

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**“MODULACIÓN PRESINÁPTICA  
DOPAMINÉRGICA DE LA SUSTANCIA  
NIGRA RETICULATA  
Y SU PAPEL EN LA GENERACIÓN DE  
OSCILACIONES: CAMBIOS  
FISIOPATOLÓGICOS EN LA ENFERMEDAD  
DE PARKINSON”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**JOSÉ DE JESÚS ACEVES BUENDÍA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ**

**MÉXICO, D.F. 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## DEDICATORIA

A mis padres

José Aceves Ochoa y María de Jesús Buendía García

A cada uno de mis hermanos

Xicoténcatl Aceves Buendía y Rosy Yunuen Aceves Buendía

A mi amiga y compañera

Tania Reyes Cruz

A mis abuelos

Jesús Aceves y Rosa Ochoa

Alberto Buendía y Emilia García

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Bargas Díaz le agradezco su apoyo incondicional, su guía a través de todo el camino del doctorado y en cada detalle de lo que significa la enseñanza. También le agradezco por su paciencia, esmero y amistad. Gracias.

Al Dr. Fernando Peña Ortega y al Dr. Stefan Mihailescu Lucian quienes formaron parte de mi comité tutorial, agradezco sus comentarios y sugerencias durante la realización del presente trabajo.

A los sinodales: Dr. Ranulfo Romo Trujillo, Dr. Arturo Hernández Cruz, Dr. Oscar Próspero García y Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar por sus críticas y comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

A la Dra. Elvira Galarraga por toda su asesoría en el área anatómica y de inmunohistoquímica.

A mis compañeros de los laboratorios BL-103 y BL-101:

Pavel Rueda Orozco por su gran apoyo, solidaridad y comprensión en momentos difíciles.

Violeta Giselle López Huerta, Ricardo Hernández Martínez, Jesús E. Pérez, Víctor E. Plata, Omar Hernández, Mario Arias, Belén Pérez, Janet Barroso, Bianca Viscarra, Brisa García, Mariana Duhne, Teresa Hernández y Esther Lara. Gracias por su gran amistad, ayuda y por esos sanos momentos de discusión académica y de diversión.

Al físico Antonio Laville y al biólogo Dagoberto Tápia por su gran paciencia y asesoramiento en todo detalle experimental.

A Sara Noguera, Zenaida Martínez, Angélica Téllez por todo su esfuerzo administrativo.

A Francisco Pérez Eugenio, Gabriel Orozco Hoyuela y Miriam Morales cuya ayuda fue indispensable para el presente trabajo.

A mi amiga y compañera Tania Reyes cuya ayuda diaria en todos los aspectos de la vida es indispensable.

A mis padres José Aceves Ochoa y María de Jesús Buendía García cuyo esfuerzo diario me ha permitido fijar y alcanzar metas.

# ÍNDICE GENERAL

Pág.

<b>Capítulo I</b>	<b>1</b>
1.1. Introducción	1
1.1.1. Ganglios Basales	1
1.1.2. Neostriado	1
1.1.3. Globo Pálido Externo	5
1.1.4. Vía Páldonigral	6
1.1.5. Núcleo Subtalámico	7
1.1.6. Vía subtálamonigral	7
1.1.7. Vía Estriatonigral	8
1.1.8. Sustancia Nigra pars Reticulata	9
1.2. Plasticidad sináptica	12
1.3. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson	13
1.3.1. Mecanismos intrínsecos	13
1.3.2. Mecanismos extrínsecos	14
1.4. La dopamina y sus receptores	16
<b>Capítulo II</b>	<b>18</b>
2.1. Hipótesis	18
2.2. Objetivos	19
<b>Capítulo III</b>	<b>20</b>
3.1. Métodos	20
3.1.1. Tejido Cerebral mantenido in vitro	20
3.1.2. Estimulación	24
3.1.3. Electrodo de registro	26
3.1.4. Registro electrofisiológico	27
3.1.5. Análisis y presentación de datos	27
<b>Capítulo IV</b>	<b>30</b>
4.1. Resultados	30
4.1.1. Dos tipos de inhibición sobre las neuronas de la SNr	30
4.1.1.1. Vías Estriatonigral y Páldonigral	30

4.1.1.2. Las neuronas de la SNr	30
4.1.1.3. Separación funcional de las corrientes inhibitorias postsinápticas (IPSCs) estriatonigrales y palidonigrales	31
4.1.1.4. Bloqueo de los receptores de dopamina	41
4.1.1.5. Consecuencias funcionales de la separación funcional de las aferencias nigrales y sus diferentes receptores presinápticos	43
4.1.2. Plasticidad sináptica estriatonigral	44
4.1.2.1. La facilitación o depresión sinápticas de la vía estriatonigral depende de la activación de los receptores a NMDA	44
4.1.2.2. El papel de los receptores de dopamina D <sub>1</sub> sobre la facilitación sináptica estriatonigral	48
4.1.2.3. Papel de los receptores a cannabinoides CB <sub>1</sub> en la depresión sináptica estriatonigral	51
4.1.2.4. Para provocar LTD en la sinapsis estriatonigral es necesario un incremento en el calcio intracelular de la posinápsis	54
4.1.2.5. La señalización del receptor CB <sub>1</sub> prevalece sobre la señalización del receptor D <sub>1</sub>	56
<b>Capítulo V</b>	<b>59</b>
5.1 Discusión	59
5.1.1. Las IPSCs estriatonigrales son diferentes de las pálido-nigrales	59
5.1.2. Los receptores de dopamina estriatonigrales y pálido-nigrales sensan las concentraciones de dopamina endógena del medio extracelular	60
5.1.3. Consecuencias funcionales	62
5.1.4. Plasticidad sináptica en la vía directa	64
5.1.5. Las neuronas de la SNr son detectores de coincidencias	66
5.1.6. Balance “digital” de las vías directa e indirecta en los núcleos de salida	69
<b>Capítulo VI</b>	<b>71</b>
Conclusiones generales	71
Referencias	72
Apéndice	98

# Glosario

AADC	DOPA descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
A/D	Analógico/ digital
AMPA / kainato	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato / kainato
AMPc	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
CF	Corteza frontal
CPGs	Central pattern generator en ingles (Generador central de patrones)
CS	Colículo superior
DOPA	dihidroxifenilalanina
EPSCs	Excitatory post-synaptic currents en ingles (Corrientes postsinápticas excitadoras )
FR	Formación reticular
GABA	Ácido- $\gamma$ -aminobutírico
GB	Ganglios basales
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno (en los primates equivalente al núcleo entopeduncular en las ratas)
HFS	High frequency stimulation en ingles (estimulación de alta frecuencia)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
HP	Pospotencial hiperpolarizante
IPSC	Inhibitory post-synaptic currents en ingles



KHz	Kilo hertz
KPBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos de potasio
LTD	Long term depression (depresión de largo plazo)
LTSP	Long term synaptic plasticity (plasticidad sináptica de largo plazo)
MΩ	Mega ohmios
ME	Medula espinal
mM	Milimoles / litro
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ms	milisegundo
mV	milivoltio
min	minutos
NEp	Núcleo entopeduncular
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPP	Núcleo pedúnculo pontino
NStr	neostriado
NST	Núcleo subtalámico
OD/ID	Diámetro externo/diámetro interno
PA	Potencial de acción
pA	Pico Amperes
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PV	paralbúmina
RPP	Razón de pulsos pareados

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-trascricpción inversa
SNC	Sustancia negra compacta
SNr	Sustancia negra pars reticulata
TBS	Solución salina Tris-amortiguada
TC	Tallo cerebral
TH	Tirosina hidroxilasa
vs.	versus
ZCPN	Zona de conductancia con pendiente negativa
$\mu\text{m}$	micrometro
$\mu\text{M}$	Micromoles/litro

# Resumen

## Modulación Presináptica

En estudios previos se ha mostrado que la función asociada con la activación de los receptores presinápticos de dopamina en las aferentes de la sustancia nigra reticulata (SNr) son: 1) incrementar las corrientes postsinápticas inhibitoras (IPSCs) generadas por las terminales estriatonigrales (vía directa) sobre las neuronas postsinápticas de la SNr. Estos receptores son del tipo D1. 2) Modular las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs) generadas por las aferentes subtálamonigrales (paso final de la vía indirecta) en las mismas neuronas de la SNr. En este caso, la activación de los receptores clase D1 incrementa y la activación de los receptores clase D2 decreta las EPSCs. Sin embargo, el bloqueo de ambos receptores simultáneamente, aumenta la amplitud de estos EPSCs.

Siguiendo estos estudios previos, aquí mostramos, por primera vez, mediante el uso de registros electrofisiológicos en tejido cerebral de rata, que las aferentes pálido-nigrales poseen receptores presinápticos a dopamina de la clase D2 (tipos D3/D4). Su acción es decreta las IPSCs generadas por las aferentes pálido-nigrales sobre las mismas neuronas de la SNr.

También hallamos que la administración tónica de un antagonista selectivo para los receptores tipo D1, decreta las IPSCs estriatonigrales, sugiriendo que se necesitan niveles tónicos de dopamina extracelular para mantener la función de la vía estriatonigral (vía directa). Así mismo, cuando se bloquean de manera tónica los receptores de la clase D2 (D3 y D4), las IPSCs pálido-nigrales incrementan su amplitud, mientras que las estriatonigrales no sufren ningún cambio, sugiriendo que la dopamina tónica reprime la inhibición de la vía pálido-nigral.

Para simular la ausencia de dopamina tónica, bloqueamos a los receptores de ambas clases, D1 y D2. Sucedió que se decreta la actividad de la vía directa (estriatonigral) mientras se incrementó la actividad de la vía indirecta (pálido-nigral y subtálamonigral). El resultado fue que la mayoría de las neuronas de proyección de la SNr entraron a un modo de disparo caracterizado por oscilaciones recurrente con disparo en ráfagas, similar o igual al observado durante el Parkinsonismo, tanto en pacientes como en animales. Estos resultados plantean la pregunta de que tan importantes son los niveles de dopamina endógena en los núcleos de salida de los ganglios basales para la expresión de los signos patológicos.

## Plasticidad Sináptica

Actualmente no existe una hipótesis para explicar cómo interactúan la vía directa y la vía indirecta para alcanzar un balance durante el aprendizaje de procedimientos motores. Ambas vías convergen en la SNr llevando la información procesada por el estriado. Tampoco se conocen los mecanismos que regulan la plasticidad sináptica estriatonigral.

Aquí usando registros electrofisiológicos se describe la facilitación dependiente de la activación del receptor de dopamina D1 en las sinapsis estriatonigrales (vía directa). Y su interacción con las aferentes glutamatérgicas provenientes principalmente del núcleo subtalámico (vía indirecta) en la SNr. Esta interacción muestra una depresión sináptica de largo plazo (LTD) en las sinapsis estriatonigral dependiente de la producción de cannabinoides por parte de la SNr cuando los receptores de NMDA están activos y una facilitación sináptica dependiente de la activación del receptor de dopamina tipo D1 cuando los receptores de NMDA están inactivos.

Esta interacción hace a las neuronas de la SNr un detector de coincidencias y una compuerta de cambio. Cuando están inactivos los receptores NMDA en la SNr se permite la facilitación dependiente de dopamina en la vía estriatonigral, teóricamente facilitando el movimiento. Cuando están activos los receptores NMDA se genera una LTD de la misma sinapsis, por lo tanto se decremента el movimiento.

En la presente tesis se propone que las neuronas de la SNr trabajan como compuertas lógicas, ajustando el sistema motor y estableciendo un balance entre las dos vías de los ganglios basales. Permitiendo al sistema escoger las sinergias apropiadas para el aprendizaje motor y el soporte postural.

# Capítulo I

## 1.1. INTRODUCCIÓN

### 1.1.1. GANGLIOS BASALES

Los Ganglios Basales se encargan de implementar la memoria de procedimientos y las rutinas motoras, tal como la secuencia de movimientos necesaria para manejar un coche o tocar el piano, (Cools, 1984; Takakusaki et al., 2004; Grillner et al., 2005; Yin y Knowlton, 2006; Graybiel 2008). En su arquitectura, guiado por la corteza, se genera el mecanismo para la selección de acciones. Arquitectura conservada en todos los vertebrados (Redgrave et al., 2011; Stephenson-Jones et al., 2011).

En los roedores, los ganglios basales incluyen al neostriado, al núcleo subtalámico, al globo pálido externo, al núcleo entopeduncular ó globo pálido interno, a la sustancia nigra reticulata, y a la sustancia nigra compacta. El neostriado y el núcleo subtalámico reciben proyecciones excitadoras glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral y forman los dos núcleos de entrada a los ganglios basales (Albin et al., 1989; Smith et al., 1998). La salida principal de los ganglios basales es a través de los núcleos globo pálido interno y sustancia nigra reticulata (Figura 1), que en conjunto se denominan los núcleos de salida. Ésta salida es inhibitoria y proyecta al tálamo y al tallo cerebral. Las proyecciones hacia el tallo cerebral inhiben al colículo Superior, el núcleo pedúnculo pontino, y la región locomotora mesencefálica (Albin et al., 1989; Boraud et al., 2002; Mink, 1996; Smith et al., 1998; Takakusaki et al., 2003, 2004).

### 1.1.2. NEOESTRIADO

El neostriado contiene neuronas de proyección GABAérgicas, llamadas espinosas medianas. Las neuronas espinosas medianas se segregan en dos poblaciones; la primera proyecta de forma directa a los núcleos de salida, por lo que es llamada “**vía directa**” o estriatonigral. La segunda población da origen a una vía

polisináptica; es decir, hace relevo en dos núcleos intermedios (globo pálido externo y núcleo subtalámico) antes de llegar a los núcleos de salida (globo pálido interno y sustancia nigra), por lo que es llamada “**vía indirecta**”. El primer relevo es el globo pálido externo por lo que también se llama “vía estriatopalidal” (Albin et al., 1989; Smith et al., 1998; Kravitz et al., 2010). Las neuronas del globo pálido externo proyectan al núcleo subtalámico. El núcleo subtalámico proyecta a los núcleos de salida, ésta última sinapsis de la “vía indirecta” es excitadora (también llamada vía subtálamonigral).

Las neuronas espinosas medianas de la “**vía directa**” expresan el receptor de dopamina D<sub>1</sub> además de sintetizar dinorfina y sustancia P (Gerfen et al., 1995; Kita y Kitai, 1988; Le Moine et al., 1990; Yoshida y Precht, 1971). Cuando la corteza excita a las neuronas espinosas medianas de la “vía directa”, se inhibe el disparo de los núcleos de salida, que son inhibidores tónicos del tálamo lo que da origen a una doble inhibición en serie. Por lo tanto la inhibición sobre los núcleos de salida *desinhibe* a los circuitos tálamo-corticales de los movimientos (Alexander et al, 1986; Albin et al, 1989) (Figura 1) y permite acontecer la acción motora.

Las neuronas espinosas medianas de la “**vía indirecta**” expresan al receptor de dopamina D<sub>2</sub> y sintetizan encefalinas (Albin et al., 1989; Kita y Kitai, 1988; Bouthenet et al., 1991; Gerfen et al., 1990; Gerfen et al., 1995; Waszczak et al., 1998). Estas neuronas inhiben a las neuronas del globo pálido externo, que a su vez inhiben tónicamente al núcleo subtalámico y a los núcleos de salida. Por lo tanto, cuando el globo pálido externo es inhibido por la vía estriatopalidal, el núcleo subtalámico y los núcleos de salida son desinhibidos. Con esto, la actividad tónica del núcleo subtalámico a los núcleos de salida es liberada (Figura 1).

Si los núcleos de salida reciben dos inhibiciones, una del estriado y otra del globo pálido externo entonces una pregunta que surge es: ¿Cuál es la diferencia funcional entre estas dos inhibiciones?; Éste es el problema abordado en la presente Tesis.



El modelo original de los ganglios basales se ha modificado gradualmente, recibiendo por una parte respaldo experimental, y por otra numerosas enmiendas:

1. El núcleo subtalamico proyecta de vuelta al globo pálido externo formando un circuito recíprocamente conectado entre neuronas inhibitoras (globo pálido externo) y excitadoras (núcleo subtalámico) (Bevan et al., 2002; Plenz y Kitai, 1999) lo que da origen a un “generador central de pautas temporales de disparo” (Central Pattern Generator). En condiciones fisiológicas este arreglo permite la generación el disparo rítmico en algunas neuronas, pero en condiciones patológicas generaría oscilaciones aberrantes involucrando a una gran cantidad de neuronas. Esto llevaría a la rigidez y a la acinesia, según el modelo que explica el funcionamiento de los ganglios basales y la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson denominado: “el modelo oscilatorio” (Oscillatory Model) (Bergman et al., 1994; Bevan et al., 2002; Hutchinson et al., 2004; Plenz y Kitai, 1999; Ruskin et al., 1999, 2003; Walters et al., 2007).
2. El núcleo subtalámico recibe entradas excitadoras directas de la corteza dando lugar a la “**vía hiperdirecta**”. El balance excitador/inhibidor sobre los núcleos de salida está dado por la competencia entre las actividades del núcleo subtalámico, el neostriado y globo pálido externo. Tanto el núcleo subtalámico como el globo pálido externo tienen pocas células y disparan tónicamente inervando a muchas neuronas de los nucleos de salida; los comandos corticales sobre el núcleo subtalámico cambian su tasa de disparo. En contraste, el neostriado posee muchas neuronas pero es casi silente, sólo aumenta su disparo de manera significativa cuando hay un comando cortical (Galarraga et al., 1989; Stern et al., 1997; Vergara et al., 2003; Wilson 1983).
3. El globo pálido externo manda una fuerte proyección inhibitora a los núcleos de salida, dando origen a una segunda vía indirecta inhibitora, la cual se estudia en la presente tesis.



