande que en animales intactos que muestran una respuesta local que distorsiona la cinética del evento sináptico evocado (comparar con la **figura 15**). **(B, F)** respuestas sinápticas umbrales de la misma neurona antes (trazos negros) y durante bicuculina (trazos de color). Note la ausencia de acción de la bicuculina en las MSNs-SP+, lo que sugiere una disminución en las entradas inhibitoras. En el caso de las MSNs-ENK+, es revelada una despolarización intrínseca que deforma la cinética sináptica. **(C, G)** Respuestas

córtico-estriatales supraumbrales antes (trazos negros) y después de la bicuculina (trazos de color), una disminución importante de la acción de la bicuculina es claramente visible en las MSNs-SP+, confirmando que se impide el reclutamiento de estradas inhibitoras después de alcanzar ciertas intensidades de estimulación (comparar con la **figura 15**). Es evidente una fuerte despolarización con un tren de espigas prolongado a niveles supraumbrales en las MSNs-ENK+. **(D)** Substracciones digitales de las respuestas en las MSNs-SP+ (a-c). Note que la despolarización inicial debida al componente inhibitor esta muy disminuida en las respuestas subumbrales **(a)**, mientras que a nivel umbral parece ocluida o no participa **(b)**. La respuesta supraumbral revela inhibición de la despolarización inicial pero una falta casi total de la participación inhibitora en el mantenimiento tardío del potencial en meseta despolarizante **(c)**. **(H)** La substracciones de los componentes sensibles a bicuculina tienen casi la misma amplitud para todas las respuestas en las MSNs-ENK+, aunque más prolongados con intensidades de estimulación creciente, lo que sugiere la activación de corrientes intrínsecas **(e-g)**.

4.7 Contribución de la corriente de calcio Ca_v1 durante las respuestas córtico-estriatales

En las dendritas de las MSNs donde llegan las aferencias corticales para generar la respuesta córtico-estriatal se localizan canales de Ca^{2+} Ca_v1 (L) y los receptores a DA (Freund et al., 1984; Carter y Sabatini, 2004; Kreitzer y Malenka, 2005; Day et al, 2006). Se ha demostrado en MSNs no identificadas que los canales Ca_v1 se activan durante la respuesta córtico-estriatal (Galarraga et al., 1997, Adermark y Lovinger, 2007; Flores-Barrera et al., 2009). Estos canales son también el blanco principal de la señalización de los receptores D_1 y D_2 durante la estimulación somática directa (Hernández-López et al., 1997; 2000). Finalmente, también se ha demostrado que los canales Ca_v1 participan en la generación de las transiciones de voltaje up- down-state en las MSNs (Vergara et al. 2003). Por lo tanto, es lógico inferir que pueden estar involucrados en la respuesta cortical evocada en las MSNs de la vía directa e indirecta, sin embargo, este último punto no ha sido probado.

La **figura 21 A, B** muestra que la calciseptina 400 nM, un bloqueador del canal de Ca^{2+} Ca_v1 , reduce la respuesta córtico-estriatal en las MSNs- D_1 y D_2 . Los registros sobrepuestos en condición control (negro) y en presencia de calciseptina (azul) confirman que las corrientes de Ca^{2+} intrínsecas son activadas por la transmisión

córtico-estriatal en ambas clases de neuronas de proyección. El bloqueo de los canales Ca_v1 en las MSNs-D₁ disminuye la respuesta córtico-estriatal un $29\pm 2\%$ ($n=7$; $P<0.05$), mientras que en las MSNs-D₂ reduce la respuesta un $28\pm 2\%$ ($n=8$; $P<0.007$). Se observaron reducciones similares después de $2.5\ \mu\text{M}$ de nicardipina, otro bloqueador del canal Ca_v1 (**ver figura 21**). En las MSNs-D₁ note dos componentes de aumento: inicial y tardío, y en las MSNs-D₂ sólo un componente inicial más un decaimiento prolongado (Flores-Barrera et al., 2010). El área bajo la respuesta después de los bloqueadores de los canales Ca_v1 con respecto a sus propios controles para cada tipo celular fue de $11,646\pm 750\ \text{mV}\cdot\text{ms}$ contra $8,212\pm 462\ \text{mV}\cdot\text{ms}$ para las MSNs-D₁ ($n=7$; $P<0.03$) y de $7,876\pm 864\ \text{mV}\cdot\text{ms}$ contra $5,611\pm 675\ \text{mV}\cdot\text{ms}$ para las MSNs-D₂ ($n=8$; $P<0.007$).

A continuación se probaron los efectos del Bay K 8644 ($2.5\text{-}5\ \mu\text{M}$), agonista del canal de Ca^{2+} Ca_v1 (L), sobre la respuesta córtico-estriatal. Los registros sobrepuestos en una MSN-D₁ en control (negro) y en presencia de $2.5\ \mu\text{M}$ de Bay K 8644 (naranja) (**figura 21E**) muestran que el Bay K 8644 prolonga el potencial en meseta e induce el disparo de más potenciales de acción, mientras que en las MSNs-D₂ (**figura 21F**) despolariza la respuesta a todo lo largo y ayudó a generar una respuesta autorregenerativa. En las MSNs-D₁ las acciones del Bay K 8644 mostraron un incremento y despolarizaciones sostenidas (**figura 21G**), y en las MSNs-D₂ una disminución en la despolarización después del pico inicial (**figura 21H**).

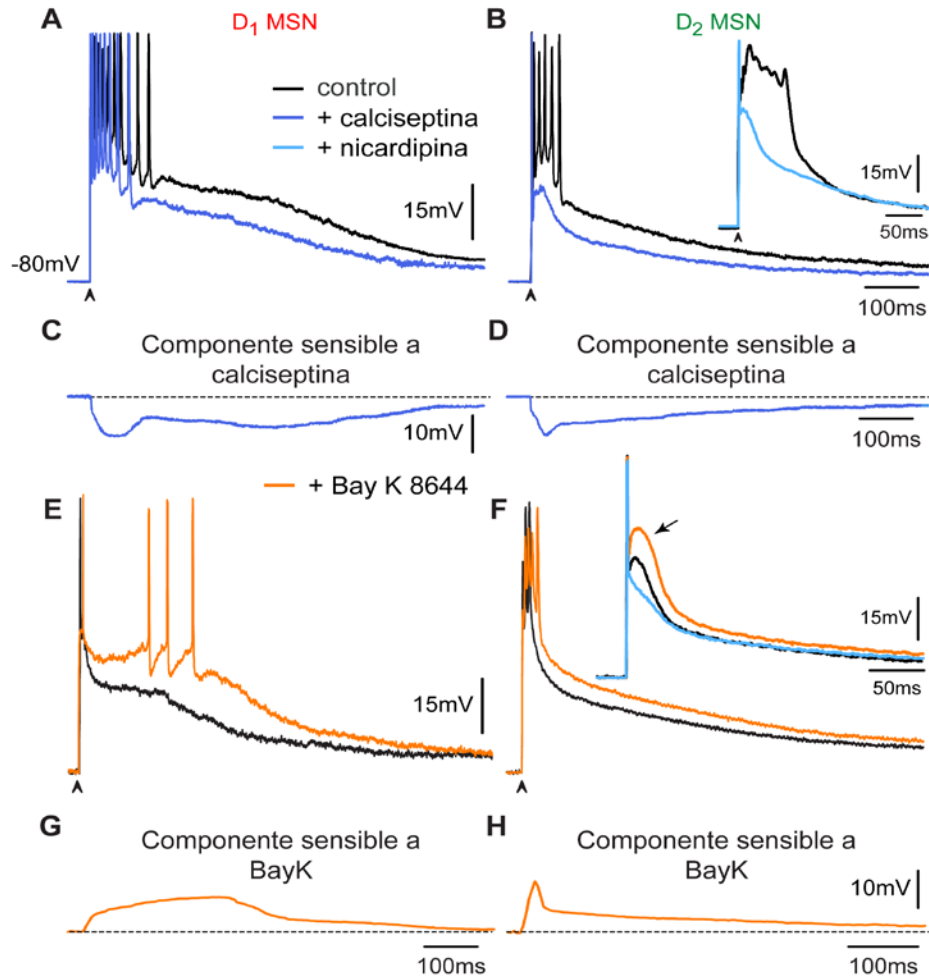


Figura 21. Contribución de la corriente de calcio Ca_v1 durante la respuesta córtico-estriatal en las MSNs- D_1 y D_2 . (A) Registros sobrepuestos en control (negro) y en presencia de calciseptina 400 nM (azul) en una MSN- D_1 . (B) Registros sobrepuestos en control (negro) y en presencia de calciseptina 400 nM (azul) en una MSN- D_2 . Note el tren breve de potenciales de acción en las MSNs- D_2 comparado al de las MSNs- D_1 (comparar, A y B). La respuesta autorregenerativa que subyace el tren de potenciales de acción en las MSNs- D_2 (comparar, figura 21B, inserto), antes (trazo negro) y durante 2.5 μ M de nicardipina (azul claro). (C, D) La substracción de los registros sobrepuestos de arriba revelan el componente sensible a calciseptina en las MSNs- D_1 y D_2 . Note que en las MSNs- D_1 los componentes inicial y tardío aumentan y en las MSNs- D_2 sólo el inicial aumenta seguido por un decaimiento continuo. (E) Registros sobrepuestos en control (negro) y en presencia de 2.5 μ M de Bay K 8644 (naranja) en una MSN- D_1 . (F) Registros sobrepuestos en control (negro) y en presencia de 2.5 μ M de Bay K 8644 (naranja) en una MSN- D_2 . En las MSNs- D_1 el agonista Ca_v1 prolongó el potencial en meseta e indujo el disparo de más potenciales de acción, mientras que en las MSNs- D_2 despolarizó la respuesta a todo lo largo. El inserto en F muestra que en las MSNs- D_2 el Bay K 8644 ayuda a generar una respuesta autorregenerativa. (G, H) Substracción de las acciones del Bay K 8644; note un aumento y despolarización sostenidas en las MSNs- D_1 y un decaimiento en la despolarización después del pico inicial en las MSNs- D_2 .

El área bajo la respuesta sináptica después del agonista Ca_v1 , Bay K 8644 y con respecto a sus propios controles fue de $11,821 \pm 1,324$ mV·ms contra $15,306 \pm 1,600$ mV·ms para las MSNs- D_1 ($n=4$; $P<0.05$) y de $7,919 \pm 2,178$ mV·ms contra $11,308 \pm 2,600$ mV·ms para las MSNs- D_2 ($n=4$; $P<0.05$).

Debido a que la acción de los bloqueadores de Ca^{2+} son similares en ambas clases neuronales, los diferentes papeles que los canales Ca_v1 logran en cada respuesta, como lo reveló la acción del Bay K 8644, sugieren que otras corrientes sinápticas o intrínsecas están encargadas de la regulación de los canales Ca_v1 , quizás en sitios dendríticos.

Dado que los canales Ca_v1 y los receptores a DA se encuentran en las dendritas de las MSNs donde llegan la mayoría de las aferencias corticales (Freund et al., 1984; Carter y Sabatini, 2004; Kreitzer y Malenka, 2005; Day et al, 2006), y como los principales blancos de la modulación dopaminérgica son los canales Ca_v1 (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 1997; 2000), nos enfocamos en la modulación dopaminérgica de esta corriente intrínseca.

4.8 Modulación dopaminérgica de la respuesta córtico-estriatal en las neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta

Para entender la participación de la dopamina en la respuesta sináptica y los cambios observados al eliminar este transmisor en el estriado, se examinó la respuesta córtico-estriatal en las MSNs- D_1 , evocada incrementando la intensidad de estimulación en presencia de SKF 81297, $1 \mu M$, agonista selectivo de los receptores a dopamina de la clase D_1 (D_1R) (**figura 22 A-C**: control, trazos negros; con SKF 81297, trazos rojos). La activación del receptor D_1 incrementó la respuesta en todas las neuronas de la vía directa registradas, aumentando la despolarización y el número de potenciales de acción generados. Sorprendentemente, en condiciones control la respuesta mostró inactivación de los potenciales de acción durante la despolarización sináptica, un fenómeno más frecuente en las MSNs- D_2 , pero raramente visto en las MSNs- D_1 (Flores-Barrera et

al., 2010). Es decir, la activación del receptor D_1 podría hacer a las neuronas de la vía directa tan excitables como las neuronas de la vía indirecta. La acción del SKF 81297 fue bloqueada completamente por el antagonista del receptor D_1 , SCH 23390, 1 μM ($n=3$, no mostrado). El porcentaje de aumento en la despolarización inducido por el agonista D_1 en la respuesta córtico-estriatal supraumbrales fue de $29\pm 8\%$ ($n=8$; $P<0.03$). La **figura 22D** muestra las subtracciones de los registros (**A-C**). Hay que notar que la activación del receptor D_1 aumenta la respuesta córtico-estriatal prolongando e incrementando el potencial en meseta de manera gradual y, lo más importante, revelando una respuesta autorregenerativa inicial que subyace a la despolarización inicial durante las intensidades de estimulación mayor (**figura 22D**, flecha).

También se examinó la respuesta córtico-estriatal evocada incrementando la intensidad de estimulación en las MSNs- D_2 , en presencia de quinolorane, 1 μM , agonista selectivo de los receptores a dopamina de la clase D_2 ($D_2\text{R}$) (**figura 2E-G**: control, trazos negros; con quinolorane, trazos verdes:). La activación del receptor de la clase D_2 redujo la respuesta en todas las neuronas de la vía indirecta, disminuyendo la despolarización. En estos trazos, se prefirió ilustrar la respuesta autorregenerativa que comúnmente subyace el tren de potenciales de acción en las neuronas de la vía indirecta (Flores-Barrera et al., 2010; **ver figura 13E3 e insertos en la figura 21B, F**) para mostrar que la acción de los $D_2\text{R}$ disminuye esa respuesta. La acción del quinolorane fue completamente bloqueada por sulpiride, 1 μM , antagonista del receptor D_2 ($n=3$, no mostrado). El porcentaje de reducción de la despolarización inducido por el agonista D_2 en la respuesta córtico-estriatal supraumbrales sin incluir la respuesta autorregenerativa fue de $23\pm 6\%$ ($n=10$; $P<0.03$). Es decir, en neuronas de la vía indirecta la activación del receptor D_2 redujo significativamente la respuesta sináptica. La **figura 22H** muestra las subtracciones de los registros de arriba (**E-G**). Note que la activación del receptor D_2 disminuye la respuesta córtico-estriatal, incluyendo la respuesta autorregenerativa (**figura 22H**, flecha) (Bargas et al., 1991; Flores-Barrera et al., 2010).

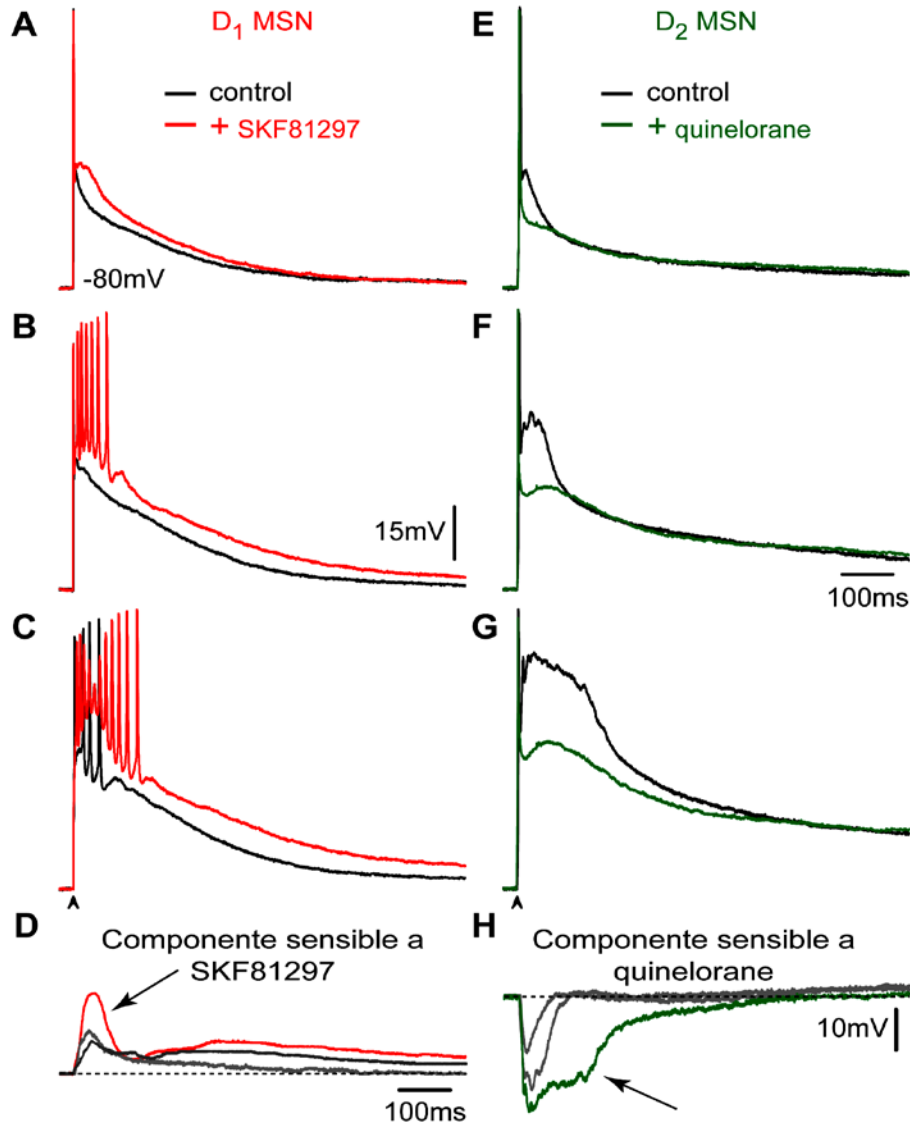


Figura 22. Modulación dopaminérgica de la respuesta córtico-estriatal en las MSNs-D₁ y D₂. (A-C). Respuesta ortodrómica córtico-estriatal a un estímulo simple de intensidad creciente en una MSN-D₁. Sobreposición en cada intensidad; controles en negro y después de la adición de SKF 81297, 1 μ M (rojo). Note el incremento en la despolarización y el disparo, incluyendo la inactivación de los potenciales de acción (C) debido a la activación de los D₁R. (E-G) Respuesta ortodrómica córtico-estriatal a un estímulo simple de intensidad creciente en una MSN-D₂. Sobreposición en cada intensidad; controles en negro y después de la adición de quinolorane, 1 μ M (verde). En lugar del tren de potenciales de acción se muestra la respuesta autorregenerativa subyacente. Note una disminución en la despolarización sináptica debido a la activación de los D₂R en cada intensidad. (D, H) Substracción de los registros sobrepuestos de arriba. La acción de los D₁R facilita las despolarizaciones iniciales y en meseta. Note una posible respuesta autorregenerativa (flecha) (D). La activación de los D₂R disminuye las despolarizaciones en todas las intensidades de estimulación, incluyendo las respuestas autorregenerativas (flecha) (H).

El área bajo la respuesta sináptica para cada tipo celular después de la activación de los receptores a DA y con respecto a sus propios controles fue de $9,124 \pm 609$ mV·ms contra $11,810 \pm 1,264$ mV·ms para las MSNs-D₁ (n=8, $P < 0.03$) y de $8,950 \pm 1,006$ mV·ms contra $7,173 \pm 687$ mV·ms para las MSNs-D₂ (n=10; $P < 0.03$). Considerando estos resultados, parece que por aumento en la excitabilidad de las neuronas de la vía directa y disminución en la excitabilidad de las neuronas de la vía indirecta, la DA puede balancear la excitabilidad de las MSNs de ambas vías de los ganglios basales (Galarraga et al., 1997; Carter y Sabatini, 2004; Liu et al., 2004; Day et al., 2008) de acuerdo a la “hipótesis de las dos vías”.

4.9 La modulación dopaminérgica es ocluida cuando son bloqueados los canales de calcio Ca_v1

La **figura 23A** muestra las respuestas córtico-estriatales sobrepuestas en una MSN-D₁ representativa, en control (negro), en presencia de $2.5 \mu\text{M}$ de nicardipina (azul claro) y después de la aplicación de $1 \mu\text{M}$ de SKF 81297 (rojo), agonista de los receptores a dopamina de la clase D₁. Note la ausencia de acción del agonista D₁ después del bloqueo de los canales Ca_v1. La **figura 23B** muestra las respuestas córtico-estriatales sobrepuestas en una MSN-D₂ representativa, en control (negro), en presencia de $2.5 \mu\text{M}$ de nicardipina (azul claro) y después de la aplicación de $1 \mu\text{M}$ de quinolorane (verde), agonista de los receptores a dopamina de la clase D₂. Note la ausencia de acción del agonista D₂ después del bloqueo de los canales Ca_v1. Estos experimentos sugieren que los canales Ca_v1 son el blanco principal de la modulación de DA durante la integración córtico-estriatal.

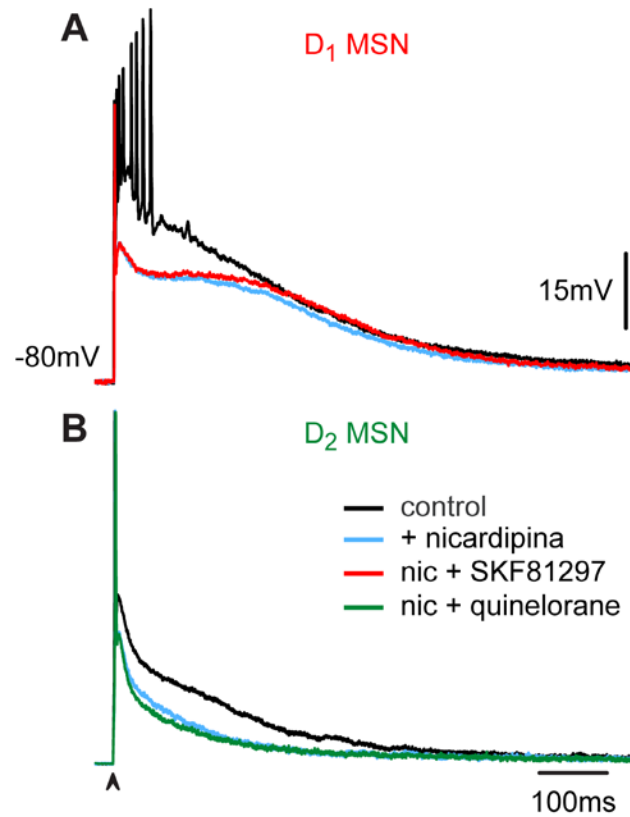


Figura 23. Disminución de la modulación dopaminérgica por el bloqueo de los canales Ca_v1 . (A) Registros sobrepuestos en una MSNs- D_1 y (B) en una MSN- D_2 , en control (trazos negros) y en presencia de nicardipina $2.5 \mu M$ (trazos azul claro). Adición del agonista D_1R , SKF 81297 (trazo rojo) en una MSN- D_1 (A) y del agonista D_2R quinolorane (trazos verdes) en una MSN- D_2 (B). Note la falta de acción de los agonistas a DA una vez que los canales Ca_v1 han sido bloqueados.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Este trabajo demuestra que: (1) La respuesta córtico-estriatal de las MSNs de la vía directa (D₁-SP+) es diferente a la de la vía indirecta (D₂-ENK+) y constituye una “huella electrofisiológica” que distingue fácilmente a las MSNs durante los experimentos electrofisiológicos: la respuesta sináptica es más prolongada y la meseta despolarizante evoca más potenciales de acción en neuronas de la vía directa, mientras que una respuesta autorregenerativa intrínseca es visible en neuronas de la vía indirecta. (2) Una de las causas principales para explicar estas diferencias es el papel de la inhibición (GABA): siempre deprime la respuesta de las MSNs D₂-ENK+, mientras que despolariza o tiene un papel dual en la respuesta de las MSNs D₁-SP+. (3) La respuesta córtico-estriatal cambia dramáticamente después de la depleción de DA: se observó una reducción en la respuesta sináptica de las MSNs D₁-SP+ y un aumento en la respuesta sináptica de las MSNs D₂-ENK+. El resultado final fue que las diferencias electrofisiológicas parecen menos evidentes después de la depleción de DA. (4) Los cambios en la respuesta córtico-estriatal después de la depleción de DA pueden ser explicados en parte por una disminución de la inhibición en ambas clases neuronales. (5) Las corrientes de Ca²⁺ Ca_v1 (L) contribuyen a la integración córtico-estriatal en las MSNs-D₁ y D₂; incluyendo la respuesta autorregenerativa que subyace al tren de espigas característico en las MSNs-D₂. (6) Un incremento selectivo en el disparo y la despolarización de la respuesta córtico-estriatal en las MSNs-D₁, mediado por el receptor dopaminérgico de la clase D₁ de tal manera que se aproximan al nivel de excitabilidad encontrado en las MSNs-D₂. (7) Una disminución significativa en el disparo y la despolarización de la respuesta córtico-estriatal en las MSNs-D₂, mediada por el receptor dopaminérgico de la clase D₂. (8) El bloqueo de los canales de Ca²⁺ Ca_v1 ocluyó la acción de los agonistas selectivos de los receptores a dopamina en las neuronas sensibles de la vía directa e indirecta. (9) La DA al actuar simultáneamente en ambas vías, puede balancear la excitabilidad de las neuronas de los GB con el fin

de hacer a las MSNs-D₂ menos excitables que las MSNs-D₁, invirtiendo su capacidad de respuesta a comandos corticales si es necesario. Estos resultados muestran que de acuerdo a la demanda hay margen suficiente para afinar la excitabilidad de las neuronas de ambas vías. Esta capacidad de ajuste es perdida muy probablemente durante el parkinsonismo (Flores-Barrera et al., 2010).

Sin embargo, el presente trabajo no excluye la posible participación de otros canales de Ca²⁺ (Carter y Sabatini, 2004; Salgado et al., 2005; Higley y Sabatini, 2010) y solo resalta la importancia de los canales Ca_v1 en la integración sináptica córtico-estriatal.

5.1 La respuesta córtico-estriatal es diferente en las neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta

En ambas clases neuronales un solo estímulo en la vía córtico-estriatal puede inducir una despolarización sináptica lenta (meseta) con disparo repetitivo (Bargas et al., 1991; Kita, 1996; Vergara et al., 2003; Tseng et al., 2007; Flores-Barrera et al., 2009). Sin embargo, la respuesta córtico-estriatal es más prolongada y evoca más potenciales de acción en las MSNs D₁-SP+, mientras que una respuesta autorregenerativa intrínseca está presente debido a la mayor excitabilidad dendrítica de las MSNs D₂-ENK+, **ver figura13** (Kreitzer y Malenka, 2007; Shen et al., 2007; Ade et al., 2008; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Valjent et al., 2009). Esta respuesta intrínseca tiene un papel en la generación de la respuesta córtico-estriatal.

Una vez correlacionadas con sus neuronas eGFP marcadas, se hizo evidente que la respuesta córtico-estriatal de las MSNs D₁-SP+ y D₂-ENK+ es tan diferente que no puede confundirse. Por lo tanto, la predicción basada en inmunocitoquímica para sustancia P y ENK en neuronas de rata y ratón produjo una alta probabilidad de determinar la identidad de las neuronas estriatales observando su respuesta córtico-estriatal ($P > 0.9$). Debido a que los casos dudosos coinciden con el porcentaje de neuronas que pueden colocalizar receptores a DA D₁ y D₂, es necesario realizar estudios adicionales para demostrar plenamente este punto. Por

último, la corriente intrínseca implicada en la respuesta autorregenerativa de las MSNs D_2 , es la corriente de Ca^{2+} tipo L, **ver figura 21B, F inserto** (Bargas et al., 1991; Carter y Sabatini, 2004; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Carrillo-Reid et al., 2009b).

5.2 Diferentes papeles de la inhibición en la respuesta córtico-estriatal de las neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta

El papel de la inhibición intraestriatal sobre la respuesta córtico-estriatal de estas clases neuronales es radicalmente distinta y podría explicar en parte las diferencias observadas entre las MSNs.

En numerosos estudios usando diferentes técnicas, incluyendo el parche de gramicidina, se ha demostrado que el potencial de inversión de la respuesta GABAérgica es similar y está por encima del potencial de reposo en todas las MSNs registradas no identificadas (Misgeld et al., 1982; Jiang y North, 1991; Bennett y Bolam, 1994; Kita, 1996; Ramanathan et al., 2002; Koos et al., 2004; Bracci y Panzeri, 2006; Dehorter et al., 2009; Flores-Barrera et al., 2009); por lo que es difícil pensar en un sesgo hacia una clase de neurona, dado que cada clase constituye aproximadamente el 50% de la población. Por lo tanto, una inhibición despolarizante está presente en ambas respuestas (**figura 4**). Dado que todos los registros fueron intracelulares con microelectrodos (sin modificar la solución interna de cloro), las diferencias en la respuesta al GABA entre las poblaciones neuronales no pueden ser atribuidas a cambios en el medio intracelular. Así, surge la pregunta acerca de ¿cuál es el papel de la inhibición en cada clase neuronal?

Las acciones de la bicuculina en las MSNs D_2 -ENK+ pueden explicarse por la mayor excitabilidad dendrítica presente en estas neuronas (Galarraga et al., 1997; Day et al., 2008): incluso cuando la inhibición es también despolarizante, tiene la función de restringir las corrientes intrínsecas despolarizantes fuertes (shunting inhibition) (Bartos et al., 2007). El bloqueo de la inhibición en estas neuronas permitió revelar corrientes intrínsecas que a niveles subumbral y umbral puede

consistir en respuestas locales no propagadas que aumentan y alteran la cinética de la respuesta sináptica, pero a nivel supraumbral se convierte en una respuesta autorregenerativa y propagada. Esta respuesta subyace el breve tren de potenciales de acción que estas neuronas exhiben. Si esta respuesta intrínseca no se controla por la inhibición puede incrementar la duración de los trenes de potenciales de acción, aunque muchas de estas espigas sufran inactivación (**figura 15**). La naturaleza iónica de esta respuesta intrínseca también se demuestra en la presente investigación, y además de la inhibición, probablemente necesite corrientes intrínsecas de K^+ para ser controlada (Day et al., 2008).

En contraste, el GABA ayudó a despolarizar la respuesta en las MSNs D_1 -SP+, haciendo una distinción radical entre las acciones de los receptores $GABA_A$ en cada clase neuronal. Dado que la inhibición es despolarizante y contribuye a evocar la despolarización sináptica desde la corteza, el bloqueo de la inhibición conduce a una disminución en la despolarización sináptica. Dos propiedades peculiares de esta despolarización inhibitoria valen la pena mencionar: en primer lugar, el hecho de que facilita el disparo de potenciales de acción durante la respuesta umbral (inhibición despolarizante excitadora), y en segundo lugar, su acción dual a nivel supraumbral: restringe el disparo al comienzo de la respuesta y mantiene la despolarización prolongada durante la meseta, **ver figura 15** (Gulledge y Stuart, 2003; Bartos et al., 2007; Mann y Paulsen, 2007; Flores-Barrera et al., 2009, 2010).

5.3 Papel del microcircuito estriatal durante el potencial en meseta

Uno de los objetivos de este estudio fue explorar la posibilidad de que la despolarización mediada por los receptores $GABA_A$ en las MSNs- D_1 (shunting inhibition) pudiera contribuir a la duración y mantenimiento de la respuesta en meseta córtico-estriatal, si contribuyen, necesariamente deben llegar de forma asincrónica a la neurona registrada en una ventana de tiempo determinada por el procesamiento del microcircuito estriatal. Por lo tanto, para demostrar esta contribución, restringimos un análisis inicial a la despolarización en meseta

supraumbral inducida por un estímulo cortical único (debido a que los IPSPs no duran cientos de milisegundos en las MSNs). En este sentido, surge la pregunta: ¿Cuántas entradas inhibitoras puede activar un comando cortical único en una MSN?. La parte del modelo de este trabajo dio como resultado cerca de 200, 140 de estas, deben llegar asincrónicamente en el árbol dendrítico y contribuir a la duración del potencial en meseta. Es decir, un comando cortical simple puede activar cinco veces más sinapsis inhibitoras ($90 + 140 = 230$) que excitadoras (46) o $230/46 = 5$, dando lugar a la reverberación del circuito. Estos números varían (por docenas; pero note que las corrientes de K^+ no han sido investigadas en esta respuesta) si se compensan por las corrientes de Ca^{2+} tipo L (Ca_v1) y/o NMDA, indicando que, en las condiciones actuales, las entradas inhibitoras parecen ser necesarias para el mantenimiento del potencial en meseta, (**figura 17**). Dicho sea de paso, grupos de aproximadamente 20-30 neuronas parecen sincronizarse espontáneamente en un vector neural estriatal o ensamble (Carrillo-Reid et al., 2008; 2009a). Si se considera que una MSN deja aproximadamente cinco contactos sinápticos en otra MSN (Guzmán et al., 2003), esto hace $140/5=28$ neuronas, que es aproximadamente el número adecuado de neuronas en un ensamble (Carrillo-Reid et al., 2008; 2009a).

5.4 Las respuestas córtico-estriatales reflejan una pérdida en la inhibición después de la depleción de dopamina

La depleción estriatal de DA produjo una reducción en la duración y amplitud de la respuesta córtico-estriatal en las MSNs-SP+ y un aumento en la duración y amplitud en las MSNs-ENK+, (**figura 18**), básicamente, cambios similares a aquellos producidos por el bloqueo del receptor $GABA_A$. En consecuencia una hipótesis de trabajo para explicar estos cambios es que la depleción de DA produce una disminución en la inhibición (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009). Las acciones alteradas de la bicuculina en ambas respuestas apoyaron una disminución en la inhibición como un cambio fisiopatológico principal durante el parkinsonismo (**figura 20**).

El resultado final fue que ambas respuestas pierden sus diferencias electrofisiológicas después de la depleción de DA. En condiciones control la vía directa e indirecta no son “equilibradas” en el sentido de que ambas muestran una respuesta similar a comandos corticales. Por el contrario, la duración de la respuesta de las MSNs D_1 -SP+ es mayor que en las MSNs- D_2 -ENK+ (ver arriba). Una disminución en la inhibición permitió un decremento en la respuesta de las MSNs D_1 -SP+, sostenida en parte por la inhibición recurrente (ver arriba). Este resultado se suma al conjunto de pruebas que implican una disminución en la función de la vía directa durante el parkinsonismo (DeLong, 1990; Obeso et al., 2004). En cambio, una disminución en la inhibición conduce a un incremento en las corrientes de fuga despolarizantes intrínsecas en las neuronas D_2 -ENK+ aumentando así su respuesta córtico-estriatal. Este resultado apoya la hipótesis de que las neuronas de la vía indirecta tienen aumentada su excitabilidad durante el parkinsonismo (DeLong, 1990; Obeso et al., 2004; Day et al., 2008). Estos resultados dan un contexto funcional a nuestro descubrimiento, pero paradójicamente, la vía directa e indirecta ahora parecen estar “equilibradas” con respecto a su respuesta córtico-estriatal (**figura 19**).

Sin embargo, esta aparente similitud entre la forma de las respuestas córtico-estriatales ocultan un mecanismo muy diferente de integración sináptica para generar dichas respuestas (ver arriba). Un análisis muy detallado pone de manifiesto que, las neuronas D_2 -ENK+ son más excitables que las neuronas D_1 -SP+ en condición control y después de la depleción de DA. La denervación dopaminérgica hace más evidente esta disparidad. Además, la inhibición recurrente es distinta entre las MSNs de la vía directa e indirecta (Tecuapetla et al., 2009; Taverna et al., 2008), las conexiones de la vía directa son aumentadas mientras que las conexiones de la vía indirecta son deprimidas por la DA (Guzmán et al., 2003; Tecuapetla et al., 2007, 2009). La denervación dopaminérgica cambiará esta relación afectando las conexiones dentro de una vía y entre las vías, alterando las dinámicas del circuito (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a, b). Por otra parte, aunque una contribución diferente de la inhibición dada por las

interneuronas fast spiking (FS) es objeto de debate (Salin et al., 2009; Gittis et al., 2010; Planert et al., 2010), hay una potenciación en la inhibición sináptica aportada por interneuronas low threshold spiking (LTS) (Dehorter et al., 2009) después de la depleción de DA. Dado el papel de las diferentes clases de interneuronas en el circuito (Whittington y Traub, 2003), estos cambios disminuirían los ritmos procinéticos rápidos y promoverían los ritmos acinéticos lentos (Hutchinson et al., 2004). Se requiere investigación adicional para ver si estas alteraciones son reflejadas en las respuestas córtico-estriatales.

5.5 Participación de la conductancia de calcio tipo L (Ca_v1) en la respuesta supraumbral

La entrada de Ca^{2+} en las MSNs juega un papel importante en la regulación de la frecuencia de disparo (Galarraga et al., 1989; Pérez-Garci et al., 2003a) y en procesos de integración sináptica (Bargas et al., 1991, Vergara et al., 2003; Carter y Sabatini, 2004). La activación de receptores-canal tipo AMPA y NMDA promueve la entrada de Ca^{2+} en las dendritas de las MSNs. La despolarización alcanzada en las dendritas puede activar canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que generan potenciales de acción de Ca^{2+} (Bargas et al., 1991; Carter y Sabatini, 2004; Flores-Barrera et al., 2009; 2010).

Los registros intracelulares en fijación de corriente han mostrado que las corrientes de Ca^{2+} tipo L, participan en la despolarización prolongada que facilita el disparo repetitivo de las MSNs (Hernández-López et al., 1997; Pérez-Garci et al., 2003a, **figura 7**). De manera similar, en este trabajo de tesis mostramos que la adición de nicardipina o calciseptina (antagonistas de canales de Ca^{2+} tipo L), producen una reducción de alrededor del 30% en las respuestas sinápticas supraumbrales (**figura 21**). Por lo tanto, queda demostrada la participación de ésta conductancia intrínseca como resultado de la activación sináptica.

Debido a que el porcentaje de reducción en la respuesta sináptica al aplicar APV (antagonista de receptores-canal tipo NMDA) fue mayor que cuando se aplicó nicardipina o calciseptina (Flores-Barrera et al., 2009) en el medio de perfusión, y

que la participación de los canales de Ca^{2+} tipo L es evidente cuando estos canales se bloquean antes, pero no después de bloquear a los receptores-canal tipo NMDA (Flores-Barrera et al., 2009), concluimos que la activación de los receptores a NMDA genera la despolarización necesaria para activar a los canales de Ca^{2+} tipo L (Vergara et al., 2003).

La suma temporal de potenciales sinápticos cerca del umbral de disparo puede generar respuestas sinápticas prolongadas con disparo repetitivo (Vergara et al., 2003). Sin embargo, un estímulo único debe tener una intensidad supraumbral para generar potenciales en meseta. Esto sugiere que a nivel fisiológico una señal debe reclutar un número mínimo de entradas sinápticas de manera sincronizada para favorecer la generación del potencial en meseta. ¿Cuántas neuronas presinápticas habría que activar? Si un botón produce un cuanto de 10 pA o cerca de 500 μV de amplitud (Wickens, 1993; Wickens y Oorschot, 2000) y la transición del *down* al *up-state* es de alrededor de 35 mV para llegar al umbral, se tendrían que activar alrededor de 70 terminales presinápticas de manera simultánea si asumimos una simple suma espacial y lineal; pero una neurona cortical deja de uno a dos botones en una MSN, esto significa que deben activarse entre 35 y 70 neuronas piramidales simultáneamente. Esto sería un número máximo debido a que ya vimos que: a) las sinapsis GABAérgicas ayudan en la despolarización y b) la activación sináptica es amplificada por la conductancia intrínseca de Ca^{2+} tipo L (*boosted*). Así es que 50 neuronas podría ser una cifra apropiada, esto es, la mitad de las neuronas presentes en una mini-columna o módulo cortical. Sin embargo, una neurona espinosa puede recibir hasta 10,000 sinapsis de éste tipo. O lo que es lo mismo, hay un mínimo de 5,000 neuronas corticales conectadas presinápticamente con una MSN, 100 veces más que las necesarias para llegar a producir una meseta o una transición. Esto sugiere que las neuronas espinosas pueden ser activadas por distintas regiones de la corteza y quizás participar en diferentes tareas o secuencias de movimientos dependiendo del contexto (Flaherty y Graybiel, 1991), por lo que no siempre serían activadas por las mismas neuronas piramidales. Las propiedades activas de las dendritas (conductancias

intrínsecas dependientes de voltaje), pueden producir interacciones no lineales entre las entradas sinápticas y el disparo de potenciales de acción, que generan cambios en la función neuronal. Las dos funciones principales de las neuronas son: decodificar las entradas sinápticas y producir una salida funcional, y segundo alterar la eficacia de conexiones sinápticas específicas, así que ciertas entradas tendrán mayor o menor control en la salida de la neurona (Shepherd, 2004). Ésta es la situación ideal para el aprendizaje asociativo de tipo Hebbiano.

5.6 La modulación dopaminérgica de la respuesta córtico-estriatal es diferente en las neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta

Los canales Ca_v1 se localizan en las dendritas de las MSNs cerca de las sinapsis corticales glutamatérgicas (Freund et al., 1984; Carter y Sabatini, 2004; Higley y Sabatini et al., 2010), un lugar estratégico para participar en la integración córtico-estriatal. Sin embargo, de acuerdo con la “hipótesis de las dos vías”, la activación del receptor de la clase D_1 facilita el disparo durante la estimulación somática directa en las MSNs- D_1 individuales, **figura 10** (Hernández-López et al., 1997) y aumenta la corriente de Ca^{2+} Ca_v1 en neuronas aisladas (Surmeier et al., 1995), y la activación del receptor de la clase D_2 reprime el disparo en las MSNs- D_2 por reducción de la misma corriente, **figura 11** (Hernández-López et al., 1997; 2000; Day et al., 2008), lo cierto es que el tratar de encontrar estas diferencias *in vivo* durante la actividad de red estriatal, las expectativas de la hipótesis de las dos vías llegan a ser muy variables e incluso contradictorias (Liang et al., 2008; Kravitz et al., 2010).

Por lo tanto, en este trabajo quisimos observar si las acciones dopaminérgicas esperadas por la “hipótesis de las dos vías” son lo suficientemente robustas para ser conservadas durante la integración dendrítica córtico-estriatal supraumbrales que se sabe activa vías polisinápticas, además de varias corrientes entrantes y salientes intrínsecas (Flores-Barrera et al., 2009; 2010). Esto implica un paso adicional para probar las acciones de la DA en respuestas fisiológicas.

El presente trabajo experimental demuestra el postulado principal de la “hipótesis de las dos vías”, es decir, debido a la activación de receptores D_1 y D_2 la excitabilidad de las neuronas de ambas vías de los GB pueden alcanzar un balance dinámico. Las acciones de la DA tienen un amplio rango de operación, si es necesario las MSNs- D_1 pueden llegar a ser más excitables que las MSNs- D_2 . Por lo tanto, los presentes datos apoyan el papel de la DA en el balance de ambas vías de los GB. La modulación de los canales Ca_v1 fue algo esperada, ya que la activación de los canales iónicos activados por ligando y dependientes de voltaje en la membrana dendrítica, además de la plasticidad sináptica de largo plazo, dependen de la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales (Snyder, et al., 2000; Hallett et al., 2006; Adermark y Lovinger, 2007).

Sin embargo, el presente trabajo no pretende excluir otros posibles componentes de la integración sináptica córtico-estriatal, que también son blanco de la modulación dopaminérgica. Se encontró que las acciones dopaminérgicas esperadas por la “hipótesis de las dos vías” son fuertes y fáciles de observar en las respuestas córtico-estriatales, siempre y cuando sean identificadas las células registradas y sean empleadas herramientas farmacológicas selectivas.

Han sido encontrados resultados variables y al azar en el disparo en situaciones fisiológicas *in vivo* (Kostal et al., 2007) y se atribuyen a una población o código neuronal vectorial (Wu et al., 2002), a partir de los cuales, se ha obtenido evidencia para el microcircuito estriatal (Carrillo-Reid et al., 2008). Así, aunque el presente trabajo apoya las fuertes acciones postsinápticas de la DA en una situación fisiológica, varios grupos también han reportado fuertes acciones presinápticas en las terminales que hacen contacto con cada clase de neurona de proyección (Flores- Hernández et al., 1997; Guzmán et al., 2003; Bamford et al., 2004; Tecuapetla et al., 2007) siguiendo determinadas reglas de conexión (Taverna et al., 2008), lo que sugiere la posibilidad de una regulación dinámica de los pesos sinápticos, así como la regulación dopaminérgica de las interneuronas estriatales (Tepper et al., 2004).

Se concluye que la estimulación cortical fuerte puede superar todos los efectos indirectos de la red, así que los presentes resultados apoyan el papel de la dopamina esperado por la “hipótesis de las dos vías”.

Por ultimo, la DA juega un papel fundamental en el movimiento y en la función normal de los GB, los déficits que surgen de las reducciones en la estimulación sostenida de los receptores a DA muestran una participación más amplia en los procesos de comportamiento (Schultz, 2007). Después de la depleción de DA, disminuyó la respuesta córtico-estriatal de las MSNs que expresan sustancia P, mientras que aumentó la respuesta de las MSNs que expresan ENK, esto es explicado en parte por una disminución de las conexiones sinápticas GABAérgicas entre las MSNs (Flores-Barrera et al., 2010). Por el contrario, el presente estudio muestra que la activación dopaminérgica del D₁R incrementa la respuesta córtico-estriatal en las MSNs-D₁ hasta el punto de inactivación de los potenciales de acción como lo observado en las MSNs-D₂, mientras que la activación del D₂R disminuye la respuesta córtico-estriatal en las MSNs-D₂ y reduce la amplitud y duración de las respuestas autorregenerativas de Ca²⁺ registradas en estas neuronas (**figura 22**). Por lo tanto, las acciones de la DA tienden a igualar la excitabilidad de las MSNs de ambas vías. Debido a que la modulación de los canales Ca_v1 se pierde en ausencia de DA, los cambios observados en la respuesta córtico-estriatal, es decir, la disminución en el potencial despolarizante de las MSNs-SP+ y la excitabilidad intrínseca mayor en las MSNs-ENK+ se pueden explicar fácilmente. El resultado final es que ambas clases de MSNs pierden la habilidad para balancear su actividad durante el parkinsonismo (Flores-Barrera et al., 2010), quizás, siendo la causa principal de la limitación del movimiento.

CONCLUSIONES

1. Las respuestas córtico-estriatales de las MSNs de la vía directa (D₁-SP+) e indirecta (D₂-ENK+) son muy diferentes y constituyen una “huella electrofisiológica” que distingue a las MSNs.
2. El papel de la inhibición es diferente en las respuestas córtico-estriatales en las MSNs de la vía directa e indirecta.
 - a) En neuronas de la vía directa, la inhibición frena el disparo inicial, y ayuda a mantener la despolarización en meseta.
 - b) En neuronas de la vía indirecta, la inhibición tiene la función de suprimir la excitabilidad intrínseca a niveles dendríticos y por lo tanto el disparo de potenciales de acción.
3. La corriente intrínseca de calcio tipo L (Ca_v1) participa en la respuesta sináptica córtico-estriatal.
4. La activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D₁ aumentó la respuesta córtico-estriatal en las MSNs-D₁, hasta el punto de inactivación de los potenciales de acción, similar a lo observado en MSNs-D₂.
5. La activación de los receptores dopaminérgicos de la clase D₂ redujo la respuesta córtico-estriatal y disminuyó la duración y amplitud de las respuestas autorregenerativas de calcio. en MSNs-D₂.
6. Después de la depleción de DA, disminuyó la respuesta córtico-estriatal de las MSNs-SP+, mientras que hubo un aumento en la respuesta de las MSNs-ENK+, explicado parcialmente por una disminución en las conexiones sinápticas GABAérgicas entre las MSNs y a la acción diferencial de la DA sobre las MSNs de la vía directa e indirecta.
7. La neuromodulación dopaminérgica en el estriado tiende a igualar la excitabilidad de las MSNs de ambas vías.

REFERENCIAS

- Ade KK, Janssen MJ, Ortinski PI, Vicini S (2008). Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 28, 1185 - 1197.
- Adermark L, Lovinger DM (2007) Combined activation of L-type Ca^{2+} channels and synaptic transmission is sufficient to induce striatal long-term depression. *J Neurosci* 27:6781–6787.
- Albin R L, Young AB, Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366-375.
- Andersen PH, Jansen JA (1990). Dopamine receptor agonists: selectivity and dopamine D1 receptor efficacy. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol.* 188: 335-347.
- Bamford NS, Zhang H, Schmitz Y, Wu NP, Cepeda C, Levine MS, Schmauss C, Zakharenko SS, Zablow L, Sulzer D (2004). Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* 42, 653-663.
- Bar-Gad I, Bergman H (2001). Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol.* 11 (6): 689-95. Review.
- Bar-Gad I, Morris G, Bergman H (2003). Information processing, dimensionality reduction and reinforcement learning in the basal ganglia. *Progress in neurobiology.* 71: 439-473.
- Bargas J, Cervantes L, Galarraga E, Fraguera A (2003). Ion channels: keys to neuronal specialization. In: Arbib MA (ed) *The handbook of brain theory and neural networks*, 2nd edn. MIT Press, Massachusetts, pp 585–590
- Bargas J, Galarraga E (2000). La acción neuromoduladora de la dopamina sobre los ganglios basales. *Ciencia al día. Instituto de Fisiología Celular.* 3: 45-56.
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989). An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res.*75: 146-56.
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res.* 539, 159-163.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994). Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14:6667–6686
- Bartos M, Vida I, Jonas P (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 45-56.

- 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 Sci U S A* 107, 14845-14850.
- Bennett BD, Bolam JP (1994). Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neurosci.* 62, 707–719.
- Bennett BD, Wilson CJ (2000). Synaptology and physiology of neostriatal neurons. In: *Brain dynamics and the striatal complex*. R. Miller and J. Wickens (eds.) Harwood Academic Publishers.
- Berke JD (2008). Uncoordinated firing rate changes of striatal fast-spiking interneurons during behavioral task performance. *J Neurosci* 28:10075–10080.
- Bolam JP, Bennett BD (1995). Microcircuitry of the neostriatum. En: Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function. Eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 1-19. Austin, TX: Landes.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PAC, Bevan MD (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat.* 196: 527-542.
- Bracci E, Panzeri S (2006). Excitatory GABAergic effects in striatal projection neurons. *J Neurophysiol* 95: 1285–1290.
- Buchwald NA, Price DD, Vernon L, Hull CD (1973). Caudate intracellular responses to thalamic and cortical inputs. *Expl Neurol.* 38: 311-323.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1996). The corticostriatal projection: From synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 19: 19-24.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibañez-Sandoval O, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Vargas J (2009a). Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 101, 737-749.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Vargas J (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435-1450.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Vautrelle N, Hernández A, Vergara R, Galarraga E, Vargas J (2009b). Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J Neurophysiol.* 102, 682-90.
- Carter AG, Sabatini BL. (2004). State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron* 44, 483– 493.
- Cepeda C, Andre VM, Yamazaki I, Wu N, Kleiman-Weiner M, Levine MS (2008). Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2

- receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *Eur. J. Neurosci.* 27, 671-682.
- Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS (1993). Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(20): 9576-80.
- Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Chandler SH, Levine MS (1998). Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *J Neurophysiol* 79, 82-94.
- Cepeda C, Levine MS (1998). Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci.* 20: 1-18.
- Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci.* 9, 251-259.
- Day M, Wokosin D, Plotkin JL, Tian X, Surmeier DJ (2008). Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J. Neurosci.* 28, 11603-11614.
- Dehorter N, Guigoni C, Lopez C, Hirsch J, Eusebio A, Ben-Ari Y, Hammond C (2009). Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 29, 7776-7787.
- DeLong MR (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281-285.
- Downie NM, Heath RW (1973). χ^2 de Pearson. En: Métodos estadísticos aplicados. Ed. Harla. pp. 212-231. México D.F.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Stenevi U, Iversen SD (1981). Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res.* 215, 147-161.
- Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, Chéramy A, O'Callaghan JP, Miller DB, Cole DG, Corbett R, Haile CN, Cooper DC, Onn SP, Grace AA, Ouimet CC, White FJ, Hyman SE, Surmeier DJ, Girault J, Nestler EJ, Greengard P (1998). DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science.* 281: 838-42.
- Flaherty AW, Graybiel AM (1991). Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *J Neurophysiol* 66: 1249-1263.

- Flores-Barrera E, Laville A, Plata V, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (2009). Inhibitory contribution to suprathreshold corticostriatal responses: An experimental and modeling study. *Cell. Mol. Neurobiol.* 29, 719-731.
- Flores-Barrera E, Vizcarra-Chacón BJ, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (2010). Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front Syst Neurosci.* 4,15.
- Flores-Hernández J, Cepeda C, Hernández-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P, Levine MS (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol.* 88: 3010-20.
- Flores-Hernández J, Galarraga E, Bargas J (1997). Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse.* 25(2): 185-95.
- Foreman MM, Fuller RW, Hynes MD, Gidda JS, Nichols CL, Schaus JM, Kornfeld EC, Clemens JA (1989). Preclinical studies on quinelorane, a potent and highly selective D2-dopaminergic agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 250: 227-235.
- Freund TF, Powell JF, Smith AD (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci.* 13, 1189-1215.
- Galarraga E, Bargas J, Sierra A, Aceves J (1989). The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res.* 75: 157-168.
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Barral J, Bargas J (1997). Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca^{++} conductance. *NeuroReport.* 8: 2183-86.
- Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández JV, Bargas J (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res.* 100: 239-49.
- García L, Audin J, D'Alessandro G, Bioulac B, Hammond C (2003). Dual effect of highfrequency stimulation on subthalamic neuron activity. *J Neurosci* 23(25): 8743-51.
- Gerfen CR (2000). Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.* 23, S64-S70.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 250: 1429-1432.
- Gerfen CR, Young III WS (1988). Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460, 161-167.

- Gertler TS, Chan CS, Surmeier DJ (2008). Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 28, 10814-10824.
- 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.* 30, 2223-2234.
- Greengard P (2001). The Neurobiology of Dopamine Signaling. *Bioscience Reports.* 21: 247-69
- Greengard P, Nairn AC, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, Allen PB, Fienberg A, Nishi A (1998). The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Brain Res Rev.* 26: 274-284.
- Gruber AJ, Powell EM, O'Donnell P (2009). Cortically activated interneurons shape spatial aspects of cortico-accumbens processing. *J Neurophysiol.*
- Gruber AJ, Solla SA, Surmeier DJ, Houk JC (2003). Modulation of striatal single units by expected reward: a spiny neuron model displaying dopamine-induced bistability. *J Neurophysiol.* 90, 1095–1114.
- Gulledge A T, Stuart GJ (2003). Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* 37, 299-309.
- Gustafson N, Gireesh-Dharmaraj E, Czubyko U, Blackwell KT, Plenz DA (2006). Comparative voltage and current-clamp analysis of feedback and feedforward synaptic transmission in the striatal microcircuit in vitro. *J. Neurophysiol.* 95:737-752.
- Guzmán JN, Hernández A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J, Bargas J (2003). Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci.* 23: 8931-40.
- Hallett PJ, Spoelgen R, Hyman BT, Standaert DG, Dunah AW (2006). Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J Neurosci.* 26, 4690-4700.
- Hernández-Echeagaray E, Starling AJ, Cepeda C, Levine MS (2004). Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: are dendrites necessary? *Eur J Neurosci.* 19: 2455-63.
- Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997). D₁ receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺-conductance. *J Neurosci* 17:3334–3342
- Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000). D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability through a novel PLCβ₁/IP₃/calcineurin signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987–8995

- Higley MJ, Sabatini BL (2010). Competitive regulation of synaptic Ca^{2+} influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nature Neurosci.* 13, 958-967.
- Hines ML, Carnevale NT (1997). The NEURON simulation environment. *Neural Comput* 9:1179–1209.
- Hines ML, Carnevale NT (2001). NEURON: a tool for neuroscientists. *Neuroscientist* 7:123–135
- Horikawa K, Armstrong WE (1988). A versatile means of intracellular labeling: Injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25:1-11.
- Hutchinson WD, Dostrovsky JO, Walters JR, Courtemanche R, Boraud T, Goldberg J, Brown P (2004). Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci* 24, 9240–9243.
- Inaji M, Okauchi T, Ando K, Maeda J, Nagai Y, Yoshizaki T, Okano H, Nariai T, Ohno K, Obayashi S, Higuchi M, Suhara T (2005). Correlation between quantitative imaging and behavior in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res.* 1064, 136-145.
- Ingham CA, Hodd SH, Taggart P, Arbuthnott GW (1998). Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J. Neurosci.* 18, 4732-4743.
- Jiang ZG, North RA (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *J. Physiol.* 443,533–553.
- Kasanetz F, Riquelme LA, Murer MG (2002). Disruption of the two-state membrane potential of striatal neurones during cortical desynchronisation in anaesthetised rats. *J Physiol (Lond)* 543: 577–589.
- Kasanetz F, Riquelme LA, O'Donnell P, Murer MG (2006). Turning off cortical ensembles stops striatal UP states and elicits phase perturbations in cortical and striatal slow oscillations in vivo. *J Physiol (Lond)*, 577: 97-113.
- Kawaguchi Y (1993). Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13, 4908-23.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18, 527-535.
- Kerr JND, Plenz D (2002). Dendritic calcium encodes striatal neurons output during up-states. *J Neurosci* 22: 1499-1512.
- Kita T, Kita H, Kitai ST (1985). Local stimulation induced GABAergic response in rat striatal slice preparations: intracellular recordings on QX-314 injected neurons. *Brain Res.* 360: 304-310.

- Kita, H. (1996). Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neurosci.* 70, 925-940.
- 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.
- Kostal L, Lansky P, Rospars JP (2007). Neuronal coding and spiking randomness. *Eur J Neurosci.* 26, 2693-2701.
- 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* 466, 622-626.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2005). Dopamine modulation of state dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J Neurosci.* 25,10537-10545.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2007). Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445, 643-647.
- Lambe EK, Aghajanian GK (2007). Prefrontal cortical network activity: opposite effects of psychedelic hallucinogens and D1/D5 dopamine receptor activation. *Neurosci* 145:900–910.
- Le Moine C, Bloch B (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol.* 355: 418-26.
- Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 4205-9.
- Lei W, Jiao Y, Del Mar N, Reiner A (2004). Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *J. Neurosci.* 24, 8289–8299.
- Levine MS, Li Z, Cepeda C, Cromwell HC, Altemus KL (1996). Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. *Synapse.* 24: 65-78.
- Liang L, DeLong MR, Papa SM (2008). Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci* 28, 7537-7547.
- Liu JC, DeFazio RA, Espinosa-Jeffrey A, Cepeda C, de Vellis J, Levine MS (2004). Calcium modulates dopamine potentiation of N-methyl-D-aspartate responses: electrophysiological and imaging evidence. *J Neurosci. Res.* 76, 315-322.

- Logan SM, Partridge JG, Matta JA, Buonanno A, Vicini S (2007) Long-lasting NMDA receptor-mediated EPSCs in mouse striatal medium spiny neurons. *J Neurophysiol* 98:2693–2704.
- Mahon S, Vautrelle N, Pezard L, Slaght SJ, Deniau JM, Chouvet G, Charpier S (2006). Distinct Patterns of Striatal Medium Spiny Neuron Activity during the Natural Sleep–Wake Cycle. *J of Neurosci* 26(48): 12587–12595
- 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, 3875-3884.
- Mann EO, Paulsen O (2007). Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci.* 30, 343-349.
- Maurice N, Tkatch T, Meisler M, Sprunger LK, Surmeier DJ (2001). D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci.* 21: 2268-77.
- Mermelstein PG, Song WJ, Tkatch T, Yan Z, Surmeier DJ (1998). Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci.* 18: 6650-61.
- Mink JW (1996). The Basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Progress Neurobiol* 50: 381- 425.
- Mink JW (2003). The basal ganglia and involuntary movements:impaired inhibition of competing motor patterns. *Arch. Neurol.* 60,1365-1368.
- Misgeld U, Wagner A, Ohno T (1982). Depolarizing IPSPs and depolarization by GABA of rat neostriatum cells in vitro. *Exp. Brain Res.* 45,108-114.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 78: 189-225.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci.* 23: 185-215.
- Nisenbaum ES, Wilson CJ (1995). Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci.* 15: 4449-63.
- Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997). Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci.* 17: 8147-55.
- O'Donnell P (2003). Dopamine gating of forebrain neural ensembles. *Eur. J . Neurosci.* 17, 429-435.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz M, Marin C, Alonso F, Zamarbide I, Lanciego JL, 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.
- Oorschot DE (2000). The domain hypothesis: A central organizing principle for understanding neostriatal circuitry?. En: *Brain dynamics and striatal complex*. Eds Miller R y Wickens JR, pp 151-163. Harwood Academic publisher, Amsterdam.
- Pacheco-Cano MT, Bargas J, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E (1996). Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs(+)-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res*. 110 (2): 205-11.
- Pérez-Garci E (2003a). Caracterización de la modulación del patrón de disparo de la neurona espinosa mediana del neostriado, por activación del receptor dopaminérgico tipo D2. Tesis Doctoral. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México D.F.
- Pérez-Garci E, Bargas J, Galarraga E (2003b). The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport*. 14: 1253-1256.
- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P, Bernardi G (2000). Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci*. 20(7): RC69.
- Planert H, Szydlowski SN, Hjorth JJJ, 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*. 30, 3499-3507.
- Plenz D (2003). When inhibition goes *incognito*: feedback interaction between spiny projection neurons in striatal function. *Trends Neurosci* 26:436–443.
- Pomata PE, Belluscio MA, Riquelme LA, Murer MG (2008). NMDA receptor gating of information flow through the striatum in vivo. *J Neurosci* 28:13384–13389
- Ramanathan S, Hanley JJ, Deniau JM, Bolam JP (2002). Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto GABAergic interneurons in the rat striatum. *J. Neurosci*. 22, 8158-8169.
- Rao G, Fisch L, Srinivasan S, D'Amico F, Okada T, Eaton C, Robbins C (2003). Does this patient have Parkinson disease? *JAMA* 289: 347-53 Review.
- Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, Agid Y DeLong MR, Obeso JA (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 11, 760-72.
- Reiner A, Medina L, Veenman CL (1998). Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res Rev*. 28, 235-285.
- Salgado H, Tecuapetla F, Pérez-Rosello T, Pérez-Burgos A, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J (2005). A reconfiguration of Cav2 Ca²⁺ channels

- current and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol.* 94: 3771-87.
- Salin P, López IP, Kachidian P, Barroso-Chinea P, Rico AJ, Gómez-Bautista V, Coulon P, Kerkerian-Le, Goff L, Lanciego JL (2009). Changes to interneuron-driven striatal microcircuits in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Disease* 34, 545-552.
- Schultz W (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol.* 80: 1-27.
- Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259-288.
- Sealfon SC, Olanow CW (2000). Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci.* 23: S34-40.
- Seeman P, Van Tol HH (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 6: 602-8.
- Shen W, Tian X, Day M, Ulrich S, Tkatch T, Nathanson NM, Surmeier D.J.(2007). Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat. Neurosci.* 10, 1458 -1466.
- Siegel S, Castellan NJ (1995). Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta 4ª edición. México. Trillas (reimpresión 1998).
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.* 86: 353-387.
- Snyder GL, Allen PB, Fienberg AA, Valle CG, Haganir RL, Nairn AC, Greengard P (2000). Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor in the neostriatum by dopamine and psychostimulants in vivo. *J. Neurosci.* 20, 4480-4488.
- Snyder GL, Fienberg AA, Haganir RL, Greengard P (1998). A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18: 10297-10303.
- Sokoloff P, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Martres MP, Giros B, Schwartz JC (1992). Pharmacology of human dopamine D3 receptor expressed in a mammalian cell line: comparison with D2 receptor. *Eur J Pharmacol.* 225: 331-337.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature.* 347: 146-151.
- Sokoloff P, Schwartz JC (1995). Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends Pharmacol Sci.* 16: 270-275.

- Stern EA, Jaeger D, Wilson CJ (1998). Membrane potential synchrony of simultaneously recorded striatal spiny neurons in vivo. *Nature* 394 (6692): 475-8.
- Stratford K, Mason A, Larkman A, Major G, Jack JJB (1989). The modeling of pyramidal neurons in the visual cortex. In: Dubin R, Miall C, Mitchison G (eds) *The computing neuron*. Addison-Wesley, Workingham, pp 296–321
- Sullivan MA, Chen H, Morikawa H (2008). Recurrent inhibitory network among striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 28:8682–8690.
- Suri RE, Schultz W (1998). Learning of sequential movements by neural network model with dopamine-like reinforcement signal. *Exp. Brain Res.* 121, 350–354.
- Suri RE, Schultz W (1999). A neural network model with dopamine-like reinforcement signal that learns a spatial delayed response task. *Neuroscience* 91, 871–890
- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14, 385-397.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.* 30, 228-235.
- Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS, Ariano MA (1993). Are neostriatal dopamine receptors co-localized? *Trends Neurosci.* 16: 299-305.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci.* 16: 6579-91.
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Geengard P (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 269-96.
- 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.* 28, 5504-5512.
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J, Galarraga E (2007). Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 10258-10263.
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzmán JN, Galarraga E, Bargas J (2005). Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J. Neurophysiol.* 93, 1119-1126.
- Tecuapetla F, Koós T, Tepper JM, Kabbani N, Yeckel MF (2009). Differential dopaminergic modulation of neostriatal synaptic connections of striatopallidal axon collaterals. *J. Neurosci.* 29, 8977-8990.