4. Aunque la mayor parte de la dopamina cerebral se halla en el neostriado (Prensa y Parent, 2001), ya no se piensa que éste sea el único blanco de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta. De hecho, el blanco más cercano a la sustancia nigra compacta es la sustancia nigra reticulata, la cual también posee neuronas dopaminérgicas entremezcladas con las neuronas GABAérgicas. (Zhou et al., 2009). La dopamina liberada en la sustancia nigra reticulata modula las terminales GABAérgicas de la “vía estriatonigral” (Radnikow y Misgeld, 1998) y “pálidonigral”, así como las terminales glutamatérgicas de la “vía subtálamo-nigral” (Ibañez-Sandoval et al., 2007). También hay una proyección dopaminérgica hacia el globo pálido interno (Parent et al., 1989; Prensa et al., 2001, 2009; Matsuda 2009).
  
5. Respecto de los núcleos de salida existe una somatotopía: la sustancia nigra reticulata regula a los músculos de cuello, de la cabeza y del rostro, mientras que el globo pálido interno regula a los músculos del cuerpo y de las extremidades. De cualquier manera, se supone que lo que acontece en la sustancia nigra reticulata, también sucede en el globo pálido interno; son equivalentes (Nambu 2007; Stephenson-Jones 2011). Por lo tanto utilizaremos a la sustancia nigra reticulata como epítome de los núcleos de salida, pues es el núcleo del cual se obtuvieron los registros de esta Tesis.

### **1.1.3. GLOBO PÁLIDO EXTERNO**

El globo pálido externo está constituido por neuronas GABAérgicas de proyección que en fijación de corriente presentan disparo tónico, regular o irregular, y algunas veces, disparo en ráfagas (Smith et al., 1994). El globo pálido externo recibe una aferencia inhibitoria por parte del neostriado (vía estriatopalidal) modulada por receptores presinápticos a la dopamina de tipo  $D_2$  (Cooper y Stanford, 2001), y recibe también aferencias excitadoras que provienen del núcleo subtalámico, moduladas por el receptor de dopamina de la clase  $D_2$  (Hernández et al., 2006; Baufreton y Bevan 2009).

El globo pálido externo proyecta al núcleo subtálamico y a la sustancia nigra reticulata siendo modulado, presinápticamente, en el núcleo subtalámico por receptores de la clase D<sub>2</sub>. La modulación presináptica en la sustancia nigra reticulata no había sido descrita antes de la presente Tesis. Por lo tanto, un objetivo fue conocer cuál es la modulación presináptica por dopamina de la “vía pálido-nigral”.

Las neuronas del globo pálido externo tienen conductancias iónicas intrínsecas que les permiten tener una actividad espontánea, en muchas ocasiones, de tipo marcapaso. Ésta actividad proporciona una entrada inhibitoria tónica que determina, en gran medida, el disparo de las neuronas de los núcleos blanco: sustancia nigra reticulata y núcleo subtalámico; así el globo pálido externo controla tónicamente la actividad de sus blancos.

Las neuronas del globo pálido externo expresan receptores de dopamina de los tipos D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>, lo cual ha sido comprobado por la presencia de RNAm (Seeman et al., 2006). La activación del receptor de dopamina D<sub>4</sub> decrementa la liberación de GABA [H<sup>3</sup>] en sinaptosomas de la sustancia nigra reticulata (Acosta-García et al., 2009).

#### **1.1.4. VÍA PÁLIDONIGRAL**

La vía palidonigral está constituida por los axones de las neuronas del globo pálido externo que proyectan hacia la sustancia nigra reticulata (Bevan et al., 1996). Es de naturaleza inhibitoria GABAérgica. Éstas terminales, de gran tamaño, contienen múltiples sitios de liberación (Smith y Bolam 1989), comparadas con las terminales sinápticas inhibitorias de la “vía indirecta”, las cuales son pequeñas y hacen sinápsis sobre el árbol dendrítico de las neuronas de la sustancia nigra reticulata (Smith et al., 1998). Sin embargo, experimentos recientes de Chuhma et al., (2011) muestran que esta distribución podría no ser la correcta.

En condiciones patológicas (como en la enfermedad de Párkinson) el globo pálido externo cambia su patrón de disparo de ser tónico a tener ráfagas rítmicas (oscilador) (Bevan et al., 2002). Lo mismo sucede en el núcleo subtalámico. Por lo que el circuito globo pálido externo-núcleo subtalamico es considerado como un generador de ritmos u oscilaciones (Plenz y Kitai 1999). Nos interesa saber si ésta oscilación es transmitida al sustancia nigra reticulata a través de la “vía pálido-nigral”.

### **1.1.5. NÚCLEO SUBTALÁMICO**

El núcleo subtalámico está constituido por neuronas glutamatérgicas de proyección (Chang et al., 1983; Kita et al., 1983a; Nakanishi et al., 1987), estas neuronas reciben aferencias glutamatérgicas (Fujimoto y Kita, 1993) de la corteza (Canteras et al., 1990) y de los núcleos parafascicular e intralaminares del tálamo (Feger et al., 1994; Mouroux et al., 1995; Deschenes et al., 1996). También recibe una aferencia inhibitoria tónica importante originada en el globo pálido externo (Kita et al., 1983b) y proyecciones de la SNc inmuno-reactivas a tirosina hidroxilasa (TH; enzima que sintetiza dopamina) (Augood et al., 2000; Brown et al., 1979; Prensa y Parent, 2001).

En núcleo subtalamico se ha detectado la presencia de RNAm que codifica para los receptores dopaminérgicos (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>5</sub>) (Baufreton et al., 2003; Bouthenet et al., 1991; Flores et al., 1999; Mansour et al., 1992). El núcleo subtalamico presenta actividad espontánea de tipo marcapaso y al activar los receptores de dopamina se facilita su disparo (Baufreton et al., 2003). Este efecto parece ser mediado por un receptor de la clase D<sub>1</sub>, probablemente por el receptor tipo D<sub>5</sub>. (Ibañez-Sandoval et al., 2006).

### 1.1.6. VÍA SUBTÁLAMONIGRAL

Esta vía es de naturaleza excitadora glutamatérgica. En la enfermedad de Parkinson, el núcleo subtalámico aumenta su actividad rítmica, lo que facilita el disparo de las neuronas de los núcleos de salida (globo pálido interno/sustancia nigra reticulata). Se piensa que el exceso en la actividad de los núcleos de salida da como resultado una inhibición de los circuitos tálamo-corticales encargados del movimiento, por lo tanto, se generan la hipocinesia o la acinesia (Bergman et al., 1994; Levy et al., 2000). Además, el incremento en la actividad de los núcleos de salida genera mayor inhibición del núcleo pedúnculo pontino, lo que produce la rigidez (Takakusaki et al., 2008).

Ibañez-Sandoval et al., en el 2006 muestran como la modulación por dopamina incrementa la liberación de glutamato activando al receptor tipo D<sub>1</sub> de la vía subtalamo-nigral, además la dopamina puede decrementar la liberación de glutamato mediante el receptor tipo D<sub>2</sub> de las terminales sinápticas, controlando de esta forma, la actividad de los núcleos de salida.

### 1.1.7. VÍA ESTRIATONIGRAL

También conocida como “vía directa”, está constituida por los axones de las neuronas del neostriado (neuronas espinosas medianas) que tienen como blanco a la sustancia nigra reticulata y el globo pálido interno (Chevalier y Deniau, 1990; Smith y Bolam, 1989). Esta vía es de naturaleza inhibitoria y monosináptica (Yoshida y Precht 1979; Matuszewich y Yamamoto 1999; Radnikow y Misgeld 1998). Está conformada por neuronas espinosas medianas que expresan al receptor de dopamina de tipo D<sub>1</sub>. Cuando este receptor es activado se incrementa la liberación de GABA sobre los núcleos de salida (Radnikow y Misgeld, 1998). Sin embargo Miyazaki y Lacey (1998) contradicen este hallazgo y mencionan que al activar al receptor D<sub>1</sub> se decrementa la liberación de GABA. En la presente Tesis se da una explicación a esta contradicción.

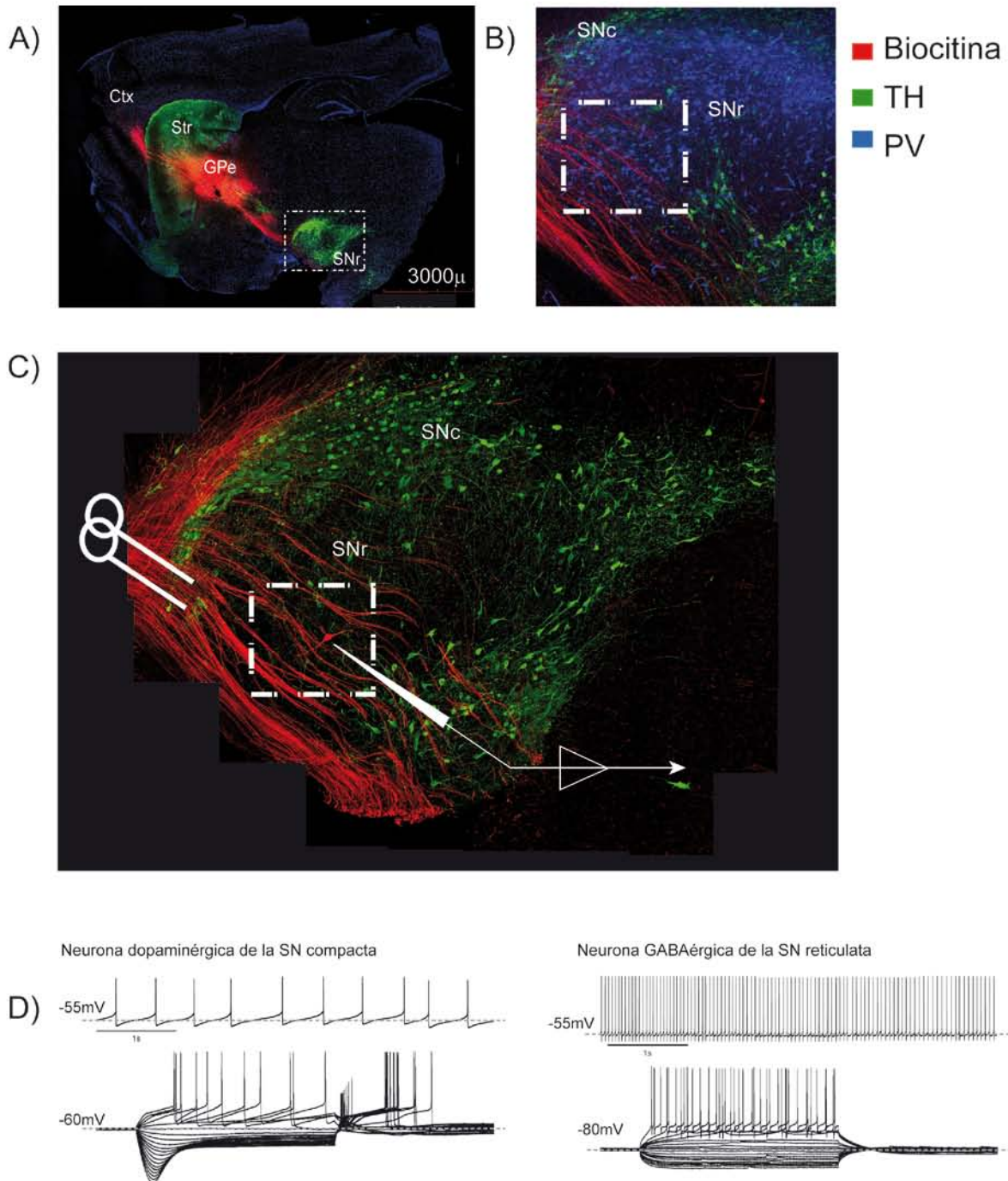
### **1.1.8. SUSTANCIA NIGRA PARS RETICULATA**

La sustancia nigra reticulata es junto con el globo pálido interno la salida de los ganglios basales (Alexander et al., 1986; Alexander y Crutcher, 1990). Recibe aferentes del núcleo subtalámico, del globo pálido externo (dorsal y ventral), del neocórtex y del núcleo accumbens (NAcc) (Bouthenet et al., 1987; Joyce y Gurevich 1999; Haber et al., 1990; Heimer et al., 1991; Bevan et al., 1994,1996; Chuhuma et al., 2010; Tripathi et al., 2010; Connelly et al., 2011). Estas aferentes de la sustancia nigra reticulata, convergen en la misma neurona modulando su tasa y patrón de disparo modificando así la salida de los Ganglios Basales (Bevan et al., 1994, Nakanishi et al., 1987; Maurice et al., 1999). Además es el sitio donde convergen comandos provenientes de diferentes cortezas; es decir, donde la información motora converge con la información del circuito límbico formando circuitos paralelos, los cuales utilizan como arquitectura repetida la vía directa e indirecta para la selección de acciones (Haber 2003; Stephenson-Jones et al., 2011; Wichmann y DeLong 2011). Las neuronas GABAérgicas inhibitorias de la sustancia nigra reticulata proyectan a los circuitos tálamo corticales que controlan los movimientos y a los núcleos del tallo cerebral como el pedúnculo pontino (PPN), el colículo superior (CS), la formación reticular (FR) y la región locomotora mesencefálica (MLR), que controlan los movimientos posturales, los músculos antigravitatorios que mantienen el equilibrio, los de la expresión facial y los periorbitarios generadores de nistagmo (Smeets et al., 2000; Hikosaka et al., 2000; Takakusaki et al., 2004, 2003; Tsumori et al., 2002; Jiang et al., 2003; Redgrave et al., 2010).

La sustancia nigra reticulata genera una inhibición tónica sobre sus blancos, es decir, inhibe los músculos que generan los movimientos. De forma que, iniciar un movimiento significa inhibir el disparo de la sustancia nigra reticulata (dejarlo salir o desinhibir los circuitos talamocorticales) lo que se logra cuando la “vía directa” es activada.

Las neuronas de la sustancia nigra reticulata son inmunoreactivas, en su mayoría, a la proteína quelante de calcio parvalbumina (PV) (González-Hernández y Rodríguez, 2000) y expresan conductancias iónicas intrínsecas como  $I_{NaP}$  y la  $I_h$  que las habilitan para generar un disparo tónico o de marcapaso (Zhou y Lee 2011). Este disparo tónico de la sustancia nigra reticulata inhibe tónicamente los núcleos blanco. Por lo tanto, la información proveniente de las diferentes cortezas, se observa como silencios de ese disparo tónico.

La aferencia que llega del neocórtex a la sustancia nigra reticulata conserva la organización topográfica de la aferencia cortical (Deniau et al., 1996; Mailly et al., 2001, 2003). Esta organización también es conservada hacia circuitos tálamo corticales (François et al., 2002; Kha et al., 2001; Tsumori et al., 2002) encargados de producir los movimientos dirigidos a metas que involucran los músculos distales.



**Figura 2. La sustancia nigra pars reticulata (SNr) contiene 2 clases de neuronas.** A) Rebanada sagital de cerebro mostrando el marcado anterógrado con biocitina de los axones que salen del NStr y otros más que salen del GPe (rojo): axones de ambas proyecciones llegan a la SNr B) La SNr contiene dos clases principales de neuronas: algunas son dopaminérgicas (inmunoreactivas para tirosina hidroxilasa (TH verde) y otras son neuronas GABAérgicas de proyección. De estas últimas, 2/3 partes son inmunoreactivas a parvalbumina (PV azul). C) Reconstrucción de la SN mostrando la ubicación del sitio de registro (cuadro) y de estimulación de los axones aferentes. D) Izquierda: registro en fijación de corriente de una neurona dopaminérgica: potencial de membrana ( $V_m$ ) de  $-55\text{mV}$  (línea interrumpida) y disparo tónico a 2-3 Hz. Ante pulsos hiperpolarizantes se activa una corriente entrante ( $I_h$ ). Derecha: registro en fijación de corriente de una neurona GABAérgica (PV+): el trazo a  $V_m = -55\text{mV}$  muestra disparo tónico a 30Hz. Las respuestas hiperpolarizantes muestran poca  $I_h$ .

Se ha mostrado que durante la enfermedad de Parkinson las neuronas de la sustancia nigra reticulata disparan en ráfagas oscilatorias. Este disparo, al influir sobre los circuitos tálamo-corticales-cerebelares produce temblor en reposo (Helmich et al., 2011), y al influir sobre los núcleos del tallo produce rigidez y acinesia (Ávila et al., 2010; Ibañez-Sandoval et al., 2007; Ruskin et al., 2002, Bergman et al., 2002; Takakusaki et al., 2003).

## 1.2 PLASTICIDAD SINÁPTICA

Los mecanismos que regulan la plasticidad sináptica de la vía estriatonigral (vía directa) no están descritos. Es por ello que en ésta Tesis nos preguntamos: ¿Cómo sucede esta modulación?. La plasticidad sináptica es una buena candidata para entender los mecanismos de toma de decisiones (Kreitzer y Malenka, 2007, 2008; Shen et al., 2008; Di Filippo et al., 2009); sin embargo, su estudio en los ganglios basales ha sido restringido a la sinapsis glutamatérgica cortico-estriatal (Calabresi et al., 2007; Kreitzer y Malenka, 2008; Surmeier et al., 2009; Wickens, 2009; Lovinger, 2010).

Se sabe que las sinapsis GABAérgicas pueden exhibir plasticidad sináptica de largo plazo (PSLP) (Mendoza et al., 2006; Sjöström et al., 2008; Castillo et al., 2011). Las sinapsis inhibitoras son de gran relevancia en los ganglios basales (Guzmán et al., 2003; Misgeld et al., 2007; Tecuapetla et al., 2007; Connelly et al., 2010; Tepper et al., 2010; Chuhma et al., 2011). Más aún, la plasticidad sináptica de largo plazo ha sido descrita en sinapsis GABAérgicas de los ganglios basales (Adermark et al., 2009; Rueda-Orozco et al., 2009).

Una pregunta concierne a cómo la dopamina permite la selección entre la vía directa y la vía indirecta, tal vez interactuando con la plasticidad sináptica (Surmeier et al., 2009; Wickens, 2009). La plasticidad sináptica, en particular la plasticidad sináptica de largo plazo, ha sido propuesta como un mecanismo celular para explicar los cambios duraderos en los pesos sinápticos de los



microcircuitos cerebrales así como del almacenaje de la memoria (e.g., Hebb, 1945; Malenka y Bear, 2004; Barbour et al., 2007; Misgeld et al., 2007). En la presente tesis analizamos los mecanismos de depresión de largo plazo (por sus siglas en ingles LTD) en la via directa.

## **1.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Las oscilaciones que se presentan en el potencial de membrana de los núcleos de salida en la enfermedad de Parkinson pueden ser generadas dentro de los mismos núcleos (intrínsecas) o transmitidas desde otros núcleos (extrínsecas).

### **1.3.1 Mecanismos intrínsecos**

Las neuronas de la sustancia nigra reticulata poseen actividad de marcapaso gracias a una corriente que les confieren una zona con pendiente negativa (ZCPN) a la relación corriente voltaje (curva I-V con biestabilidad). La ZCPN generalmente es producida por corrientes entrantes sostenidas acompañadas por alguna de las corrientes catiónicas de tipo marcapaso ó tónicas ( $I_h$ ,  $I_{NaP}$ ) (Lee y Heckman, 1998, 1999, 2001; Ibañez-Sandoval et al., 2007; Zhou y Lee 2011; Ding et al., 2011). Cuando la ZCPN está presente en las curva I-V, las entradas sinápticas pueden generar potenciales en meseta de larga duración y disparo en ráfagas (*bursts*)(Ibañez-Sandoval et al., 2007). Estas respuestas superan en mucho la duración de la entrada sináptica que las origina. Los receptores sinápticos encargados de propiciar las mesetas son los de tipo NMDA, propios de muchas sinapsis excitadoras como la subtálamonigral (Guertin y Hounsgaard, 1998; Lo y Mize, 2000). La activación del receptor NMDA también puede generar propiedades biestables en neuronas que normalmente no las tienen (biestabilidad condicional) (Vergara et al., 2003; Beurrier et al., 1998).

La consecuencia principal de la ZCPN es la inducción de oscilaciones espontáneas en el potencial de membrana generadas por la interacción de las entradas sinápticas y las corrientes intrínsecas (Guertin y Hounsgaard, 1998) como lo muestran los registros tanto del núcleo entopeduncular (Kita 2001) como del núcleo subtalámico (Baufreton y Bevan, 2008; Baufreton et al., 2009; Atherton et al., 2010). La actividad oscilatoria observada en los generadores centrales de patrones (marcha, masticación, nado, deglución, etc.) puede ser inducida en preparaciones *in vitro* de médula espinal o de tallo cerebral aislados en varias especies (lamprea, tortugas, cobayos, ratas, ratones, etc.), para lo cual basta adicionar el agonista de los receptores NMDA al baño de perfusión (Grillner et al., 2003, Guertin y Hounsgaard 1998), o incrementar la liberación de las terminales glutamatérgicas (Gordon y Whelan, 2006).

Algunos de los núcleos de los ganglios basales presentan actividad oscilatoria espontánea *in vitro* aún sin aplicar ningún fármaco (Bevan et al., 2002; Cossart et al., 2005; Sánchez-Vivez y McCormick, 2000; Vergara et al., 2003; Yuste et al., 2005). Por ejemplo, la sustancia nigra reticulata puede transitar del estado tónico al oscilatorio de manera espontánea, ya que dichas neuronas están involucradas en el control de diversas conductas estereotipadas, como la masticación, el movimiento del cuello, de los ojos, el nistagmo, la locomoción y el tono muscular entre otros (Giang et al., 2003; Salamone et al., 1998; Takakusaki et al., 2003, 2004; Ibañez Sandoval et al., 2007). Sin embargo, en situación control, el porcentaje de neuronas con disparo en ráfagas oscilantes es menor que el porcentaje de neuronas con disparo tónico. Éste porcentaje se invierte durante la enfermedad de Parkinson, es decir, la lesión con 6-hidroxidopamina incrementa el número de neuronas de la sustancia nigra reticulata que presentan oscilaciones en ráfagas (Ávila et al., 2010; Tseng et al., 2005; Murer et al., 1997; Walters et al., 2007; Belluscio et al., 2003, 2007).

### 1.3.2 Mecanismos extrínsecos

#### OSCILADORES ACOPLADOS

Plenz y Kital en 1999 mostraron que un cultivo organotípico de neuronas de los núcleos globo pálido externo y núcleo subtalamico era capaz de generar oscilaciones de neuronas sincronizadas, aun en presencia de tejido estriatal, pero en ausencia de dopamina y de aferencias corticales. Además, en ratas anestesiadas con ketamina el globo pálido externo y el núcleo subtalámico también generan oscilaciones (Magill et al., 2000).

La actividad osciladora del circuito globo pálido externo-núcleo subtalámico se correlaciona con las oscilaciones en el potencial de campo cortical (ECoG), lo que sugiere que los ritmos corticales lentos pueden ser propagados a través de la vía cortico-núcleo subtalámico-globo pálido externo. De igual forma, los ritmos corticales se correlacionan con la actividad rítmica en la sustancia nigra reticulata (Belluscio et al., 2003; Ávila et al., 2010). Por lo tanto, es posible especular que los ritmos corticales lentos son transferidos a la sustancia nigra reticulata vía el núcleo subtalámico en los estados parkinsonianos (Murer et al., 1997; Tseng et al., 2000).

La ausencia de dopamina puede generar alteraciones en la función de las aferentes “estriatonigral” y “páldonigral”. Además, se ha observado que la activación del receptor  $D_1$  cambia el patrón temporal de disparo de las neuronas de la sustancia nigra reticulata del modo oscilador al modo tónico. Bloqueando el receptor  $D_1$  se obtiene disparo irregular (Zhou et al., 2009). La activación del receptor  $D_2$  tiene un impacto menor pero robusto en la tasa de disparo (Tseng et al., 2000). Esto sugiere que una interacción de las entradas extrínsecas (presinápticas) de la sustancia nigra reticulata (moduladas por la dopamina), con las corrientes intrínsecas, también moduladas por dopamina (Zhou et al., 2009), controlan el patrón de disparo de las neuronas de la sustancia nigra reticulata, y por lo tanto, el tono de inhibición sobre los ejes tálamo-corticales y del tallo cerebral. Esta hipótesis la analizaremos en el presente trabajo.

Recientemente, utilizando métodos electrofisiológicos y optogenéticos se mostró la relevancia que tiene la modulación presináptica dopaminérgica sobre la liberación GABAérgica tanto de la “vía estriatonigral” como de la “vía pálido-nigral”, lo cual corrobora datos presentados en la presente Tesis (Connelly et al., 2010; Chuhma et al., 2011).

El modelo oscilatorio de la enfermedad de Parkinson postula que la actividad neuronal se torna patológica cuando un número suficientemente grande de neuronas se engancha en la oscilación, lo que no deja neuronas disponibles para realizar los movimientos dirigidos a metas (Bevan et al., 2002; Bergman et al., 1994; Galarraga et al., 1987; Hutchinson et al., 2004; Kreiss et al., 1996; Magill et al., 2001; Jaidar et al., 2010). La transmisión de oscilaciones lentas se ve favorecida por la ausencia de dopamina. Así, la hipersincronización entre el globo pálido externo y el núcleo subtalámico genera un resonador comandado por la vía hiperdirecta (Walters et al., 2007).

Por otro lado, el modelo “de tasa de disparo” del Parkinsonismo (Albin et al., 1989; Mink et al., 1996; Smith et al., 1998) propone un incremento en la actividad de la “vía indirecta”, lo que sobre excitaría a las conexiones subtalamonigral y pálido-nigral. Además, propone una reducción en la actividad de la “vía directa”. Existiendo así un desbalance entre las dos vías; el incremento en la actividad de los núcleos de salida debido a la sobre actividad de la vía indirecta se traduciría en una sobreinhibición de los circuitos tálamo-corticales de los movimientos dando lugar a la hipocinesia. ¿Pero son compatibles estos dos modelos?. En la presente Tesis pusimos a prueba ambos modelos y pudimos reproducir, *in vitro*, de forma aguda (usando antagonistas dopaminérgicos a los receptores  $D_1$  y  $D_2$ ), la actividad oscilatoria patológica al disminuir la actividad de la vía directa (antagonistas  $D_1$ ) y aumentar la de la vía indirecta (antagonistas  $D_{2/3/4}$ ). En otras palabras, si se producen los cambios predichos por el modelo de tasa de disparo a nivel presináptico, se generan las oscilaciones patológicas predichas por el modelo oscilador. Así que pensamos que ambos modelos son complementarios.

## 1.4 LA DOPAMINA Y SUS RECEPTORES

La dopamina es una catecolamina como la adrenalina y la noradrenalina, que al interactuar con sus receptores acoplados a proteínas G, activa diversas cascadas de señalización intracelular (Hedin et al., 1993; Missale et al., 1998; Savarese et al., 1992.) Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la super familia de 7 dominios transmembranales (7TM) acoplados a proteínas G (GCRs). Actualmente se conocen dos clases o familias de estos receptores: D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Missale et al., 1998). La clase D<sub>1</sub> esta compuesta por los tipos D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> (Monsma et al., 1990; Tiberi et al., 1991) estos activan a la adenilato ciclasa a través de proteínas G $\alpha$ (s/olf) estimulando la formación de AMPc (Kebabian y Calne, 1979). La clase D<sub>2</sub> esta constituida por los tipos D<sub>2</sub> (isoformas D<sub>2</sub>L y D<sub>2</sub>S) (Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989) el tipo D<sub>3</sub> (Sokoloff et al., 1990) y el tipo D<sub>4</sub> (Van Tol et al., 1991). A estos receptores se les conocen dos funciones intracelulares: inactivan a la adenilato ciclasa mediante proteínas G $\alpha$ i/o disminuyendo así la formación de AMPc (Kebabian y Calne 1979) y activan a la PLC mediante la hidrólisis de fosfolípidos de membrana (Hernandez-López et al., 2000).

La dopamina se sintetiza a partir del aminoácido tirosina gracias a su hidroxilación mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH) que genera la dihidroxifenilalanina (DOPA), que al ser descarboxilada en una reacción catalizada por la DOPA descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC, por sus siglas en inglés; ver Cooper et al., 1996) se transforma en dopamina.

La participación tónica de la dopamina en el control del movimiento se infiere a partir de datos clínicos y experimentales donde su depleción mediante la lesión de la SNc induce hipocinesia, rigidez y temblor en reposo (Albin et al., 1989; Hornykiewicz, 1973; Smith y Kieval, 2000). Recientemente, experimentos de optogenética han correlacionado los circuitos mencionados con la funcionalidad y con la fisiopatología (Kravitz et al., 2010; Connelly 2010; rev. en: Surmeier et al., 2011).

## Capítulo II

### 2.1 Hipótesis

1. La activación de los receptores clase D<sub>1</sub> modula la vía estriatonigral, mientras que la activación de receptores clase D<sub>2</sub> (tipo D<sub>3/4</sub>) modula a las terminales pálidonigrales.
2. La ausencia de activación tónica de estos receptores presinápticos dopaminérgicos genera el disparo en ráfagas oscilatorias de las neuronas de la sustancia nigra reticulata, tal y como sucede en los modelos de Parkinsonismo o en los pacientes con la enfermedad de Parkinson.
3. La LTD en la vía directa es la consecuencia de la activación del receptor de cannabinoides por incremento en la síntesis de endocannabinoides al activar el receptor de NMDA postsináptico (vía indirecta). Esto es, la actividad de la vía indirecta condicionará la de la vía directa en los núcleos de salida.

## 2.2 Objetivos

1. Obtener preparaciones dónde se mantengan preferentemente las vías estriatonigral o pálido-nigral. Mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.
2. Identificar a las neuronas registradas de la sustancia nigra reticulata por sus características electrofisiológicas e inmunohistoquímicas.
3. Explorar los efectos de la activación de los receptores dopaminérgicos de las clases D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, en la transmisión estriatonigral y pálido-nigral.
4. Determinar si la dopamina endógena mantiene una actividad tónica sobre los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.
5. Mostrar si el bloqueo agudo de los receptores a dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> es capaz de generar oscilaciones en el potencial de membrana de las neuronas de la sustancia nigra reticulata similares a las patológicas.
6. Identificar y describir como la activación de la vía indirecta genera una LTD en la vía directa.

## Capítulo III

### 3.1 Métodos

#### 3.1.1 Tejido cerebral mantenido *in vitro*

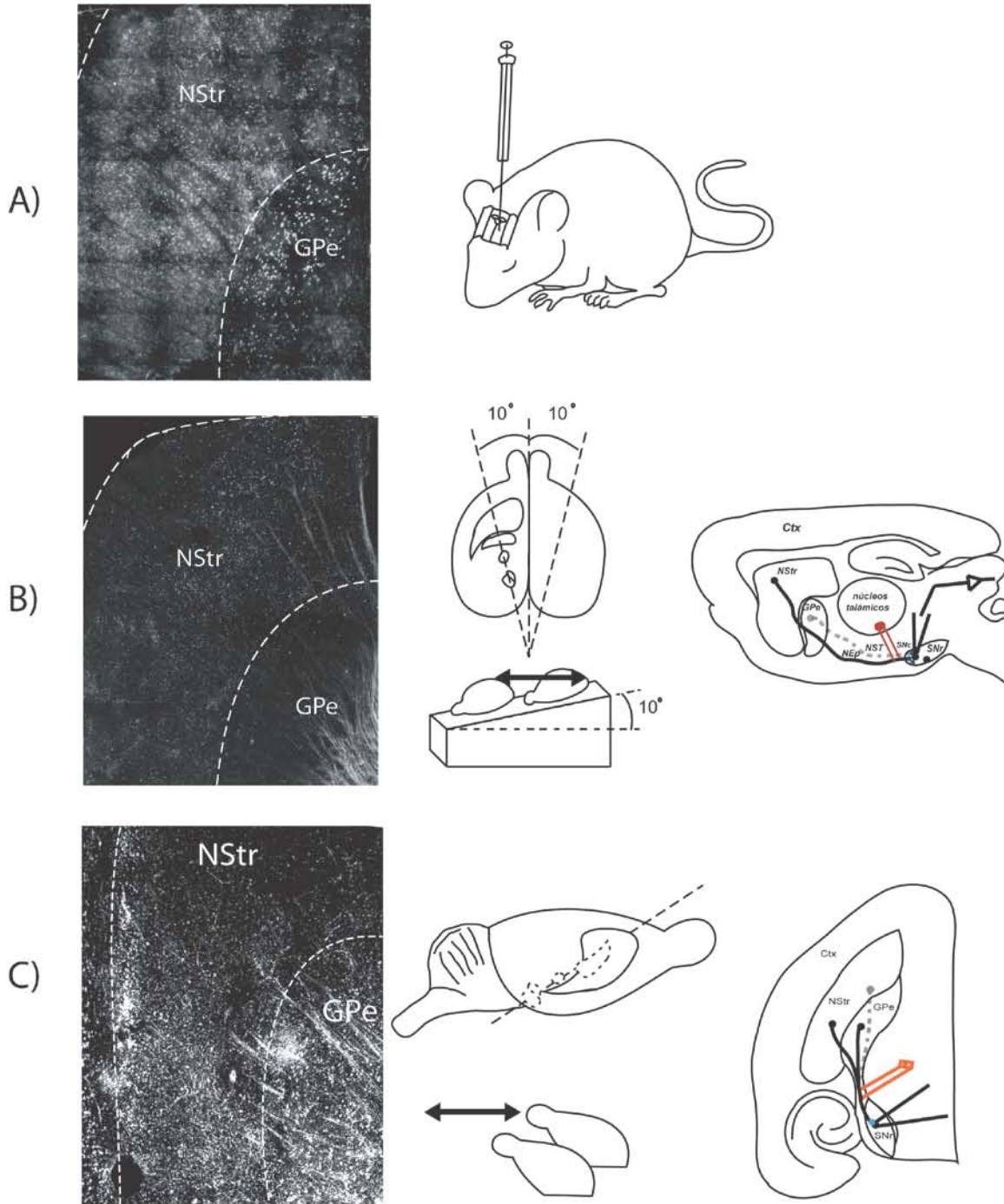
Los registros de las corrientes sinápticas en las neuronas de la sustancia nigra reticulata fueron realizados en rebanadas de tejido cerebral de rata cortadas en fresco. Para su obtención, se anestesia a los animales de entre 14 y 40 días de edad y se perfunde transcardíacamente con fluido cerebroespinal artificial hasta que no quede sangre (hemoglobina) en los vasos cerebrales para así poder realizar inmunocitoquímica de calidad. La composición del líquido de perfusión se muestra en la Tabla 1. Durante la perfusión y la obtención del tejido se sustituye el cloruro de sodio por cloruro de colina para inhibir la excitabilidad y mejorar la viabilidad.

Acto seguido se decapita al animal y se extrae el cerebro que se sumerge en fluido cerebroespinal artificial frío. Posteriormente, se corta en un vibratomo (Pelco 101 Series 1000; Pelco, St. Louis, MO). Se obtienen rebanadas finas de 250-300  $\mu\text{m}$  de espesor ya sea parasagitales o parahorizontales, ambas conteniendo los núcleos y las fibras de interés. La Figura 3 muestra los detalles de los cortes así como del trazado anatómico que nos permite seleccionar mejor las proyecciones que se van a estudiar. Cabe mencionar que estos cortes y trazados se obtuvieron después de un prolongado periodo de ensayo y error hasta optimizar la obtención de las distintas conexiones. Estas preparaciones *in vitro* son por lo tanto originales y no se habían reportado. Sin preparaciones de este tipo es imposible estudiar los microcircuitos a nivel celular y sináptico.

Solo para los casos de trazado con biocitina (Figura 2) (2%; Sigma-Aldrich, St Louis MO; disuelta en solución salina fisiológica) como ha sido descrito anteriormente (Vergara et al., 2003). Una pipeta, colocada sobre el neostriado o el globo pálido externo durante un tiempo de dos horas instila la biocitina. Luego se retira la pipeta pero la rebanada permanece unas 6 horas con perfusión constante, esperando el transporte axoplásmico, anterógrado y retrógrado.