- Tepper JM, Koós T, Wilson CJ (2004). GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci.* 27, 662-669.
- Tseng KY, O'Donnell P (2005) Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D₁-NMDA co-activation. *Cereb Cortex* 15:49–57.
- Tseng KY, O'Donnell P (2004). Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *J Neurosci.* 24: 5131-9.
- Tseng KY, Snyder-Keller A, O'Donnell P (2007). Dopaminergic modulation of striatal plateau depolarizations in corticostriatal organotypic cocultures. *Psychopharmacol.* 191, 627-640.
- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR (2002). Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J. Neurophysiol.* 88, 1263-1269.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Fisone G, Girault JA (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32, 538-547.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 24: 125-132.
- Vergara R, Rick C, Hernández-López S, Laville JA, Guzmán JN, Galarraga E, Surmeier DJ, Bargas J (2003). Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J. Physiol.* 553, 169-182.
- Vida I, Bartos M, Jonas P (2006). Shunting inhibition improves robustness of gamma oscillations in hippocampal interneuron networks by homogenizing firing rates. *Neuron* 49, 107-117.
- Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galván E, Galarraga E (2000). Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺ dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95: 745-752.
- Wang HB, Deng YP, Reiner A (2007). In situ hybridization histochemical and immunohistochemical evidence that striatal projection neurons co-containing substance P and enkephalin are overrepresented in the striosomal compartment of striatum in rats. *Neurosci. Lett.* 425, 195-199.
- Whittington MA, Traub RD. (2003). Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci.* 26, 676-82.
- Wickens JR (1990). Striatal dopamine in motor activation and reward-mediated learning: steps towards a unifying model. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 80, 9–31
- Wickens JR (1993). A Theory of the Striatum. Pergamon Press, Oxford.
- Wickens JR, Oorschot DE (2000). Neural dynamics and surround inhibition in the neostriatum: A possible connection. En: Brain dynamics and striatal

- complex, eds. Miller R a Wickens JR, pp. 141-150. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Wilson CJ (1986). Postsynaptic potentials evoked in spiny neostriatal projection neurons by stimulation of ipsilateral and contralateral neocortex. *Brain Res.* 367, 201-213
- Wilson CJ (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99: 277-297.
- Wilson CJ (2004). Basal ganglia. En: The synaptic organization of the brain, ed. Shepherd GM, 5th Edition, pp. 361-414. Oxford University Press, Oxford.
- Wilson CJ, Groves PM, Kitai ST, Linder JC (1983). Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum. *J Neurosci* 3:383–388
- Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16:2397–2410
- Wolf JA, Moyer JT, Lazarewicz MT, Contreras D, Benoit-Marand M, O'Donnell P, Finkel LH (2005). NMDA/AMPA ratio impacts state transitions and entrainment to oscillations in a computational model of the nucleus accumbens medium spiny projection neuron. *J Neurosci* 25:9080–9095.
- Wu S, Amari S, Nakahara H (2002). Population Coding and Decoding in a Neural Field: A Computational Study. *Neural Computation* 14, 999-1026.



Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways

Edén Flores-Barrera, Bianca J. Vizcarra-Chacón, Dagoberto Tapia, José Bargas and Elvira Galarraga*

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

Edited by:

Ranulfo Romo,
Universidad Nacional Autónoma de México, México

Reviewed by:

José Manuel Giménez-Amaya,
Universidad Autónoma de Madrid,
Spain
Patricio O'Donnell,
University of Maryland School of
Medicine, USA

*Correspondence:

Elvira Galarraga, División de
Neurociencias, Instituto de Fisiología
Celular, Universidad Nacional
Autónoma de México, PO Box: 70-253,
México City, DF 04510 México.
e-mail: egalarra@ifc.unam.mx

The striatum is the principal input structure of the basal ganglia. Major glutamatergic afferents to the striatum come from the cerebral cortex and make monosynaptic contacts with medium spiny projection neurons (MSNs) and interneurons. Also: glutamatergic afferents to the striatum come from the thalamus. Despite differences in axonal projections, dopamine (DA) receptors expression and differences in excitability between MSNs from “direct” and “indirect” basal ganglia pathways, these neuronal classes have been thought as electrophysiologically very similar. Based on work with bacterial artificial chromosome (BAC) transgenic mice, here it is shown that corticostriatal responses in D₁- and D₂-receptor expressing MSNs (D₁- and D₂-MSNs) are radically different so as to establish an electrophysiological footprint that readily differentiates between them. Experiments in BAC mice allowed us to predict, with high probability ($P > 0.9$), in rats or non-BAC mice, whether a recorded neuron, from rat or mouse, was going to be substance P or enkephalin (ENK) immunoreactive. Responses are more prolonged and evoke more action potentials in D₁-MSNs, while they are briefer and exhibit intrinsic autoregenerative responses in D₂-MSNs. A main cause for these differences was the interaction of intrinsic properties with the inhibitory contribution in each response. Inhibition always depressed corticostriatal depolarization in D₂-MSNs, while it helped in sustaining prolonged depolarizations in D₁-MSNs, in spite of depressing early discharge. Corticostriatal responses changed dramatically after striatal DA depletion in 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) lesioned animals: a response reduction was seen in substance P (SP)+ MSNs whereas an enhanced response was seen in ENK+ MSNs. The end result was that differences in the responses were greatly diminished after DA depletion.

Keywords: basal ganglia, strionigral pathway, striopallidal pathway, medium spiny neurons, GABA_A receptors, corticostriatal pathway, 6-hydroxy-dopamine, Parkinson disease

INTRODUCTION

Models of basal ganglia function are commonly based on the segregation of medium spiny projection neurons (MSNs) into “direct” and “indirect” pathways which act in opposite ways to control movement (DeLong, 1990; Obeso et al., 2004). GABAergic neurons of the direct strionigral pathway are characterized by a higher expression of D₁ dopamine receptors plus the expression of substance P (SP) and dynorphin (D₁-MSNs), whereas GABAergic neurons of the indirect striopallidal pathway are characterized by a higher expression of D₂ dopamine receptors and co-expression of enkephalins (D₂-MSNs) (Gerfen and Young, 1988). However, a robust way to differentiate these neurons electrophysiologically has not been described, although differences in their latency for initial firing, threshold, subtype of inward rectification, frequency of spontaneous events, their capacity to develop long term synaptic plasticity after corticostriatal stimulation, and the subunit composition of their GABAergic receptors have been reported (Kreitzer and Malenka, 2007; Shen et al., 2007; Ade et al., 2008; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Valjent et al., 2009). Unfortunately, none of these differences can be readily used to identify the pathway, direct or indirect, to which a recorded MSN belongs.

The present experimental work shows that suprathreshold corticostriatal responses are an electrophysiological footprint that serves to recognize whether a recorded MSN belongs to the

direct or indirect pathway with high probability. More importantly, these differences disclose different integration processes for striatal inhibitory inputs.

Major glutamatergic afferents to the striatum come from the cerebral cortex and are monosynaptic to both MSNs and interneurons (e.g., Kawaguchi et al., 1995). Suprathreshold corticostriatal responses may exhibit plateau depolarizations lasting hundreds of milliseconds capable to fire trains of action potentials (Bargas et al., 1991; Kita, 1996). These orthodromic responses include polysynaptic or reverberating inputs as well as intrinsic autoregenerative responses (Wilson, 1986; Kita, 1996; O'Donnell, 2003; Vergara et al., 2003; Tseng et al., 2007; Flores-Barrera et al., 2009) and are the first step for micro-circuitry integration and processing (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a). The present work demonstrates with the help of bacterial artificial chromosome (BAC) transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of D₁ or D₂ receptor promoters (BAC D₁ or D₂ eGFP mice), large, distinct and clear differences between the corticostriatal responses from direct and indirect pathway neurons. Moreover, these electrophysiological differences allowed us to predict, with high probability ($P > 0.9$), whether a recorded neuron, from rat or non-BAC mice, was going to react to SP or enkephalin (ENK) antibodies. Thereafter, we were able to demonstrate that these differences are greatly altered in

neurons from dopamine (DA)-depleted striata after unilateral 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) lesions in the substantia nigra compacta (SNc).

MATERIALS AND METHODS

SLICE PREPARATION

All experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México. BAC D₁ and D₂ eGFP mice, between postnatal days 60–90 (PD60–90) or adult Wistar rats (PD90) were used. Animals were anesthetized with ketamine/xylazine and their brains quickly removed and placed into ice cold (4°C) bath saline containing (in mM): 126 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 11 glucose, 300 mOsm/l, pH = 7.4 gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. Parasagittal neostriatal slices (250–350 μm thick) were cut using a vibratome and incubated in oxygenated bath saline at room temperature for at least 1 h before recording.

INTRACELLULAR RECORDINGS

Intracellular recordings were carried out using sharp microelectrodes (80–120 MΩ) filled with 1% biocytin and 3 M potassium acetate fabricated from borosilicate glass. Recordings were obtained with a high input impedance electrometer (Neurodata, New York, NY, USA) with an active bridge circuit using standard techniques (see Flores-Barrera et al., 2009). Signals were filtered at 1–3 kHz and digitized at 3–9 kHz with an AT-MIO-16E4 board (National Instruments, Austin, TX, USA) and a PC computer. Slices were totally submerged in the bath solution and superfused with the same saline at 2 ml/min (34–36°C). Recordings were digitized and captured with the aid of software designed in the laboratory in the LabView environment (National Instrument, Austin, TX, USA) (Lemus-Aguilar et al., 2006). Resting membrane potential was about -83 ± 4 mV; whole neuronal input resistance (R_N) was about 48 ± 6 MΩ, membrane time constant (τ_m) was about 33 ± 6 ms and equalizing time constant (τ_1) was about 5 ± 0.8 ms ($n = 46$) as measured by fitting a sum of exponential functions to the voltage transients (see also Reyes et al., 1998). No significant differences in passive properties were found between indirect and direct pathway neurons, neither between control and DA-depleted neurons (Cepeda et al., 2008; Gertler et al., 2008). Drugs were dissolved in the bath saline from stock solutions made daily.

EVOKED CORTICOSTRIATAL RESPONSES

Recordings were carried out in the dorsal striatum. The arrangement of recording and stimulating electrodes has been described (see Flores-Barrera et al., 2009). Briefly, the stimulation of cortical sensory-motor areas was performed with concentric bipolar electrodes (25–50 μm at the tip). The distance between recording and stimulating electrodes was between 0.5 and 1 mm. Synaptic responses were evoked by a single unrepeated square wave pulse of 0.1 ms. Stimulation was delivered with a stimulator (S-8800; Grass, West Warwick, RI, USA) using an isolation unit. The membrane potential was held at -80 mV while the corticostriatal responses were recorded. A series of current pulses

of increasing intensity were used to determine evoked synaptic potential threshold and response amplitude at different stimulation strengths. A series of stimulus (0.5×, 0.75×, 1.25×, 1.5×, 2.0× threshold current) was used to compare response amplitudes, as well as the effects of drugs used. Traces shown are the average of three recordings taken after the amplitude had been stabilized in a given condition.

CELL VISUALIZATION AND CONFIRMATION OF CELL IDENTITY

Medium spiny projection neurons within the dorsal striatum were identified by their enhanced expression of green fluorescent protein (eGFP) using epifluorescence microscopy (dopamine D₁ or D₂ receptor expression). In all cases neurons were injected with biocytin and sub-samples of neurons were immunoreacted to either SP or ENK antibodies. Immunocytochemical preparations were visualized on a confocal microscope (see Guzman et al., 2003). Data obtained from BAC D₁ or BAC D₂ eGFP mice were compared. Because electrophysiological responses from eGFP negative neurons from BAC D₁ eGFP cannot be discerned from those recorded from eGFP-positive neurons from BAC D₂ eGFP mice, and vice versa, their measurements of corticostriatal responses were pooled together. Moreover, corticostriatal responses identified as coming from direct or indirect pathway neurons were also identified in rat neurons. In fact, we calculated the probability to ascertain the proper identity of a rat neuron by predicting, according to its corticostriatal response, its correspondent pathway (direct or indirect) as established by immunocytochemistry for SP or ENK. This probability was >0.9 . This allowed us to use the hemiparkinsonian rat model of Parkinson disease (6-hydroxy-dopamine or 6-OHDA) to test whether corticostriatal responses changed as a result of DA depletion.

6-OHDA LESIONS

Procedures to deplete the striatum of DA after 6-OHDA in the SNc have been described (Dunnett et al., 1981). Briefly, male Wistar rats (P60–90) were anesthetized with ketamine (85 mg/kg, i.p.) and xylazine (15 mg/kg, i.p) and injected stereotaxically with 4 μg of 6-OHDA (Sigma, St. Louis, MO, USA) into the left substantia nigra (SN: 4.80 mm caudal, 1.6 mm lateral to bregma, and 8.2 mm ventral to the skull surface). 6-OHDA solution (4 μg/μl saline with 0.2 mg/ml of ascorbic acid) was ejected at a rate of 0.1 μl/min. After 2 weeks animals were selected based on their rotational behavior (amphetamine: 4 mg/kg i.p.; >500 ipsilateral stereotyped turns) (Inaji et al., 2005). The number of animals used in the experimental samples was the minimal possible to attain statistical significance under diverse experimental paradigms. All procedures employed anesthesia to avoid animal suffering.

DATA ANALYSIS AND STATISTICS

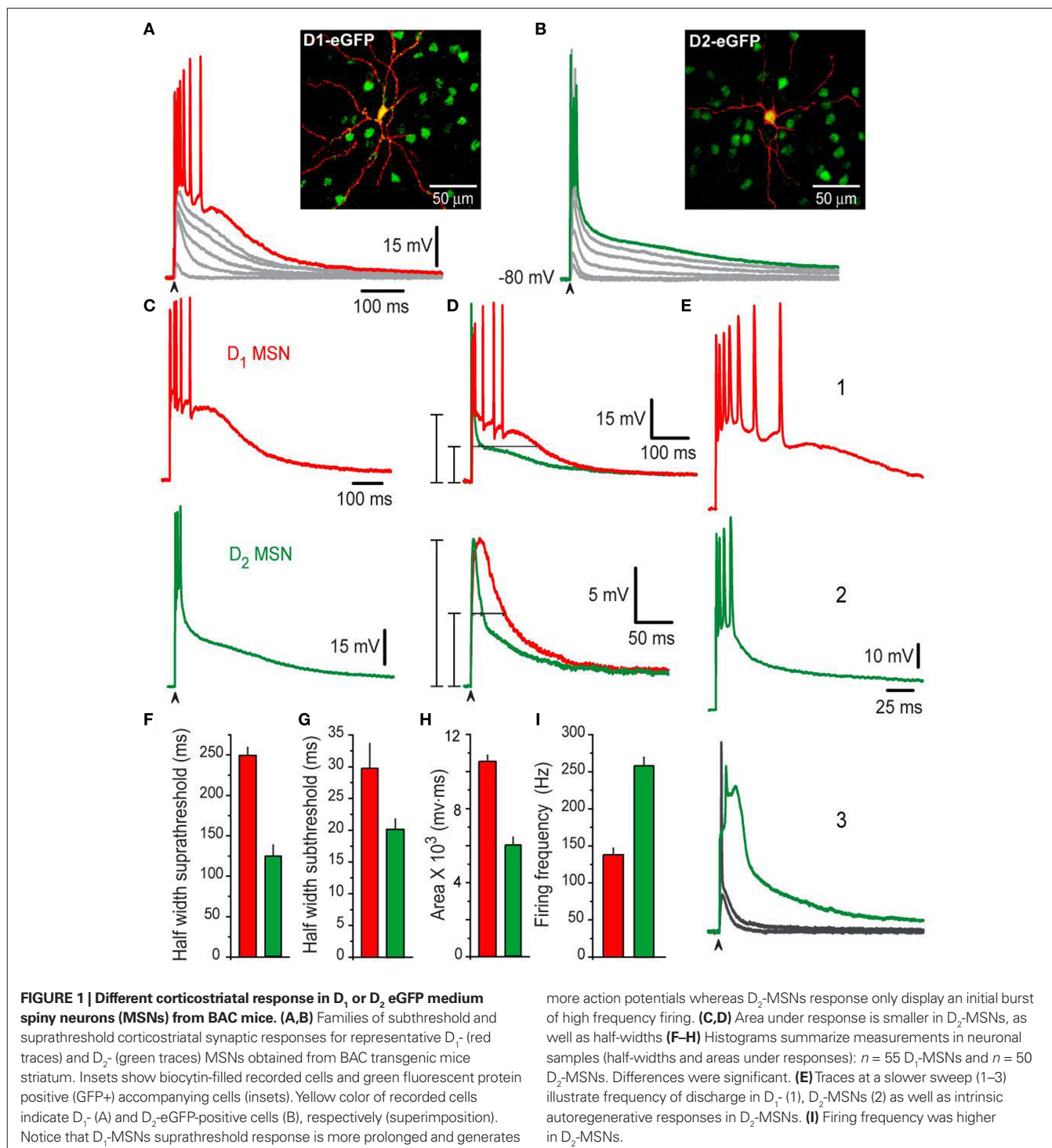
The area under the corticostriatal synaptic response was obtained by numerical integration and then normalized to the area under the threshold voltage (Flores-Barrera et al., 2009). Percentages of change in this area are reported. Digital subtraction was also used to obtain the component sensitive to bicuculline, a GABA_A receptor antagonist. Statistical values in histograms and text are presented as mean \pm SEM. Differences between measured parameters were compared with Student's *t*-tests.

RESULTS

D₁ AND D₂ MEDIUM SPINY NEURONS DIFFERED IN THEIR SUPRATHRESHOLD CORTICOSTRIATAL RESPONSES

The MSNs presented in this study (*n* = 200) were identified as belonging to the direct pathway (D₁-SP+ MSNs) based on: first, the expression of dopamine D₁ receptor identified by their expression of GFP (from PD60–90 BAC mice), and second, by their SP-immunoreactivity (SP+; from mice or rats). A similar procedure

was done to identify indirect pathway neurons (D₂-ENK+ MSNs): D₂ eGFP (from BAC mice) and ENK-immunoreactivity (ENK+; from mice or rat) (see Materials and Methods). **Figure 1** shows corticostriatal responses from a typical BAC D₁ eGFP MSN (D₁-MSN) (**Figure 1A**) and a typical BAC D₂ eGFP MSN (D₂-MSN) (**Figure 1B**). Families of subthreshold and suprathreshold corticostriatal responses for these two neuron classes are illustrated. A large, conspicuous and evident difference between these responses



can be seen at a first glance: Responses of D_1 -MSNs last longer than those from D_2 -MSNs, including both subthreshold depolarizations (gray) and suprathreshold depolarizations with trains of action potentials (colored) (**Figure 1C** cf., top vs. bottom). The same results were obtained in neurons from rats predicted to be SP+ or ENK+ according to the same electrophysiological responses (see Materials and Methods). Mean durations of suprathreshold responses at half amplitude (half-widths) were: 250 ± 9 ms for D_1 -SP+ MSNs ($n = 55$) and 124 ± 13 ms for D_2 -ENK+ MSNs ($n = 50$) (**Figure 1D** top and histogram in **Figure 1F**; $P < 0.001$). Mean half-widths of subthreshold responses were also different: 29 ± 3 ms for D_1 -SP+ MSNs and 19 ± 2 ms for D_2 -ENK+ MSNs (**Figure 1D** bottom and histogram in **Figure 1G**; $P < 0.005$). Moreover, areas under cortico-striatal responses were significantly larger in D_1 -SP+ MSNs than in D_2 -ENK+ MSNs: $10,546 \pm 331$ mV·ms vs. $5,987 \pm 427$ mV·ms, respectively ($P < 0.001$; histogram in **Figure 1H**). **Figures 1E1,E2** illustrate the same responses at a slower sweep: trains of action potentials in D_1 -SP+ MSNs lasted more but attained a slower mean firing frequency than trains in D_2 -ENK+ MSNs: 138 ± 8 Hz vs. 258 ± 11 Hz, respectively ($P < 0.001$, histogram in **Figure 1I**). Finally, in the case of D_2 -ENK+ MSNs, suprathreshold responses frequently exhibit intrinsic autoregenerative potentials instead of the brief train of spikes (in some trials during the same experiment) (**Figure 1E3**), suggesting that this intrinsic property underlies the train of action potentials and shapes the response in D_2 -ENK+ MSNs (Bargas et al., 1991; Kita, 1996; Gruber et al., 2003; Vergara et al., 2003; Carter and Sabatini, 2004; Day et al., 2008; Flores-Barrera et al., 2009). These responses were rarely seen in D_1 -SP+ MSNs in these conditions, but were easily disclosed in all D_2 -ENK+ MSNs when subject to hyperpolarization (not shown here but see Bargas et al., 1991), supporting previous suggestions that dendritic excitability, and therefore, cortico-striatal integration is different in D_1 -SP+ and D_2 -ENK+ MSNs (Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008).

CONTRIBUTION OF SYNAPTIC INHIBITION DIFFERED IN THE CORTICOSTRIATAL RESPONSES OF DIRECT AND INDIRECT PATHWAY NEURONS

It is known that inhibitory inputs from axon collaterals interconnecting MSNs (Tunstall et al., 2002; Guzman et al., 2003; Koos et al., 2004; Tecuapetla et al., 2005, 2007, 2009; Gustafson et al., 2006; Gertler et al., 2008) and from several types of GABAergic interneurons (Koos et al., 2004; Tecuapetla et al., 2007) contribute to suprathreshold cortico-striatal responses (Flores-Barrera et al., 2009). Some differences in the actions of GABAergic inputs onto D_1 - and D_2 -MSNs have been shown (Ade et al., 2008; Cepeda et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009; Gittis et al., 2010; Planert et al., 2010). However, the probable contribution of these differences in the shaping of cortico-striatal responses is not known. **Figure 2** shows that important functional differences can be disclosed for the contribution of inhibition on the suprathreshold responses from D_1 -SP+ and D_2 -ENK+ MSNs. Representative examples of orthodromic responses from D_1 -SP+ and D_2 -ENK+ MSNs are shown in **Figures 2A,E** (control). **Figures 2B,F** show that the action of the GABA_A receptor blocker, 10 μ M bicuculline, is completely different for each response: GABA_A receptor blockade in D_1 -SP+ MSN ($n = 24$) had a dual action (**Figure 2B**): Early in the response it produced an enhancement of the initial depolarization

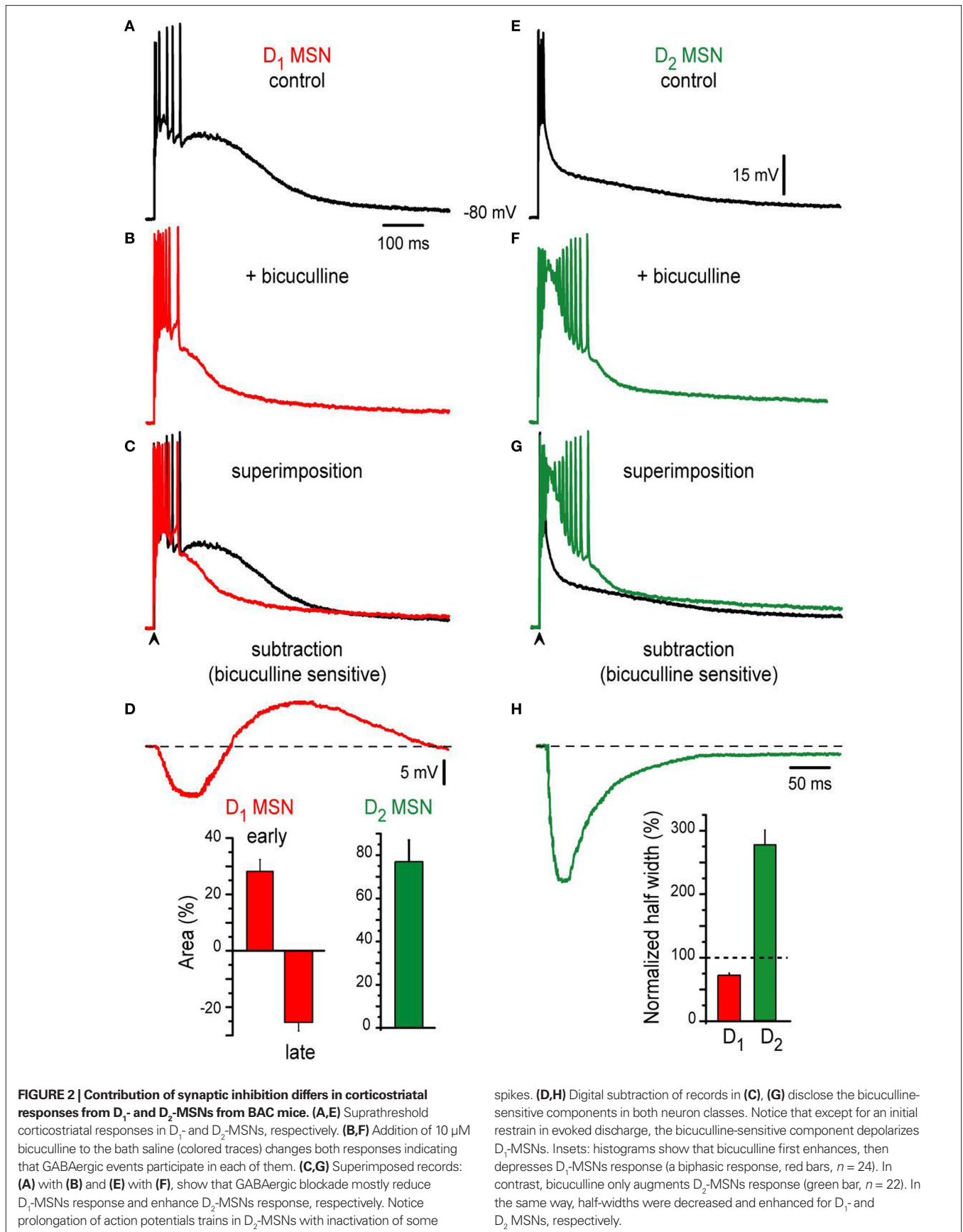
and an increase in the frequency of evoked discharge, suggesting that initial depolarization and firing are being restrained by the GABAergic inputs contributing to the response (Flores-Barrera et al., 2009). However, later in the response the plateau depolarization was reduced by GABA blockade, indicating that GABAergic inputs help in sustaining the depolarization (depolarizing inhibition) (Gulledge and Stuart, 2003; Bartos et al., 2007; Mann and Paulsen, 2007; Flores-Barrera et al., 2009).

Superimposition (**Figure 2C**: superimposition of **Figures 2A,B**) and subtraction of recordings (**Figure 2D**: subtraction of **Figures 2A,B**), disclose the dual action of GABA in direct pathway neurons: the bicuculline-sensitive component first hyperpolarizes the neuron with respect to firing level, and second, depolarizes the neuron and helps in sustaining the depolarization late in the response: superimposed traces cross each other (**Figure 2C**). Percentages of early depolarization (before crossing) and late hyperpolarization (after crossing) induced by bicuculline in the synaptic response are summarized in the histogram at the inset of **Figure 2D**: $28 \pm 4\%$ (early) and $-25 \pm 3\%$ (late) ($P < 0.002$).

In contrast, bicuculline behaved differently in the indirect pathway MSNs responses (cf., **Figures 2E,F**): it depolarized the response all along. Superimposition of recordings, before and after bicuculline (**Figure 2G**), do not cross each other. And subtraction of them (**Figures 2E,F,H**) discloses a bicuculline-sensitive component whose action persisted during the whole trace; that is, inhibition decreases the amplitude of the response at all times. Percentage of amplitude depolarization increase after bicuculline was $76 \pm 10\%$ (inset of **Figure 2D**; $n = 22$; $P < 0.002$) in D_2 -ENK+ MSNs responses. The number of action potentials and duration of the train also increased. However, some spikes inactivated due to the amount of depolarization attained in D_2 -ENK+ MSNs after bicuculline. This large depolarization reflects the underlying intrinsic autoregenerative response below the train of action potentials in control responses from D_2 -ENK+ MSNs (Bargas et al., 1991; Carrillo-Reid et al., 2009a,b) which is facilitated by bicuculline (**Figure 1E3**). Therefore, the result strongly suggests that a main role of inhibition in D_2 -ENK+ MSNs is to restrain intrinsic dendritic excitability (**Figure 2G**) (Bargas et al., 1991; Carter and Sabatini, 2004; Day et al., 2008). Histogram at the inset of **Figure 2H** compares half-widths of responses from each cell class after bicuculline, with respect to their own controls (dashed line): clearly, D_1 -SP+ MSNs response decrease in duration (ca. 76%; 249 ± 9 ms to 189 ± 2 ms) while D_2 -ENK+ MSNs response increase in duration (ca. 192%; 124 ± 1 ms to 238 ± 8 ms) during bicuculline action. Both picrotoxin and gabazine had the same actions as bicuculline (not shown).

We conclude that the role of inhibition is different in the cortico-striatal suprathreshold responses of direct and indirect pathways MSNs. In direct neurons, inhibition restrains initial firing but helps in maintaining plateau depolarization. In indirect pathway neurons, inhibition has the function of suppressing intrinsic excitability at dendritic levels and thus firing of action potentials (Bargas et al., 1991; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Flores-Barrera et al., 2009).

If the above conclusion is correct we should be able to distinguish different roles of inhibition in subthreshold responses also, because at lower stimulus strengths we may be able to record depolarizing non-propagating intrinsic responses (Carter



and Sabatini, 2004; Day et al., 2008). To test this hypothesis, the contribution of the bicuculline-sensitive component to the corticostriatal responses of direct and indirect pathway neurons was further observed at different stimulation intensities. The results are shown in **Figure 3** (subthreshold, threshold and suprathreshold intensities): at subthreshold levels (cf., **Figures 3A,E**) bicuculline is revealed to depress synaptic inputs in D_1 -SP+ MSNs while it enhances synaptic inputs in D_2 -ENK+ MSNs. Note that control subthreshold synaptic events (black traces in **Figures 3A,E**) were depolarizing for both synaptic potentials near 10 mV above rest, with no indication of a hyperpolarizing component, indicating that inhibitory contribution to these potentials is depolarizing for both types of neuron (i.e., reversal potentials less negative than resting potentials near -80 mV). This has been corroborated by several studies using different techniques (Misgeld et al., 1982; Jiang and North, 1991; Bennett and Bolam, 1994; Kita, 1996; Ramanathan et al., 2002; Koos et al., 2004; Bracci and Panzeri, 2006; Dehorter et al., 2009; Flores-Barrera et al., 2009) discarding biases towards one neuronal class. Nonetheless, blockade of GABA_A receptors during subthreshold responses decreases the synaptic potential in D_1 -SP+ MSNs since a depolarizing component: inhibition, was blocked (colored trace in **Figure 3A**). In contrast, bicuculline enhances subthreshold responses in D_2 -ENK+ MSNs (**Figure 3E** colored trace) even if inhibition is also depolarizing. To explain how a depolarizing input enhances depolarization when it is blocked, one has to assume that inhibition in D_2 -ENK+ MSNs is restraining intrinsic depolarizing currents (shunting inhibition) even at subthreshold levels (Carter and Sabatini, 2004; Day et al., 2008) supporting the assumption made above.

This assumption is further supported by analyzing threshold inputs (cf., **Figures 3B,F**; spikes are clipped).

Noticeably, GABAergic synapses help to fire an action potential in D_1 -SP+ MSNs since bicuculline avoided firing (**Figure 3B** colored trace); inhibition being both depolarizing and excitatory for these neurons at this stimulus strength (Vida et al., 2006). In contrast, bicuculline discloses an intrinsic local response during threshold inputs in D_2 -ENK+ MSNs (**Figure 3F** colored trace). Local response disrupts both kinetics and duration of synaptic potentials and preceded the appearance of intrinsic autoregenerative responses at stronger stimulus strengths (**Figure 3G**). Finally, **Figures 3C–H** illustrate suprathreshold traces and subtractions of the different paired traces (**Figures 3A–G**).

To summarize, although the bicuculline-sensitive component (i.e., GABA inputs) is depolarizing at all intensities in both types of MSNs and it actually contributes to synaptic depolarization and even firing in D_1 -SP+ MSNs (Bracci and Panzeri, 2006), in D_2 -ENK+ MSNs it has another role, that of restraining intrinsic dendritic excitability (Day et al., 2008). These results demonstrate different roles for inhibition in direct and indirect pathway neurons. The cause of these different inhibitory roles may not be completely attributed to different inhibitory inputs (Mallet et al., 2006; Gittis et al., 2010; Planert et al., 2010), which is under debate, but to differences in intrinsic dendritic excitability of direct and indirect neurons (Day et al., 2008).

Finally, evidence has been shown that a tonic current mediated by GABA_A receptors containing the α_5 subunit is more expressed in the D_2 - than in the D_1 -MSNs (Ade et al., 2008). Therefore, we

wanted to see the contribution of this current to the difference between the responses. $10 \mu\text{M}$ L655-708, an inverse selective agonist of GABA_A receptors containing the α_5 subunit was applied to the bath saline after similar evoked responses obtained with similar stimulus strength were obtained in both neuronal classes. **Figure 4** shows that a similar percentage of the corticostriatal response was enhanced in both neuronal classes during L655-708: ca. 37% and 35% for D_1 -SP+ and D_2 -ENK+ MSNs, respectively ($n = 4$ for each MSN type, **Figures 4A,B**). Histogram in **Figure 4C** summarizes these results. Thus, although tonic inhibition may serve other purposes (Ade et al., 2008), the present experiments show that it is not the main cause of corticostriatal response differences found between adult D_1 -SP+ and D_2 -ENK+ MSNs (Day et al., 2008).

CORTICOSTRIATAL RESPONSES ARE MODIFIED BY DOPAMINE DEPLETION

As said above, although described differences were discovered in BAC mice, they were corroborated in rats by predicting, based on their electrophysiological responses, which neuron was going to be SP+ or ENK+ by double labeling with biocytin plus immunocytochemistry for the peptide of choice. This prediction showed high accuracy ($P > 0.9$). Neurons that rose doubts coincide with the percentage of neurons that are supposed to co-localize both receptors and peptides (Wang et al., 2007). However, this correspondence needs further corroboration (multiple labeling out of the scope of the present work) by a future study.

In any case, the above experiments allowed us to employ the widely used rat model of Parkinson disease (unilateral lesion with 6-OHDA in the substantia nigra pars compacta; see Materials and Methods) to compare corticostriatal responses before and after striatal DA depletion. Only lesions that induced >500 ipsilateral stereotyped turns ($n = 55$ rats) were considered, to ensure that most dopaminergic innervation in the striatum ipsilateral to the lesion was lost. Further histochemical analysis in a subset of striatal slices confirmed a virtual unilateral loss of tyrosine hydroxylase in lesioned animals. Corticostriatal synaptic responses after DA depletion were therefore examined in slices from PD90 rats. Slices were obtained 2–3 weeks after the lesion and behavioral testing.