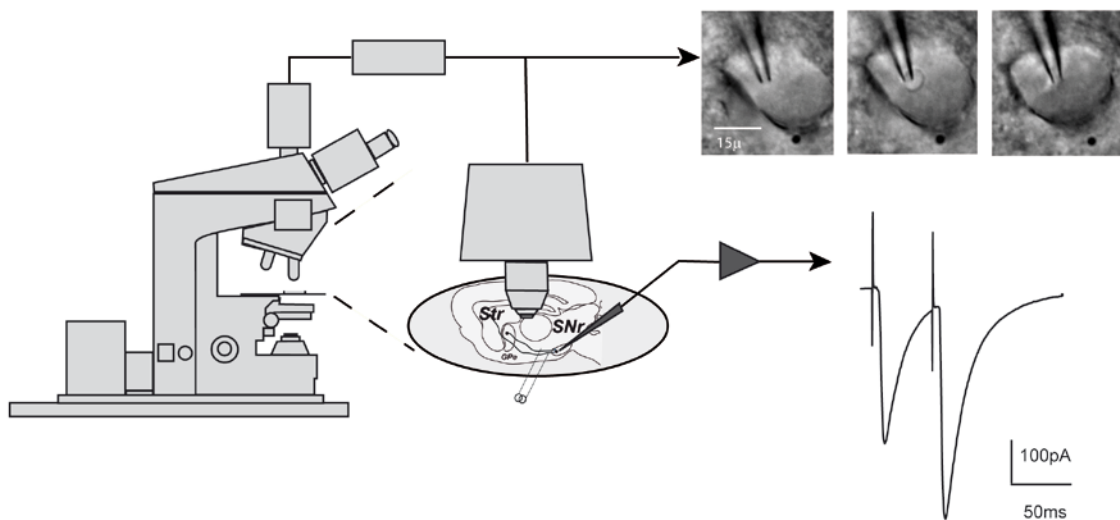


Posteriormente, el tejido se fija en una solución con 4% de paraformaldehído y 1% de ácido pícrico durante 12hrs a 4°C. Al día siguiente, las rebanadas son lavadas con una solución salina amortiguada de fosfatos de potasio (KPBS) 10 minutos, tres veces, para quitar el exceso de fijador. Al terminar de lavar las rebanadas se incluyen en agar al 7% para posteriormente colocarlas en un vibratomo para obtener cortes de 60  $\mu\text{m}$  de espesor en presencia de KPBS, los cuales posteriormente se incuban en KPBS que contiene 0.5% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 minutos para suprimir la actividad endógena de la peroxidasa. Acto seguido, las rebanadas se lavan y se incuban en una solución salina TRIS-amortiguada (TBS) que contiene tritón X-100 más el complejo avidina-biotinilada con peroxidasa (1:100; Vector, Burlingham, CA, USA.) durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las rebanadas con KPBS se reaccionan con 0.05% de tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina y 0.003% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en TBS para posteriormente montarlas en portaobjetos gelatinizados para su inspección en el microscopio. En algunos casos, después de cortar, las rebanadas se incuban con Cy3 y TBS durante 24 horas para posteriormente montarlas en portaobjetos gelatinizados para su inspección y reconstrucción digital en un microscopio confocal.



**Figura 3.- Preservación preferente de la vía estriatonigral o páldidonigral dependiendo del corte en la rebanada cerebral. A)** Marcado retrógrado inyectando fluorogold en la SNr de una rata anestesiada. El recuadro de la izquierda muestra que un gran grupo de neuronas tanto del NStr como del GPe son marcadas, mostrando así la gran convergencia que tienen sobre la SNr. **B)** Trazado retrógrado, con biocitina, de una rebanada parasagital de cerebro de rata con ángulo de 10°. El recuadro muestra que se marcan neuronas en el NStr preferentemente. **C)** Trazado retrógrado, con biocitina, de una rebanada para-horizontal de cerebro de rata con ángulo de 35°. El recuadro muestra que se marcan, preferentemente, neuronas en el GPe, aunque no se puede evitar que también se marquen neuronas en el NStr.

Para los casos de registro, posterior al corte el tejido se transfiere a un recipiente con fluido cerebroespinal artificial. La solución se mantiene en burbujeo constante con una mezcla de  $O_2$ : 95% y  $CO_2$ : 5%, durante un período de entre una y dos horas. Después, las rebanadas se transfieren a una cámara de registro diseñada en el laboratorio de volumen = 1.5 ml y que es fijada en la platina del microscopio (Diaphot, Nikon). El tejido se superfunde con flujo constante de fluido cerebroespinal artificial (Tabla 1) a una velocidad de 2.5 ml/min. Los registros de los eventos sinápticos provocados se hicieron visualizando primero a la población de neuronas y seleccionando la zona de registro en la sustancia nigra reticulata con ayuda de un objetivo 10X / NA 0.3. El electrodo de estimulación se sitúa en la cápsula interna (Figura 2). Posteriormente, se selecciona una neurona (Figura 4) utilizando un objetivo de inmersión en agua (40X / NA 0.75), empleando la técnica de videomicroscopía infrarroja (Stuart et al., 1993).



**Figura 4. Esquema del dispositivo experimental.** Izquierda: microscopio, una amplificación de la platina muestra a la rebanada parasagital mostrando los núcleos de interés (NStr, GPe y SNr). El electrodo de estimulación se colocó en la cápsula interna y la respuesta sináptica se registró en el soma de una neurona GABAérgica de la SNr. Derecha arriba: visualización de una neurona de la SNr empleando la técnica de videomicroscopía infrarroja. Derecha abajo: pulsos pareados: corrientes posinápticas inhibitorias (IPSC) en una neurona de la SNr.

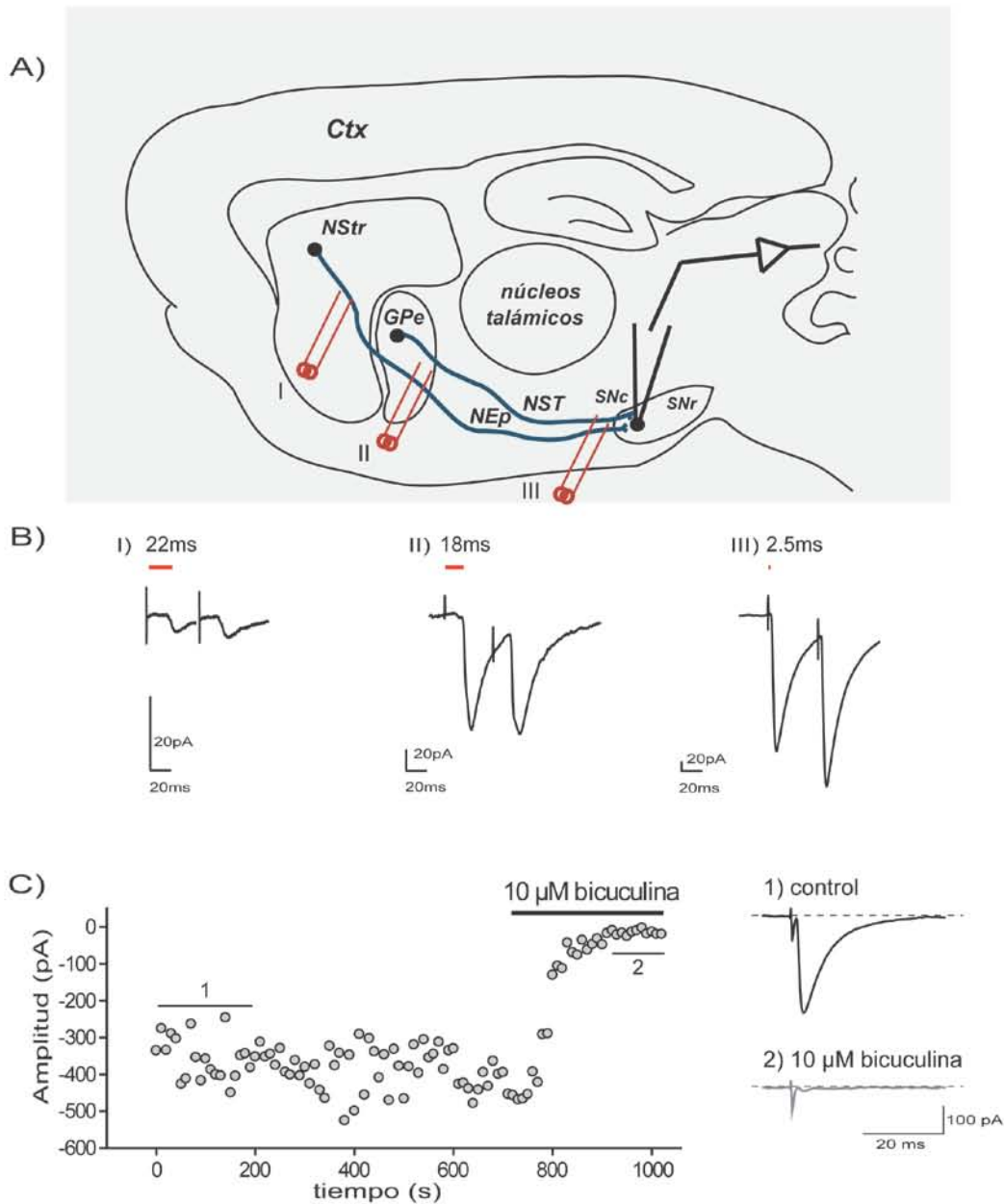
**Tabla 1.** Composición del fluido cerebroespinal artificial (CEA) y de la solución interna utilizadas (concentración en mM)

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

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

### 3.1.2 Estimulación

La vía estriatonigral ha sido descrita anatómica y electrofisiológicamente (Yoshida y Precht 1971, Smith y Bolam 1989), es de naturaleza inhibitoria y monosináptica, sin embargo, la vía pálido-nigral solo había sido descrita anatómicamente. (Smith y Bolam 1989). Las terminales de las neuronas GABAérgicas de los núcleos neoestriado y globo pálido externo ejercen su acción inhibitoria sobre las neuronas GABAérgicas de la sustancia nigra reticulata (Figura 5 y 6).



**Figura 5. Registro de IPSCs estriatonigrales acercando el electrodo de estimulación al de registro. A)** esquema de la rebanada parasagital de cerebro donde se muestran los sitios de estimulación: I) en el NStr, II) el GPe y III) la cápsula interna (CI). **B)** Latencias de las IPSCs obtenidas estimulando en los diferentes sitios indicados en A: I)  $22 \pm 2$  ms desde el NStr II)  $18 \pm 1$  ms desde el GPe y III)  $2.5 \pm 1$  ms en la CI ( $n = 3$ ). Note el aumento en la amplitud de la respuesta conforme el electrodo de estimulación se acerca al de registro. **C)** Curso temporal de las amplitudes de las IPSCs en presencia de CNQX ( $10 \mu\text{M}$ ) y de APV ( $50 \mu\text{M}$ ), antagonistas de los receptores a glutamato AMPA/kainato y NMDA, respectivamente. Note el bloqueo de las IPSCs al agregar  $10 \mu\text{M}$  de bicuculina a la perfusión. De lado derecho se observan trazos representativos de la situación control (1) y después de la adición de bicuculina (2).

Situando el electrodo de estimulación en la capsula interna (CI) se obtienen respuestas sinápticas preferentemente estriatonigrales (90%) cuando se utiliza una rebanada parasagital. Usando rebanadas parahorizontales se obtienen respuestas sinápticas preferentemente pálido-nigrales (60%). Así, aunque pueden estimularse varias vías, el caso es reconocer cuál es la que está siendo estimulada en un determinado experimento y eso no es difícil de lograr ya que como se verá, las características funcionales de ambas aferentes son muy diferentes. Asimismo, la vía subtalamonigral se bloquea con antagonistas a los receptores a glutamato a menos que queramos estimular a los receptores de NMDA postsinápticos.

El electrodo de estimulación es bipolar concéntrico de platino-iridio (FHC Inc., Bowdoinham, ME; de 12-50  $\mu\text{m}$  en la punta y de 1  $\text{K}\Omega$  de resistencia). Está conectado a un generador de pulsos (Digitimer DS2). Se usan dos pulsos separados por un intervalo de 50 ms a una frecuencia de 0.1 Hz. Esto genera las respuestas pareadas. Para inducir la plasticidad de largo plazo se utiliza el protocolo de estimulación de alta frecuencia (HFS): dos trenes a 100 Hz (1 segundo cada uno, 200 estímulos en total) con un intervalo entre los trenes de 10 segundos (Mendoza et al., 2006). Para la plasticidad de corto plazo se dan trenes de 10 estímulos a 10 Hz cada 10 segundos; sincronizando la estimulación y el registro a través de un estimulador adicional (Digitimer D4030). El registro de las corrientes sinápticas inhibitoras se realizó en presencia de CNQX (10 $\mu\text{M}$ ) y de APV (50 $\mu\text{M}$ ). Para confirmar la naturaleza inhibitora del evento sináptico, al final de cada experimento se adiciona 10 $\mu\text{M}$  de bicuculina (Figura 5). El potencial de mantenimiento en la mayoría de los experimentos realizados fue de -80 mV.

### 3.1.3 Electrodo de registro

Las corrientes sinápticas se registran empleando la técnica de célula completa ("*whole-cell clamp*"; Hamill et al., 1981; Marty y Neher, 1995). Para ello se utilizan pipetas de borosilicato de 1.65/1.1 mm (OD/ID; WPI Sarasota, FL) estiradas con

un jalador (Sutter Instrument Corp. Novato, CA). Tienen una resistencia de 3-5 M $\Omega$  después de pulirlas y ser llenadas con la solución interna (Tabla 1).

### **3.1.4 Registro electrofisiológico**

El registro de las corrientes postsinápticas inhibitoras (IPSCs) en la modalidad de fijación de voltaje se realiza de acuerdo al siguiente procedimiento: la señal se amplifica con un el electrómetro Axopatch 200B (Axon Ins., Foster City, CA) que tiene un preamplificador 10X, luego se filtra a 5 KHz (filtro de Bessel) para ser digitalizada a una frecuencia de adquisición de 10 KHz con un convertidor (A/D; Digidata 1200, Axon Ins.; Foster City, CA) de 12 bits. Para la adquisición se usa una interface AT-MIO-6040E y una tarjeta DAQ (NI-DAQ; National Instruments, Austin TX) instrumentada en línea mediante un programa hecho en el ambiente LabVIEW (National Instruments, Austin TX). La tarjeta NI-DAQ guarda los datos en archivos binarios en el disco duro de la computadora para su análisis posterior. La señal se monitorea en la pantalla de un osciloscopio (Tektronix TDS 3012) y en la pantalla de un computador PC.

### **3.1.5 Análisis y presentación de los datos**

Los registros de las corrientes IPSCs almacenadas en la computadora son analizados con ayuda de programas de análisis hechos en el laboratorio (J. Pérez Ortega) y con programas comerciales (e.g., Origin 7). Se miden la amplitud máxima de las corrientes sinápticas así como el tiempo al pico y el tiempo de caída. Se grafica el curso temporal de la amplitud antes y después de aplicar un fármaco. Cada punto del curso temporal es el promedio de 12-36 eventos.

Para evaluar la acción de receptores presinápticos se utilizó el protocolo de pulsos pareados: dos estímulos de la misma intensidad separados por un intervalo de 50 ms, aplicados cada 10 segundos (0.1 Hz). Este protocolo evalúa la dinámica presináptica en la liberación de neurotransmisores debida al amortiguamiento del

calcio residual (Katz y Miledi, 1967, 1968; Zucker y Regehr, 2002): Una pequeña fracción del calcio que entra a las terminales en respuesta al primer estímulo, un potencial de acción, se suma al calcio que entra durante el segundo estímulo. Si las terminales estimuladas poseen baja probabilidad de liberación, el incremento de calcio resultante favorecerá que un mayor número de vesículas se fusionen y liberen su contenido al espacio sináptico durante el segundo estímulo. De esta manera la segunda respuesta del par será mayor que la primera: la facilitación de la respuesta pareada significa entonces baja probabilidad de liberación inicial.

Pero si las terminales poseen alta probabilidad de liberación inicial, vaciarán casi todo su contenido durante el primer estímulo. Durante el segundo estímulo ya no habrá suficientes vesículas disponibles para liberar. En cuyo caso la segunda respuesta será de menor amplitud que la primera: la depresión de la respuesta pareada ante el segundo estímulo sugiere alta probabilidad de liberación inicial (Katz y Miledi 1967, Ibañez Sandoval et al., 2006).

Esto es fácil de corroborar cuando se modifica la concentración extracelular de calcio: a una alta concentración hay depresión, a una baja concentración hay facilitación, pues la probabilidad de liberación del neurotransmisor contenido en las vesículas sinápticas es dependiente de la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje situados en la terminal. Ningún cambio postsináptico puede hacer que la proporción entre los pulsos pareados cambie de esa manera, por lo que el protocolo de los pulsos pareados es una prueba estándar para evaluar la modulación presináptica.

De acuerdo con esto, si un neuromodulador como la dopamina controla la liberación a nivel presináptico, deberíamos poder observarlo a través de cambios en la proporción de las amplitudes de las respuestas pareadas. Si la dopamina inhibiera la transmisión disminuyendo la entrada de calcio a la terminal, habría una disminución en la probabilidad de liberación, y por lo tanto se observaría una facilitación de la segunda respuesta. Por el contrario, si la dopamina facilita la



transmisión sináptica aumentando la probabilidad de liberación, se observa una depresión de la segunda respuesta.

El parámetro cuantificado es la “razón de pulsos pareados” =  $2a. \text{ respuesta} / 1a. \text{ respuesta} = RPP$ . Para esto las amplitudes se obtuvieron del promedio de 25 trazos para cada una de las condiciones.