In SP+ MSNs (cf., **Figures 5A,B**), the area under the corticostriatal response was significantly reduced after denervation when compared to the controls: $11,533 \pm 663$ mV·ms ($n = 11$) in the controls vs. $8,769 \pm 527$ mV·ms ($n = 16$) in DA-depleted neurons (**Figure 5E**; $P < 0.025$), as well as the half-width: 260 ± 14 ms in controls vs. 215 ± 13 ms (**Figure 5F**; $P < 0.01$).

The opposite was true for ENK+ MSNs (cf., **Figures 5C,D**), the area under the corticostriatal response was significantly enhanced: cf., $5,828 \pm 736$ mV·ms ($n = 9$) in the controls vs. $8,942 \pm 937$ mV·ms ($n = 13$) in DA-depleted neurons (**Figure 5E**; $P < 0.02$). The half-width also changed: 130 ± 22 ms in controls vs. 226 ± 24 ms (**Figure 5F**; $P < 0.01$). Neither threshold for action potential firing nor the firing frequency nor the passive properties changed as a result of DA depletion. However, a long lasting depolarization predominated during the response of ENK+ MSN after DA depletion. The overall result was that corticostriatal responses from SP+ and ENK+ MSNs after DA depletion looked similar, in contrast to those in the controls (cf., **Figures 1 and 5B,D**).

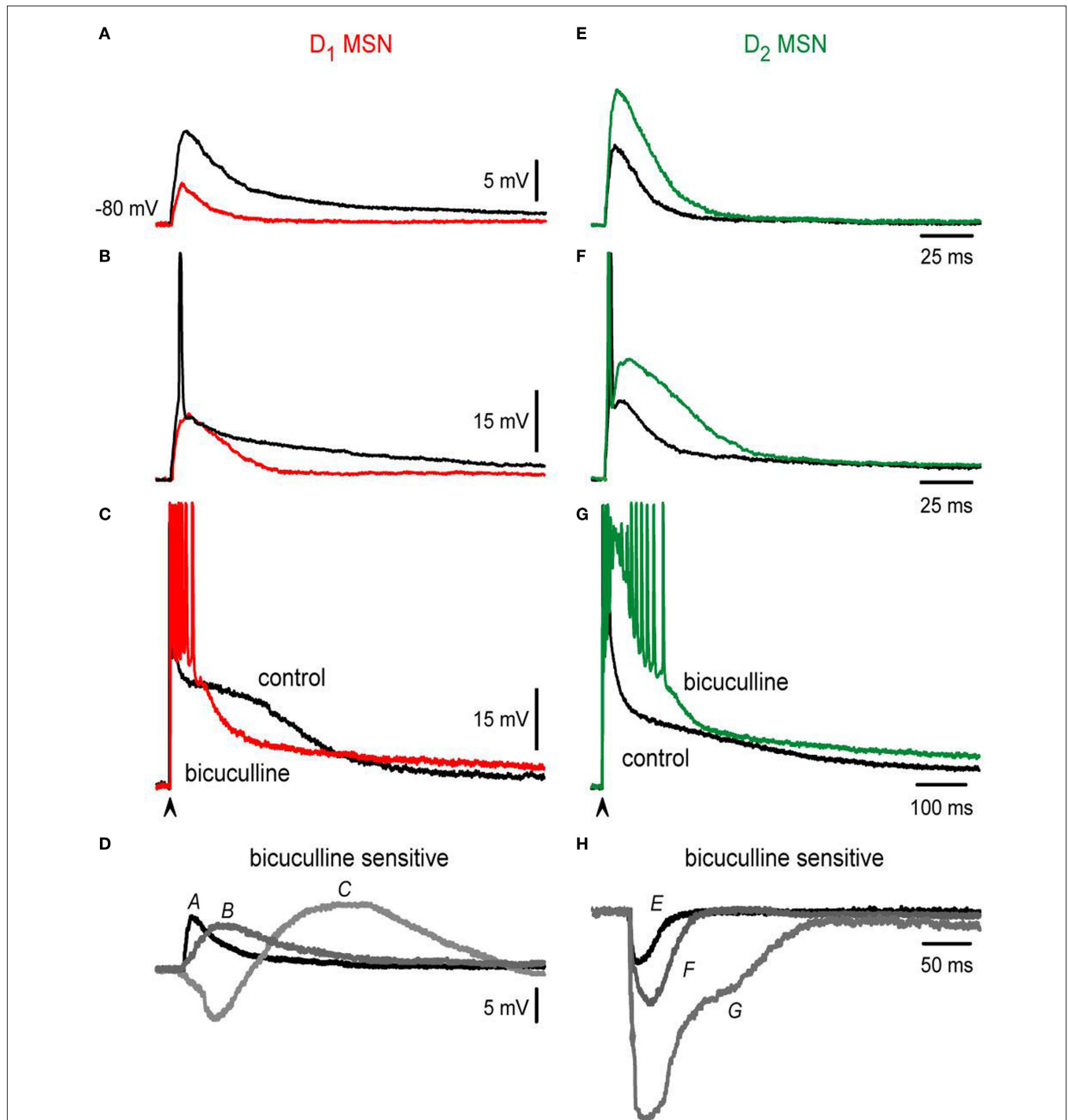


FIGURE 3 | Bicuculline actions differ in D₁- and D₂-MSNs at different stimulation intensities. (A,E) Blockade of GABAergic synapses during subthreshold synaptic responses (black trace = control; colored trace = after bicuculline): both responses are depolarizing and have a similar amplitude in control conditions (about 10 mV). Notice that GABAergic blockade reduces the synaptic response in D₁- and increases the synaptic response in D₂-MSNs. There is no hyperpolarizing synaptic component in any response in spite of both being bicuculline-sensitive: inhibition is depolarizing in both cases. **(B,F)** Blockade of GABAergic synapses during threshold synaptic responses. Again, a decrease and an increase in the responses were observed in D₁- and D₂-MSNs synaptic

responses, respectively. Notice that blockade of GABAergic synapses impedes the firing of action potentials in D₁-MSNs **(B)** and elicits a local response that distorts synaptic kinetics in D₂-MSNs **(F)**. **(C,G)** Blockade of GABAergic synapses in suprathreshold synaptic responses. Superimposed traces cross each other in D₁-MSNs and do not cross in D₂-MSNs. **(D-H)** Digital subtractions of traces in **(A-G)**: Bicuculline-sensitive component helps in depolarizing all D₁-MSNs synaptic responses, except at the beginning of the suprathreshold responses. In contrast, bicuculline enhanced D₂-MSNs synaptic responses at all stimulus strengths. Inhibition is depolarizing and even excitatory in D₁-MSNs whereas it always represses D₂-MSNs (shunting inhibition).

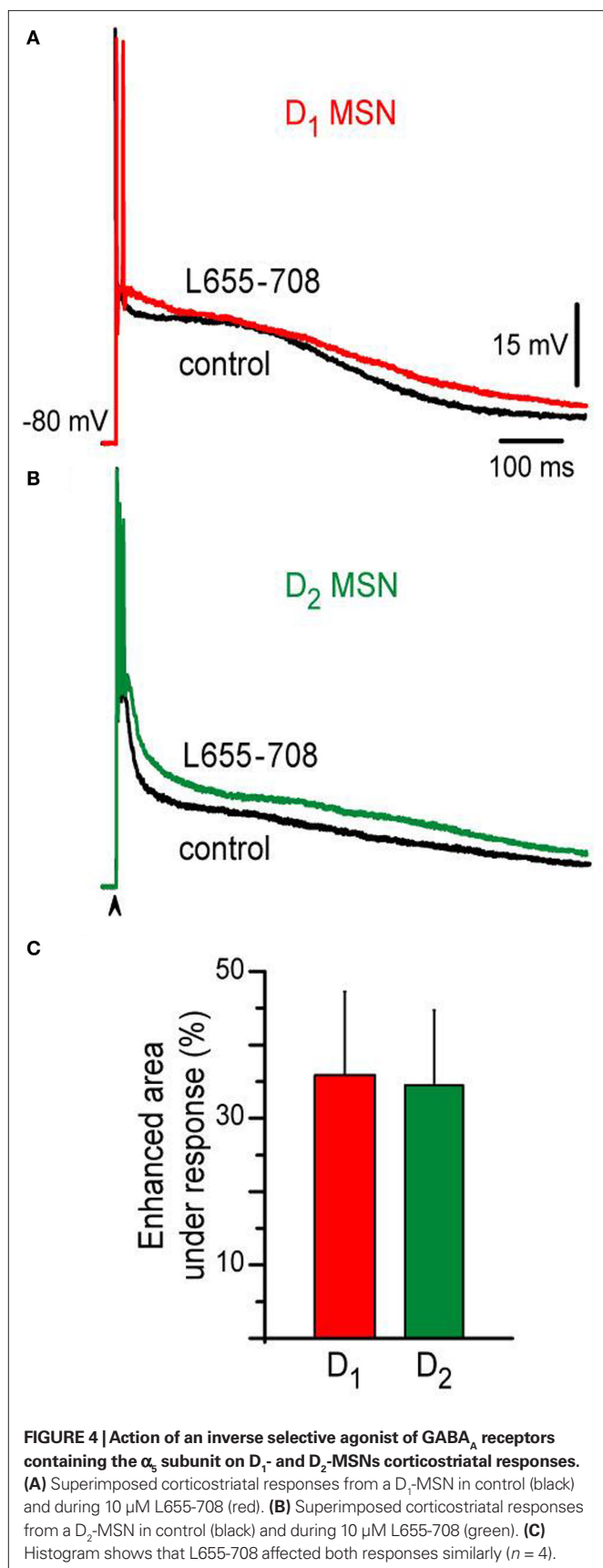


Figure 6 gives a picture of a more thorough comparison at different stimulus strengths (subthreshold, threshold – with spikes clipped – and suprathreshold responses).

Notice that, synaptic potentials were reduced after DA depletion in SP+ MSNs for similar stimulus strengths. DA depletion resulted in smaller corticostriatal responses to any stimulus in direct pathway neurons (**Figures 6A–C**). Because it was previously shown that inhibition contributes to the depolarizing synaptic response in control neurons (**Figure 3**), we hypothesized that a decrease in inhibition may be causing these different responses (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009). In contrast, similar stimulation intensities showed that DA depletion enhanced and prolonged synaptic potentials in ENK+ MSN (**Figures 6D–F**) even more than in control conditions, resulting in larger corticostriatal responses to any stimulus in indirect pathway neurons (**Figures 6D–F**), as though inhibition was less capable to control intrinsic excitability in ENK+ MSNs (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009).

Although no significant differences were observed in the areas under the response for suprathreshold responses (**Figure 6I**), comparisons below threshold level did show a clear difference: corticostriatal responses are smaller in direct pathway neurons after DA depletion, establishing new evidence of a functional decrease in direct pathway neurons during parkinsonism, and secondly, corticostriatal responses are larger in indirect pathway neurons after DA depletion supporting the long time hypothesized enhancement of indirect pathway function after denervation. Besides rendering this new evidence, the results show that changes suffered after DA depletion resemble those obtained with GABA_A receptor blockade (**Figure 3**), in the sense that one response is decreased and the other is increased after the experimental maneuver. Therefore, we decided to compare GABA_A receptor blockade in direct and indirect neurons after DA depletion.

INHIBITORY CONTRIBUTION TO SUPRATHRESHOLD RESPONSES IS MODIFIED AFTER DA DEPLETION

10 μ M bicuculline were then added while evoking a corticostriatal response in each neuron class subject to DA depletion. Subthreshold synaptic responses behaved in the same way as the controls during GABA_A receptor blockade: bicuculline reduced these responses in SP+ MSNs and enhanced them in ENK+ MSNs neurons (cf., **Figures 7A–G**).

However, bicuculline effects were weaker in SP+ MSNs as compared to controls from intact animals (**Figure 7Da**). In fact, at threshold and suprathreshold intensities responses in direct pathway neurons show less inhibition during the early response $16 \pm 3\%$ ($n = 4$) (**Figure 7Dc** vs. $28 \pm 4\%$ in intact animals; $P < 0.03$) (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009). Remarkably, the late depolarizing component that prolonged the plateau depolarization in SP+ MSNs was reduced to $15 \pm 4\%$ (**Figure 7Dc** vs. $25 \pm 3\%$ **Figure 3D** in intact animals; $P < 0.05$) supporting the view that recurrent inhibitory inputs sustain the prolonged depolarization (Flores-Barrera et al., 2009).

On the other hand, bicuculline actions in ENK+ MSNs were greatly enhanced as compared to the controls (**Figures 7E–H**), so that dendritic excitability seemed greatly increased after the lesion

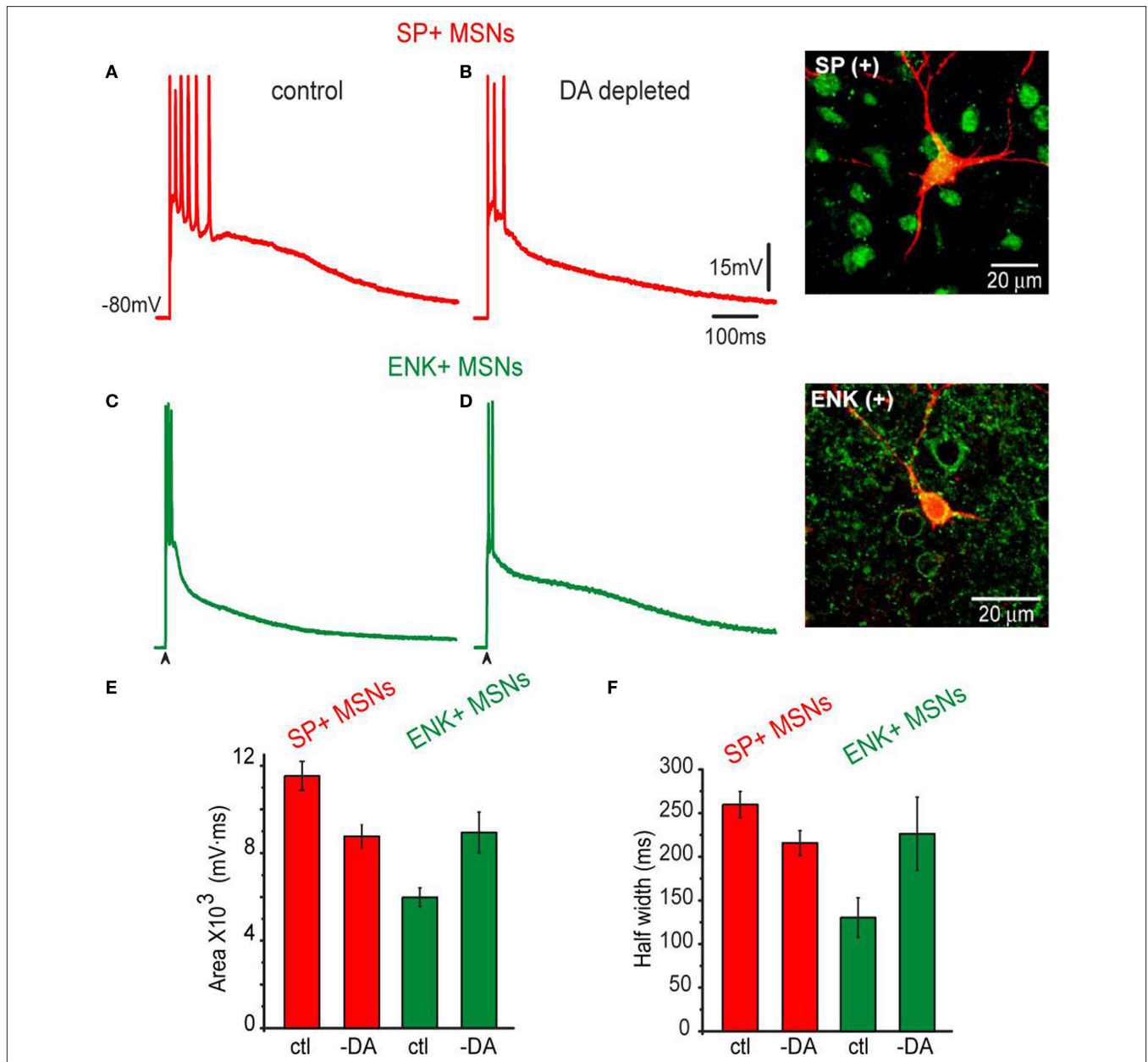


FIGURE 5 | Corticostriatal synaptic responses of SP+ MSNs and ENK+ MSNs as modified by unilateral 6-OHDA lesions in the SNc. (A)

Representative suprathreshold corticostriatal response of a SP+ MSN recorded from an intact rat. **(B)** Representative suprathreshold corticostriatal response of a SP+ MSN recorded in a 6-OHDA lesioned rat. Notice a response decreased in both amplitude and duration; the train of action potentials is substituted by a brief burst. **(C)** Representative suprathreshold corticostriatal response of an ENK+ MSN from an intact rat. **(D)** Representative suprathreshold corticostriatal response of an ENK+ MSN recorded in a 6-OHDA lesioned rat. Notice enhanced depolarization. Inset shows double staining of the recorded and biocytin-filled SP+ and ENK+ MSNs. **(E)** Histograms of areas under synaptic responses in

intact (ctl) and DA-depleted (-DA) samples of neurons. Notice a decrease in the area of SP+ MSNs responses and an increase in the area of ENK+ MSNs responses. After DA depletion areas from both neuronal responses are not significantly different. **(F)** Histograms of half-widths of corticostriatal responses in intact (ctl) and DA-depleted (-DA) neurons. Response half-widths decreased in SP+ MSNs and increased in ENK+ MSNs. SP+ MSNs (red): $n = 11$ in control and $n = 16$ after DA depletion. ENK+ MSNs (green): $n = 9$ in control and $n = 13$ after DA depletion. Differences were significant when comparing control and DA-depleted neurons of the same class, and when comparing control responses between neuronal classes. Differences became non-significant when comparing neuronal classes after DA depletion.

(Day et al., 2008) and intrinsic active components were clear at subthreshold intensities (Figure 7E). The role of inhibition in the suprathreshold response of ENK+ MSNs was also reduced (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009) and firing was less

repressed: $39 \pm 7\%$ after the lesion ($n = 5$, vs. $76 \pm 10\%$ in intact animals; $P < 0.01$) (Figures 7G,H). No changes in half-widths of the responses were observed after bicuculline (Figures 7C,G, compare Figure 2H histogram).

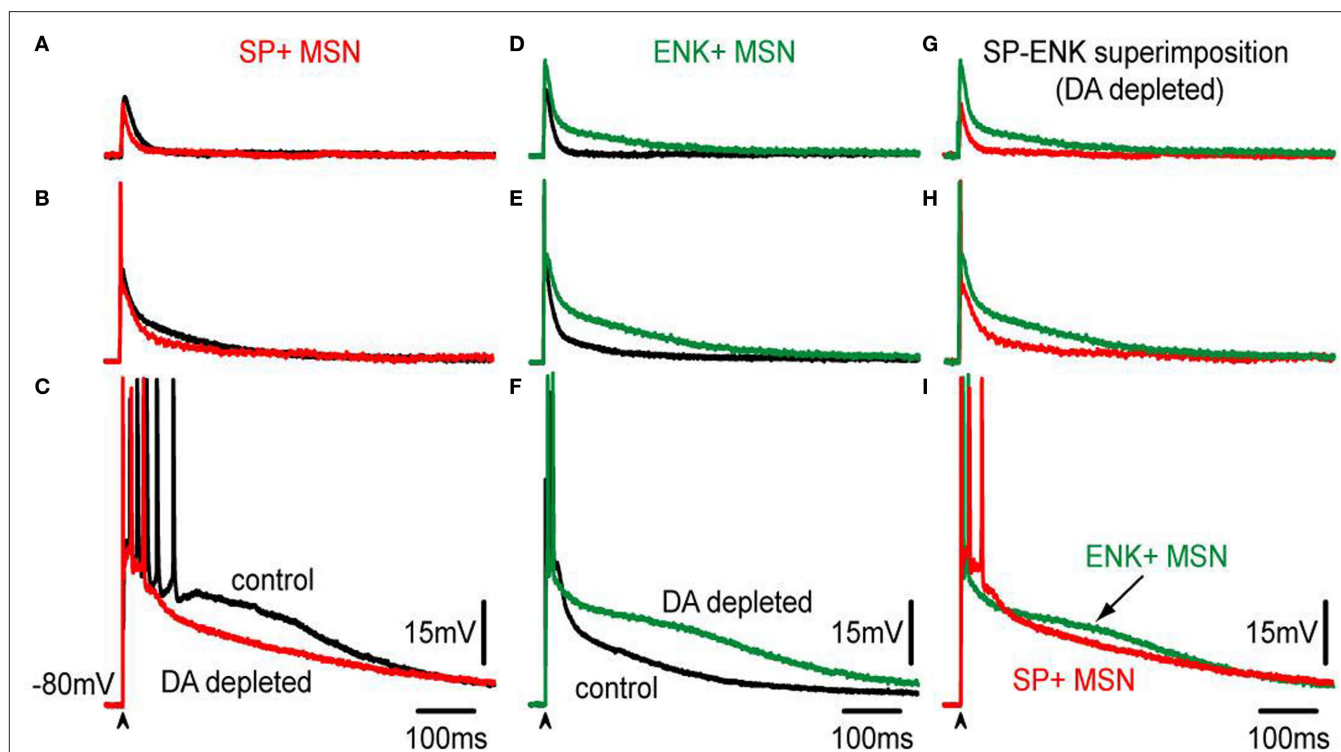


FIGURE 6 | Comparison of corticostriatal responses evoked by different stimulus intensities in SP+ and ENK+ MSNs from intact and lesioned (6-OHDA) animals. (A–C) Superimposition of control, (black traces) and DA-depleted (red traces), subthreshold, threshold – spikes clipped – and suprathreshold corticostriatal responses in a representative SP+ MSN. Except for the suprathreshold case, influence of DA depletion in the responses is hardly noticed. In the suprathreshold response depolarizing inhibition is decreased after DA depletion; similarly to the action of bicuculline

(cf., Figure 3). (D–F) Superimposition of control, (black traces) and DA-depleted (green traces), subthreshold, threshold – spikes clipped – and suprathreshold corticostriatal responses in a representative ENK+ MSN. Notice that the responses are more depolarized and prolonged than their corresponding controls modifying the kinetics of purely synaptic inputs. (G–I) Superimposition of corticostriatal responses from SP+ (red) and an ENK+ (green) MSNs after DA depletion: notice smaller and less prolonged responses for SP+ MSNs, except for the suprathreshold responses that look similar.

A working hypothesis to explain these data is that a reduction in inhibition is a main cause of the changes observed in the corticostriatal responses in both neuronal classes: most importantly, a decrease in the depolarizing plateau of SP+ MSNs, and a greater intrinsic excitability of ENK+ MSNs dendrites.

DISCUSSION

This work demonstrates: (1) Corticostriatal responses in direct (D_1 -SP+) and indirect (D_2 -ENK+) pathway MSNs are remarkably different and can serve as a footprint to identify the neurons during physiological experiments: they are more prolonged and evoke more action potentials in direct pathway neurons, while an intrinsic autoregenerative response is conspicuous in indirect pathway neurons. (2) A main cause to explain these differences is the role of inhibition: it always depressed D_2 -ENK+ MSNs responses, whereas it depolarizes or has a dual role in D_1 -SP+ MSNs responses, (3) Corticostriatal responses changed dramatically after DA depletion: a reduction in the response was seen in SP+-MSNs and an enhancement in the response was seen in ENK+-MSNs. The end result was that their electrophysiological differences appeared less evident after DA depletion. (4) Changes in corticostriatal responses after DA depletion may in part be explained by a decrease of inhibition in both neuronal classes.

CORTICOSTRIATAL RESPONSES IN DIRECT AND INDIRECT MSNs ARE DIFFERENT

In both neuronal classes a single stimulus to the corticostriatal pathway can induce a slow (plateau-like) orthodromic depolarization with repetitive firing (Bargas et al., 1991; Kita, 1996; Vergara et al., 2003; Tseng et al., 2007; Flores-Barrera et al., 2009). However, corticostriatal responses are more prolonged and evoke more action potentials in D_1 -SP+ MSNs, whereas an intrinsic autoregenerative response is present in D_2 -ENK+ MSNs due to their more patent dendritic excitability (Kreitzer and Malenka, 2007; Shen et al., 2007; Ade et al., 2008; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Valjent et al., 2009). This intrinsic response has a role in shaping the response.

Once matched to their eGFP labeled neurons, it became clear that corticostriatal responses from D_1 -SP+ and D_2 -ENK+ MSNs are so different that they cannot be confused. Thus, a prediction based on immunocytochemistry for SP and ENK in both rat and mice neurons yielded a high probability in ascertaining the identity of striatal neurons by looking at their corticostriatal responses ($P > 0.9$). Because doubtful cases coincide with the percentage of neurons that may co-localize D_1 and D_2 receptors it is necessary to perform further studies to fully demonstrate this point. Finally,

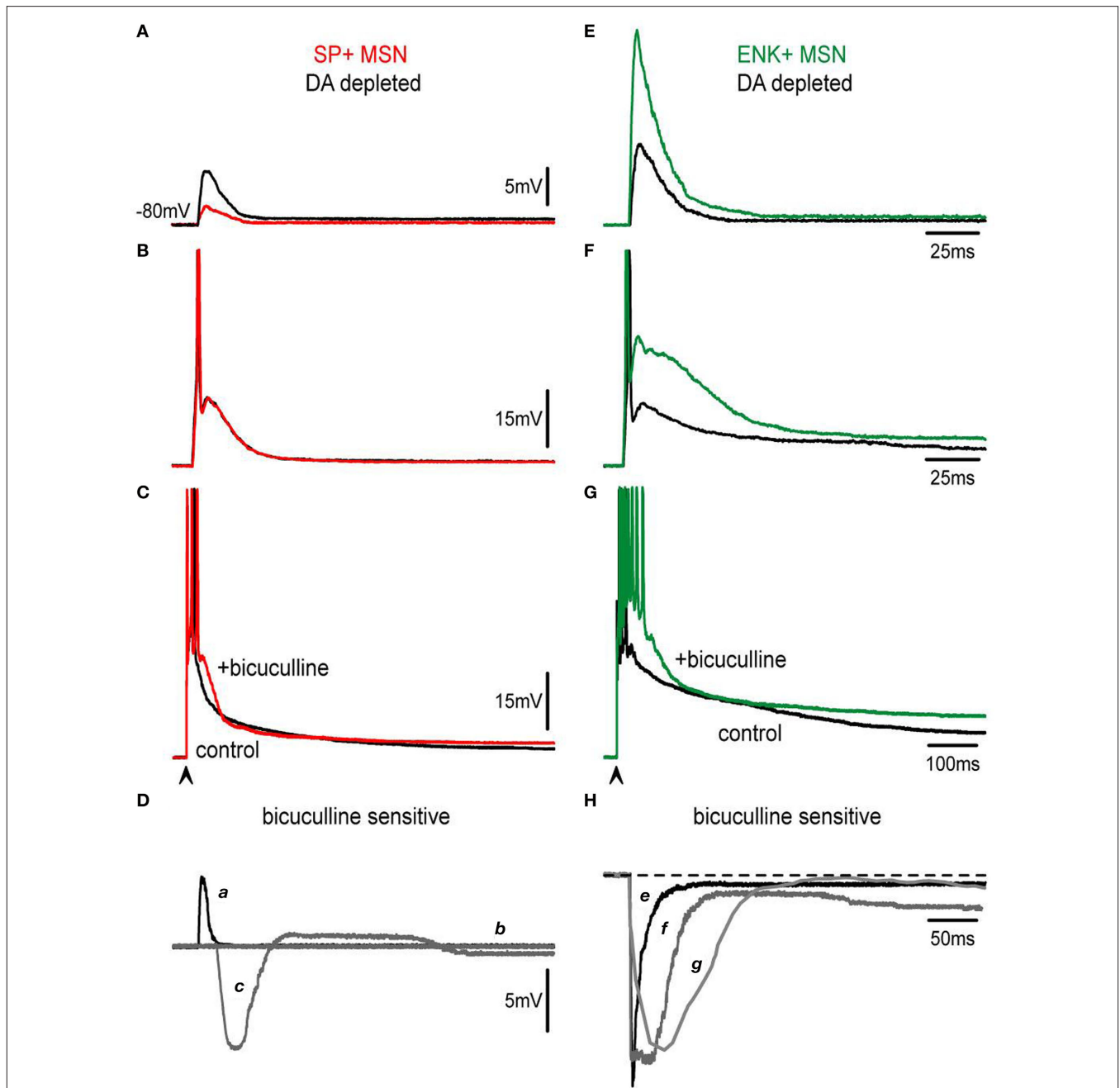


FIGURE 7 | Actions of bicuculline on corticostriatal responses are modified after DA depletion. (A,E) Subthreshold synaptic responses of SP+ and ENK+ neurons depleted of DA (black traces) are compared. Both responses are depolarizing in spite of containing inhibitory components as demonstrated by the actions of 10 μ M bicuculline (colored traces). Bicuculline reduces SP+ MSNs response whereas it enhances ENK+ MSNs synaptic responses. However, enhancing bicuculline action on ENK+ MSNs is larger than in intact animals (cf., **Figure 3**) exhibiting a local response that distorts the kinetics of the evoked synaptic event. **(B,F)** Threshold synaptic responses after DA depletion (black traces) from the same neurons are compared before and during bicuculline (colored traces): Notice absence of bicuculline action in SP+ MSNs at threshold level, suggesting a decrease in inhibitory inputs. In the case of ENK+ MSNs, an intrinsic depolarization that deforms synaptic kinetics is disclosed. **(C,G)** Suprathreshold corticostriatal responses after DA depletion (black traces)

are compared in the same neurons before and during bicuculline (colored traces): a great decrease in bicuculline action is clearly visible in SP+ MSNs (cf., **Figure 3**), confirming that recruiting of inhibitory inputs is hindered after attaining certain stimulus strengths. A robust depolarization with a prolonged train of spikes is evident in ENK+ MSNs at suprathreshold levels. **(D)** Digital subtractions of responses in SP+ MSNs (a–c) are signaled by corresponding letters. Notice: initial depolarization due to the inhibitory component is much decreased in subthreshold responses (a), while at threshold level bicuculline action seems occluded or not participating (b). Suprathreshold response reveals inhibition of initial depolarization (c) but an almost complete lack of inhibitory participation in the sustaining of the late depolarizing plateau potential. **(H)** By comparison, bicuculline-sensitive components subtracted from ENK+ MSNs responses (e–g) have about the same amplitude for all responses, although more prolonged with increases in stimulus strength, suggesting the activation of intrinsic currents.

it is necessary to find out the class of intrinsic current involved in the autoregenerative response of D_2 -MSNs, although previous evidence favors Na^+ - and Ca^{2+} -currents (Bargas et al., 1991; Carter and Sabatini, 2004; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Carrillo-Reid et al., 2009b).

DIFFERENT ROLES OF INHIBITION IN THE CORTICOSTRIATAL RESPONSES OF DIRECT AND INDIRECT MSNs

Different cortical inputs to each class of MSNs (Ingham et al., 1998; Lei et al., 2004; Mallet et al., 2006; Cepeda et al., 2008) may in part explain some of the differences described. However, the present results demonstrate that the role of intrastriatal inhibition on the corticostriatal responses of these neuronal classes is radically different and could explain a part of the variation. Reversal inhibitory potential is similar and above the resting potential in all MSNs recorded by numerous studies using different techniques including gramicidin patches (Misgeld et al., 1982; Jiang and North, 1991; Bennett and Bolam, 1994; Kita, 1996; Ramanathan et al., 2002; Koos et al., 2004; Bracci and Panzeri, 2006; Dehorter et al., 2009; Flores-Barrera et al., 2009); making it hard to think in a bias towards one class of neuron given that each class is about 50% of the population. In addition, no hyperpolarizing potential has been reported, or was observed in this study, when evoking synaptic responses of different intensities at near -80 mV resting potential, even when all responses from each class of neuron had a bicuculline-sensitive component. Therefore, a depolarizing inhibition is present in both responses. Nevertheless, inhibition always depressed the response in D_2 -ENK+ MSNs, whatever the stimulus strength, whereas it helped to depolarize the response in D_1 -SP+ MSNs, thus making a radical distinction between the actions of $GABA_A$ receptors in each neuronal class. Moreover, because recordings were done with sharp electrodes without internal chloride solution, significant differences between neuronal populations cannot be attributed to changes in intracellular media. Thus, a question arises about the reasons of such a different inhibitory role in each neuronal class.

Bicuculline actions in D_1 -SP+ MSNs are easier to explain: Since inhibition is depolarizing and contributes to evoked synaptic depolarization from the cortex, blockade of inhibition leads to a decrease in synaptic depolarization. Two peculiar properties of this inhibitory depolarization are worth mentioning: first, the fact that it facilitates the firing of action potentials during threshold responses (excitatory depolarizing inhibition), and secondly, its dual action at suprathreshold levels: restraining firing at the beginning of the response and supporting the prolonged depolarization during the plateau (Gulledge and Stuart, 2003; Bartos et al., 2007; Mann and Paulsen, 2007; Flores-Barrera et al., 2009). In fact, a previous experimental and modeling study by our group simulated initial shunting inhibition with strong somatic inhibitory inputs, and later depolarization with recurrent reverberant and depolarizing inhibitory inputs along the dendrites (Flores-Barrera et al., 2009). Recurrent architecture in the striatal microcircuit facilitates prolonged depolarizations and explains spontaneous synchronization and micro-circuitry activity, which are greatly altered when inhibition is reduced (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a).

Bicuculline actions in D_2 -ENK+ MSNs can be explained by the distinct and higher dendritic excitability present in these neurons (Galarraga et al., 1997; Day et al., 2008): even when inhibition is

also depolarizing, it has the role of restraining stronger depolarizing intrinsic currents (shunting inhibition) (Bartos et al., 2007). Thus, blockade of inhibition in these neurons leads to a disclosure of intrinsic currents which at subthreshold and threshold levels may consist in local non-propagated responses that enhance and alter the kinetics of synaptic responses, but at suprathreshold levels become autoregenerative, propagated responses. In fact, these responses underlie the brief train of action potentials that these neurons display. If uncontrolled by inhibition, these intrinsic responses may increase the duration of action potential trains, although many of these spikes undergo inactivation. The ionic nature of these intrinsic responses is currently under investigation, and besides inhibition, they probably need K^+ currents to be controlled (Day et al., 2008).

CORTICOSTRIATAL RESPONSES AFTER DA DEPLETION REFLECT A LOSS IN INHIBITION

Striatal DA depletion produced a reduction in amplitude and duration of corticostriatal responses in SP+ -MSNs and an enhancement of duration and amplitude in ENK+ -MSNs, basically, similar changes than those produced by $GABA_A$ receptor blockade (see above). Accordingly, a working hypothesis to explain these changes is that a decrease in inhibition resulted from DA depletion (Taverna et al., 2008; Tecuapetla et al., 2009). And in fact, altered bicuculline actions in both responses supported a decrease in inhibition as a main physiopathological change during parkinsonism.

The end result was that both responses lost their conspicuous electrophysiological differences in shape after DA depletion. In control conditions direct and indirect pathways are not “balanced” in the sense that both show a similar response to cortical commands. On the contrary, duration of D_1 -SP+ MSNs responses is larger than that in D_2 -ENK+ MSNs (see above). A decrease in inhibition leads to a decrease in the response of D_1 -SP+ MSNs sustained in part by recurrent inhibition (see above). This result adds to the body of evidence that implies a decrease in direct pathway function during parkinsonism (DeLong, 1990; Obeso et al., 2004). By contrast, a decrease in inhibition leads to an increase in the escape of intrinsic depolarizing currents in D_2 -ENK+ neurons thus enhancing their corticostriatal response. This outcome supports the hypothesis that indirect pathway neurons have an increased excitability during parkinsonism (DeLong, 1990; Obeso et al., 2004; Day et al., 2008). These results give a functional context to our findings, but paradoxically, direct and indirect pathways now appear to be “balanced” with respect to their corticostriatal response shape.

However, this apparent similarity between response shapes hides significantly different mechanism of integration to generate the responses (see above). A more detailed analysis shows that in fact, D_2 -ENK+ neurons are more excitable than D_1 -SP+ neurons both in control and after DA depletion. Dopaminergic denervation actually worsens this disparity. In addition, recurrent inhibition between spiny neurons is not similar between direct and indirect pathway neurons (Tecuapetla et al., 2009), direct connections being enhanced whereas indirect connections are being depressed by dopamine (Guzman et al., 2003; Tecuapetla et al., 2007, 2009). Logically, denervation will change this relation affecting the connections within a pathway and among the pathways, altering circuit dynamics (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a,b). Moreover, although a different contribution of inhibition provided by fast-spiking (FS)

interneurons is now under debate (Salin et al., 2009; Gittis et al., 2010; Planert et al., 2010), clearly, there is a potentiation in synaptic inhibition provided by low threshold spiking (LTS) interneurons (Dehorter et al., 2009) after DA depletion. Given the role of these different interneuron classes in the circuit (Whittington and Traub, 2003), these changes would diminish prokinetic fast rhythms and promote akinetic slower rhythms (Hutchinson et al., 2004). Therefore, further investigation is needed to see if these alterations are reflected in the corticostriatal responses.

REFERENCES

- Ade, K. K., Janssen, M. J., Ortinski, P. I., and Vicini, S. (2008). Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 28, 1185–1197.
- Bargas, J., Galarraga, E., and Aceves, J. (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res.* 539, 159–163.
- Bartos, M., Vida, I., and Jonas, P. (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 45–56.
- Bennett, B. D., and Bolam, J. P. (1994). Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neuroscience* 62, 707–719.
- Bracci, E., and Panzeri, S. (2006). Excitatory GABAergic effects in striatal projection neurons. *J. Neurophysiol.* 95, 1285–1290.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibañez-Sandoval, O., Hernandez-Cruz, A., Galarraga, E., and Bargas, J. (2009a). Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 101, 737–749.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernández, A., Vergara, R., Galarraga, E., and Bargas, J. (2009b). Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 682–690.
- 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.
- Carter, A. G., Sabatini, B. L. (2004). State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron* 44, 483–493.
- Cepeda, C., Andre, V. M., Yamazaki, I., Wu, N., Kleiman-Weiner, M., and Levine, M. S. (2008). Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *Eur. J. Neurosci.* 27, 671–682.
- Day, M., Wokosin, D., Plotkin, J. L., Tian, X., and Surmeier, D. J. (2008). Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J. Neurosci.* 28, 11603–11614.
- Dehorter, N., Guigoni, C., Lopez, C., Hirsch, J., Eusebio, A., Ben-Ari, Y., and Hammond, C. (2009). Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 29, 7776–7787.
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281–285.
- Dunnett, S. B., Bjorklund, A., Stenevi, U., and Iversen, S. D. (1981). Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res.* 215, 147–161.
- Flores-Barrera, E., Laville, A., Plata, V., Tapia, D., Bargas, J., and Galarraga, E. (2009). Inhibitory contribution to suprathreshold corticostriatal responses: an experimental and modeling study. *Cell. Mol. Neurobiol.* 29, 719–731.
- Galarraga, E., Hernandez-Lopez, S., Reyes, A., Barral, J., and Bargas, J. (1997). Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca^{2+} conductance. *Neuroreport* 8, 2183–2186.
- Gerfen, C. R., and Young, W. S. III (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.
- Gertler, T. S., Chan, C. S., and Surmeier, D. J. (2008). Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 28, 10814–10824.
- Gittis, A. H., Nelson, A. B., Thwin, M. T., Palop, J. J., and Kreitzer, A. C. (2010). Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *J. Neurosci.* 30, 2223–2234.
- Gruber, A. J., Solla, S. A., Surmeier, D. J., and Houk, J. C. (2003). Modulation of striatal single units by expected reward: a spiny neuron model displaying dopamine-induced bistability. *J. Neurophysiol.* 90, 1095–1114.
- Gulledge, A. T., and Stuart, G. J. (2003). Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* 37, 299–309.
- Gustafson, N., Gireesh-Dharmaraj, E., Czubayko, U., Blackwell, K. T., and Plenz, D. A. (2006). Comparative voltage and current-clamp analysis of feedback and feedforward synaptic transmission in the striatal microcircuit in vitro. *J. Neurophysiol.* 95, 737–752.
- Guzman, J. N., Hernandez, A., Galarraga, E., Tapia, D., Laville, A., Vergara, R., Aceves, J., and Bargas, J. (2003). Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J. Neurosci.* 23, 8931–8940.
- Hutchinson, W. D., Dostrovsky, J. O., Walters, J. R., Courtemanche, R., Boraud, T., Goldberg, J., and Brown, P. (2004). Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J. Neurosci.* 24, 9240–9243.
- Inaji, M., Okauchi, T., Ando, K., Maeda, J., Nagai, Y., Yoshizaki, T., Okano, H., Nariai, T., Ohno, K., Obayashi, S., Higuchi, M., and Suhara, T. (2005). Correlation between quantitative imaging and behavior in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res.* 1064, 136–145.
- Ingham, C. A., Hodd, S. H., Taggart, P., and Arbuthnott, G. W. (1998). Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J. Neurosci.* 18, 4732–4743.
- Jiang, Z. G., and North, R. A. (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro. *J. Physiol.* 443, 533–553.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., and Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18, 527–535.
- Kita, H. (1996). Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neuroscience* 70, 925–940.
- Koos, T., Tepper, J. M., and Wilson, C. J. (2004). Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J. Neurosci.* 24, 7916–7922.
- Kreitzer, A. C., and Malenka, R. C. (2007). Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445, 643–647.
- Lei, W., Jiao, Y., Del Mar, N., and Reiner, A. (2004). Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *J. Neurosci.* 24, 8289–8299.
- Lemus-Aguilar, I., Bargas, J., Tecuapetla, F., Galarraga, E., 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.
- Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C., and Gonon, F. (2006). Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of Parkinsonian rats. *J. Neurosci.* 26, 3875–3884.
- Mann, E. O., and Paulsen, O. (2007). Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci.* 30, 343–349.
- Misgeld, U., Wagner, A., and Ohno, T. (1982). Depolarizing IPSPs and depolarization by GABA of rat neostriatum cells in vitro. *Exp. Brain Res.* 45, 108–114.
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M., Marin, C., Alonso, F., Zamarbide, 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.
- O'Donnell, P. (2003). Dopamine gating of forebrain neural ensembles. *Eur. J. Neurosci.* 17, 429–435.
- Planert, H., Szydłowski, S. N., Hjorth, J. J. J., Grillner, S., and Silberberg, G. (2010). Dynamics of synaptic transmission between fast-spiking interneurons and striatal projection neurons of the direct and indirect pathways. *J. Neurosci.* 30, 3499–3507.
- Ramanathan, S., Hanley, J. J., Deniau, J. M., and Bolam, J. P. (2002).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Antonio Laville and Marcela Palomero-Rivero for technical support and advice and to Dr. Claudia Rivera for animal care. This work was supported by grants from a Project Program grant IMPULSA 03 from UNAM, by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) Grant 98004, and by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Universidad Nacional Autónoma de México: IN205610 and IN206010 to Bargas J and Galarraga E.

- Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto GABAergic interneurons in the rat striatum. *J. Neurosci.* 22, 8158–8169.
- Reyes, A., Galarraga, E., Flores-Hernández, J., Tapia, D., and Bargas, J. (1998). Passive properties of neostriatal neurons during potassium conductance blockade. *Exp. Brain Res.* 120, 70–84.
- Salin, P., López, I. P., Kachidian, P., Barroso-Chinea, P., Rico, A. J., Gómez-Bautista, V., Coulon, P., Kerkerian-Le., Goff, L., and Lanciego, J. L. (2009). Changes to interneuron-driven striatal microcircuits in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 34, 545–552.
- Shen, W., Tian, X., Day, M., Ulrich, S., Tkatch, T., Nathanson, N. M., and Surmeier, D. J. (2007). Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat. Neurosci.* 10, 1458–1466.
- Taverna, S., Ilijic, E., and Surmeier, D. J. (2008). Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 28, 5504–5512.
- Tecuapetla, F., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., and Galarraga, E. (2007). Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 10258–10263.
- Tecuapetla, F., Carrillo-Reid, L., Guzman, J. N., Galarraga, E., and Bargas, J. (2005). Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J. Neurophysiol.* 93, 1119–1126.
- Tecuapetla, F., Koós, T., Tepper, J. M., Kabbani, N., and Yeckel, M. F. (2009). Differential dopaminergic modulation of neostriatal synaptic connections of striatopallidal axon collaterals. *J. Neurosci.* 29, 8977–8990.
- Tseng, K. Y., Snyder-Keller, A., and O'Donnell, P. (2007). Dopaminergic modulation of striatal plateau depolarizations in corticostriatal organotypic cocultures. *Psychopharmacology* 191, 627–640.
- Tunstall, M. J., Oorschot, D. E., Kean, A., and Wickens, J. R. (2002). Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J. Neurophysiol.* 88, 1263–1269.
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., and Girault, J. A. (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32, 538–547.
- Vergara, R., Rick, C., Hernandez-Lopez, S., Laville, J. A., Guzman, J. N., Galarraga, E., Surmeier, D. J., and Bargas, J. (2003). Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J. Physiol.* 553, 169–182.
- Vida, I., Bartos, M., and Jonas, P. (2006). Shunting inhibition improves robustness of gamma oscillations in hippocampal interneuron networks by homogenizing firing rates. *Neuron* 49, 107–117.
- Wang, H. B., Deng, Y. P., and Reiner, A. (2007). In situ hybridization histochemical and immunohistochemical evidence that striatal projection neurons co-containing substance P and enkephalin are overrepresented in the striosomal compartment of striatum in rats. *Neurosci. Lett.* 425, 195–199.
- Whittington, M. A., and Traub, R. D. (2003). Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci.* 26, 676–682.
- Wilson, C. J. (1986). Postsynaptic potentials evoked in spiny neostriatal projection neurons by stimulation of ipsilateral and contralateral neocortex. *Brain Res.* 367, 201–213.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 10 February 2010; paper pending published: 27 March 2010; accepted: 10 May 2010; published online: 10 June 2010.

Citation: Flores-Barrera E, Vizcarra-Chacón BJ, Tapia D, Bargas J and Galarraga E (2010) Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci.* 4:15. doi: 10.3389/fnsys.2010.00015
Copyright © 2010 Flores-Barrera, Vizcarra-Chacón, Tapia, Bargas and Galarraga. This is an open-access article subject to an exclusive license agreement between the authors and the Frontiers Research Foundation, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original authors and source are credited.



Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny projection neurons from direct and indirect pathways

Edén Flores-Barrera, Bianca J. Vizcarra-Chacón, José Bargas, Dagoberto Tapia and Elvira Galarraga*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Federal District, México

Edited by:

James M. Tepper, Rutgers, The State University of New Jersey, USA

Reviewed by:

Michael S. Levine, Brain Research Institute, USA

Jeffery R. Wickens, Okinawa Institute of Science and Technology, Japan

*Correspondence:

Elvira Galarraga, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box: 70-253, México City, Federal District 04510, México.
e-mail: egalarraga@ifc.unam.mx

Suprathreshold corticostriatal responses recorded from medium spiny neurons (MSNs) from the direct and indirect pathways of the basal ganglia are different. Their differences readily distinguish D_1 - and D_2 -type receptor expressing MSNs in both bacterial artificial chromosome-transgenic mice and their control littermates as well as in rats: indirect pathway neurons are more excitable than direct pathway neurons revealing autoregenerative spikes underlying their spike trains, whereas direct pathway neurons exhibit more prolonged plateau potentials and spike trains. SKF 81297, a selective agonist for D_1 -class receptors enhanced corticostriatal responses in direct pathway neurons, while quinlorane, a selective agonist for D_2 -class receptors reduced orthodromic and autoregenerative responses in indirect pathway neurons thus making both neuron classes similarly excitable. Because dopaminergic postsynaptic actions target Ca_v1 (L) class voltage-gated calcium channels in MSNs, we hypothesized that these channels are involved and can explain a part of the dopaminergic actions on corticostriatal integration. Both 2.5 μ M nifedipine and 400 nM calciseptine, selective Ca_v1 channel blockers, reduced corticostriatal responses in both D_1 - and D_2 -receptor expressing neurons, respectively. A previous blockade of Ca_v1 channels occluded the actions of dopamine agonists in both neuronal classes. In contrast, a Ca_v1 (L) channel activator, 2.5 μ M Bay K 8644, enhanced corticostriatal responses in neurons from both pathways. It is concluded that Ca_v1 intrinsic currents mediate a part of the dopaminergic modulation during orthodromic synaptic integration of cortical inputs in both classes of MSNs.

Keywords: Ca_v1 channels, strionigral pathway, striopallidal pathway, medium spiny neurons, dopamine receptors, corticostriatal pathway

INTRODUCTION

Striatal dopamine (DA) is involved in initiation of learned procedures (Schultz, 2007). Localization of different DA receptors in medium spiny neurons (MSNs) belonging to direct and indirect pathways of the basal ganglia (Gerfen, 2000) has led to the idea that balanced activity in these two pathways is regulated by opposite actions of DA in each of them: the “two pathway hypothesis” (Albin et al., 1989; Mink, 2003; Redgrave et al., 2010). Both voltage- and current-clamp data in single cells have partially confirmed these assumptions: D_1 -class receptor (D_1R) activation facilitates firing in MSNs of the direct pathway by enhancing Ca_v1 (L) calcium current, whereas D_2 -class receptor (D_2R) activation represses firing in MSNs of the indirect pathway by decreasing the same current (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 1997, 2000). Supposedly, facilitating the direct pathway and preventing activity in the indirect pathway are DA roles when promoting movement (Bateup et al., 2010; Kravitz et al., 2010). These DA receptors use different signaling cascades to target Ca_v1 (L) calcium channels (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 1997, 2000).

Nonetheless, although clear differences in DA actions can be recorded during direct stimulation experiments (Surmeier et al., 1995, 2007; Galarraga et al., 1997; Hernández-López et al., 1997, 2000; Salgado et al., 2005), these differences have

not been observed during more physiological corticostriatal synaptic responses (Flores-Barrera et al., 2010), when neurons are embedded in their rich polysynaptic network where indirect effects can ensue (Albin et al., 1989; Mink, 2003; Flores-Barrera et al., 2009; Bateup et al., 2010; Kravitz et al., 2010; Redgrave et al., 2010). Two questions need to be answered: First, if indirect pathway D_2 -expressing neurons are more excitable than direct pathway neurons (Day et al., 2006; Flores-Barrera et al., 2010) then, it is important to know whether activation of D_1 -class receptors is strong enough to make direct pathway neurons more excitable, perhaps as excitable as indirect pathway neurons. Secondly, it is also important to know whether D_2 -class receptor activation is strong enough to decrease significantly the corticostriatal response of indirect pathway neurons. In other words, to test the robustness of dopaminergic actions on corticostriatal responses it is necessary to observe whether DA actions do in fact produce a balance in excitability as the “two pathway hypothesis” postulates. If this is so, it is necessary to know how much margin is available to the system in order to achieve the supposed balance. To answer these questions, we used selective agonists and antagonists of D_1 - and D_2 -class receptors, bacterial artificial chromosome (BAC) transgenic mice to identify the recorded neurons, and

evoked suprathreshold synaptic responses in which both polysynaptic and intrinsic currents are involved (Flores-Barrera et al., 2009, 2010).

Because both DA receptors and Ca_v1 channels are found in dendrites of MSNs where most cortical inputs arrive (Freund et al., 1984; Carter and Sabatini, 2004; Kreitzer and Malenka, 2005; Day et al., 2006), and because DA modulation particularly targets Ca_v1 channels in MSNs (Surmeier et al., 1995; Hernández-López et al., 1997, 2000), the present study focuses in the involvement of this intrinsic current on corticostriatal synaptic integration and its role during dopaminergic modulation. However, the present work was not intended to exclude other possible contributors. It was found that dopaminergic actions expected by the two pathways hypothesis are robust and readily observed upon corticostriatal responses, provided the recorded cells from both pathways are identified and selective pharmacological tools are employed.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México. BAC-transgenic mice for D_1 - and D_2 -receptors expressing MSNs (D_1 - and D_2 -MSNs) of 60- to 90-day-old mice were anesthetized, decapitated, and their brains removed and submerged in an iced saline solution containing (in mM): 120 NaCl, 3 KCl, 25 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, and 11 glucose (33–35°C, 300 mOsm/l with glucose, pH 7.4, after bubbling with 95% O_2 plus 5% CO_2). Briefly, and as previously described in detail, 350 μ m thick parasagittal slices were cut (Flores-Barrera et al., 2010) on a vibratome and left to equilibrate for at least 1 h at room temperature in the same saline. Thereafter, slices were transferred to a recording chamber and continuously superfused with the same saline at 33–35°C. Intracellular recordings were performed from spiny neurons of the dorsal neostriatum using sharp electrodes filled with potassium-acetate 3 M and 1% biocytin (d.c. resistance 80–120 $M\Omega$). Records were obtained with an active bridge electrometer (Neuro Data, Cygnus Technology, Inc., Delaware Water Gap, PA, USA), digitized, and saved for off-line analysis with a personal computer. After recordings, neurons were injected with biocytin for its anatomical identification. Biocytin injected neurons were identified as D_1 - or D_2 -type receptors expressing MSNs. D_1 - and D_2 -type dopaminergic agonists: SKF 81297 and quinlorane, as well as antagonists: SCH 23390 and sulpiride were used. Ca_v1 (L) type calcium agonist Bay K 8644 and L-type calcium channel blockers, nifedipine (Sigma, St. Louis, MO, USA), and calciseptine (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) were dissolved and applied to the bath saline. Most experiments were paired, so that recordings in the presence and absence of bath-applied drugs were compared in the same neuron with non-parametric statistics (Systat v.7., SPSS Inc., Chicago, IL, USA): When D_1 and D_2 -MSNs parameters were compared Mann–Whitney's U test was employed. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

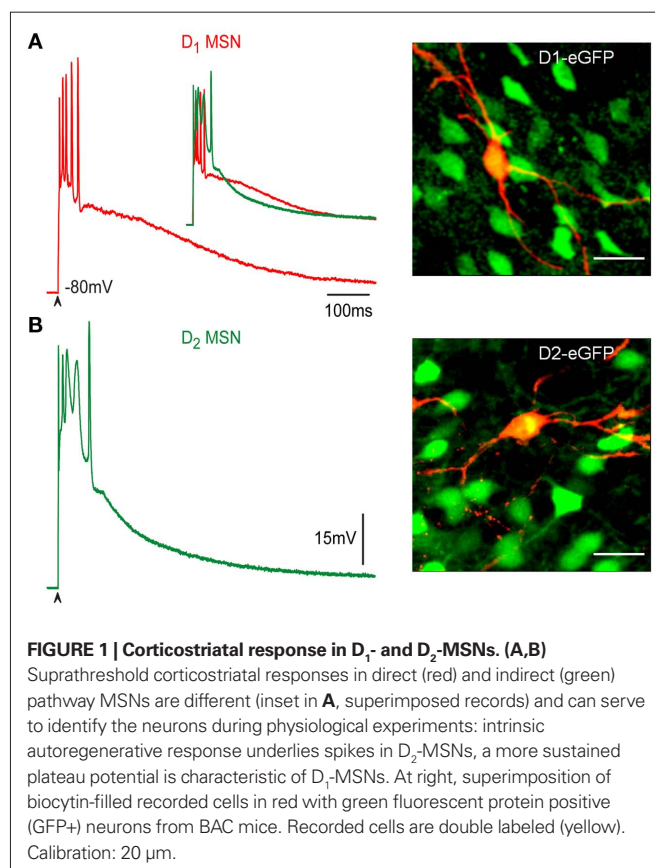
RESULTS

DOPAMINERGIC MODULATION OF CORTICOSTRIATAL RESPONSES IN MSNs FROM DIRECT AND INDIRECT PATHWAYS

Medium spiny neurons were identified as belonging to the direct or indirect pathways by double labeling the biocytin-filled and green fluorescent protein positive (GFP+) recorded cells.

Figure 1A shows a suprathreshold corticostriatal response (red) from a BAC D_1 -receptor expressing neuron. Photomicrograph at right shows the double labeled recorded neuron (superimposed eGFP-green and biocytin-red). **Figure 1B** shows a suprathreshold corticostriatal response (green) from a BAC D_2 -receptor expressing neuron. Photomicrograph at right shows the double labeled neuron. Corticostriatal responses in D_1 -receptor expressing MSN (D_1 -MSN) show action potentials of increasing amplitude and a slowly decaying plateau potentials, whereas D_2 -receptor expressing MSN (D_2 -MSN) shows a larger but briefer depolarization with firing of inactivating action potentials followed by a quasi exponential decay. Inset in **Figure 1A** shows superimposition of both recordings to emphasize their differences (Flores-Barrera et al., 2010): area under D_1 -MSNs response is $10,568 \pm 523$ mV·ms and area under D_2 -MSNs response, without including the autoregenerative response, is $8,204 \pm 697$ mV·ms, respectively ($n = 36$; $P < 0.001$).

Corticostriatal responses evoked with increasing stimulation strength were tested in D_1 -MSNs with 1 μ M SKF 81297, a selective D_1 -class receptor agonist (**Figures 2A–C**, black traces: control; red traces: plus SKF 81297). In all direct pathway neurons recorded, D_1 -receptor activation enhanced the response, augmenting the depolarization, and the number of action potentials fired. Surprisingly, responses exhibited inactivation of action potentials during synaptic depolarization, a phenomenon more commonly seen in D_2 -MSNs but rarely seen in D_1 -MSNs in control conditions (Flores-Barrera et al., 2010). That is, D_1 -receptor activation could render direct pathway neurons as excitable as



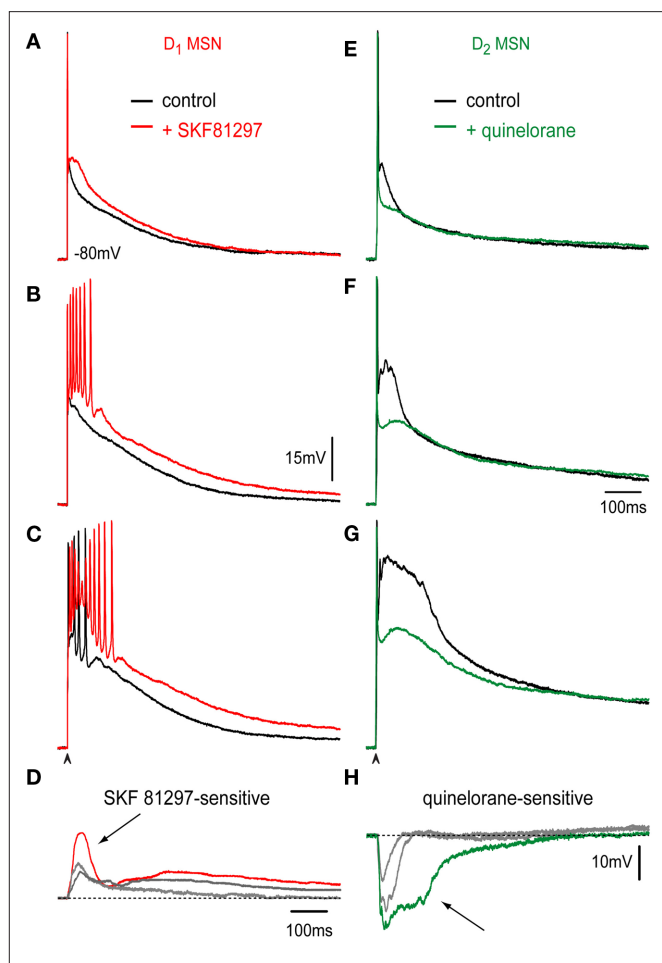


FIGURE 2 | Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in D_1 - and D_2 -MSNs. (A–C) Orthodromic corticostriatal responses to a single stimulus of increasing stimulation intensity in a D_1 -MSN. Controls: black and after addition of 1 μ M of the D_1 R selective agonist SKF 81297 (red); superimposed in each frame. Note increasing firing and depolarization due to D_1 R activation including action potential inactivation (C). (E–G) Orthodromic corticostriatal responses to a single stimulus of increasing stimulation intensity in a D_2 -MSN. Controls: black and after addition of 1 μ M of the D_2 R selective agonist quinelorane (green); superimposed in each frame. Underlying autoregenerative response is shown instead of the action potential train. Note a decrease in synaptically evoked depolarizations due to D_2 R activation in each frame. (D,H) Subtraction of superimposed recordings above: D_1 R action facilitated both initial and sustained plateau depolarizations. Note a possible autoregenerative response (arrow, D). D_2 R action decreased depolarizations at all stimulus intensities, including autoregenerative responses (arrow, H).

indirect pathway neurons. Action of SKF 81297 was completely blocked by the D_1 -receptor antagonist 1 μ M SCH 23390 ($n = 3$; not shown). Percentages of depolarization enhancement induced by D_1 -agonist in the maximal corticostriatal response were $29 \pm 8\%$ ($n = 8$; $P < 0.03$). **Figure 2D** shows subtractions from the records above. Note that D_1 -receptor activation enhances the corticostriatal response both by prolonging and increasing the plateau potential in a gradual manner and, most importantly, by disclosing an initial underlying autoregenerative response at the initial depolarization during the highest stimulus strength (**Figure 2D**, arrow).

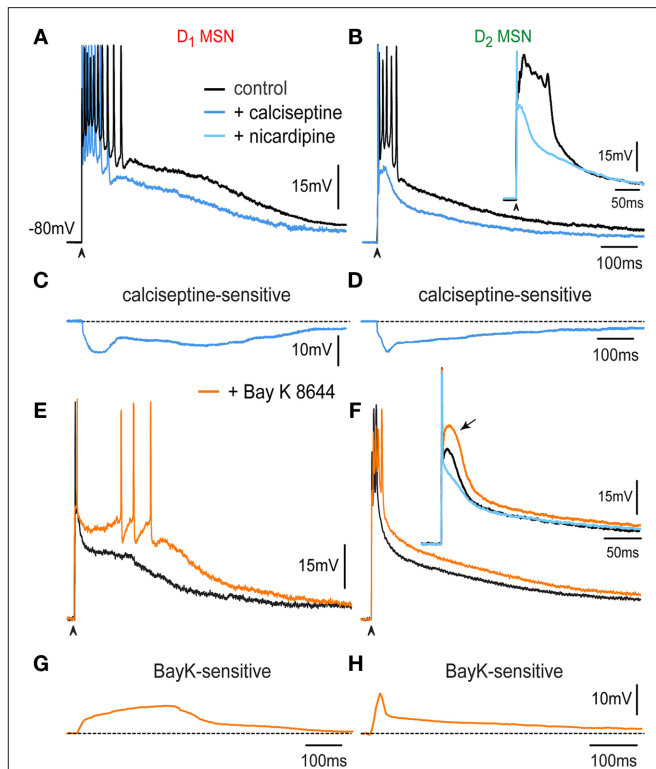
Corticostriatal responses evoked with increasing stimulation strength were tested in D_2 -MSNs with 1 μ M quinelorane, a selective D_2 -class receptor agonist (**Figures 2E–G**, black traces: control; green traces: plus quinelorane). In all indirect pathway neurons D_2 -receptor activation reduced the response, decreasing the depolarization. In these traces, it was preferred to illustrate the autoregenerative response that commonly underlies the train of action potentials in indirect pathway neurons (Flores-Barrera et al., 2010) to show that D_2 R action decreases that response. Action of quinelorane was completely blocked by the D_2 -receptor antagonist 1 μ M sulpiride ($n = 3$; not shown). Percentages of depolarization reduction induced by D_2 -agonist in the maximal corticostriatal response without including the autoregenerative response were $23 \pm 6\%$ ($n = 10$; $P < 0.03$). That is, D_2 -receptor activation significantly decreased the synaptic response of indirect pathway neurons. **Figure 2H** shows subtractions from the records above. Note that D_2 -receptor activation decreases the corticostriatal response including the autoregenerative response (**Figure 2H**, arrow; Bargas et al., 1991; Flores-Barrera et al., 2010).

Taking all the results together it appears that DA actions can balance the excitability of direct and indirect pathway neurons of the basal ganglia by both enhancing the excitability of direct and repressing the excitability of indirect pathway neurons (Galarraga et al., 1997; Carter and Sabatini, 2004; Liu et al., 2004; Day et al., 2008) as the “two pathways hypothesis” requires. Areas under synaptic responses for each cell type after DA receptors activation and with respect to their own controls are $9,124 \pm 609$ mV·ms vs. $11,810 \pm 1,264$ mV·ms for D_1 -MSNs ($n = 8$, $P < 0.03$) and $8,950 \pm 1,006$ mV·ms vs. $7,173 \pm 687$ mV·ms for D_2 -MSNs ($n = 10$; $P < 0.03$).

Ca_v1 CALCIUM CURRENT CONTRIBUTION DURING CORTICOSTRIATAL RESPONSES

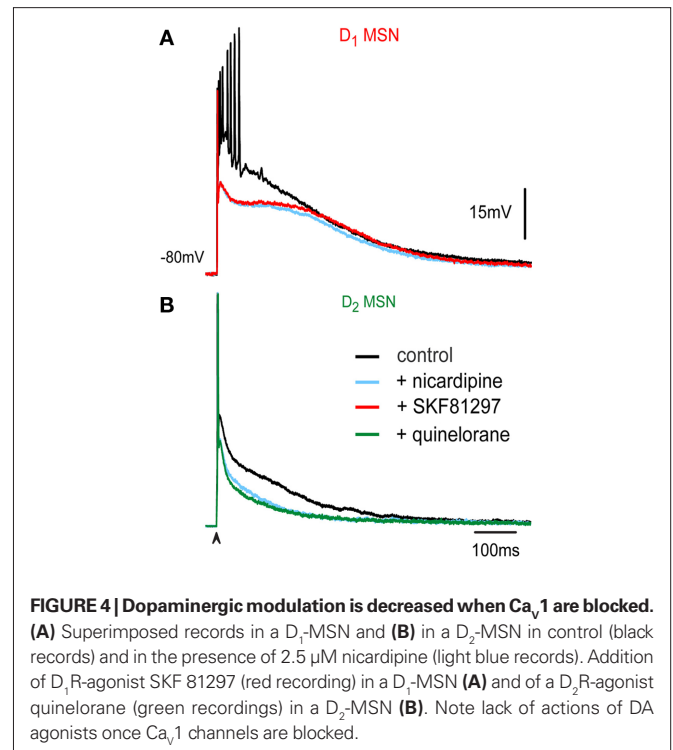
Both DA receptors and Ca_v1 (L) calcium channels are found in dendrites of MSNs where cortical inputs arrive to generate corticostriatal responses (Freund et al., 1984; Carter and Sabatini, 2004; Kreitzer and Malenka, 2005; Day et al., 2006). Ca_v1 channels are activated during corticostriatal responses in non-identified MSNs (Galarraga et al., 1997; Adermark and Lovinger, 2007; Flores-Barrera et al., 2009). These channels are also a main target for D_1 - and D_2 -receptors signaling during direct somatic stimulation (Hernández-López et al., 1997, 2000). Finally, Ca_v1 channels have also been shown to participate in the generation of down- to up-state voltage transitions in MSNs (Vergara et al., 2003). Therefore, it is logical to infer that they may be involved in the evoked corticostriatal responses in both direct and indirect MSNs, however, this last point has not been proved.