## **Capítulo IV**

### **4.1. RESULTADOS**

#### **4.1.1 DOS TIPOS DE INHIBICIÓN SOBRE LAS NEURONAS DE LA SNr**

##### **4.1.1.1 Vías estriatonigral y pálido-nigral**

La presencia predominante de la conexión estriatonigral en la preparación parasagital se demostró después de teñir mediante transporte anterógrado con biocitina las fibras provenientes del neostriado (Figura 1a), las cuales pueden seguirse hasta que se adentran en la sustancia nigra reticulata (Figura 1b). Por lo tanto, el electrodo de estimulación se coloca donde estas fibras parecen más abundantes. La integridad de la vía se demuestra al estimular a distintas distancias a lo largo del trayecto de las fibras obteniéndose IPSCs con distintas latencias y amplitudes dependiendo de la distancia (Figuras 3 y 5).

En cambio, en la rebanada con ángulo parahorizontal se conservó preferentemente la vía pálido-nigral (Figura 3).

##### **4.1.1.2 Las neuronas GABAérgicas de la sustancia nigra reticulata**

Se realizó inmunohistoquímica para ubicar el sitio óptimo de registro: con mayor cantidad de neuronas GABAérgicas inmunoreactivas a parvoalbúmina (PV+) que son las de proyección (González-Hernández y Rodríguez 2000; Hontanilla et al., 1997; Rajakumar et al., 1994; Ibáñez-Sandoval et al. 2006) (Figura 3).

Se registraron dos tipos de neuronas:

1. 90 de las 120 neuronas registradas (Figura 3) disparaban a 15-40Hz, con potenciales de acción de duración =  $0.73 \pm 0.01$  ms, medidos a la mitad de su amplitud máxima. Estas neuronas tenían poca respuesta hiperpolarizante (I<sub>h</sub>) y un umbral de disparo =  $-55 \pm 5$  mV, siendo PV+.
2. 20 de las 120 neuronas eran dopaminérgicas (Figura 3) con tasas de disparo < 10 Hz y en general alrededor de los 3 Hz. Sus potenciales de acción de duración =  $2.3 \pm 0.1$  ms medidos a la mitad de la amplitud máxima. Estas neuronas exhiben fuerte respuesta hiperpolarizante (I<sub>h</sub>) (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997; Rohrbacher et al., 2000).

#### 4.1.1.3 Separación funcional de las corrientes inhibitorias postsinápticas estriatonigrales y pálido-nigrales

Las corrientes inhibitorias postsinápticas (IPSCs) se aíslan en presencia de los bloqueadores de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA: CNQX (10  $\mu$ M) y APV (50  $\mu$ M), respectivamente; lo que elimina la estimulación de la vía subtálamonigral glutamatérgica. La comprobación de la naturaleza inhibitoria se hizo con bicuculina o gabazina, bloqueadores: del receptor GABA<sub>A</sub> (Figura 5 C).

Las IPSCs provenientes de la vías estriatonigral y pálido-nigral resultaron muy diferentes desde el punto de vista funcional, corroborando el único reporte previo sobre estas diferencias de Connelly et al. (2010).

1. Las corrientes de la vía estriatonigral son más pequeñas que las IPSCs de la vía pálido-nigral (media  $\pm$  error estándar para la primera IPSC del pulso pareado):  $235 \pm 50$  pA (n = 32) vs.  $1399 \pm 152$  pA (n = 20; P < 0.0001), respectivamente.
2. La razón de pulsos pareados (RPP) también fue diferente: las IPSCs estriatonigrales muestran facilitación: RPP =  $1.41 \pm 0.07$  (Figura 6 A y G; n = 30). En tanto que las IPSCs pálido-nigrales muestran depresión: RPP =  $0.4 \pm$

0.06 (Figura 6 B y G; n = 19; P < 0.0001); aunque no siempre tan fuerte como se muestra en la Figura 6 D.

3. La plasticidad de corto plazo (10 pulsos a 20 Hz) de la vía estriatonigral exhibe facilitación sin fallas (Figura 6 C; n = 8) mientras que la vía pálido nigral muestra depresión con fallas intermitentes (Figura 6 D; n=6; P < 0.0001).
4. La cinética de las corrientes medida con la proporción: constante de decaimiento/tiempo al pico fue también diferente:  $4.5 \pm 0.5$  (n = 30) en la sinapsis estriatonigral y  $12.6 \pm 0.8$  en la pálido nigral (n = 19; P < 0.0001), mostrando que las IPSCs pálido nigrales son más breves que las estriatonigrales (Connelly et al., 2010).

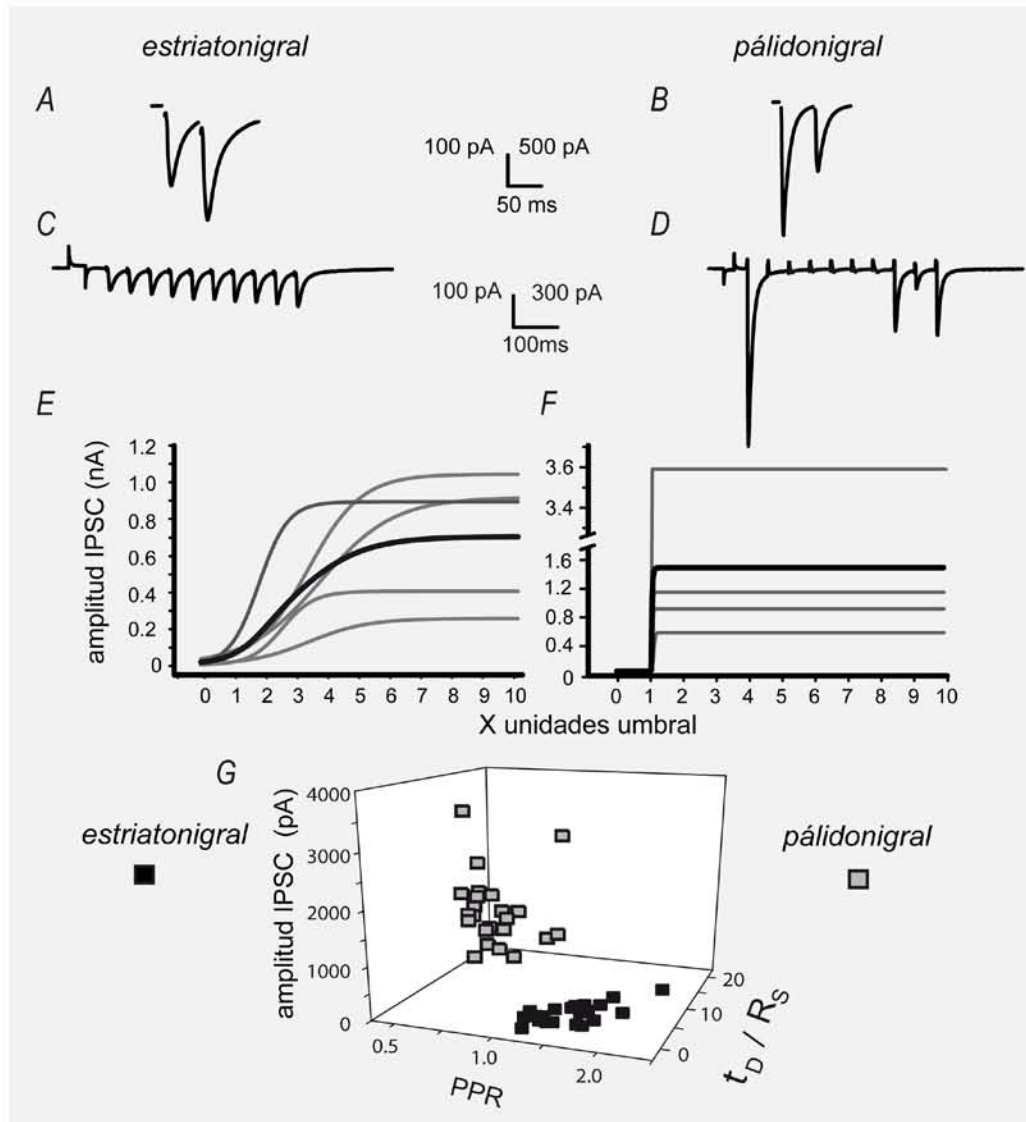
Estas características coinciden con el único reporte previo (Connelly et al., 2010) y fueron verificadas cualitativamente evocando estímulos ya sea desde el neostriado o el globo pálido externo (dato no mostrado).

Además realizamos

5. La función “Intensidad del estímulo vs. amplitud de la corriente” (I-A) ajustándola a una función sigmoideal de tres parámetros (Tecuapetla et al., 2005; Figura 6) de la forma:

$$A(I) = \frac{A_{\max}}{1 + e^{-k(I-I_h)}}$$

Donde A(I)= amplitud de las IPSC como función de la intensidad del estímulo,  $A_{\max}$ = la amplitud máxima alcanzada, k = el factor pendiente o de reclutamiento de terminales sinápticas e  $I_h$  = la intensidad del estímulo necesaria para alcanzar la mitad de la amplitud máxima. Todos estos parámetros fueron significativamente diferentes cuando se compararon ambas vías (estriato vs. pálido nigrales):  $A_{\max} = 430 \pm 3$  pA vs.  $1512 \pm 10$  pA (n = 8; P < 0.0001); k =  $3.6 \pm 0.3$  vs.  $14 \pm 5$  (n = 8; P < 0.0001);  $I_h$ :  $2.3 \pm 0.2$  vs.  $1.1 \pm 0.1$  (n = 8; P < 0.005).



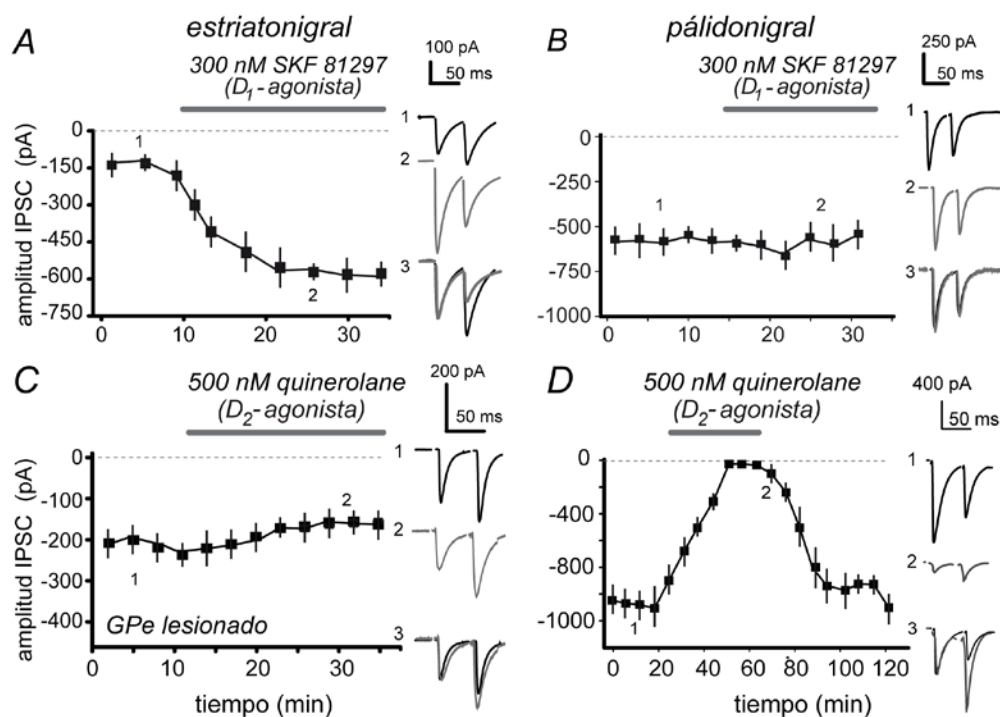
**Figura 6. Las corrientes posinápticas inhibitorias de las vías estriatonigral y pálidonigral son fáciles de diferenciar. (A)** Corrientes posinápticas inhibitorias estriatonigrales (IPSCs): exhiben facilitación de los pulsos pareados y son de menor amplitud. **(B)** IPSCs pálidonigrales: exhiben depresión de los pulsos pareados y son mayores. **(C)** La plasticidad de corto plazo (STP) de las terminales estriatonigrales es de facilitación. **(D)** La STP de las aferentes pálidonigrales es de depresión con fallas. **(E)** Las gráficas intensidad-amplitud (I-A) de las IPSCs estriatonigrales tienen forma sigmoidea. **(F)** Las gráficas I-A de las IPSCs pálidonigrales son cuasi-cuánticas: dan un brinco del umbral a su máxima amplitud y ya no cambian. El ajuste I-A usa:  $A(I) = A_{max} / (1 + e^{-k(I-I_{th})})$ ; ver texto. Todos los parámetros fueron significativamente diferentes. **(G)** Gráfica de grupos: muestra que las IPSCs provenientes de cada vía pueden ser separadas (lo son a simple vista durante el experimento). PPR = razón de pulsos pareados,  $\tau_D / R_s$  = cte. de tiempo de decaimiento de las IPSCs,  $R_s$  = tiempo al pico de las IPSCs.

Además, lo anterior coincide con las características previamente reportadas para las IPSCs estriatonigrales (Radnikow y Misgeld, 1998; Wallmichrath y Szabo, 2002; Beurrier et al., 2006; Chuhma et al., 2011), así como las características de las IPSCs de origen palidial haciendo sinapsis en otros núcleos (Tecuapetla et al., 2005; Baufreton et al., 2009), y la comparación de Connelly et al. (2010) Lo anterior sugiere funciones totalmente diferentes para cada una de estas vías.

Ahora nos preguntamos: ¿Será diferente la modulación presináptica, por agonistas dopaminérgicos selectivos, de las clases  $D_1$  y  $D_2$ , en las terminales de estas vías?.

La activación del receptor  $D_1$  a concentraciones nanomolares incrementa la IPSC estriatonigral (Radnikow y Misgeld, 1998; Chuhma et al., 2011) alrededor de  $153 \pm 10\%$  (300 nM de SKF81297;  $n = 15$ ;  $P < 0.001$ ), mientras que la RPP decrece de  $1.4 \pm 0.13$  en el control a  $1.0 \pm 0.12$  durante SKF 81297 ( $P < 0.001$ ), confirmando la modulación presináptica (Figura 7A). Estas acciones son reversibles y bloqueadas por 100 nM del antagonista del receptor  $D_1$ : SCH 23390 ( $n = 5$ ; no mostrado aquí pero ver mas abajo), indicando que a esta concentración el agonista es altamente selectivo. Por el contrario, los agonistas del receptor  $D_1$  no tienen efectos significativos sobre las IPSC pálido-nigrales a estas concentraciones.

Resultados opuestos se obtuvieron con el uso de agonistas selectivos para los receptores de la clase  $D_2$  (e.g., 500 nM de quinolorane): las IPSCs estriatonigrales no sufrieron cambios significativos (Figura 7C;  $n = 5$  NS; Chuhma et al., 2011) mientras que las IPSCs pálido-nigrales fueron decrementadas significativamente (Figura 7D):  $73 \pm 18\%$  ( $n = 19$ ;  $P < 0.0001$ ). La RPP incrementó de  $0.76 \pm 0.1$  a  $1.83 \pm 0.2$  ( $P < 0.001$ ), indicando la acción presináptica. Estas acciones fueron reversibles y bloqueadas por 500 nM de sulpiride, un antagonista de receptores de la clase  $D_2$  ( $n = 5$ ; no se muestra aquí pero ver abajo).



**Figura 7. Acciones diferentes de los agonistas de los receptores a dopamina de las clases D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> sobre las IPSCs estriatonigrales y páldonigrales:** (A, B) 100 nM del agonista de los receptores de la clase D<sub>1</sub>: SKF 81297 incrementa la IPSCs estriatonigrales pero no tienen efecto sobre las terminales páldonigrales. (C, D) 500 nM del agonista de los receptores de la clase D<sub>2</sub>: quinelorane, no tienen acciones significativas sobre las IPSCs estriatonigrales (en algunos casos el GPe fue lesionado para evitar contaminación de las aferentes páldonigrales) pero decretan, reversiblemente, las IPSC páldonigrales. Nótese los cambios de RPP que acompañan a estas acciones. El registro 3 de cada cuadro es la superposición de los registros 1 y 2 después de la normalización respecto de la primera IPSC para apreciar mejor los cambios en la RPP.

En resumien, la acción del agonista de la clase D<sub>1</sub> incrementa las IPSCs estriatonigrales (Floran et al., 1990; Radnikow y Misgeld, 1998; Chuhma et al., 2011), pero no tiene acción sobre las IPSCs páldonigrales (Figura 7), mientras que la acción del agonista de la clase D<sub>2</sub> decreta las IPSCs páldonigrales, sin acciones significativas sobre la vía estriatonigral (Figura 7).

Por lo tanto, no sólo la dinámica sináptica entre las dos entradas es diferente si no que su respuesta a la dopamina es distinta debido a que expresa las dos diferentes familias de receptores.

Además, estos resultados nos fuerzan a inferir que los reportes previos de inhibición mediada por los receptores D<sub>1</sub> sobre las terminales estriatonigrales

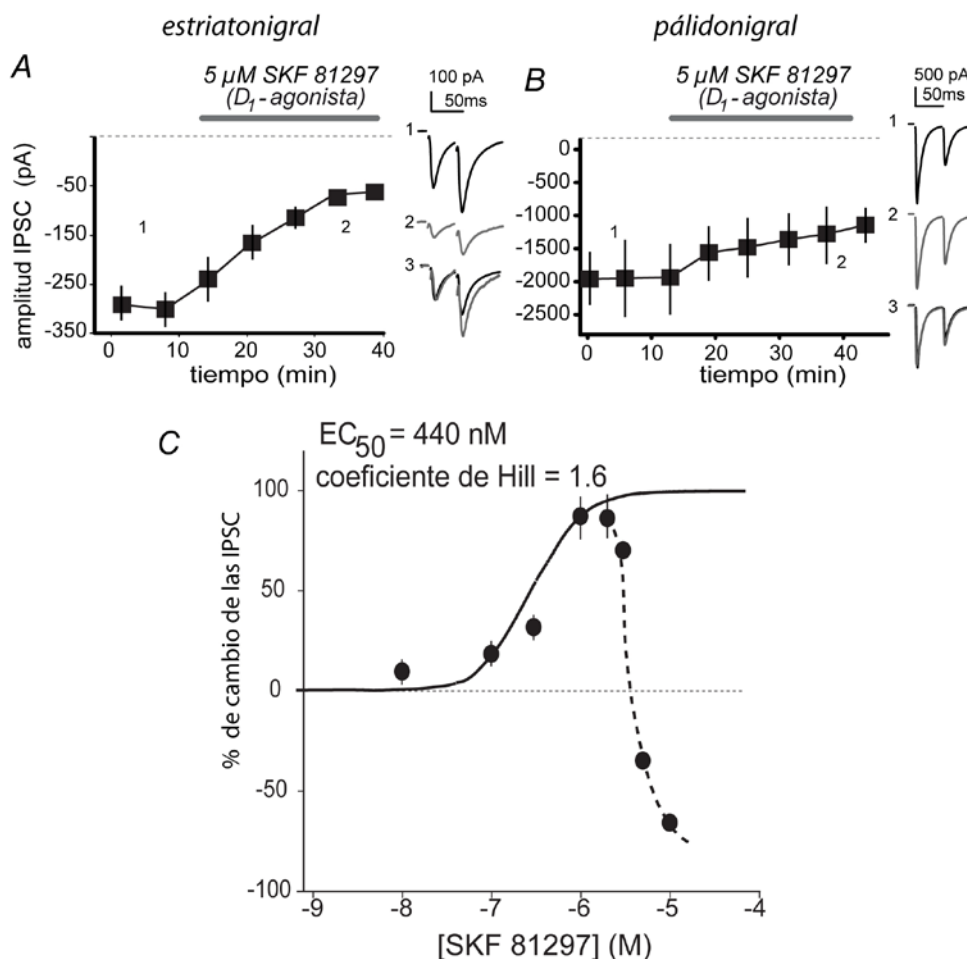
(Miyazaki y Lacey, 1998b) implicaban una acción inespecífica, una contaminación palidial, o ambas.

Para evaluar esta hipótesis usamos concentraciones micromolares del agonista D<sub>1</sub> mientras se provocaban IPSCs en cada una de las vías.

Las Figuras 8 A y B muestran los efectos de 5  $\mu$ M de SKF 81297: se decrementan las IPSCs de ambas vías: en las estriatonigrales  $82 \pm 13\%$  ( $n = 18$ ;  $P < 0.001$ ) y en las palidonigrales  $35 \pm 15\%$  ( $n = 6$ ;  $P < 0.005$ ). Sin embargo estas acciones no pueden ser bloqueadas por el antagonista SCH 23390 (no mostrado), lo que sugiere inespecificidad.

Una prueba final la constituye la relación concentración respuesta (C-R) del agonista D<sub>1</sub> SKF 81297: la gráfica es bifásica (Figura 8C). El ajuste de la ecuación de Hill para la parte ascendente señala una EC<sub>50</sub> de  $440 \pm 60$  nM y un coeficiente de Hill de  $1.6 \pm 0.2$ , sugiriendo cooperatividad y acciones específicas solamente a concentraciones submicromolares. El que las entradas sinápticas palidonigrales sean afectadas usando concentraciones micromolares confirma que las acciones no son específicas (Figura 8).





**Figura 8. Relación concentración-respuesta del agonista D1 SKF 81297.** (A, B)  $5 \mu\text{M}$  de SKF 81297 decremanta las IPSCs provocadas tanto de las terminales estriatonigrales como pálido nigrales. El registro de muestra # 3 es la superposición de los registros 1 y 2 después de la normalización de la primera IPSC para apreciar mejor los cambios en la RPP. (C) Relación concentración-respuesta (curva C-R). Note que arriba de las  $3 \mu\text{M}$  del agonista las IPSCs de ambas vías decaen. La parte ascendente de la C-R fue ajustada con la ecuación de Hill encontrando una  $EC_{50}$  submicromolar.

Dado que las concentraciones eficaces de los agonistas eran del orden nanomolar, hipotetizamos que, acaso, la dopamina endógena, presente en el espacio intersticial, fuese capaz de ejercer una acción tónica y constante sobre los receptores dopaminérgicos. Esta probabilidad es de relevancia para la terapéutica de los Parkinsonismos y otras enfermedades motoras, pues sería indicativo de las dosis eficaces.

La Figura 9 ilustra que la hipótesis es correcta. Las Figuras 9 A y B muestran que 50 nM del antagonista de los receptores de la clase  $D_1$ , SCH 23390, son suficientes para inhibir las IPSCs estriatonigrales sin tener acciones significativas sobre las IPSCs pálido-nigrales. Esto es, la dopamina endógena mantiene de manera tónica y constante la amplitud; es decir, la función, de las terminales estriatonigrales de la vía indirecta. Así, sin dopamina, la influencia de la vía directa se colapsa. Las IPSCs estriatonigrales decrecieron de  $319 \pm 75$  pA en el control a  $150 \pm 11$  pA después de 50 nM de SCH 23390 ( $n = 12$ ;  $P < 0.02$ ). Las Figuras 9 C y D confirman este hallazgo y además, muestran que la potencia y rapidez de la acción del agonista del receptor  $D_1$  es dependiente de la concentración. Las IPSCs estriatonigrales son reducidas –virtualmente abolidas– cuando la concentración del antagonista alcanza 1  $\mu$ M (Figura 9C). El efecto es reversible (no se muestra). Se ilustran trazos representativos de antes y después de las drogas así como su superposición normalizada. La RPP incrementa de  $1.9 \pm 0.4$  en el control a  $2.4 \pm 0.6$  después de SCH 23390 en las IPSCs estriatonigrales ( $n = 21$ ;  $P < 0.001$ ; cuando las IPSCs totalmente abolidas la RPP no puede ser medida); confirmando la acción presináptica.

Podemos imaginar lo que sucedería en ausencia de dopamina (e.g., Parkinsonismos): la vía directa, de la cual dependen los movimientos dirigidos a metas, es abolida. Los receptores  $D_1$  en las terminales de la vía directa estriatonigral son detectores sensibilísimos de la concentración extracelular de dopamina. Como si estas terminales necesitaran de la dopamina para ser funcionales. Razón más que suficiente para explicar la acinesia en caso de ausencia de dopamina.

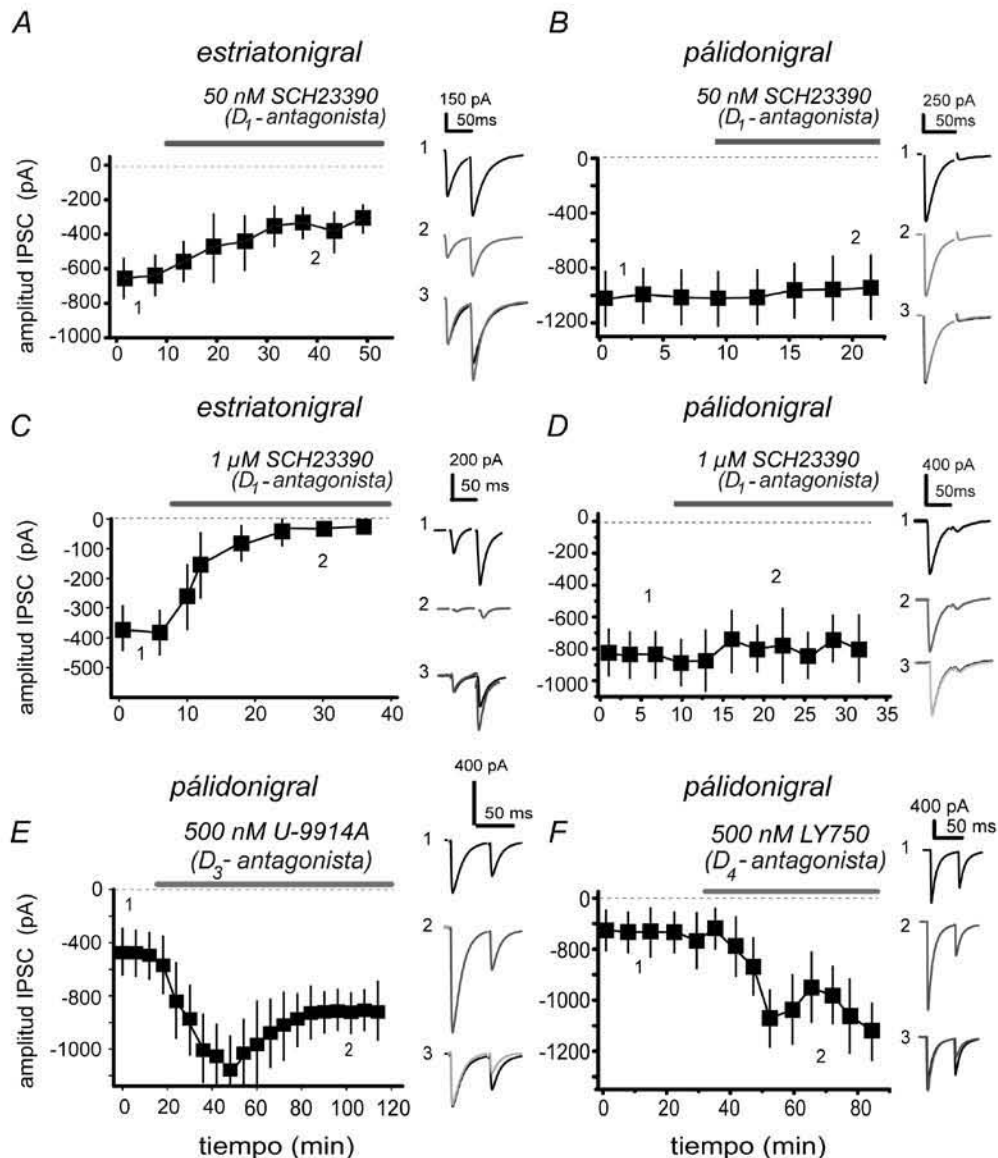
Sin embargo, el antagonista  $D_1$ , SCH 23390, no produce ninguna acción sobre las IPSCs pálido-nigrales a ninguna de las concentraciones probadas (submicromolares hasta 1  $\mu$ M; Figura 9D): La acción del receptor  $D_1$  está ausente en la vía pálido-nigral. Estamos ante dos entradas sinápticas funcionalmente distintas.

Las Figuras 9 E y F muestran las acciones de antagonistas selectivos de los receptores de dopamina de los subtipos D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> (familia D<sub>2</sub>). 500 nM de U 9914A, antagonista selectivo del receptor D<sub>3</sub>, incrementan las IPSCs pálido-nigrales en un  $262 \pm 16\%$  ( $n = 12$ ;  $P < 0.001$ ), mientras que la RPP decrece de  $0.87 \pm 0.08$  en el control a  $0.51 \pm 0.1$  durante el antagonista.

De la misma manera, 500 nM de LY 750, antagonista selectivo del receptor D<sub>4</sub> incrementa las IPSCs pálido-nigrales en un  $170 \pm 20\%$  ( $n = 7$ ;  $P < 0.001$ ), mientras la RPP decrece de  $0.78 \pm 0.07$  en el control a  $0.57 \pm 0.09$  durante el bloqueo. El antagonista sulpiride, genérico para los receptores de la clase D<sub>2</sub> tiene acciones similares (no mostrado): las IPSCs pálido-nigrales incrementan a  $150 \pm 14\%$  ( $n = 3$ ) mientras la RPP decrece de  $0.77 \pm 0.03$  en el control a  $0.35 \pm 0.01$ .

Para resumir, los receptores D<sub>3/4</sub> parecen estar presentes en las terminales pálido-nigrales (Murray et al., 1994; Bevan et al., 1996; Marshall et al., 2001; Rivera et al., 2003; Seeman et al., 2006; Acosta-García et al., 2009; Gasca-Martinez et al., 2010) y también son muy sensibles a la dopamina intersticial, cuyo efecto parece ser el mantener reprimida la fuerza de estas sinapsis. Esto es, en ausencia de la acción dopaminérgica estas terminales incrementan - mientras decrece la de las estriatonigrales.

El nivel tónico de dopamina intersticial mantiene funcional a la vía directa y reprimida a la indirecta en su rama pálido-nigral. La ausencia de dopamina inhibiría a la vía directa y aumentaría la influencia de la vía indirecta, tal como el modelo de tasa de disparo o de las dos vías postula.



**Figura 9. Los receptores presinápticos poseen sensibilidad por las concentraciones intersticiales de dopamina endógena. (A, B)** 50 nM del antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos, SCH 23390, son suficientes para decrementar las IPSCs estriatonigrales pero no tienen acciones sobre las IPSCs páldonigrales. **(C, D)** incrementando la concentración del antagonista a 1  $\mu$ M el bloqueo de las IPSCs estriatonigrales se vuelve mayor y más rápido, confirmando la dependencia de la concentración. La misma concentración del antagonista no tiene acción sobre las terminales páldonigrales. **(E)** 500 nM de U-9914A, antagonista selectivo del receptor tipo D3 incrementa significativamente las IPSCs páldonigrales. Sin embargo hay una reversión parcial de este efecto a pesar de mantener al antagonista en la perfusión. **(F)** 500nM de LY750, antagonista selectivo del receptor tipo D4, incrementa las IPSCs páldonigrales. Los paneles a la derecha de cada gráfica muestran registros representativos de antes y después de las drogas así como su superposición (3) después de la normalización del primer IPSC para apreciar mejor los cambios en la RPP cuando está presente.

Hemos reportado previamente que las terminales subtálamonigrales están tónicamente controladas por la dopamina intersticial mediante los receptores dopaminérgicos de las clases  $D_1$  y  $D_2$  (Ibáñez-Sandoval et al., 2006).

#### 4.1.1.4 Bloqueo de los receptores de Dopamina

El bloqueo de ambos receptores simultáneamente, incrementa las EPSCs subtálamonigrales (Ibáñez-Sandoval et al., 2006). Por lo tanto, es de esperarse que ante la ausencia de dopamina ambas ramas de la vía indirecta, la subtálamonigral y la pálidonigral, aumenten su fuerza sináptica, lo que concuerda con lo predicho por el modelo de las dos vías: la vía indirecta aumenta su función.

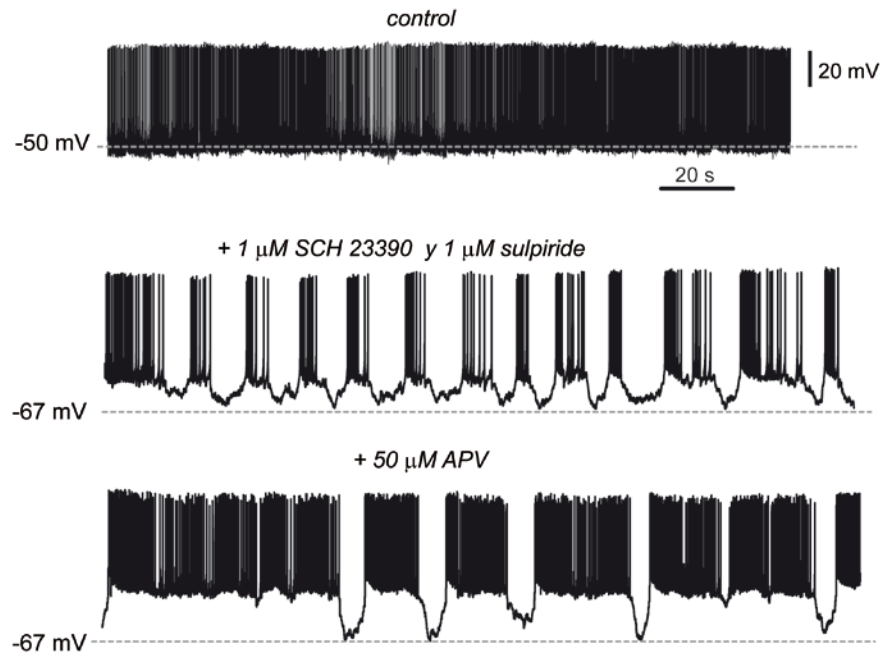
Debido a los resultados anteriores (Radnikow y Misgeld, 1998; Acosta-García et al., 2009; Chuhma et al., 2011) se formulo la siguiente hipótesis: el bloqueo agudo de ambas familias de receptor dopaminérgico:  $D_1$  y  $D_2$  terminará con la acción tónica de la dopamina endógena sobre las aferentes a los núcleos de salida, con el consecuente decremento de la vía directa estriatonigral y el consecuente incremento de la fuerza sináptica en ambas ramas de la vía indirecta: subtálamo y pálidonigral, que según el “modelo de las dos vías o de tasa de disparo”, desembocaría en el Parkinsonismo (Albin et al., 1989; DeLong 1990). Si esto es así, el “modelo oscilatorio” predice que el disparo de las neuronas de los núcleos de salida deben de entrar en un modo de disparo de tipo ráfagas oscilatorias (Raz et al., 2000; Levy et al., 2002; Hutchinson et al. 1997,2004): esto es, el signo electrofisiológico patognomónico del Parkinsonismo.

Para probar esta hipótesis (Figura 10) se bloquaron agudamente los receptores dopaminérgicos de las dos familias,  $D_1$  y  $D_2$ . Esto hizo que las neuronas de la Sustancia nigra reticulata cambiarán su patrón temporal de disparo preferente, de tónico (control), a disparo en ráfagas recurrentes oscilatorias ( $n = 7$ ;  $P < 0.001$ ); es decir, al disparo propio del Parkinsonismo.