Figures 3A,B show that the Ca_v1 channel blocker, 400 nM calciseptine, reduces corticostriatal responses in both D_1 - and D_2 -MSNs. Superimposed records in control (black) and in the presence of calciseptine (blue) confirm that intrinsic calcium currents are activated by corticostriatal transmission in both classes of projection neurons. Blockade of Ca_v1 channels in D_1 -MSNs decreased the corticostriatal response by $29 \pm 2\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$), while it decreased the response by $29 \pm 2\%$ ($n = 8$; $P < 0.007$) in D_2 -MSNs. Similar reductions were observed after 2.5 μ M nica-dipine (see **Figure 4**). Note two rising components in D_1 -MSNs:



initial and late, and only an initial component plus a prolonged decay in D_2 -MSNs. Subtractions of superimposed records disclose the calciseptine-sensitive component (Figures 3C,D; Flores-Barrera et al., 2010). Areas under responses for each cell type after blockers of Ca_v1 channels with respect to their own controls are $11,646 \pm 750$ mV·ms vs. $8,212 \pm 462$ mV·ms for D_1 -MSNs ($n = 7$; $P < 0.03$) and $7,876 \pm 864$ mV·ms vs. $5,611 \pm 675$ mV·ms for D_2 -MSNs ($n = 8$; $P < 0.007$). Inset in Figure 3B shows in other indirect pathway neuron, a reduction in the orthodromic autoregenerative response after 2.5 μ M nicardipine.

We next tested the effects of the Ca_v1 (L) calcium agonist Bay K 8644 (2.5–5 μ M) on the corticostriatal response. Superimposed records: in control (black) and in the presence of 2.5 μ M Bay K 8644 (orange) in



a D_1 -MSN (Figure 3E) and in a D_2 -MSN (Figure 3F) show that the Ca_v1 agonist prolongs the plateau potential and induces the firing of more action potentials in D_1 -MSNs, whereas it depolarized the response of D_2 -MSNs along its entire decay. Bay K 8644 helps in eliciting an autoregenerative response in D_2 -MSNs (inset in Figure 3F). Bay K 8644 actions show increasing and sustained depolarizations in D_1 -MSNs (Figure 3G), and a decaying depolarization after the initial peak in D_2 -MSNs (Figure 3H). Inset in Figure 3F shows in another indirect pathway neuron, after 2.5 μ M nicardipine in the presence of Bay K 8644 a reduction in orthodromic autoregenerative response.

Because the actions of calcium blockers was so similar in both neuronal classes, the different roles that Ca_v1 channels accomplish in each response, as disclosed by Bay K 8644, suggests that other synaptic or intrinsic currents are in charge of Ca_v1 channels regulation, perhaps at dendritic sites.

Areas under synaptic responses for each cell type after Ca_v1 agonist Bay K 8644 with respect to their own controls are $11,821 \pm 1,324$ mV·ms vs. $15,306 \pm 1,600$ mV·ms for D_1 -MSNs ($n = 4$; $P < 0.05$) and $7,919 \pm 2,178$ mV·ms vs. $11,308 \pm 2,600$ mV·ms for D_2 -MSNs ($n = 4$; $P < 0.05$).

DOPAMINERGIC MODULATION IS OCCLUDED WHEN Ca_v1 CHANNELS ARE BLOCKED

Figure 4A shows superimposed corticostriatal responses in a representative D_1 -MSN in control (black), in the presence of 2.5 μ M nicardipine (light blue) and after application of the D_1 -class receptor agonist 1 μ M SKF 81297 (red). Note absence of action of D_1 -agonist after blockade of Ca_v1 channels. Figure 4B shows superimposed corticostriatal responses in a representative D_2 -MSN in control (black), in the presence of 2.5 μ M nicardipine (light blue) and after application of the D_2 -class receptor agonist 1 μ M quinolorane

(green). Note absence of action of D_2 -agonist after blockade of Ca_v1 channels. These experiments suggest that Ca_v1 channels are a major target of DA modulation during corticostriatal integration.

DISCUSSION

Corticostriatal responses of D_1 - and D_2 -MSNs constitute an “electrophysiological footprint” that readily distinguishes between direct and indirect pathway neurons (Flores-Barrera et al., 2010) because dendritic excitability, and therefore, corticostriatal integration is different in D_1 - and D_2 -MSNs when all synaptic and intrinsic currents are in place (Day et al., 2008; Flores-Barrera et al., 2010). The present work demonstrated: (1) A selective dopaminergic D_1 -class receptor mediated increase in firing and depolarization of the corticostriatal response in D_1 -MSNs in such a way as to approach the level of excitability found in D_2 -MSNs. (2) A selective dopaminergic D_2 -class receptor mediated a significant decrease in firing and depolarization of the corticostriatal response in D_2 -MSNs. (3) Ca_v1 (L) calcium currents contribute to corticostriatal integration in both D_1 - and D_2 -MSNs; including the autoregenerative response underlying the train of spikes characteristic of D_2 -MSNs. (4) Blockade of Ca_v1 channels occluded the actions of selective DA receptor agonists in their respective responsive neurons from the direct and indirect pathways. (5) By acting in both pathways simultaneously DA may balance the excitability of the neurons from both basal ganglia pathways to make D_2 -MSNs less excitable than D_1 -MSNs, if necessary, thus reversing their responsiveness to cortical commands. These findings show that there is enough margin to tune up the excitability of the neurons from both pathways, upon demand. This tuning capability is very probably lost during Parkinsonism (Flores-Barrera et al., 2010).

The present work did not exclude, however, the possible participation of other calcium channels (Carter and Sabatini, 2004; Salgado et al., 2005; Higley and Sabatini, 2010) in corticostriatal integration and only underlines the importance of Ca_v1 channels.

Ca_v1 channels are positioned near cortical glutamatergic synapses in MSNs dendrites (Freund et al., 1984; Carter and Sabatini, 2004; Higley and Sabatini, 2010), a strategic location to participate in corticostriatal integration. However, in spite of voltage- and current-clamp recordings during direct stimulation experiments in single cells agree with the assumptions of the “two pathways hypothesis,” that are, first, D_1 -class receptor activation facilitates firing in D_1 -MSNs during direct somatic stimulation of single cells (Hernández-López et al., 1997) and enhances Ca_v1 calcium current in isolated neurons (Surmeier et al., 1995), and secondly, D_2 -class receptor activation represses firing in MSNs of the indirect pathway by decreasing the same current (Hernández-López et al., 1997, 2000; Day et al., 2008), the fact is that in trying to find these differences during striatal network activity, *in vivo*, the expectations of the two pathways hypothesis become very variable and even contradictory (Liang et al., 2008; Kravitz et al., 2010).

It is argued that an undisputed electrophysiological evidence of the two pathways hypothesis is lacking during more physiological conditions because indirect circuit influences distort or increase the variability of the responses (e.g., Kravitz et al., 2010). Therefore, in this work we wanted to observe whether dopaminergic actions expected by the “two pathways hypothesis” is robust enough to be preserved during corticostriatal suprathreshold dendritic integration which is known to activate polysynaptic pathways as well

as several intrinsic inward and outward currents (Flores-Barrera et al., 2009, 2010). This implies to test DA actions during more physiological responses.

The present experimental work demonstrates the main postulate of the “two pathways hypothesis,” that is, that the excitability of neurons from both basal ganglia pathways can reach a dynamic balance due to both D_1 - and D_2 -class receptors activation which enhance and decrease, respectively, the corticostriatal responses of direct and indirect pathway neurons. DA actions have a wide range of operation since D_1 -MSNs can become more excitable than D_2 -MSNs if necessary. Therefore, the present data support DA role as that of balancing both basal ganglia pathways. Targeting of Ca_v1 channels was somehow expected since the gating of voltage-dependent and ligand-gated (ionotropic) ion channels in the dendritic membrane, as well as long-term synaptic plasticity, depend on calcium entry through these channels (Snyder, et al., 2000; Hallett et al., 2006; Adermark and Lovinger, 2007).

Variable results and randomness in firing found *in vivo* more physiological situations (Kostal et al., 2007) are attributed to a population or vectorial neural coding (Wu et al., 2002), evidence of which, has been obtained for the striatal microcircuit (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009). Thus, although the present work supports potent and robust DA postsynaptic actions in a more physiological situation, several groups have also reported potent presynaptic actions on terminals making contact with each class of projection neuron (Flores-Hernández et al., 1997; Guzmán et al., 2003; Bamford et al., 2004; Tecuapetla et al., 2007) and following determined connections rules (Taverna et al., 2008), suggesting the possibility of a concomitant dynamic regulation of synaptic weights as well as dopaminergic regulation of striatal interneurons (Tepper et al., 2004).

CONCLUSION

Dopamine plays a fundamental role in normal basal ganglia function, the deficits arising from reductions in the sustained stimulation of DA receptors show a rather wide involvement in behavioral processes (Schultz, 2007). After DA depletion, a reduction in the corticostriatal response was reported in substance P expressing MSNs whereas an enhancement in the response was observed in enkephalin expressing MSNs, partially explained by a decrease of synaptic GABAergic connections among MSNs (Flores-Barrera et al., 2010). In contrast, the present study shows that the dopaminergic D_1 R activation increased the corticostriatal response in D_1 -MSN up to the point of action potential inactivation as that observed in D_2 -MSNs whereas D_2 R activation depressed the corticostriatal response in D_2 -MSNs and decreases duration and amplitude of calcium autoregenerative responses recorded in these neurons. Therefore, dopaminergic DA receptors actions tend to equalize the excitability of MSNs from both pathways.

Because modulation of Ca_v1 channels is lost in the absence of DA, the changes observed in the corticostriatal response after DA depletion: a decrease in the depolarizing plateau of SP+ expressing MSNs, and a greater intrinsic excitability of ENK+ expressing MSNs can be readily explained. The end result is that both classes of MSNs lose their ability to balance their activity during Parkinsonism (Flores-Barrera et al., 2010), being, perhaps, a main cause of movement impairment.

It is concluded that strong cortical stimulation can overcome all these indirect network effects so that the present results support the DA role expected by the “two pathways hypothesis.”

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Antonio Laville and Gabriela X Ayala for technical support and advice. This work was supported by grants from a Project Program grant IMPULSA 03 from UNAM, by Consejo Nacional

REFERENCES

- Adermark, L., and Lovinger, D. M. (2007). Combined activation of L-type Ca²⁺ channels and synaptic transmission is sufficient to induce striatal long-term depression. *J. Neurosci.* 27, 6781–6787.
- Albin, R. L., Young, A. B., and Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366–375.
- Bamford, N. S., Zhang, H., Schmitz, Y., Wu, N. P., Cepeda, C., Levine, M. S., Schmauss, C., Zakharenko, S. S., Zablow, L., and Sulzer, D. (2004). Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* 42, 653–663.
- Bargas, J., Galarraga, E., and Aceves, J. (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res.* 539, 159–163.
- Bateup, H. S., Santini, E., Shen, W., Birnbaum, S., Valjent, E., Surmeier, D. J., Fisone, G., Nestler, E. J., and Greengard, P. (2010). Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14845–14850.
- 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.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernandez, A., Vergara, R., Galarraga, E., and Bargas, J. (2009). Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 682–690.
- Carter, A. G., and Sabatini, B. L. (2004). State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron* 44, 483–493.
- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C. A., Shering, A. F., Wokosin, D., Ilijic, E., Sun, Z., Sampson, A. R., Mugnaini, E., Deutch, A. Y., Sesack, S. R., Arbuthnott, G. W., and Surmeier, D. J. (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci.* 9, 251–259.
- Day, M., Wokosin, D., Plotkin, J. L., Tian, X., and Surmeier, D. J. (2008). Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J. Neurosci.* 28, 11603–11614.
- Flores-Barrera, E., Laville, A., Plata, V., Tapia, D., Bargas, J., and Galarraga, E. (2009). Inhibitory contribution to suprathreshold corticostriatal responses: an experimental and modeling study. *Cell. Mol. Neurobiol.* 29, 719–731.
- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B. J., Tapia, D., Bargas, J., and Galarraga, E. (2010). Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci.* 4:15. doi: 10.3389/fnsys.2010.00015
- Flores-Hernández, J., Galarraga, E., and Bargas, J. (1997). Dopamine selects glutamatergic excitatory inputs to the neostriatum. *Synapse* 25, 185–195.
- Freund, T. F., Powell, J. F., and Smith, A. D. (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13, 1189–1215.
- Galarraga, E., Hernández-López, S., Reyes, A., Barral, J., and Bargas, J. (1997). Dopamine facilitates EPSPs through an L-type Ca²⁺-conductance. *Neuroreport* 8, 2183–2186.
- Gerfen, C. R. (2000). Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.* 23, S64–S70.
- Guzmán, J. N., Hernandez, A., Galarraga, E., Tapia, D., Laville, A., Vergara, R., Aceves, J., and Bargas, J. (2003). Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J. Neurosci.* 23, 8931–8940.
- Hallett, P. J., Spoelgen, R., Hyman, B. T., Standaert, D. G., and Dunah, A. W. (2006). Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J. Neurosci.* 26, 4690–4700.
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., and Galarraga, E. (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺-conductance. *J. Neurosci.* 17, 3334–3342.
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Pérez-García, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., and Surmeier, D. J. (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability through a novel PLCB1/IP3/calcineurin signaling cascade. *J. Neurosci.* 20, 8987–8995.
- Higley, M. J., and Sabatini, B. L. (2010). Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat. Neurosci.* 13, 958–967.
- Kostal, L., Lansky, P., and Rospars, J. P. (2007). Neuronal coding and spiking randomness. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2693–2701.
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., and Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622–626.
- Kreitzer, A. C., and Malenka, R. C. (2005). Dopamine modulation of state dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J. Neurosci.* 25, 10537–10545.
- Liang, L., DeLong, M. R., and Papa, S. M. (2008). Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J. Neurosci.* 28, 7537–7547.
- Liu, J. C., DeFazio, R. A., Espinosa-Jeffrey, A., Cepeda, C., de Vellis, J., and Levine, M. S. (2004). Calcium modulates dopamine potentiation of N-methyl-D-aspartate responses: electrophysiological and imaging evidence. *J. Neurosci. Res.* 76, 315–322.
- Mink, J. W. (2003). The basal ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns. *Arch. Neurol.* 60, 1365–1368.
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y., DeLong, M. R., and Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 760–772.
- Salgado, H., Tecuapetla, F., Perez-Rosello, T., Perez-Burgos, A., Perez-Garci, E., Galarraga, E., and Bargas, J. (2005). A reconfiguration of CaV2 Ca²⁺ channels current and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 94, 3771–3787.
- Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288.
- Snyder, G. L., Allen, P. B., Fienberg, A. A., Valle, C. G., Haganir, R. L., Nairn, A. C., and Greengard, P. (2000). Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor in the neostriatum by dopamine and psychostimulants in vivo. *J. Neurosci.* 20, 4480–4488.
- Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings, H. C. Jr., Nairn, A. C., and Greengard P. (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14, 385–397.
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., and Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.* 30, 228–235.
- Taverna, S., Ilijic, E., and Surmeier, D. J. (2008). Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 28, 5504–5512.
- Tecuapetla, F., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., and Galarraga, E. (2007). Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10258–10263.
- Tepper, J. M., Koós, T., and Wilson, C. J. (2004). GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci.* 27, 662–669.
- Vergara, R., Rick, C., Hernández-López, S., Laville, J. A., Guzmán, J. N., Galarraga, E., Surmeier, D. J., and Bargas, J. (2003). Membrane potential oscillations of striatal medium spiny neurons in a corticostriatal slice. *J. Physiol.* 553, 169–182.
- Wu, S., Amari, S., and Nakahara, H. (2002). Population coding and decoding in a neural field: a computational study. *Neural Comput.* 14, 999–1026.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 17 December 2010; paper pending published: 06 March 2011; accepted: 15 March 2011; published online: 29 March 2011.

Citation: Flores-Barrera E, Vizcarra-Chacón BJ, Bargas J, Tapia D and Galarraga E (2011) Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci.* 5:15. doi: 10.3389/fnsys.2011.00015
Copyright © 2011 Flores-Barrera, Vizcarra-Chacón, Bargas, Tapia and Galarraga. This is an open-access article subject to an exclusive license agreement between the authors and Frontiers Media SA, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original authors and source are credited.

Inhibitory Contribution to Suprathreshold Corticostriatal Responses: An Experimental and Modeling Study

Edén Flores-Barrera · Antonio Laville · Victor Plata ·
Dagoberto Tapia · José Bargas · Elvira Galarraga

Received: 13 February 2009 / Accepted: 12 March 2009 / Published online: 7 April 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Neostriatal neurons may undergo events of spontaneous synchronization as those observed in recurrent networks of excitatory neurons, even when cortical afferents are transected. It is necessary to explain these events because the neostriatum is a recurrent network of inhibitory neurons. Synchronization of neuronal activity may be caused by plateau-like depolarizations. Plateau-like orthodromic depolarizations that resemble up-states in medium spiny neostriatal neurons (MSNs) may be induced by a *single* corticostriatal suprathreshold stimulus. Slow synaptic depolarizations may last hundreds of milliseconds, decay slower than the monosynaptic glutamatergic synaptic potentials that induce them, and sustain repetitive firing. Because inhibitory inputs impinging onto MSNs have a reversal potential above the resting membrane potential but below the threshold for firing, they conform a type of “shunting inhibition”. This work asks if shunting GABAergic inputs onto MSNs arrive asynchronously enough as to help in sustaining the plateau-like corticostriatal response after a *single* cortical stimulus. This may help to begin explaining autonomous processing in the striatal micro-circuitry in the presence of a tonic excitatory drive and independently of spatio-temporally organized inputs. It is shown here that besides synaptic currents from AMPA/KA- and NMDA-receptors, as well as L-type intrinsic

Ca²⁺- currents, inhibitory synapses help in maintaining the slow depolarization, although they accomplish the role of depressing firing at the beginning of the response. We then used a NEURON model of spiny cells to show that inhibitory synapses arriving asynchronously on the dendrites can help to simulate a plateau potential similar to that observed experimentally.

Keywords Shunting inhibition · GABA · Medium spiny neurons · Synaptic transmission neostriatum · NMDA · Ca²⁺-current

Abbreviations

MSNs	Medium spiny neostriatal neurons
CNQX	6-Cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
KA	Kainate
GABA	γ -Aminobutyric acid
SP	Synaptic potential (mixed)
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartate
APV	D-(–)-2-Amino-5-phosphonovaleric acid
I-V	Current–voltage (relationship)
I-R	Intensity–response (relationship)
IPSP	Inhibitory postsynaptic potential
EPSP	Excitatory postsynaptic potential

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10571-009-9394-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Flores-Barrera · A. Laville · V. Plata · D. Tapia · J. Bargas ·
E. Galarraga (✉)
Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular-
Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México,
P.O. Box: 70-253, 04510 Mexico City, D.F., Mexico
e-mail: egalarra@ifc.unam.mx

Introduction

Spontaneous firing patterns of striatal projection neurons exhibit voltage transitions from hyperpolarized “down”-states to depolarized “up”-states (O’Donnell and Grace 1995; Wilson and Kawaguchi 1996). The corticostriatal pathway is one possible origin of these transitions because

single suprathreshold stimulus to this pathway may be enough to induce slow (plateau-like), orthodromic depolarizations that resemble up-states in medium spiny neostriatal neurons (MSNs; Bargas et al. 1991; Kita 1996; Vergara et al. 2003; Tseng et al. 2007). The importance of plateau-potentials resides in that they serve as “windows for synchronization” of ensemble activity (O’Donnell 2003; O’Donnell et al. 1999; Yuste et al. 2005). Events of spontaneous neuronal synchronization have been directly observed during the periods of striatal activity in vitro and in vivo (Carrillo-Reid et al. 2008, 2009; Pomata et al. 2008) or indirectly inferred by correlating single neuron recordings with field potentials (e.g., Goto and O’Donnell 2001; Mahon et al. 2001; Tseng et al. 2001).

The role of glutamate AMPA/KA receptors in the corticostriatal monosynaptic excitatory postsynaptic potential (EPSP) that initiate the plateau potential response is well known (e.g., Misgeld et al. 1982; Jiang and North 1991; Kita 1996; Calabresi et al. 2000; Tseng et al. 2007; Cepeda et al. 2008). The contribution of inward currents carried by *N*-methyl *D*-aspartate receptor-channels (NMDA receptor) in the duration of this response has also been shown (Galarraga et al. 1997; Vergara et al. 2003; Chapman et al. 2003; Li et al. 2004; Kreitzer and Malenka 2007; Logan et al. 2007; Tseng et al. 2007; Pomata et al. 2008). Intrinsic currents carried by voltage-activated L-type ($\text{Ca}_v1.3$) Ca^{2+} -channels have also been suggested as contributors to the synaptically induced corticostriatal potentials (Bargas et al. 1991; Galarraga et al. 1997; Cepeda et al. 1998; Akopian and Walsh 2002; Vergara et al. 2003; Carter and Sabatini 2004; Olson et al. 2005; Tseng et al. 2007) although a direct comparison with the time course of NMDA-generated events is lacking.

In this work we ask whether di- or poly-synaptic inhibitory inputs, also known to be present in this response (Kita 1996; Tunstall et al. 2002; Guzmán et al. 2003; Plenz 2003; Koos et al. 2004; Gustafson et al. 2006; Tecuapetla et al. 2007), may in part explain its long duration after a *single* cortical stimulus. That is, whether a *single* cortical command is capable to induce reverberation in the circuit long enough after the stimulus is over. And if that is the case, what is the amount of this synaptic contribution. The reversal potential of inhibitory inputs in MSNs is about -65 mV (Misgeld et al. 1982; Jiang and North 1991; Kita 1996); larger than the resting potential but smaller than the threshold for firing, i.e.: “shunting inhibition” (e.g., Bartos et al. 2007; Sullivan et al. 2008). This work confirms that shunting inhibition in MSNs restrains action potential firing, and at the same time, helps in maintaining the corticostriatal plateau potential; in a similar way in that recurrent networks sustain the generation and maintenance of voltage oscillations and plateau potentials (Bartos et al. 2007; Lambe and Aghajanian 2007; Sullivan et al. 2008; Tseng and O’Donnell 2005).

Finally, we implemented a NEURON model of MSNs to assess the requirement of asynchronous inhibitory inputs (Gruber et al. 2009) to faithfully reproduce the suprathreshold corticostriatal response. It was found that the plateau potential in spiny neurons may be a manifestation of the recurrent activity of principal neurons (e.g., Bartos et al. 2007; Sullivan et al. 2008) and also, perhaps, interneurons (Berke 2008; Gruber et al. 2009), so that the number of inhibitory inputs arriving asynchronously on the dendritic arbor may surpass the number of excitatory cortical inputs initiating the response. The results suggest that axon collaterals of MSNs are important in maintaining long-lasting events of synchronization among MSNs (Carrillo-Reid et al. 2008, 2009; Pomata et al. 2008).

Materials and Methods

Preparation of Slices

All procedures were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México. The experiments were performed on brain slices obtained from young or adult Wistar rats (postnatal days from 20 to >45 days). Animals were deeply anesthetized and decapitated. Their brains were quickly removed and placed into ice cold (4°C) bath saline containing (in mM) the following: 126 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO_3 , 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 11 glucose, 300 mOsm/l, $\text{pH} = 7.4$ by bubbling with 95% O_2 and 5% CO_2 .

Parasagittal neostriatal slices ($350\ \mu\text{m}$ thick) were cut using a vibratome and stored in oxygenated bath saline at room temperature for at least 1 h before recording. In some experiments, a sharp micropipette filled with external saline and 5% biocytin was placed in the cortex and left there for 2 h while the slice was constantly superfused in an interphase recording chamber. Thereafter the pipette was retired, and the slice was superfused with oxygenated saline for another 3 h. The slice was then fixed and processed to visualize the bound HRP as previously described (Ibañez-Sandoval et al. 2006). This enabled the resolution, through trans-illumination microscopy, of labeled neurons inside the cortex and, most importantly, of corticostriatal fibers projecting to their targets. One of such experiments is illustrated in Fig. 1. Our recordings were obtained from striatal regions with abundance of cortical fibers as revealed by our in vitro preparations; otherwise, slow corticostriatal responses are more difficult to record.

Intracellular recordings were carried out using either sharp microelectrodes ($80\text{--}120\ \text{M}\Omega$) filled with 1% biocytin and 3 M potassium acetate or whole-cell patch

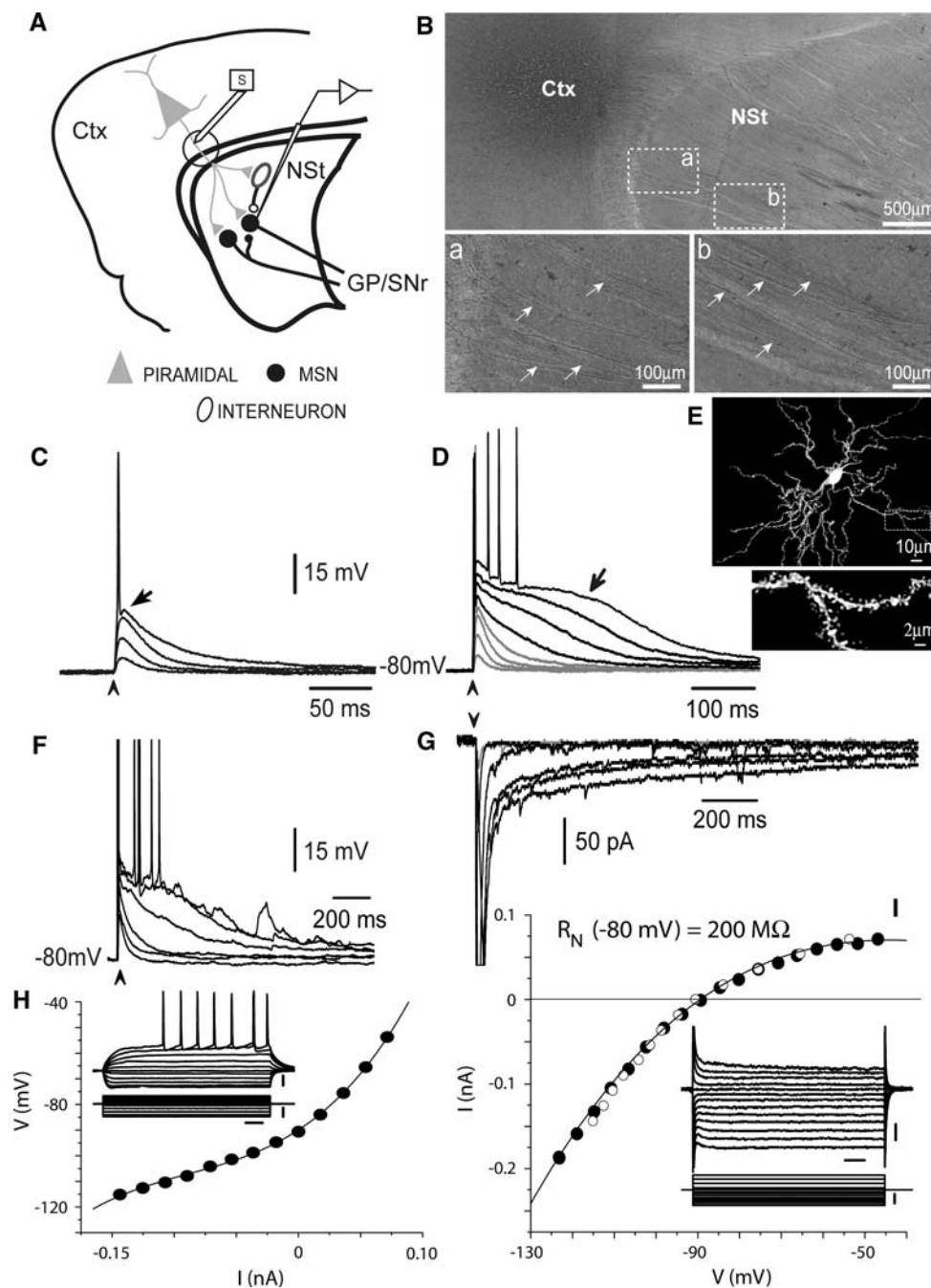


Fig. 1 Corticostriatal suprathreshold response. **a** Schematic of experimental arrangement showing the positions of recording and stimulating electrodes and the cellular elements involved. **b** Photograph of the area of interest. After biocytin instillation in the cortex (Ctx) (see “Methods”), several fibers can be traced anterogradely into the neostriatum (NSt). Squares (dashed lines) show common recording sites, and are seen at larger magnification at the bottom (**a** and **b**). Note abundant labeled fibers. **c** A single stimulus of increasing strength delivered at the cortex evokes subthreshold postsynaptic potentials. An action potential is reached at threshold intensity (arrow). **d** Suprathreshold activity (black traces) is superimposed to subthreshold traces from (**c**) (gray traces). A plateau potential with repetitive firing is elicited at the topmost trace (rat

PD > 45 d, sharp electrode recording). **e** This cell and most cells in the next figures were identified as medium spiny projection neurons. **f** A similar plateau potential can be induced in spiny neurons from younger animals (rat PD = 20 d, whole-cell recording). **g** Voltage-clamp recordings of the same responses only show exponentially decaying currents with action currents firing at the beginning of the response. **h** Current–voltage relationship (I–V plot) obtained in current-clamp mode. The typical firing of spiny neostriatal neurons exhibits inward rectification and delayed tonic firing. **i** Filled circles: an I–V plot obtained in voltage-clamp mode (empty circles represent the I–V plot in **h**, after axis permutation). Both I–V plots coincide showing minimal interference from series resistance or bridge balance. Horizontal calibrations **h**, **i**: 50 ms

pipettes filled with (in mM) the following: 115 KH_2PO_4 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 0.5 EGTA, 0.2 Na_2ATP and 0.2 Na_3GTP . Recordings were obtained with either a high input impedance electrometer (Neurodata, New York, NY, USA) with an active bridge circuit (sharp microelectrodes) or with an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) to perform current- and voltage-clamp recordings (patch pipettes) using standard techniques. Signals were filtered at 1–3 KHz and digitized at 3–9 KHz with an AT-MIO-16E4 board (National Instruments, Austin, TX) in a PC. Slices were totally submerged in the bath solution and superfused with the same saline at 2 ml/min (34–36°C). Cell membrane potential (ca. –80 mV) and input resistance (ca. 50–200 M Ω) were obtained near the resting membrane potential. Internal solutions containing cesium, commonly used in trying to minimize space-clamp problems at the dendrites, were not used, since we are interested in the physiological response.

Recordings were digitized and captured with the aid of software designed in the laboratory in the LabView environment (National Ins., Austin, TX, USA; Lemus-Aguilar et al. 2006). Drugs were dissolved in the bath saline from stock solutions made daily.

Evoked Synaptic Responses

Recordings were carried out in the dorsal striatum. A commonly used arrangement of recording and stimulating electrodes is indicated in Fig. 1a. The stimulation of cortical sensory motor areas was performed with concentric bipolar electrodes (50 μm at the tip). The distance between recording and stimulating electrode was around 0.5–1 mm. Synaptic responses were evoked by a single unrepeatable square wave pulse of 0.1 ms. Sometimes 4 pulses of the same duration, at 20 Hz, were given for comparison. Stimulation was delivered with a stimulator (S-8800; Grass, West Warwick, RI) using an isolation unit. The cell membrane potential was held at –80 mV while the corticostriatal responses were recorded. Traces shown are the average of five traces recordings taken after the amplitude had been stabilized in a given condition. After recording, neurons were injected with biocytin as previously described (Guzmán et al. 2003).

Drugs

Drugs used were 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoline disodium salt (CNQX) which is an antagonist of the glutamate α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor (AMPA), D-(–)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) which is a blocker of the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDA). Picrotoxin, gabazine and bicuculline (methiodide or hydrochloride),

antagonists of the γ -aminobutyric acid receptors of the A-type (GABA_A receptors) were also used as well as the intrinsic conductance blockers: nicardipine, nitrendipine, calciseptine (L-type or Ca_v1 Ca^{2+} -channel blockers) purchased from Sigma-Aldrich-RBI, St Louis, MO, USA, Tocris, Ellisville, MO, USA and Alomone Labs, Jerusalem, Israel.

Data Analysis and Statistics

The area, under the synaptic responses, was obtained by numerical integration and then normalized to the threshold response. Percentages of change in this area are reported. Results are reported as means \pm SEM. Control and test experimental samples were compared using the same cells with free distribution statistics (Wilcoxon's *T* test). Significance was set at $P < 0.05$. Digital subtraction was used to obtain the components sensitive to each drug. A complete intensity–response relationship (I–R plot) of the suprathreshold synaptic response was obtained for a sample of neurons before and during APV (Fig. 3d). Three parameter logistic functions of the form (Tecuapetla et al. 2005)

$$A(i) = \frac{A_{\max}}{1 + \exp(-k(i - ih))}$$

were fitted to the data, where $A(i)$ is the magnitude of the response as a function of stimulus intensity (i.e. measured as the area under the voltage response or depolarization \times duration) normalized to threshold level = 1, A_{\max} is saturation level or maximal response, k is the steepness factor of the function, i is stimulus intensity in threshold units and normalized to threshold = 1, and ih is the stimulus strength necessary to attain half the maximal response. Differences between parameters and their estimation errors were compared with Student's *t* tests.