Lo mismo sucede al aumentar la influencia excitadora del núcleo subtalámico con NMDA o bloquear la vía directa con bicuculina (Ibáñez-Sandoval et al., 2007; Hammond et al., 2007; Walters et al., 2007; Walters y Bergstrom, 2009; Zold et al., 2009). Las transiciones entre disparo tónico en ráfagas recurrentes se da en forma fisiológica espontánea, aunque rara vez (Ibáñez-Sandoval et al., 2007).

Nosotros pudimos provocar esta transición al bloquear los receptores dopaminérgicos (Figura 10).

Para evidenciar si el circuito oscilador núcleo subtalámico-globo pálido externo está influyendo en la generación del disparo oscilatorio se agregó el antagonista del receptor NMDA (APV 50 mM). Para provocar un bloqueo parcial de la influencia del núcleo subtalámico (una suerte de subtalectomía parcial farmacológica). El resultado es que el patrón de disparo se vuelve menos oscilante y más tónico (Ibáñez-Sandoval et al., 2007). Sin embargo, el disparo es abruptamente interrumpido por hiperpolarizaciones súbitas, muy probablemente provenientes de las entradas palidales.



**Figura 10. El bloqueo agudo de los receptores de dopamina de ambas clases genera disparo oscilatorio en ráfagas de las neuronas de la SNr.** Arriba: disparo espontáneo tónico, patrón temporal de disparo usual registrado en las neuronas de la SNr en condiciones control. En medio: el bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos de las clases D1 y D2 (1  $\mu$ M de SCH23390 más 1  $\mu$ M de sulpiride) cambia el patrón temporal de disparo de las neuronas de la SNr de tónico a oscilatorio en ráfagas, comúnmente encontrado durante el Parkinsonismo. Abajo: el bloqueo parcial de la influencia del NST (50  $\mu$ M de APV) produce un regreso al disparo tónico aunque frecuentemente interrumpido por fuertes hiperpolarizaciones repentinas.

#### 4.1.1.5 Consecuencias funcionales de la separación funcional de las aferencias nigrales y sus diferentes receptores presinápticos

Los datos presentados hasta ahora indican que las concentraciones tónicas de dopamina están constantemente sensadas por los receptores a dopamina presentes en las terminales sinápticas de las aferentes nigrales. Datos previos en el laboratorio señalan esto para la vía excitadora subtalamonigral, última escala de la vía indirecta.

En esta Tesis se muestra para la vía directa estriatonigral (receptor  $D_1$ ) y para la vía pálido-nigral (receptores  $D_3/D_4$ ), rama alternativa de la vía indirecta.

Se Debe inferir entonces que el modelo fisiopatológico de las dos vías para explicar el Parkinsonismo se cumple en los núcleos de salida, e.g, la Sustancia nigra reticulata: la ausencia de dopamina causará un aumento de la influencia de la vía indirecta, involucrando al oscilador globo pálido externo-núcleo subtalámico, y una disminución de la vía directa. El resultado final es un cambio en el patrón temporal de disparo de las neuronas nigrales, del disparo tónico observado mayoritariamente en situación control, al disparo en ráfagas oscilatorias tal y como se registra mayoritariamente en pacientes y animales Parkinsonianos.

## **4.1.2 Plasticidad sináptica estriatonigral**

### **4.1.2.1 La facilitación o depresión sinápticas de la vía estriatonigral depende de la activación de los receptores a NMDA**

Estos experimentos se realizaron estimulando la vía estriatonigral con trenes de alta frecuencia (HFS): dos trenes de estimulación a 100 Hz (Mendoza et al., 2006; Rueda-Orozco et al., 2009). Con el propósito de conocer qué tipo de plasticidad sináptica se provoca con estos trenes y si alguna de ellas puede ser de largo plazo.

Los cursos temporales de la Figura 11 ilustran IPSCs estriatonigrales antes y después del protocolo mencionado (HFS) bajo dos diferentes condiciones: La primera condición incluye los bloqueadores de los receptores ionotrópicos al glutamato: 10  $\mu$ M de 6-cyano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), antagonista del receptor AMPA/KA y 50  $\mu$ M de ácido (2*R*)-amino-5-fosfonovalerico (APV), antagonista del receptor NMDA (Ibañez-Sandoval et al., 2006; Rueda-Orozco et al., 2009) (Figura 11A). Observe que después de la estimulación, la plasticidad



que se presenta en las corrientes es la de pasar por un periodo breve de potenciación postetánica, para después mantener incrementada su amplitud respecto del control, por más de 20 min, una vez terminada la estimulación.

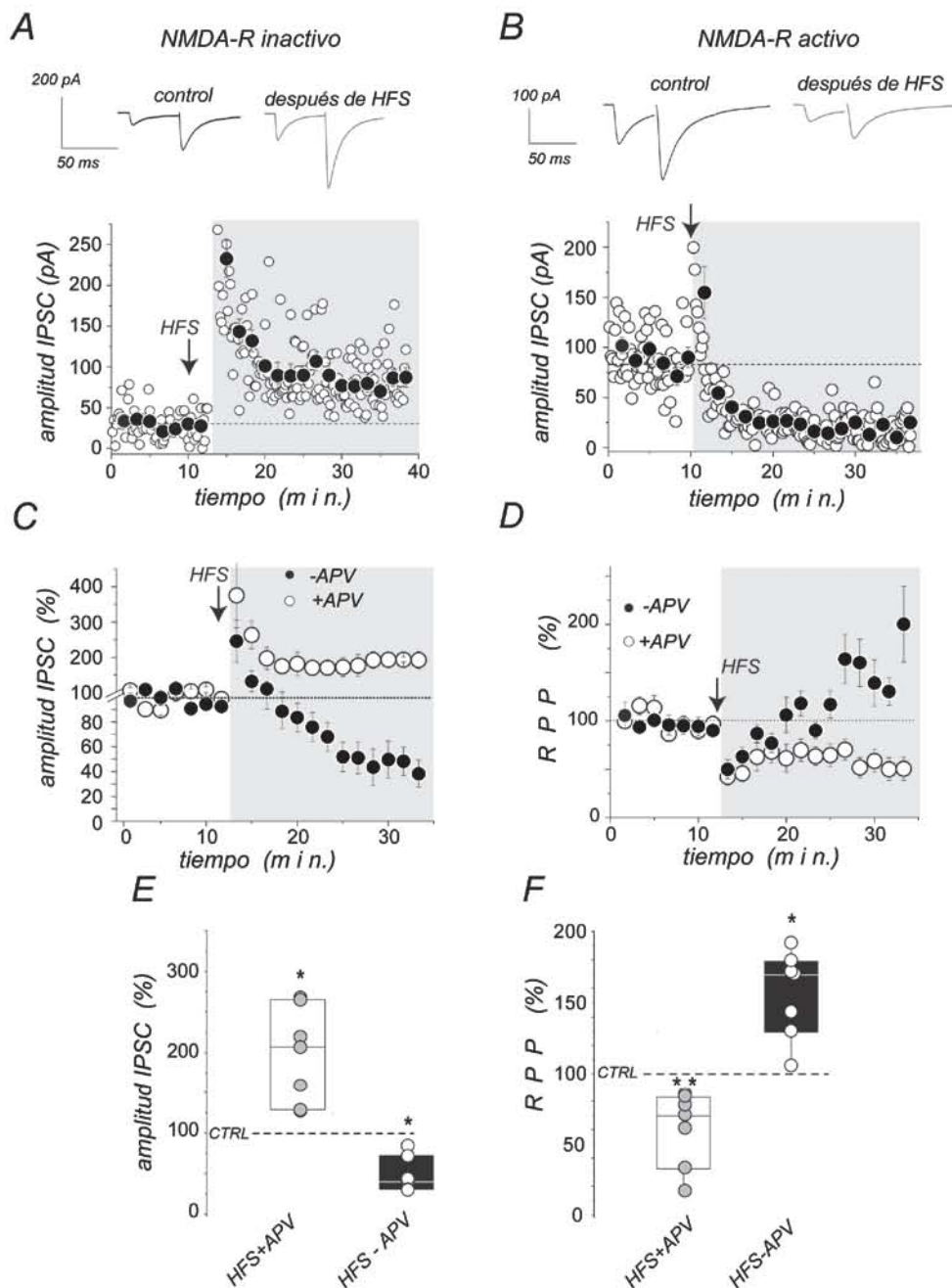
La segunda condición suprime al antagonista APV de la solución salina para que al aplicar el estímulo se activen los receptores a glutamato del tipo NMDA, presentes en las sinapsis subtálamonigrales (Ibañez-Sandoval et al., 2006, 2007; Aceves et al., 2011) (Figura 11B). Bajo esta condición la plasticidad encontrada es exactamente la opuesta: las IPSCs estriatonigrales decremantan su amplitud y se mantienen deprimidas por más de 20 minutos después de la HFS. Los paneles superiores en las Figuras 11A y B muestran las IPSCs resultado de pulsos 10 minutos antes (control izq.) o después de la HFS: entre los minutos 30 y 40, del curso temporal.

Los cursos temporales de la Figura 11C ilustran las medias  $\pm$  los errores estándar (SEM) de las amplitudes normalizadas de las IPSCs a lo largo del tiempo, en las dos condiciones y en las dos muestras distintas de experimentos: Cuando los receptores NMDA están bloqueados (en APV), la amplitud de las IPSCs se mantiene alrededor de 200% por encima del valor control por más de 20 minutos después de la HFS ( $n = 7$ ; Figura. 11C, círculos vacíos HFS+APV;  $P < 0.001$ ). Cuando se activan los receptores a NMDA (en ausencia de APV), se induce una depresión duradera de 40% comparada con el control ( $n = 7$ ; Figura 11C, círculos llenos HFS-APV;  $P < 0.001$ ).

La Figura 11D muestra que los cambios en la amplitud son acompañados por cambios contrarios en la RPP: en el caso de la facilitación hay un decremento (círculos vacíos;  $P < 0.03$ ) y en el caso de la depresión hay un incremento (círculos llenos;  $P < 0.001$ ), sugiriendo que ambos fenómenos tienen una contribución presináptica.

Usamos gráficas de cajas (Tukey) y de densidad para ilustrar las distribuciones de ambos parámetros en las dos muestras (Figuras 11E y F).

En resumen, el mismo protocolo de estimulación (HFS) genera dos tipos distintos de plasticidad en las mismas neuronas postsinápticas (sustancia nigra reticulata) y estimulando las mismas aferentes estriatonigrales: facilitación duradera cuando no se activan los receptores a NMDA postsinápticos, o depresión duradera cuando sí se activan los receptores a NMDA. Como si el receptor NMDA fuera una especie de interruptor que puede cambiar el sentido de la plasticidad de una facilitación a una depresión en la misma sinapsis. En lo que resta de la Tesis, describiremos los mecanismos que explican estos fenómenos.



**Figura 11. Facilitación o depresión duraderas de las IPSCs estriatonigrales** **A)** Curso temporal en la amplitud de IPSCs estriatonigrales antes y después de la estimulación de alta frecuencia (HFS, flecha): los círculos vacíos representan respuestas individuales con su variación cuántica y los círculos llenos son promedios de 10 respuestas. La primera IPSC del par se utiliza para construir el curso temporal. RPP = amplitud de IPSC2 / amplitud de IPSC1. Hay un breve periodo de potenciación posttánica seguido de una facilitación sostenida de las IPSC (en CNQX y APV). **B)** Experimento similar al que se muestra en (a) salvo que el APV está ausente (los NMDA-R están activos): la potenciación posttánica seguida por una depresión persistente de las IPSCs. En los márgenes superiores de (a) y (b): respuestas pareadas representativas antes y después de la HFS. **C)** Medias normalizadas de experimentos similares en dos muestras: con bloqueo de los NMDA-R (+APV, círculos vacíos, n = 7) y con NMDA-R activos (-APV, círculos llenos, n = 7). **D)** Medias normalizadas de las RPP (+APV, círculos vacíos y -APV, círculos llenos). **E-F)** Gráficas de caja y de densidad mostrando las distribuciones de las muestras (\* p < 0,001, \*\* p < 0,03)

#### 4.1.2.2 El papel de los receptores de dopamina D<sub>1</sub> sobre la facilitación sináptica estriatonigral

Intentamos encontrar el papel de la modulación dopaminérgica en la facilitación estriatonigral que se presenta después de la estimulación (HFS). En la Figura 12 se ilustran los experimentos dirigidos a ese fin. Ya se sabe que una característica distintiva de la sinapsis estriatonigral es la expresión de receptores presinápticos a dopamina de tipo D<sub>1</sub>. Estos receptores incrementan la amplitud de las IPSCs y por lo tanto la liberación de GABA de la vía estriatonigral (Radnikow y Misgeld, 1998; Yanovsky et al., 2003; Aceves et al., 2011; Chuhma et al., 2011). Por otro lado, ya expusimos que estos receptores presinápticos parecen estar continuamente modulados por los niveles extracelulares de dopamina (Yanovsky et al., 2003; Aceves et al., 2011). Estos niveles podrían aumentar mucho después de la HFS y permanecer elevados durante un largo tiempo (Cheramy et al., 1981; Reynolds et al., 2001; Wickens, 2009).

Observamos que cuando se agrega al baño de perfusión el antagonista de los receptores a dopamina de la clase D<sub>1</sub> (1  $\mu$ M SCH 23390), la HFS ya no es capaz de producir facilitación sináptica aunque los receptores a NMDA estén bloqueados. Por el contrario, se genera una fuerte depresión (Figura 12 A y B para los promedios de la muestra) que se suma a la producida por el antagonista (ver arriba), acompañada de un incremento de la RPP ( $n = 9$ ;  $P < 0.01$ ; inserto y Figura 12B, círculos llenos). La potenciación postetánica todavía puede ser provocada. El decremento en la amplitud de las IPSCs, sólo por la presencia de SCH-23390 (media  $\pm$  SEM) fue de  $27 \pm 9\%$  (Figura 12B círculos vacíos;  $n=9$ ;  $P<0.01$ , la barra indica la presencia del antagonista; Yanovsky et al., 2003; Aceves et al., 2011). El aumento en la depresión sináptica después de la HFS, en la presencia de SCH-23390, fue de  $60 \pm 19\%$  (Figuras 12 A y B círculos vacíos;  $P<0.001$  – vs. el control y  $P<0.02$  – vs. SCH-23390). Por lo tanto, el antagonista de los receptores D<sub>1</sub> es suficiente para bloquear la inducción de la facilitación duradera de la sinapsis estriatonigral.

El experimento opuesto, es decir, el uso de 500 nM SKF-81297, agonista selectivo de los receptores  $D_1$ , produce, como es de esperar, acciones opuestas: se facilitan las IPSCs por la sola presencia del agonista (Figura 12C) (Radnikow y Misgeld, 1998; Aceves et al., 2011; Chuhma et al., 2011). El incremento es significativo y no presenta signos de desensibilización según se observa en muestras de experimentos similares:  $302 \pm 52\%$  (Figura 12D círculos vacíos;  $n = 6$ ;  $P < 0.001$ ), y se acompaña de un decremento en la RPP:  $76 \pm 19$  (Figura 12D círculos llenos;  $P < 0.01$ ). La nula sensibilización apoya el hallazgo de que el nivel funcional de la sinapsis esté relacionado con la concentración extracelular de dopamina.

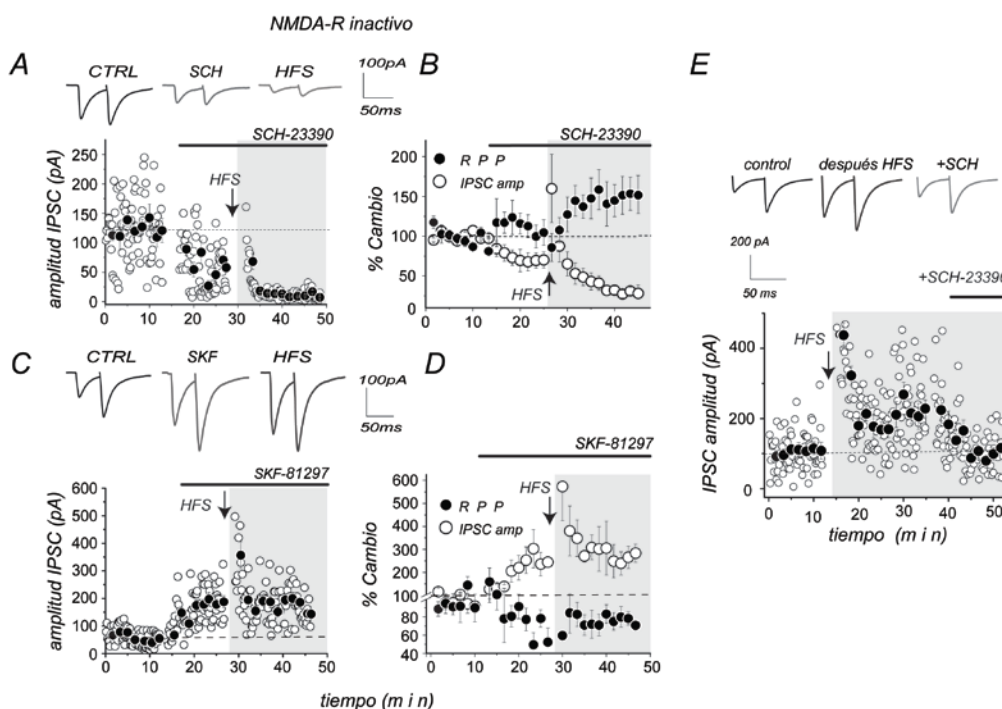
Cuando aplicamos la estimulación (HFS) después de la activación del receptor tipo  $D_1$ , los efectos son ocluidos (después de 10 min en la presencia de SKF-81297 mas CNQX y APV durante registros de amplitud estable). La potenciación postetánica no fue afectada sugiriendo que existe un margen para que las IPSC puedan crecer. El hecho de que la facilitación sináptica fuera producida por un agonista de dopamina el cual ocluye las acciones de la estimulación sugiere que ambos fenómenos tienen la misma causa: la modulación presináptica de las sinapsis estriatonigrales por la activación del receptor  $D_1$  (Radnikow y Misgeld, 1998; Guzmán et al., 2003; Mizuno et al., 2007; Tecuapetla et al., 2007; Aceves et al., 2011; Chuhma et al., 2011). Esto sugiere que aunque la facilitación observada es de largo plazo no constituye una potenciación de largo plazo (LTP), que produzca cambios estructurales permanentes, y sí una modulación que representa los niveles de dopamina.