NEURON Modeling

A simplified reduced model of medium spiny neostriatal projection neuron (MSNs) was done with NEURON, version 6.0 (Hines and Carnevale 1997, 2001) as follows: a soma (length (*L*) = 16 μm , diameter (diam) = 12 μm), with seven dendritic trees made out of cylindrical compartments, simulated the anatomy. Each dendritic tree consisted of one primary trunk (*L*, 40 μm ; with a steep diameter tapering from 5.5 to 1 μm in the first 4 μm and a smooth diameter tapering from 1 to 2.4 μm up to *L*) constructed with 22 sections, two secondary branches (*L*, 73 μm ; with diameter tapering from 2.4 to 1.68 μm) constructed with eight sections, and four tertiary branches (*L*, 73 μm ; and diameter tapering from: 1.68 to 0.88 μm) constructed with nine sections.

Forty-six dendritic spines were connected to distal secondary, and tertiary dendrites at the sites of modeled glutamatergic synaptic contacts were used in the simulation of Fig. 5f. Each spine consisted of two compartments: the neck (L, 1 μm ; diameter 0.3 μm) and the head (L, 1 μm ; diameter 0.9 μm). Spine area for nonrepresented spines was compensated by incrementing the length and diameter of the dendritic compartments (Stratford et al. 1989), so as to match the total dendritic and spine surface area as a function of distance from the soma and according to previous high voltage microscopic studies (Wilson et al. 1983). Suprathreshold corticostriatal stimulation was mimicked by fine tuning a certain number of excitatory and inhibitory synapses (see “Results”). Axial resistivity was 100 Ω/cm . Specific membrane capacitance was adjusted to 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. All simulations were done at 35°C. The cell model incorporated ionic channel models describing leak currents, Na_v1 , Ca_v1 , K_v1 , K_v4 , K_v7 , KCa_1 , KCa_2 , AMPA, NMDA, GABA currents, and a model for internal calcium dynamics. The Appendix in the Supplementary Information section contains the details of this NEURON-model.

Results

Corticostriatal Responses as Plateau Potentials

Figure 1a shows a scheme of the experimental arrangement to obtain suprathreshold corticostriatal responses. It also shows the neuronal elements that may be involved in this response; Post-synaptic elements from which recordings are made are medium spiny neurons (MSNs; filled circles). Local interneurons (ovoid), cortical pyramidal cells (triangle), other MSNs, and their respective synapses may participate in shaping the response recorded in one MSN. The drawing illustrates the positions of the stimulating and recording electrodes. Note that the initiating monosynaptic event is the excitatory synapse from the pyramidal neuron. Figure 1b shows a composed photograph of the region represented in Fig. 1a. Cortical deep layers received a biocytin instillation (see “Methods”) that anterogradely filled many fibers and axons that can be seen crossing the corpus callosum into the striatum (top). Biocytin was delivered on the site used for field stimulation while rectangular squares (*a* and *b* at the bottom) show common sites of recording, 0.5–1.0 mm away from the stimulation site. Several labeled axons (arrows) following the tracts of the internal capsule can be observed, confirming that abundant bundles of corticostriatal fibers are involved in this in vitro experimental arrangement (Schlösser et al. 1999).

Using this arrangement, synaptic responses were evoked in spiny cells with cortical field stimulation of increasing

strength at a membrane potential held at about -80 mV (“down”-state near resting membrane potential; In Fig. 1c, d arrow heads indicate stimuli). Threshold for action potential firing was about -56 ± 3 mV ($n = 53$). This range for a voltage transition is commonly seen. All neurons identified with intracellular biocytin and sampled for this study were medium-sized spiny projection neurons (MSNs; Fig. 1e).

A family of subthreshold and threshold synaptic responses is shown in Fig. 1c. Exponential-like decay to baseline should be noticed. Cortical synaptic potentials (SP) decayed $>90\%$ in about 50 ± 2 ms ($n = 24$). Increasing stimulus strength (suprathreshold) evoked plateau-like corticostriatal responses which are illustrated in Fig. 1d. Responses from Fig. 1c are superimposed (lighter gray traces) for comparison. Suprathreshold responses are different to subthreshold ones in that they do not decay exponentially, slow depolarizations are common (ca. 400–800 ms), and repetitive firing after a single shock can ensue. These responses cannot be explained by a monosynaptic cortical SP unless electrotonic length is minimized (e.g., Logan et al. 2007). Although it is commonly implied that slow, up-state depolarizations are the sum of several glutamatergic SP, and physiologically this should be a common case, here it is shown that a slow depolarization can be produced by a *single* cortical stimulus (adult rat, PD 45 days, sharp electrode recording). In spite of this duration, maximal amplitude of threshold responses is 22 ± 5 mV, while amplitude of suprathreshold responses is 28 ± 5 mV ($n = 84$; from a membrane potential of -80 mV). That is, stimulation strength does not significantly increase amplitude, but does increase the duration and number of action potentials fired (Bargas et al. 1991; Kita 1996; Vergara et al. 2003; Tseng et al. 2007). Plateau potentials, after single stimulus, have been observed in other neuronal classes (e.g., Lo and Mize 2000; Schiller and Schiller 2001; Wu et al. 2004; Zhou et al. 2006; Kass and Mintz 2006; Tseng et al. 2007) and have been considered the result of recurrent activation in the microcircuit (e.g., Arshavsky et al. 1997; O’Donnell 2003; Lambe and Aghajanian 2007; Sullivan et al. 2008); hence they are essential to produce voltage oscillations, patterning, and synchronization (Arshavsky et al. 1997; O’Donnell 2003; Grillner 2006; Yuste et al. 2005). However, note that there is no recurrent excitation in this micro-circuit (Fig. 1a). Figure 1f shows that similar slow plateau-like potentials can be induced in MSNs from younger animals (rat PD = 20 days, whole-cell recording). However, voltage-clamp recordings of the same responses fail to show the richness of the voltage response, and only show a slow exponential decay of the contributing currents with action currents firing at the beginning of the response. This current kinetics may be due to a variable space clamp obtained

at the dendrites, and a variable contribution of membrane capacitance combined with the point clamp at the soma (a quasi infinite soma shunt). It also suggests that important contributing currents lack the positive feedback to become auto-regenerative (discussed later). Thus, we decided that although voltage-clamp recordings may show the ionic currents underlying the plateau potentials, they do not give a good qualitative assessment about their contribution in the making of a suprathreshold voltage response, which is the physiological response. Thus, this initial analysis (below) is based on voltage recordings. Figure 1h, i show that neurons could also be identified electrophysiologically as spiny neostriatal neurons. Superimposition of current–voltage relationships (I–V plots) obtained in both current- and voltage-clamp modes (Fig. 1i, empty and filled circles, respectively) shows coincident steady-state measurements (e.g., Ibañez-Sandoval et al. 2006).

NMDA-Receptor Contribution to Corticostriatal Response is Proportional to Stimulation Strength

What explains repetitive firing after a *single* shock? Figure 2a–c illustrates corticostriatal responses obtained after a single cortical stimulus of increasing strength, before (Fig. 2a) and after the NMDA receptors are blocked with 50 μ M APV (Fig. 2b). Superimposition of the larger responses is seen in Fig. 2c. An influence of NMDA receptor activation is evident (Galarraga et al. 1997; Vergara et al. 2003; Logan et al. 2007; Pomata et al. 2008) because the burst of spikes is lost after NMDA-blockage. In fact, without available NMDA receptors it is not possible to obtain repetitive firing after a single stimulus at the highest stimulus strength (Fig. 2b): Intensity–response relationships (I–R plots; Fig. 2d) were obtained from a sample of neurons. Intensity was normalized to threshold strength, while responses were measured as the area under the response (amplitude \times duration). Note that NMDA influence could be detected since the subthreshold responses but was increasingly larger at suprathreshold responses (Fig. 2d) resulting in divergent I–R plots. Fitting logistic functions to the data (see “Methods” and Fig. 2d), it was found that corticostriatal responses with and without the APV-sensitive component did not differ significantly in steepness (k ; see “Methods”) (6 ± 1 in control vs. 5 ± 1 in APV; response/stimulus units, NS) or in the strength needed to obtain a half maximal response (ih : 1.2 ± 0.1 in control vs. 1.3 ± 0.1 in APV; threshold units, NS), suggesting that the same number of afferents were recruited in both instances. In contrast, the plots had significant differences in the maximal response attained: A_{\max} was 9.3 ± 2.7 when NMDA receptors were available (control) vs. 3.9 ± 1 when NMDA receptors were blocked (in APV). It was suggested that this difference can be

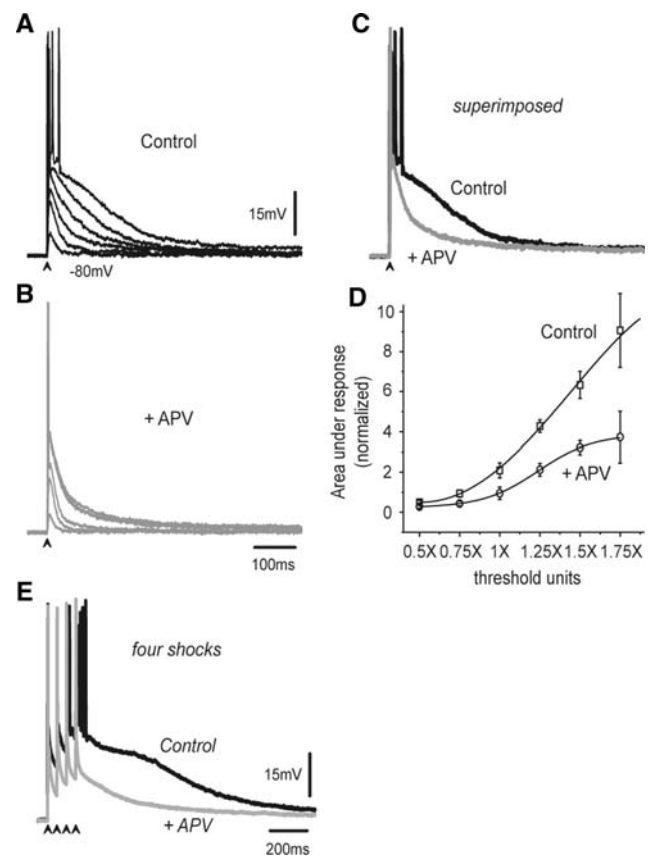


Fig. 2 Contribution of NMDA receptors to the corticostriatal response. (a, b) Families of corticostriatal responses obtained after a single cortical stimulus of increasing strength, before (a) and after the NMDA-receptors are blocked with 50 μ M APV (b). c Superimposition of the larger responses in (a) and (b). d Intensity–response relationships in a sample of neurons. Data were fitted with $A(i) = A_{\max}/(1 + \exp(-k(i - ih)))$ where $A(i)$ = amplitude of response as a function of stimulus strength (normalized to threshold); k = steepness factor (how easy corticostriatal afferents are recruited by stimulation strength); i = stimulus strength (normalized to threshold intensity); ih = stimulus strength necessary to attain half maximal amplitude; A_{\max} = maximal response amplitude. e Superimposition as in (c), but with four slightly suprathreshold shocks at 20 Hz as corticostriatal stimulus

attributed to postsynaptic NMDA-receptor activation: responses with the NMDA component are $138 \pm 22\%$ larger (Fig. 3a, b; $n = 6$; $P < 0.05$). In fact, cortical SPs without the NMDA component appeared to be near saturation (Fig. 2d +APV), and no slow components of enough amplitude or duration was evident and no repetitive firing was possible (Fig. 2b) after a single stimulus. It is concluded that, in the present conditions, NMDA receptors are necessary to have a corticostriatal plateau-like depolarization after a single stimulus.

Because higher strength with field stimulation means the recruitment of more afferents impinging on the recorded neuron (spatial summation), we next investigated the dependency of the APV-sensitive component upon

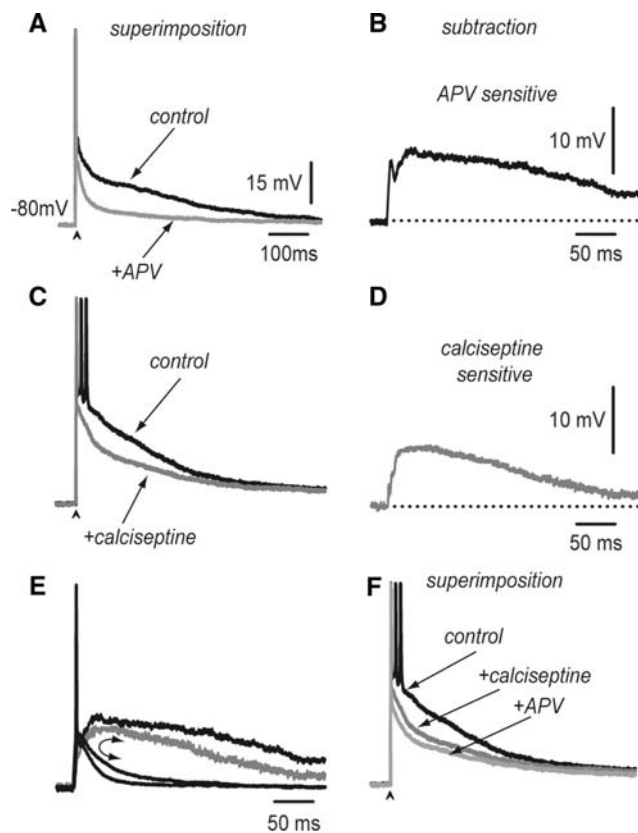


Fig. 3 Synaptic and intrinsic depolarizing components of the corticostriatal response. **a** Superimposition of a suprathreshold corticostriatal response firing a single action potential in control (black trace) and after adding 50 μ M APV to the bath saline (gray trace). **b** A digital subtraction of the traces in (a). Note that after a single shock the depolarization contributed by NMDA current may last hundreds of milliseconds. **c** Superimposition of a suprathreshold corticostriatal response firing a burst of action potentials in control (black trace) and after adding 400 nM calciseptine, a blocker of Ca_v1 class (L) Ca^{2+} -channels to the bath saline (gray trace). **d** A digital subtraction of the traces in (c). Note that after a single shock the depolarization contributed by Ca_v1 class (L) Ca^{2+} -channels may last hundreds of milliseconds. **e** Nonscaled superimposition of the traces in (b) and (d) to compare their duration and time courses with that of the corticostriatal subthreshold and threshold responses (mostly AMPA/KA receptor currents). Note that when AMPA/KA synaptic potentials are already decaying, the NMDA and L current components are turning on, explaining the prolonged duration of the corticostriatal response after a single shock. **f** Voltage traces after successive blockage of, first, the L current, and then, the NMDA current

temporal summation. Figure 2e (black trace) shows that the summation of four slightly suprathreshold synaptic responses also elicit a comparable larger and slower APV-sensitive component that sustains repetitive firing. In average, the responses after four stimuli are $246 \pm 14\%$ larger than the responses after a single stimulus ($n = 45$; $P < 0.02$). Again, the blockage of NMDA receptors abolishes the plateau depolarization (Fig. 2e, gray trace). It is concluded that both spatial and temporal summations

amplify the corticostriatal response attributed to NMDA receptor activation (Kepecs and Raghavachari 2007).

Nonetheless, the fact that the NMDA component correlates with the duration of the corticostriatal response and that it is a part of the monosynaptic (initial) response does not mean that the plateau potential can be explained by the sole activation of the NMDA synaptic current (Fig. 3a, b). On the contrary, evidence of intrinsic inward current participation has been encountered and a clear comparison between the two has not been reported.

Participation of Intrinsic Ca^{2+} Current

Figure 3 compares the apparent contribution of the NMDA receptor synaptic current (Fig. 3a, b, see previously) with that from the $\text{Ca}_v1.3$ current, that is, the L-type Ca^{2+} -channels current activated at subthreshold voltages (Fig. 3c, d; Bargas et al. 1994; Olson et al. 2005), which has been proposed to participate in the generation of up-states and corticostriatal responses (Galarraga et al. 1997; Hernández-López et al. 1997, 2000; Suri et al. 2001; Gruber et al. 2003; Vergara et al. 2003; Adermark and Lovinger 2007). Figure 3a–d show that in both cases, the blockers of the respective currents (50 μ M APV and 400 nM calciseptine, respectively) greatly reduce the synaptically induced corticostriatal response, confirming that both synaptic and intrinsic currents are activated after corticostriatal transmission (Adermark and Lovinger 2007; Cepeda et al. 1998; Galarraga et al. 1997; Vergara et al. 2003). Blockage of L-channels reduced the slow corticostriatal response by $31 \pm 5\%$ ($n = 6$, $P < 0.05$). Similar reductions were observed after 2.5 μ M nifedipine or 1 μ M nitrendipine (not shown). Digital subtraction (Fig. 3b, d) discloses the APV- and calciseptine-sensitive components. Note that both the synaptically induced current and the intrinsic current may last hundreds of milliseconds after a single shock and thus contribute similarly to response duration (cf Fig. 3b, d). In fact, superimposing and scaling subthreshold and threshold EPSPs with the APV- and calciseptine-sensitive components (Fig. 3e) show that the mainly AMPA/KA-mediated EPSP is already falling down when NMDA- and L channels-mediated depolarizations are still rising as a result of a single shock; giving then the opportunity of network interactions if repetitive firing ensues.

Finally, Fig. 3f shows that if APV is applied after L channels being blocked, its effects appear less than those found when applied alone; suggesting that NMDA- and L-currents do not add linearly. In fact, if calciseptine is administered after APV it has no effect (negative results not shown). Therefore, as expected, L channels contribution is a result of NMDA-receptors activation (which explains results in Fig. 2).

But then, if the network of interconnected MSNs is activated, what could be the role of this activation?

Role of Synaptic Inhibition During the Corticostriatal Response

We evaluated the role of inhibitory GABA_A synaptic inputs during the suprathreshold corticostriatal response and compared it with NMDA and L channels contributions. It has been shown that a single cortical stimulus may activate, simultaneously, dozens of MSNs (Carrillo-Reid et al. 2008, 2009), and that different amounts of inhibition may contribute to this response (Kita 1996; Tunstall et al. 2002; Guzmán et al. 2003; Plenz 2003; Koos et al. 2004; Gustafson et al. 2006; Tecuapetla et al. 2007; Gruber et al. 2009). It has also been shown that MSNs is connected with each other via recurrent GABAergic synaptic inputs and that inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) have reversal potentials around -65 mV (Misgeld et al. 1982; Jiang and North 1991; Bennett and Bolam 1994; Kita 1996; Ramanathan et al. 2002). Because axons lengths and distances between connected neurons may vary, a question arises about the delays exhibited by arriving inhibitory synaptic connections onto a given MSN. If they are asynchronous enough, they may help in maintaining the corticostriatal response (Gruber et al. 2009). There is an evidence of asynchronous inhibition in the striatum (Sullivan et al. 2008). But to clearly demonstrate it on an MSN we required to show it after a *single* cortical stimulus, because it is known that fast GABAergic transmission cannot last hundreds of milliseconds after a single shock (Misgeld et al. 1982; Jiang and North 1991; Tunstall et al. 2002; Gustafson et al. 2006; Tecuapetla et al. 2007).

Figure 4a shows a corticostriatal plateau potential before (black trace) and after (gray trace) the bath application of the GABA_A receptor antagonist, $10 \mu\text{M}$ bicuculline (either methiodide, $n = 8$, or hydrochloride, $n = 2$, were applied). It was clear that blockage of GABAergic transmission had a dual action. First, it produced an enhancement of the initial depolarization and an increase in the discharge (gray trace), suggesting that initial depolarization and firing are being restrained by GABAergic inputs (inhibition). Secondly, late depolarization was *reduced* by the GABA receptor antagonist; indicating that GABAergic inputs do help in maintaining the plateau potential (e.g., Ben-Ari 2002). A digital subtraction of responses before and after bicuculline better illustrates this dual action (Fig. 4b). As it is the case of shunting inhibition, the response is restrained earlier but it is sustained later (e.g., Bartos et al. 2007; Mann and Paulsen 2007). In a sample of neurons, the initial depolarization (before the first crossing point in the superimposed traces) was enhanced after bicuculline $35 \pm 6\%$ ($n = 10$; $P < 0.05$)

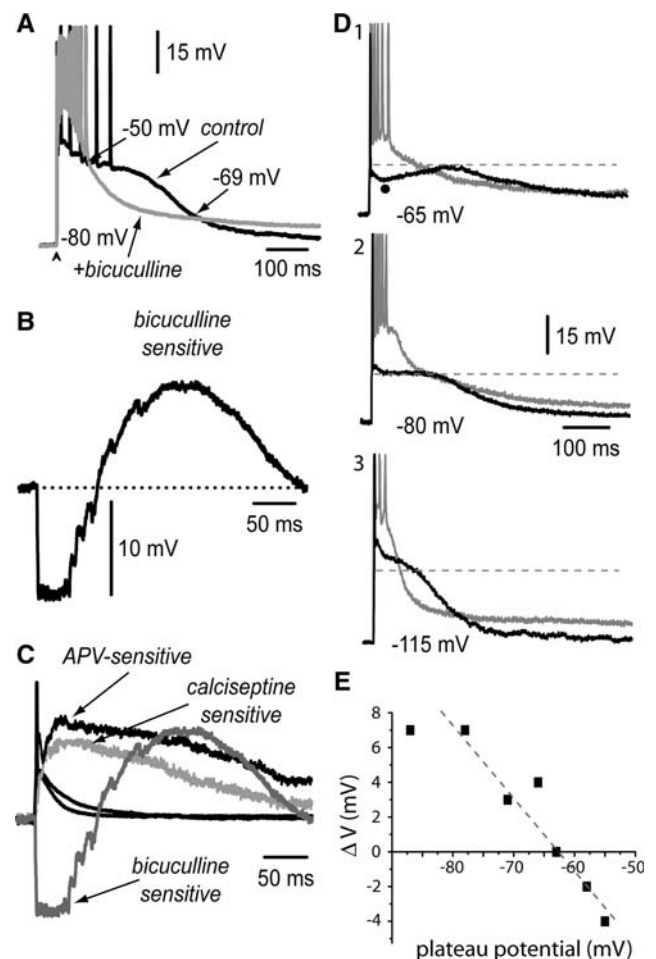


Fig. 4 Role of synaptic inhibition during the corticostriatal response. **a** Superimposition of a suprathreshold corticostriatal response firing a train of action potentials in control (black trace) and after adding $10 \mu\text{M}$ bicuculline a GABA_A receptor antagonist to the bath saline (gray trace). Note that GABAergic current was restraining firing at the beginning of the response, but later, it was helping to maintain the level of depolarization. **b** A digital subtraction of the traces in (a) shows that the bicuculline-sensitive component of the corticostriatal response is biphasic: the first 50–70 ms is lower than the response in the presence of bicuculline and all the time left is above it (hundreds of milliseconds); in this case two spikes occur when the bicuculline-sensitive component is depolarizing. Note that the first component of the subtraction is not hyperpolarizing (< -80 mV in a) but it is just more negative than threshold for firing. Superimpositions in Fig. 5e, f take this fact into account. **c** The time course of the bicuculline-sensitive component is compared with that of the APV-sensitive (NMDA-) and (calcisepetine-sensitive) Ca_v1 (L) Ca²⁺-currents components. Note that the GABAergic component decays faster in part explaining the termination of the plateau-potential. **d** 1–3 A plateau potential evoked at different holding potentials (black trace). Note that at depolarized potentials it becomes hyperpolarizing (there is a local minimum, dot and dashed gray line). Addition of $10 \mu\text{M}$ bicuculline blocks local minima (gray traces). **e** Relative plateau amplitude (local minima/maxima) plotted against its absolute membrane potential yields a reversal potential ≈ -63 mV

while the later part of the response (after the first crossing point) was decreased after bicuculline by $30 \pm 4\%$ ($n = 8$, $P < 0.05$). Picrotoxin and gabazine have the same action as

bicuculline ($n = 8$; not shown). Figure 4c compares the duration of the GABAergic component with that of the NMDA and L channels components (Fig. 3e). It can be seen that inhibition may help in explaining both its maintenance and its termination, by shifting the balance of currents toward more polarized membrane potentials. Moreover, Fig. 4d shows that a portion of the corticostriatal plateau potential reversed its polarity when the neurons were depolarized by intracellular direct current injection. Figure 4e plots the relation between plateau depolarization and absolute amplitude (in mV) of the local minimum/maximum of the plateau potential (black traces, measures at time signaled by dot in D1). Reversal potential was -63 ± 4 mV ($n = 6$) similar to the reported reversal potential for IPSPs in MSNs. Gray traces in Fig. 4d are the same responses after the addition of bicuculline.

Because it is known that several MSNs do display similar plateau potentials inside a time window lasting hundreds of milliseconds after the same cortical stimulus (Carrillo-Reid et al. 2008), the most parsimonious interpretation of the present results is that a barrage of GABAergic inputs reaches the recorded MSN with different delays. Thus, the present result supports the view that recurrent inhibitory (feedback) activity (Plenz 2003; Sullivan et al. 2008; Gruber et al. 2009) may help in sustaining the plateau potential (see Bartos et al. 2007), as it commonly happens in recurrent excitatory networks (Tseng and O'Donnell 2005; Grillner 2006; Lambe and Aghajanian 2007).

Modeling Supports the Role of the Striatal Micro-Circuitry During the Plateau Potential

The NEURON model of an “average” MSN was constructed taking into account its characteristic spine density and its reported intrinsic currents (see Appendix in Supplementary Information). Figure 5a, b compares the reconstruction of a biocytin-filled MSN with its schematic compartmental model (see “Methods”). Insets show actual and simulated spines. A fine tuning of a set of ionic currents models (Na_v1 , Ca_v1 , K_v1 , K_v4 , K_v7 , KCa_1 , KCa_2 , AMPA, NMDA, GABA currents, and a model for internal calcium dynamics) known to be essential for the biophysical behavior of MSNs (Bargas et al. 2003; Wolf et al. 2005; Day et al. 2008) was used to approximate their firing characteristics upon step current depolarization and their inward rectification during hyperpolarizing current steps (Fig. 5c, d).

Suprathreshold corticostriatal stimulation was mimicked with the fine tuning of synaptic glutamatergic and GABAergic inputs so that long-lasting inhibition such as that depicted in Fig. 4c (bicuculline-sensitive) was attained (Fig. 5e, f). Interestingly, this particular match between

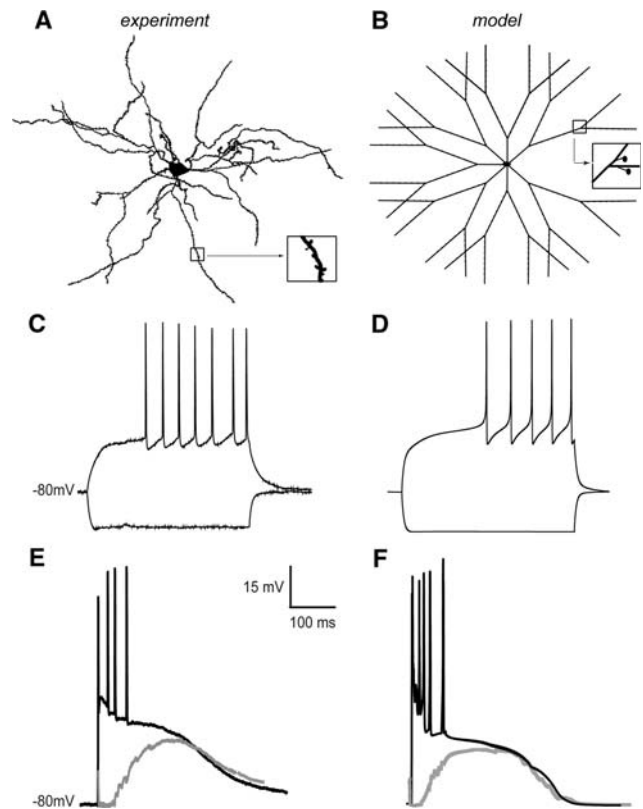


Fig. 5 A NEURON-model of a medium spiny neuron to illustrate the contribution of inhibition during the corticostriatal response. **a** A biocytin-filled medium spiny neostriatal neuron reconstructed with a camera lucida. Inset: details of spiny dendritic shaft. **b** A compartmental model (see “Methods”) of a spiny neuron, with the spines necessary to add glutamatergic synaptic inputs (rest of spines surface is compensated with dendritic surface to preserve electrotonic length and passive parameters) (see Supplementary material). **c** Characteristic delay to first spike, tonic firing and inward rectification for depolarizing and hyper-polarizing intracellular current steps of equal strength. **d** Similar characteristics in the model neuron. **e** Suprathreshold corticostriatal response showing a train of action potentials and a plateau-like depolarization lasting hundreds of milliseconds (*black trace*). The inhibitory component of a corticostriatal response obtained by subtraction is superimposed (*gray trace*). It is the same trace as in Fig. 4b, c. **f** A similar simulated corticostriatal response in the model neuron (*black trace*) with a similarly subtracted inhibitory component (*gray trace*). Inhibitory components are not scaled for amplitude but are scaled to match the duration of the corticostriatal responses

one experimental and its simulated suprathreshold corticostriatal response was achieved by activating 46 (around 50) glutamatergic synapses on the same number of dendritic spines (see “Methods”), 89 (around 90) somatic GABAergic synapses, and 142 (around 140) dendritic GABAergic synapses distributed over secondary and tertiary dendrites with different arrival times. A decrease in the number of inhibitory synapses had to be compensated with an increase in the amount of NMDA or L channels current to maintain the same plateau, and viceversa. Nevertheless, the space of solutions seemed restricted.

Although a better dynamical analysis and a segregation of MSNs into two populations (Day et al. 2008) deserve further studies, at present, it can be said that the number of inhibitory inputs that appear to be participating following a suprathreshold cortical command is relatively large (as compared with the number of excitatory inputs; see “Discussion”).

Discussion

One goal of this study was to explore the possibility that GABA_A receptors-mediated depolarization in MSNs (shunting inhibition) could contribute to the duration and maintenance of the plateau-like corticostriatal response, noticing that, if they do contribute, they necessarily should arrive asynchronously to the recorded neuron in a determined window of time given by the processing of the striatal micro-circuitry. Therefore, to demonstrate this contribution, we restricted an initial analysis to suprathreshold plateau depolarization induced by a *single* cortical stimulus (because IPSPs do not last hundreds of milliseconds in MSNs). In this sense, the question aroused: How many inhibitory inputs can a *single* cortical command activate on a responding MSN? The modeling part of this work yielded about 200, 140 of them, should arrive asynchronously on the dendritic arbor and contribute to the duration of the plateau potential. That is, a single cortical command may activate five times as many inhibitory synapses ($90 + 140 = 230$) than excitatory ones (46) or $230/46 = 5$, resulting in circuit reverberation. These numbers vary (by the dozen; but notice that K⁺-currents have not been investigated in this response) if compensated by NMDA and/or L-type (Ca_v1)-currents, indicating that, in the present conditions, inhibitory inputs appear to be necessary for the maintenance of the plateau potential. Incidentally, groups of about 20–30 neurons appear to synchronize spontaneously in a striatal neural vector or ensemble (Carrillo-Reid et al. 2008). If one considers that an MSN leaves about five synaptic contacts on another MSN (Guzmán et al. 2003), this makes $140/5 = 28$ neurons which is about the right number of neurons in an ensemble (Carrillo-Reid et al. 2008).

A second goal was to compare the contribution of inhibition with that coming from NMDA- and intrinsic Ca²⁺-current-mediated depolarizations. In some circuits capable of storing motor programs, afferents may convey the commands that turn them on, but afterwards, the circuits may help in sustaining their own activity without a continuous spatio-temporal integrated input, just requiring a continuous tonic drive to go on (see Arshavsky et al. 1997). This has been explained for excitatory circuits by the existence of a core of recurrent excitatory interneurons

that alternate their activity, which therefore, maintain itself (Grillner 2006). The plateau potential is just a manifestation of this local circuit activity (Lambe and Aghajanian 2007; Tseng and O'Donnell 2005). But reverberant activity can also be a property of recurrent networks of inhibitory neurons if shunting inhibition is present, and if a sufficient number of inhibitory inputs arrive with enough delay (Bartos et al. 2007). Recent evidence suggests that this may be the case in the striatum: various amounts of shunting inhibition are evident depending on the location of the cortical stimulus (Gruber et al. 2009), different arrival times for inhibitory inputs onto striatal interneurons reveal reverberation in the striatal microcircuitry (Sullivan et al. 2008), events of spontaneous synchronization after interrupting cortical stimulation in the presence of a tonic drive (Carrillo-Reid et al. 2008) have been demonstrated, and finally, during behavioral tasks interneurons appear not just to provide a feed-forward inhibition at the beginning of the response (Plenz 2003), but also to participate in the barrage of asynchronous inputs (Berke 2008) which is in agreement with their role in assembly orchestration (Carrillo-Reid et al. 2008). Therefore, this work adds another piece into the story showing that, after a single cortical stimulus, inhibition onto an MSN may last as long as NMDA- and L-type channels responses. This is independent of cortical neurons having similar NMDA-induced plateaus, after *single* stimulus, and thus becoming another factor of induced plateaus in MSNs (Vergara et al. 2003).

Still, other possible components of the plateau-like response need further investigation, i.e. the role of intrinsic outward currents and gap junctions. Therefore, before their contribution is evaluated, modeling has to be hypothetical. In addition, modulatory influences (e.g., by dopaminergic and cholinergic systems) may change some of these components so that the response may vary dynamically in agreement to brain state (e.g., Suri et al. 2001; Tseng et al. 2007; Day et al. 2008; Ondracek et al. 2008; Vautrelle et al. 2009).

Plateau potentials serve as windows for synchronization of neuronal ensembles (e.g., O'Donnell 2003; O'Donnell et al. 1999; Yuste et al. 2005). The traveling of synchronized activity by these ensembles is the basis for the processing of the tasks ascribed to a microcircuit. One may ask how a network of inhibitory neurons may be the site for storage of tasks attributed to procedural memory such as motor programs, learned procedures, and habits (Graybiel 2005) that may be turned on by the cortex, but afterwards, run by their own. Together with other recent investigations, our experimental and modeling work supports the view that shunting inhibition not only serves as a lateral inhibition network but is a key element to understand how a network of inhibitory neurons may sustain autonomous cycles of activity and spontaneous events of synchronization (Carrillo-Reid et al. 2008, 2009).

Acknowledgments This work was supported by grants from a Project Program grant IMPULSA 03 to J. Bargas, and E. Galarraga, by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) Grant 49484 and by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Universidad Nacional Autónoma de México: IN201607 to J. Bargas and IN201507 to E. Galarraga.

References

- Adermark L, Lovinger DM (2007) Combined activation of L-type Ca^{2+} channels and synaptic transmission is sufficient to induce striatal long-term depression. *J Neurosci* 27:6781–6787. doi:10.1523/JNEUROSCI.0280-07.2007
- Akopian G, Walsh JP (2002) Corticostriatal paired-pulse potentiation produced by voltage-dependent activation of NMDA receptors and L-type Ca^{2+} channels. *J Neurophysiol* 87:157–165
- Arshavsky YI, Deliagina TG, Orlovsky GN (1997) Pattern generation. *Curr Opin Neurobiol* 7:781–789. doi:10.1016/S0959-4388(97)80136-5
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1991) Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res* 539:159–163. doi:10.1016/0006-8993(91)90700-6
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994) Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14:6667–6686
- Bargas J, Cervantes L, Galarraga E, Fragueta A (2003) Ion channels: keys to neuronal specialization. In: Arbib MA (ed) *The handbook of brain theory and neural networks*, 2nd edn. MIT Press, Massachusetts, pp 585–590
- Bartos M, Vida I, Jonas P (2007) Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* 8:45–56. doi:10.1038/nrn2044
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728–739. doi:10.1038/nrn920
- Bennett BD, Bolam JP (1994) Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neurosci* 62:707–719. doi:10.1016/0306-4522(94)90471-5
- Berke JD (2008) Uncoordinated firing rate changes of striatal fast-spiking interneurons during behavioral task performance. *J Neurosci* 28:10075–10080. doi:10.1523/JNEUROSCI.2192-08.2008
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Marfia GA, Pisani A, Sancesario G, Bernardi G (2000) Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 61:231–265. doi:10.1016/S0301-0082(99)00030-1
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernandez-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Bargas J (2008) Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99:1435–1450. doi:10.1152/jn.01131.2007
- Carrillo-Reid L, Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibáñez-Sandoval O, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Bargas J (2009) Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 101:737–749. doi:10.1152/jn.90975.2008
- Carter AG, Sabatini BL (2004) State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron* 44:483–493. doi:10.1016/j.neuron.2004.10.013
- Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Chandler SH, Levine MS (1998) Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *J Neurophysiol* 79:82–94
- Cepeda C, André VM, Yamazaki I, Wu N, Kleiman-Weiner M, Levine MS (2008) Differential electrophysiological properties of dopamine D_1 and D_2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *Eur J Neurosci* 27:671–682. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06038.x
- Chapman DE, Keefe KA, Wilcox KS (2003) Evidence for functionally distinct synaptic NMDA receptors in ventromedial versus dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 89:69–80. doi:10.1152/jn.00342.2002
- Day M, Wokosin D, Plotkin JL, Tian X, Surmeier DJ (2008) Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J Neurosci* 28:11603–11614. doi:10.1523/JNEUROSCI.1840-08.2008
- Galarraga E, Hernandez-Lopez S, Reyes A, Barral J, Bargas J (1997) Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca^{2+} conductance. *NeuroReport* 8:2183–2186. doi:10.1097/00001756-199707070-00019
- Goto Y, O'Donnell P (2001) Network synchrony in the nucleus accumbens in vivo. *J Neurosci* 21:4498–4504
- Graybiel AM (2005) The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol* 15:638–644. doi:10.1016/j.conb.2005.10.006
- Grillner S (2006) Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52:751–766. doi:10.1016/j.neuron.2006.11.008
- Gruber AJ, Solla SA, Surmeier DJ, Houk JC (2003) Modulation of striatal single units by expected reward: a spiny neuron model displaying dopamine-induced bistability. *J Neurophysiol* 90:1095–1114. doi:10.1152/jn.00618.2002
- Gruber AJ, Powell EM, O'Donnell P (2009) Cortically activated interneurons shape spatial aspects of cortico-accumbens processing. *J Neurophysiol*. doi:10.1152/jn.91002.2008
- Gustafson N, Gireesh-Dharmaraj E, Czubyko U, Blackwell KT, Plenz DA (2006) Comparative voltage and current-clamp analysis of feedback and feedforward synaptic transmission in the striatal microcircuit in vitro. *J Neurophysiol* 95:737–752. doi:10.1152/jn.00802.2005
- Guzmán JN, Hernández A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J, Bargas J (2003) Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci* 23:8931–8940
- Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D_1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca^{2+} -conductance. *J Neurosci* 17:3334–3342
- Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D_2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca^{2+} currents and excitability through a novel $\text{PLC}\beta_1/\text{IP}_3/\text{calcineurin}$ signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987–8995
- Hines ML, Carnevale NT (1997) The NEURON simulation environment. *Neural Comput* 9:1179–1209. doi:10.1162/neco.1997.9.6.1179
- Hines ML, Carnevale NT (2001) NEURON: a tool for neuroscientists. *Neuroscientist* 7:123–135
- Ibáñez-Sandoval O, Hernández A, Floran B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erlij D, Aceves J, Bargas J (2006) Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D_1 and D_2 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 95:1800–1811. doi:10.1152/jn.01074.2005
- Jiang ZG, North RA (1991) Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro. *J Physiol* 443:533–553
- Kass JI, Mintz IM (2006) Silent plateau potentials, rhythmic bursts, and pacemaker firing: three patterns of activity that coexist in quadristable subthalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:183–188. doi:10.1073/pnas.0506781102

- Kepecs A, Raghavachari S (2007) Gating information by two-state membrane potential fluctuations. *J Neurophysiol* 97:3015–3023. doi:10.1152/jn.01242.2006
- Kita H (1996) Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neurosci* 70:925–940. doi:10.1016/0306-4522(95)00410-6
- 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.2163-04.2004
- Kreitzer AC, Malenka RC (2007) Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445:643–647. doi:10.1038/nature05506
- Lambe EK, Aghajanian GK (2007) Prefrontal cortical network activity: opposite effects of psychedellic hallucinogens and D1/D5 dopamine receptor activation. *Neurosci* 145:900–910. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.12.048
- Lemus-Aguilar I, Bargas J, Tecuapetla F, Galarraga E, 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
- Li L, Murphy TH, Hayden MR, Raymond LA (2004) Enhanced striatal NR2B-containing *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic currents in a mouse model of Huntington disease. *J Neurophysiol* 92:2738–2746. doi:10.1152/jn.00308.2004
- Lo FS, Mize RR (2000) Synaptic regulation of L-type Ca^{2+} channel activity and long-term depression during refinement of the retinocollicular pathway in developing rodent superior colliculus. *J Neurosci* 20:RC58
- Logan SM, Partridge JG, Matta JA, Buonanno A, Vicini S (2007) Long-lasting NMDA receptor-mediated EPSCs in mouse striatal medium spiny neurons. *J Neurophysiol* 98:2693–2704. doi:10.1152/jn.00462.2007
- Mahon S, Deniau JM, Charpier S (2001) Relationship between EEG potentials and intracellular activity of striatal and cortico-striatal neurons: an in vivo study under different anesthetics. *Cereb Cortex* 11:360–373. doi:10.1093/cercor/11.4.360
- Mann EO, Paulsen O (2007) Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci* 30:343–349. doi:10.1016/j.tins.2007.05.003
- Misgeld U, Wagner A, Ohno T (1982) Depolarizing IPSPs and depolarization by GABA of rat neostriatum cells in vitro. *Exp Brain Res* 45:108–114. doi:10.1007/BF00235769
- O'Donnell P (2003) Dopamine gating of forebrain neural ensembles. *Eur J Neurosci* 17:429–435. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02463.x
- O'Donnell P, Grace AA (1995) Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J Neurosci* 15:3622–3639
- O'Donnell P, Greene J, Pabello N, Lewis BL, Grace AA (1999) Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci* 877:157–175. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb09267.x
- Olson PA, Tkatch T, Hernandez-Lopez S, Ulrich S, Ilijic E, Mugnaini E, Zhang H, Bezprozvanny I, Surmeier DJ (2005) G-protein-coupled receptor modulation of striatal $Ca_v1.3$ L-type Ca^{2+} channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci* 25:1050–1062. doi:10.1523/JNEUROSCI.3327-04.2005
- Ondracek JM, Dec A, Hoque KE, Lim SA, Rasouli G, Indorkar RP, Linardakis J, Klika B, Mukherji SJ, Burnazi M, Threlfell S, Sammut S, West AR (2008) Feed-forward excitation of striatal neuron activity by frontal cortical activation of nitric oxide signaling in vivo. *Eur J Neurosci* 27:1739–1754. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06157.x
- Plenz D (2003) When inhibition goes *incognito*: feedback interaction between spiny projection neurons in striatal function. *Trends Neurosci* 26:436–443. doi:10.1016/S0166-2236(03)00196-6
- Pomata PE, Belluscio MA, Riquelme LA, Murer MG (2008) NMDA receptor gating of information flow through the striatum in vivo. *J Neurosci* 28:13384–13389. doi:10.1523/JNEUROSCI.4343-08.2008
- Ramanathan S, Hanley JJ, Deniau JM, Bolam JP (2002) Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto GABAergic interneurons in the rat striatum. *J Neurosci* 22:8158–8169
- Schiller J, Schiller Y (2001) NMDA receptor-mediated dendritic spikes and coincident signal amplification. *Curr Opin Neurobiol* 11:343–348. doi:10.1016/S0959-4388(00)00217-8
- Schlösser B, Bruggencate G, Sutor B (1999) Local disinhibition of neocortical neuronal circuits causes augmentation of glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the rat neostriatum in vitro. *Exp Neurol* 157:180–193. doi:10.1006/exnr.1999.7039
- Stratford K, Mason A, Larkman A, Major G, Jack JJB (1989) The modeling of pyramidal neurons in the visual cortex. In: Dubin R, Miall C, Mitchison G (eds) *The computing neuron*. Addison-Wesley, Workingham, pp 296–321
- Sullivan MA, Chen H, Morikawa H (2008) Recurrent inhibitory network among striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 28:8682–8690. doi:10.1523/JNEUROSCI.2411-08.2008
- Suri RE, Bargas J, Arbib MA (2001) Modeling functions of striatal dopamine modulation in learning and planning. *Neurosci* 103:65–85. doi:10.1016/S0306-4522(00)00554-6
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzman JN, Galarraga E, Bargas J (2005) Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol* 93:1119–1126. doi:10.1152/jn.00657.2004
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J, Galarraga E (2007) Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10258–10263. doi:10.1073/pnas.0703813104
- Tseng KY, O'Donnell P (2005) Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D_1 -NMDA co-activation. *Cereb Cortex* 15:49–57. doi:10.1093/cercor/bhh107
- Tseng KY, Kasanetz F, Kargieman L, Riquelme LA, Murer MG (2001) Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions. *J Neurosci* 21:6430–6439
- Tseng KY, Snyder-Keller A, O'Donnell P (2007) Dopaminergic modulation of striatal plateau depolarizations in corticostriatal organotypic cocultures. *Psychopharmacol* 191:627–640. doi:10.1007/s00213-006-0439-7
- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR (2002) Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol* 88:1263–1269
- Vautrelle N, Carrillo-Reid L, Bargas J (2009) Diversity of up-state voltage transitions during different network states. In: Tseng KY (ed) *Cortico-subcortical dynamics in Parkinson disease*, Chapter 5. Humana/Springer, New York, pp 73–85
- Vergara R, Rick C, Hernandez-Lopez S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E, Surmeier DJ, Bargas J (2003) Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol* 553:169–182. doi:10.1113/jphysiol.2003.050799
- Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16:2397–2410
- Wilson CJ, Groves PM, Kitai ST, Linder JC (1983) Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum. *J Neurosci* 3:383–388

- Wolf JA, Moyer JT, Lazarewicz MT, Contreras D, Benoit-Marand M, O'Donnell P, Finkel LH (2005) NMDA/AMPA ratio impacts state transitions and entrainment to oscillations in a computational model of the nucleus accumbens medium spiny projection neuron. *J Neurosci* 25:9080–9095. doi:[10.1523/JNEUROSCI.2220-05.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2220-05.2005)
- Wu SH, Ma CL, Kelly JB (2004) Contribution of AMPA, NMDA, and GABA_A receptors to temporal pattern of postsynaptic responses in the inferior colliculus of the rat. *J Neurosci* 24:4625–4634. doi:[10.1523/JNEUROSCI.0318-04.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0318-04.2004)
- Yuste R, MacLean JN, Smith J, Lansner A (2005) The cortex as a central pattern generator. *Nat Rev* 6:477–483. doi:[10.1038/nrn1686](https://doi.org/10.1038/nrn1686)
- Zhou Z, Xiong W, Masurkar AV, Chen WR, Shepherd GM (2006) Dendritic calcium plateau potentials modulate input–output properties of juxtglomerular cells in the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 96:2354–2363. doi:[10.1152/jn.00003.2006](https://doi.org/10.1152/jn.00003.2006)

Appendix

The formulation for the ionic currents in the NEURON-model of MSNs used here were mainly taken from either the NEURON-model data base (<http://senselab.med.yale.edu/modeldb/>), its modifications by Arthur Houweling (“My first neuron”; <http://www.cnl.salk.edu/~arthur/MyFirstNEURON.html>), Wolf et al. (2005), and measurements and formulation made by our group for sodium and potassium leak currents, as well as the inward rectifier current (Bargas et al. 2003). To simplify, a low threshold Ca^{2+} current, known to be essential to generate the tonic firing pattern of medium spiny neurons (MSNs) (Hernandez-Lopez et al. 1997), was generated by simply shifting to more negative potentials the $V_{1/2}$ of the high threshold Ca^{2+} current, and only one generic Ca^{2+} -current, representing all high voltage Ca^{2+} currents known to be present in MSNs, is present in this NEURON-model. This Ca^{2+} -current activates corresponding K^{+} -currents (see below). The formulations were fine tuned in order to represent average input resistance and a representative corticostriatal response from either young or older animals, and direct or indirect pathways neurons (see Fig. 1 and Day et al. 2008) as well as the characteristic tonic firing of MSNs. Further research is needed to see specific differences between indirect and direct pathway neurons. This model focused in the contribution of inhibition on suprathreshold corticostriatal response.

Leak Currents

Leak currents were modeled with Ohm’s law:

$$I_{ion} = g_{ion}(V_m - E_{ion}) \quad (\text{A.1})$$

where the subscript *ion* is either sodium (Na) or potassium (K) ions, g_{ion} is the maximum conductance of the channel population, V_m is the membrane potential and

E_{ion} is the corresponding reversal potential for each ion. Table 1 lists the parameters for the leak currents.

Table 1. Parameters of leak currents

Current	g_{ion} (S/cm²)	E_{ion} (mV)
Ileak_{Na}	1.3162E-5	50
Ileak_K	9.0338E-5	-97

Hodgkin-Huxley type of model for voltage gated currents

Four currents were modeled according to a Hodgkin-Huxley formulation. By the Ohm's law at instantaneous times:

$$I_{ion} = g_{max} m^p h^q (V_m - E_{ion}) \quad (A.2)$$

where the subscript ion , V_m and E_{ion} mean the same as in A.1, m and h represent the activation and inactivation gates, p and q are the number of particles involved in activation and inactivation. m and h are described by the same differential equation:

$$x' = \frac{x_{\infty} - x}{1 - e^{-t/\tau_x}} \quad (A.3)$$

where x' represents differentiation of m or h with respect to time, and x_{∞} and τ_x are given by:

$$x_{\infty} = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} ; \quad \tau_x = \frac{1}{\alpha + \beta} \quad (A.4)$$

the voltage dependency of α and β is obtained by fitting exponential functions to experimental values. Different authors propose different expressions for α and β and for different currents.

The four currents modeled in this fashion were:

- A transient sodium current, N_{av1} (Hodgkin and Huxley, 1952), modified for neurons by McCormick and Huguenard 1992 and modified by Houweling (see above). Thus, α and β for the activation gate m are given by:

$$\alpha = \frac{A(V_m + V_\alpha)}{1 - e^{-(V_m + V_\alpha)/k_\alpha}} ; \quad \beta = \frac{-B(V_m + V_\beta)}{1 - e^{-(V_m + V_\beta)/k_\beta}} \quad (\text{A.5})$$

- for the inactivation gate h :

$$\alpha = A e^{-(V_m + V_\alpha)/k_\alpha} ; \quad \beta = \frac{B}{1 + e^{-(V_m - V_\beta)/k_\beta}} \quad (\text{A.6})$$

- A persistent sodium current, N_{av1} (Traub and Miles 1991; Prescott and De Koninck 2005) and present in the Houweling model (see above). Here α and β for the activation gate m are:

$$\alpha = \frac{A(V_\alpha - V_m)}{e^{(V_\alpha - V_m)/k_\alpha} - 1} ; \quad \beta = \frac{B(V_\beta - V_m)}{e^{(V_\beta - V_m)/k_\beta} - 1} \quad (\text{A.7})$$

- A K_v1 delayed rectifier as modeled by Hodgkin and Huxley (Hodgkin and Huxley 1952), modified for neurons (McCormick and Huguenard 1992), and present in the Houweling model. α and β for the activation

$$\text{gate } n \text{ are: } \alpha = \frac{A(V_m + V_\alpha)}{1 - e^{-(V_m + V_\alpha)/k_\alpha}} ; \quad \beta = B e^{-(V_m + V_\beta)/k_\beta}$$

(A.8)

- An inactivating potassium current, K_v4 ($\sim I_D$) (Miyasho et al. 2001), from the NEURON-DB. α and β for the activation, n , and inactivation, h , gates are:

$$\alpha = \frac{A}{1 + e^{(V_m + V_\alpha)/k_\alpha}} ; \quad \beta = \frac{B}{1 + e^{(V_m + V_\beta)/k_\beta}} \quad (\text{A.9})$$

Table 2 lists the parameters for these voltage-gated currents.

Table 2. Parameters for Hodgkin-Huxley like currents

Current	g_{ion} (S/cm ²)	p,q	gate	A	B	V_α (mV)	K_α	V_β (mV)	K_β	E_{ion} (mV)
Na_v1 Action Potential (Transient)	0.036	3,1	m	0.091	0.062	38	5	38	5	50
			h	0.016	2.07	55	15	17	21	50
K_v1 Action Potential Delayed rectifier	0.009	4,0	n	0.01	0.017	45	5	50	40	-97
Na_v1 (Persistent)	0.0008	1,1	m	0.32	0.28	66	4	-97	5	50
			h	0.128	4	67	18	90	2.5	50
K_v4 I_D Slowly inactivating delayed rectifier	0.0015		m	8.5	35	17	12.5	99	14.5	-97
			h	0.0015	0.0055	89	8	83	-8	-97

Voltage-gated currents formulated as logistic functions

This formulation uses A.2 with x_∞ in equation A.3 expressed as a logistic (Boltzmann type) function:

$$x_\infty = 1 / (1 + e^{-(V_m \pm V_{1/2})/k}) \quad (\text{A.10})$$

where V_m is the membrane potential, $V_{1/2}$ is the half activation (or inactivation) potential and k is the slope factor, \pm sign is positive for activation gates and negative for inactivation gates. τ_x is given by different expressions due to data fitting from experimental data.

Three ionic currents were modeled in this way:

- An inward rectifier potassium current, K_{ir2} , modeled from our own data (Bargas et al. unpublished). τ_m is given by the expression:

$$\tau_m = A(1 - e^{-V_m/\tau_u})(e^{-V_m/\tau_d} - B) \quad (\text{A.11})$$

- A transient potassium current K_{v4} ($\sim I_A$) (McCormick and Huguenard 1992) as modified by Houweling, where τ_m is given by the expression:

$$\tau_m = \frac{1}{(e^{(V_m+V_u)/k_u} + e^{(V_m+V_d)/k_d}) + A} \quad (\text{A.12})$$

and τ_h is given by the expression:

$$\tau_h = \frac{1}{(e^{(V_m+V_u)/k_u} + e^{(V_m+V_d)/k_d})} \quad (\text{A.13})$$

for $V_m < 63$ else **A**

- A slowly activating potassium current, K_{v7} (I_M) (Yamada et al. 1989) in which τ_m is given by the expression:

$$\tau_m = \frac{A}{B(e^{(V_m+V_u)/k_u} + e^{(V_m+V_u)/k_u})} \quad (\text{A.14})$$

Table 3 shows the parameters for these voltage gated currents.

Table 3. Parameters for ionic currents model with logistic equations

Current	g_{ion} (S/cm ²)	p,q	gate	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	A 1/(ms)	B	τ_u (mV)	τ_d (mV)	-	E_{ion} (mV)
K_{ir2} Inward rectifier	6.72E-5	1,0	m	-73	-9.2	0.037	12	19.84	43.15	-	-97
						A (ms)	V_u (mV)	k_u (mV)	V_d (mV)	k_d (mV)	E_{ion} (mV)
K_{v4} I_A Transient	0.0009	4,1	m	60	4.5	0.37	35.82	19.69	79.69	12.7	-97
			h	78	6	19	46.05	5	238.4	37.45	-97
						A 1/(ms)	B	V_u (mV)	k_u (mV)	-	E_{ion} (mV)
K_{v7} I_M Slowly Activating	0.00018	1,0	m	35	10	1000	3.3	35	20	-	-95

Voltage-gated calcium currents modeled after the constant field equation

The difference in calcium concentration between the exterior and the interior of the neuron is so large that changes in the internal concentration produced by channel openings change the driving force in a non-linear way. Therefore, calcium currents were modeled using the constant field equation for current:

$$I_{ion} = P_{ion} m^p h^q \frac{z^2 F^2}{RT} V_m \left(\frac{[ion]_{in} - [ion]_{out} e^{\frac{-zFV_m}{RT}}}{1 - e^{\frac{-zFV_m}{RT}}} \right) \quad (A.15)$$

where P_{ion} is the membrane permeability to ions, z is the valence of the ion, F is Faraday constant, R is the gas constant, T is the temperature in °K, $[ion]_{in}$ and $[ion]_{out}$ are the internal and external ionic concentrations, respectively. and m , h , p and q are the gates and particles described in equation A.2.

Only two calcium currents were included: a high voltage activating current (~

Ca_v1.2) which served as a general current for calcium entry during the action potential (McCormick and Huguenard 1992), and a current similar to Ca_v1.3 known to be important for the characteristic firing pattern (Hernandez-Lopez et al. 1997; 2000). It was obtained by just shifting $V_{1/2}$ to more negative voltages (Olson et al. 2005; Xu and Lipscombe 2001). m_{∞} is described by equation A.10 while τ_m was described by:

$$\tau_m = \frac{1}{\frac{A}{1 + e^{(V_m + V_A)/k_A}} - \frac{B(V_m - V_B)}{1 - e^{(V_m + V_B)/k_B}}} \quad (\text{A.16})$$

Table 4 shows the parameters for the calcium currents.

Table 4. Parameters for calcium currents

Current	P _{ion} (S/cm ²)	p,q	gate	V _{1/2}	k	A	B	V _A (mV)	k _A (mV)	V _B (mV)	k _B (mV)
Ca_v1.2 (I_Lα1C) High Threshold Activation Persistent	0.036	2,0	m	10	-10	1.6	0.02	5	1/0.072	1.31	5.36
Ca_v1.3 (I_Lα1D) Low Threshold Activation Persistent	0.0008	2,0	m	52.6	-10	0.32	0.28	66	4	-97	5

Calcium-activated potassium currents

The calcium activated potassium channels are also essential to simulate the firing pattern of MSNs (Bargas et al. 1999) and are modeled with equation A.2. However, for the large conductance current, K_{Ca}1 (or I_{BK}), m_{∞} and τ_m have expressions dependent on the internal calcium concentration $[Ca]_{in}$ (McCormick et al. 1993). Thus, m_{∞} and τ_m are expressed by equations A.4 with α and β expressed by:

$$\alpha = A + [Ca]_{in}^2 ; \quad \beta = B \quad (A.17)$$

For the small conductance current, K_{Ca2} (or I_{SK}) (Destexhe et al.1994), m_{∞} and τ_m are expressed directly by:

$$m_{\infty} = \frac{[Ca]_{in}^2}{A^2 + [Ca]_{in}^2} ; \quad \tau_m = \frac{A^2}{B[Ca]_{in}^2} \quad (A.18)$$

Table 5 shows the parameters for the calcium activated potassium currents.

Table 5. Parameters for calcium activated potassium currents

Current	g_{ion} (S/cm ²)	p,q	gate	A	B	E_{ion} (mV)
K_{Ca1} (I_{BK}) Big conductance	1.05E-6	1,0	m	1200	0.001	131
K_{Ca2} (I_{SK}) Small conductance	1E-5	2,0	m	0.03	0.025	131

Calcium dynamics

To work in cycles, ionic concentrations must return to their initial values once and again. For sodium and potassium ions the change in concentrations is considered negligible for all practical purposes in the present model. In contrast, changes in internal calcium concentrations due to calcium currents are considerable and they are needed for the activation of the calcium activated potassium currents responsible for interspike intervals and quasi tonic firing (Bargas et al. 2003; Vilchis et al. 2000; Wolf et al. 2005). Thus, to return internal calcium concentrations to their initial values, calcium must be buffered and expelled from the neuron interior cytoplasm (Destexhe et al. 1994). This role was accomplished by:

1. Calcium entry through the calcium channels, whose change in concentration can be calculated by dividing the net calcium current by Faraday's constant:

$$\frac{\partial [Ca]_{cur}}{\partial t} = \frac{I_{Ca}}{F} \quad (A.19)$$

2.- Calcium is expelled by a pump with a capacity B dependent on calcium binding and unbinding rates given by a dissociation constant k_D , and on calcium transportation from the interior to the exterior of the neuron given by a rate constant k_r . Such capacity B can be obtained with a simplified Michaelis-Menten approximation:

$$B = \frac{k_r [Ca]_{in}}{[Ca]_{in} + k_D} \quad (A.20)$$

3.- Then, first order kinetics calcium buffering is given by:

$$\frac{\partial [Ca]_{buf}}{\partial t} = \frac{[Ca]_{\infty} - [Ca]_{buf}}{\tau_{buf}} \quad (A.21)$$

where $[Ca]_{buf}$ is the buffered calcium, $[Ca]_{\infty}$ is the steady-state concentration of calcium, which for all practical purposes is equal to the initial internal concentration of calcium $[Ca]_0$, and τ_{buf} is the buffering process time constant. Combining equations A.19, A.20, and A.21 the change in internal calcium concentration as a function of time is given by:

$$\frac{\partial [Ca]_{in}}{\partial t} = \frac{I_{Ca}}{F} - \frac{k_r [Ca]_{in}}{[Ca]_{in} + k_D} + \frac{[Ca]_0 - [Ca]_{in}}{\tau_{buf}} \quad (A.22)$$

The calcium dynamics parameters are $k_D = 0.0001$ (mM), $k_r = 0.0001$ (mM/ms), $\tau_{buf} = 1 \times 10^4$ (ms), and the initial internal calcium concentration is set to 50 nM.

Synaptic currents

Glutamatergic synaptic currents were simulated by attaching AMPA and NMDA synapses on modeled spines (see Methods) connected to secondary and tertiary dendritic compartments (branches). GABAergic synaptic currents were simulated by

attaching GABAergic synapses on the soma and dendritic tree. All three synaptic currents were simulated by an α -function, exception made for the NMDA, in which the α -function was multiplied by a function of voltage and external magnesium concentration to simulate the NMDA voltage and magnesium dependence:

$$I_{syn} = w g_{syn} f(v) e^{\frac{t_0-t}{a}} \frac{1-e^{-\frac{t_0-t}{b}}}{c} \quad (\text{A.23})$$

$$f(V_m) = \left(1 - \frac{Mg_o}{1 + Ae^{\frac{zFV_m}{RT}}} \right) \quad (\text{for NMDA synapses}) \quad (\text{A.24})$$

$f(V_m) = 1$ for AMPA and GABA synapses. Table 6 shows synaptic parameters.

Table 6. Synaptic parameters.

Current	w	g_{max} (μS)	t_0 (ms)	a	b	c	E_{syn} (mV)
I_{AMPA}	1	0.0023	10	18	2.2	0.68	0
I_{NMDA}	1	0.0023	10	200	40	0.6	0
$I_{GABA_{soma}}$	0.1-2	0.1-2	10-15	25	1	0.8	-65
$I_{GABA_{dend}}$	0.01-0.8	$5e^{-4}$ -0.3	10-500	25	1	0.8	-65

Cortical stimulation and simulation

To simulate the corticostriatal response in Figure 5E, that is, simulated response in Figure 5F, the following synaptic contacts were needed: cortical stimulation consisted in 46 glutamatergic synapses on spines connected to secondary and tertiary dendrites, with the same onset and synaptic conductance, 89 GABAergic synapses on the soma, with the same onset and amplitude, simulate perisomatic inhibition, and 142 GABAergic synapses distributed all over secondary and tertiary dendrites with different onsets and delays according to experimental results (see Results Fig. 5).

Simulation is achieved by simultaneously solving the system of equations (above) where the principal equation ($V(t)$) is:

$$C \frac{\partial V}{\partial t} = \sum_{l=1}^k I_l + \sum_{v=1}^m I_v + \sum_{s=1}^n I_s + I_p \quad (\text{A.25})$$

evaluating the membrane potential in every compartment as a function of time, and consequently of space.

References

- Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, Pineda JC, Galarraga E (1999) Ca²⁺-activated outward currents in neostriatal neurons. *Neurosci* 88: 479-488
- Bargas J, Cervantes L, Galarraga E, Fraguela A (2003) Ion Channels: Keys to Neuronal Specialization. "The Handbook Of Brain Theory And Neural Networks. 2nd ed." Ed.: M.A. Arbib. MIT Press. Massachusetts, pp. 585 - 590
- Day M, Wokosin D, Plotkin JL, Tian X, Surmeier DJ (2008) Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J Neurosci* 28:11603-11614
- Destexhe A, Contreras D, Sejnowski TJ, Steriade M (1994) A model of spindle rhythmicity in the isolated thalamic reticular nucleus. *J Neurophysiol* 72: 803-818
- Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D₁ receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺-conductance. *J Neurosci* 17:3334-3342
- Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability through a novel PLC β_1 /IP₃/calcineurin signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987-8995
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* 116: 497-506
- McCormick DA, Huguenard JR (1992) A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J Neurophysiol* 68: 1384-1400

- McCormick DA, Wang Z, Huguenard JR (1993) Neurotransmitter control of neocortical neuronal activity and excitability. *Cerebral Cortex* 3: 387-398
- Miyasho T, Takagi H, Suzuki H, Watanabe S, Inoue M, Kudo Y, Miyakawa H (2001) Low-threshold potassium channels and a low-threshold calcium channel regulate Ca^{2+} spike firing in the dendrites of cerebellar Purkinje neurons: a modeling study. from "An Active Membrane Model of the Cerebellar Purkinje Cell 1.simulation of Current Clamp in Slice". *Brain Res* 891:106-15
- Olson PA, Tkatch T, Hernandez-Lopez S, Ulrich S, Ilijic E, Mugnaini E, Zhang H, Bezprozvanny I, Surmeier DJ (2005) G-protein-coupled receptor modulation of striatal $\text{Ca}_v1.3$ L-type Ca^{2+} channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci* 25: 1050-1062
- Prescott SA, De Koninck Y (2005) Integration time in a subset of spinal lamina I neurons is lengthened by sodium and calcium currents acting synergistically to prolong subthreshold depolarization. *J Neurosci* 25: 4743-4754
- Traub RD, Miles R (1991) *Neuronal Networks of the Hippocampus*, Cambridge University Press
- Xu W, Lipscombe D (2001) Neuronal $\text{Ca}_v1.3$ L-Type Channels Activate at Relatively Hyperpolarized Membrane Potentials and Are Incompletely Inhibited by Dihydropyridines. *J Neurosci* 21(16):5944–5951
- Yamada WM, Koch C, Adams PR (1989) Chap. 4.- Multiple Channels and Calcium Dynamics in *Methods in Neuronal Modeling 2nd Edition: From Ions to Networks*, MIT Press
- Vilchis C, Vargas J, Ayala GX, Galvan E, Galarraga E (2000) Ca^{2+} channels that activate Ca^{2+} -dependent K^+ currents in neostriatal neurons. *Neurosci* 95:745-752
- Wolf JA, Moyer JT, Lazarewicz MT, Contreras D, Benoit-Marand M, O'Donnell P, Finkel LH (2005) NMDA/AMPA ratio impacts state transitions and entrainment to oscillations in a computational model of the nucleus accumbens medium spiny projection neuron. *J Neurosci* 25:9080–9095