Debido a estos resultados decidimos administrar el antagonista de los receptores tipo  $D_1$  ( $1 \mu\text{M}$  SCH-23390) para observar si es capaz de revertir la facilitación duradera ya estabilizada subsecuente a la HFS. La Figura 12E muestra que ese es el caso ( $n = 7$ ;  $P < 0.004$ ), indicando que ningún cambio estructural o permanente es producido por la HFS y que la facilitación sináptica se debe a la modulación dopaminérgica y no a la plasticidad sináptica de largo plazo (LTP).

Como las neuronas de la sustancia nigra reticulata son registradas con una solución interna rica en  $\text{Cs}^+$  y QX-314, que bloquea la mayoría de las corrientes

postsinápticas intrínsecas, y los registros se realizan a un potencial de mantenimiento de -80 mV, donde la mayor parte de las corrientes intrínsecas están inactivas, además de que los cambios llevan consigo una modificación de la RPP sin cambios en la resistencia de entrada postináptica, podemos concluir que la facilitación es la modulación dopaminérgica presináptica ya descrita. (Floran et al., 1990; Radnikow y Misgeld, 1998; Aceves et al., 2011).

La facilitación es duradera pues los niveles de dopamina endógena aumentan por mucho tiempo como resultado de la HFS (Cheramy et al., 1981; Reynolds et al., 2001; Wickens, 2009).



**Figura 12. La facilitación sináptica estriatonigral depende de dopamina.** Los experimentos fueron hechos en la presencia de CNQX+APV. **A)** Curso temporal de las amplitudes de las IPSC estriatonigrales durante la adición del antagonista de los receptores D1, 1  $\mu$ M SCH-23390 (barra horizontal): ya no se puede inducir la facilitación y en su lugar hay depresión. **B)** Medias normalizadas en una muestra experimental: IPSC = círculos vacíos, RPP = círculos llenos ( $n = 9$ ;  $P < 0.001$  SCH+HFS). **C)** Curso temporal de la amplitud de la IPSC durante la adición de 500 nM de SKF81297, agonista de los receptores D1 (barra horizontal). El agonista facilita la sinapsis y además ocluye la acción de la HFS. Margen superior: respuestas pareadas representativas antes y después de la HFS. **D)** Medias normalizadas en la muestra experimental: Amplitud de las IPSC = círculos vacíos ( $n = 6$ ;  $P < 0.001$ ) y RPP = círculos llenos ( $n = 6$ ;  $P < 0.01$ ). **E)** La facilitación mediada por HFS (NMDA-R inactivos) se revierte por la adición del antagonista de los receptores D1: 1  $\mu$ M SCH-23390, mostrando que este efecto es mediado por la liberación endógena de dopamina después de la HFS y que no es LTP. Margen superior: respuestas pareadas antes y después de la HFS.

En síntesis, el bloqueo de los receptores  $D_1$  impide la inducción de la facilitación y también la revierte una vez instalada y estable. Asimismo, la activación del receptor  $D_1$  mimetiza y ocluye la facilitación producida por el estímulo. Confirmando así que la dinámica de los pesos sinápticos en la vía directa estriatonigral depende de dopamina (Chase, 1998; Yanovsky et al., 2003; Aceves et al., 2011). Se infiere que un decremento en el tono dopaminérgico de la sustancia nigra reticulata provoca que las conexiones de la vía directa sean incapaces de adaptar sus pesos sinápticos y de responder a los comandos motores.

#### 4.1.2.3 Los receptores a cannabinoides $CB_1$ en la depresión sináptica estriatonigral

La facilitación de la sinapsis estriatonigral depende de una modulación activada por el receptor tipo  $D_1$ . Pero ¿qué receptor está a cargo de la depresión? Los receptores a cannabinoides del tipo  $CB_1$  se encuentran en altas concentraciones en la sustancia nigra reticulata y el globo pálido interno (Tsou et al., 1998; Egertova y Elphick, 2000; Mátyás et al., 2006; Wallmichrath y Szabo, 2002). Los receptores  $CB_1$  también modulan las conexiones estriatonigrales de manera presináptica (Szaboo et al., 2000; Wallmichrath y Szaboo, 2002; Misgeld, 2004; Yanovsky et al., 2003; Misgeld et al., 2007; Romo-Parra et al., 2009).

La Figura 13A muestra que con los receptores NMDA disponibles para ser activados durante la estimulación (Ibañez-Sandoval et al., 2006), el antagonista de los receptores a cannabinoides  $CB_1$ , 1  $\mu$ M AM-251, previene la inducción de la depresión sináptica por la estimulación de alta frecuencia (HFS), sugiriendo que los cannabinoides endógenos son liberados al espacio extracelular siendo los causantes de la depresión (Yanovsky et al., 2003). Nótese que el antagonista por sí solo no reduce las IPSCs, porque, no hay cannabinoides endógenos a concentración suficiente para ser sensada por los receptores si no hay

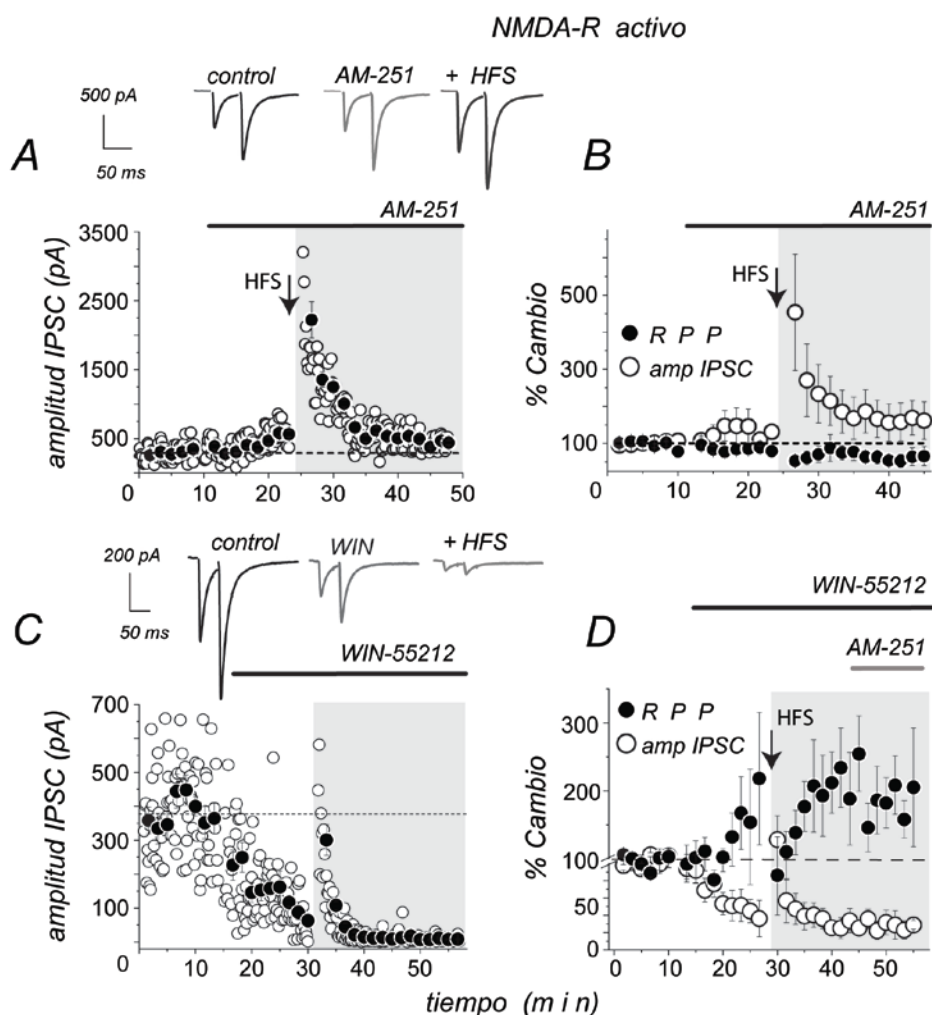
estimulación. La potenciación posttetánica se mantiene presente (Figuras 13 A y B; amplitud de IPSCs = círculos vacíos; RPP = círculos llenos;  $n=6$ ; NS). La tendencia aparente a tener facilitación en lugar de depresión (Figuras 13B, círculos vacíos) no es significativa. Lo anterior nos hizo inferir que la depresión sináptica provocada por la HFS cuando los receptores NMDA están disponibles, depende de los receptores a cannabinoides (Robbe et al., 2002; Chevaleyre y Castillo, 2003; Gerdeman y Lovinger, 2003; Chevaleyre et al., 2006; Robbe et al., 2006; Kreitzer y Malenka, 2007; 2008; Massey y Bashir, 2007; Ohno-Shosaku et al., 2007; Adermark et al., 2009).

La Figura 13C confirma que un agonista de los receptores  $CB_1$ ,  $10 \mu\text{M}$  WIN-55212, por sí solo decrementa la amplitud de las IPSCs estriatonigrales (Figura 13D: círculos vacíos) en un  $61 \pm 10\%$  ( $n = 6$ ;  $P < 0.05$ ) (Szaboo et al., 2000; Wallmichrath y Szaboo, 2002; Yanovsky et al., 2003; Misgeld, 2007; Romo-Parra et al., 2009). Esta acción es reversible y acompañada por un incremento en la RPP de  $154 \pm 21\%$  (Figuras 13D círculos llenos;  $n = 6$ ;  $P < 0.05$ ), indicando una acción presináptica.

Cuando la HFS es aplicada en presencia de WIN-55212, se logra una disminución mayor y más duradera en la amplitud de las IPSCs (Figuras 13C y D círculos vacíos):  $37 \pm 19\%$  ( $P < 0.002$ ) incluso si se compara con las IPSCs en presencia de WIN-55212 ( $P < 0.05$ ). En una muestra de experimentos ( $n = 4$ ) probamos el antagonista de cannabinoides,  $1\mu\text{M}$  AM-251, para observar si es posible revertir la depresión de largo plazo inducida por la HFS una vez que era estable. Se observó que en este caso, el antagonista no puede revertir la depresión instalada y estable (Figura 14D barra gris), lo que sugiere que esta depresión conlleva cambios estructurales en la sinapsis, es una verdadera depresión de largo plazo (LTD) y no una simple modulación dependiente de cannabinoides (e.g., Mulkey et al., 1994; Gerdeman y Lovinger, 2003; Hashimoto et al., 2005; Massey y Bashir, 2007; Sergeeva et al., 2007; Szabadits et al., 2011; Xue et al., 2011). Como una vez establecidos los cursos temporales con y sin AM-251, estos son similares, los datos se agruparon en el curso temporal ilustrado en la Figura 14D.



De manera similar a las sinapsis glutamatérgicas corticoestriatales, corticoacumbinales (Gerdeman et al., 2002; Kreitzer y Malenka, 2007; Shen et al., 2008; Robbe et al., 2002), hipocampales (Chevayleyre y Castillo, 2003; Ohno-Shosaku et al., 2007) y cerebelares (Safo y Regehr, 2005), la LTD estriatonigral depende de la actividad de los receptores presinápticos a cannabinoides CB<sub>1</sub>.



**Figura 13. La depresión es de largo plazo (LTD) y depende de endocannabinoides.** **A)** La presencia de un antagonista de los receptores CB<sub>1</sub>, 1  $\mu$ M AM 251 (barra horizontal), impide la inducción de la depresión. Margen superior: respuestas pareadas antes y después de la HFS. **B)** Medias normalizadas de la amplitud de las IPSCs (círculos vacíos) y las correspondientes RPPs (círculos llenos) en una muestra de experimentos ( $n = 6$ ; NS). La facilitación no es significativa. **C)** Curso temporal de las amplitudes de las IPSC durante la adición del agonista de los receptores CB<sub>1</sub> 10  $\mu$ M WIN 55212 (barra horizontal). Se deprime la amplitud de la IPSC y se incrementa la RPP ( $n = 6$ ;  $P < 0.05$ ). La posterior HFS produce una depresión más profunda y duradera. Margen superior: respuestas pareadas antes y después de la HFS. **D)** Medias normalizadas de la amplitud de las IPSC (círculos vacíos) y la correspondiente RPP (círculos llenos) ( $n = 6$ , WIN:  $P < 0.05$ ; WIN+HFS:  $P < 0.002$ ). En un grupo de experimentos ( $n = 4$ ) se añadió 1  $\mu$ M AM-251 (barra gris horizontal) una vez se estabilizaba: la depresión no fue revertida sugiriendo una verdadera LTD.

#### 4.1.2.4. Para provocar LTD en la sinapsis estriatonigral es necesario un incremento en el calcio intracelular de la postsinápsis

El incremento en el calcio intracelular generado por la activación del receptor NMDA en la sustancia nigra reticulata (Ibañez-Sandoval et al., 2006, 2007) podría ser necesario para inducir la síntesis de cannabinoides endógenos (e.g., Gerdeman et al., 2001; Robbe et al., 2002; Chevaleyre et al., 2003; Massey y Bashir, 2007; Ohno-Shosaku et al., 2007). Estos a su vez actuarían como mensajeros retrógrados para modular la presinápsis estriatonigral (Yanovsky et al., 2003).

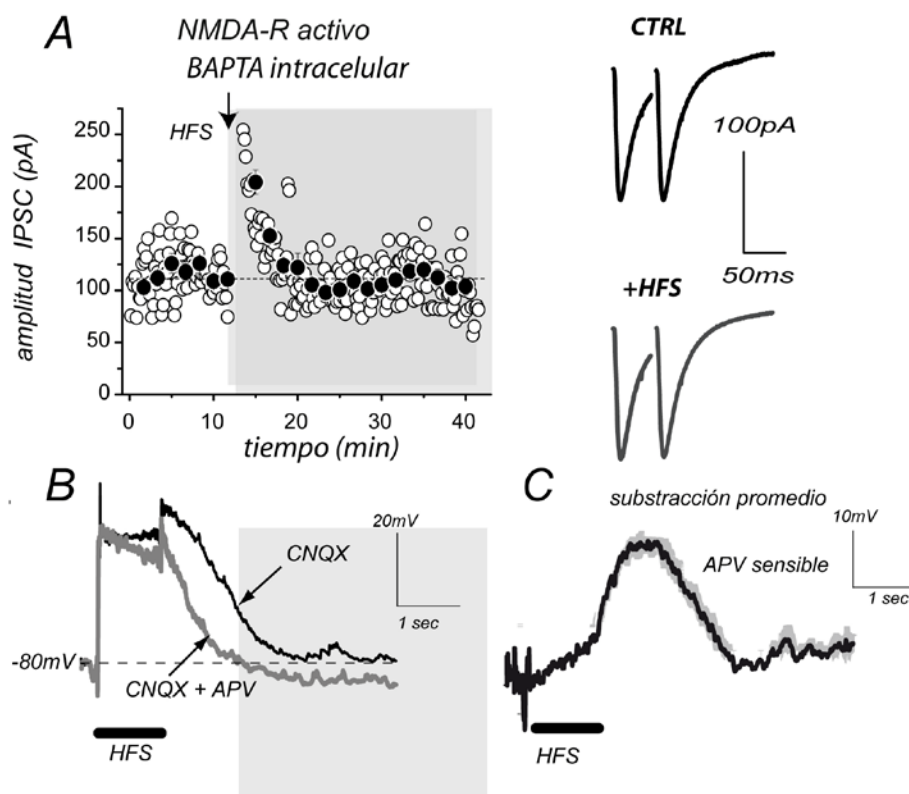
Para probar esta hipótesis se utilizó la HFS dejando activos a los receptores NMDA, maniobra que evoca una LTD (Figuras 11 B y C). Por lo contrario, si repetimos el experimento en presencia del quelador de calcio, 20  $\mu$ M BAPTA, en el medio intracelular (pipeta de registro), se impide la inducción de LTD después de la HFS (Figura 14A). Esto ocurre sin cambios en la RPP, indicando que la modulación presináptica fue impedida por una maniobra posináptica. (Figura 14A recuadro a la derecha) (Yanovsky et al., 2003; Chevaleyre et al., 2006; Hashimoto et al., 2007; Ohno-Shosaku et al., 2007).

Estimulando la sinapsis estriatonigral en fijación de corriente a -80 mV, así como altas concentraciones de cloro (ver Métodos) tales como las usadas para los experimentos anteriormente descritos en fijación de voltaje, provocamos eventos sinápticos GABAérgicos despolarizantes con la HFS. Esto se hizo en presencia de CNQX y APV y en presencia de CNQX sin APV. Al comparar las respuestas en ambas condiciones fue fácil identificar la contribución del receptor NMDA a la respuesta (Figuras 14B y C). La substracción de estas respuestas muestra que la contribución del receptor NMDA (Figura 14C) genera una despolarización lenta de más de 10 mV de amplitud y más de un segundo de duración (barra negra en

Figuras 15B y C;  $n = 6$ ;  $P < 0.02$ ; trazo en negro = media; en gris = SEM). Potenciales de membrana menos negativos sólo incrementarían este componente (Ibañez-Sandoval et al., 2006). Claramente, la activación del receptor NMDA puede ser una fuente de calcio intracelular para la síntesis de cannabinoides. (Ohno-Shosaku et al., 2007). Por lo tanto, se cumplen las condiciones para explicar porque los receptores NMDA pueden inducir la síntesis de cannabinoides y la depresión sináptica (Yanovsky et al., 2003), lo que no excluye la contribución de otros receptores (Surmeier et al., 2009). Se puede inferir que la quelación del calcio intracelular inhibe la síntesis de cannabinoides y la depresión de las IPSCs. Sin embargo, ni bloquear el receptor CB<sub>1</sub> ni quelar el calcio intracelular induce la facilitación de las IPSC cuando no hay depresión.

Cuando repetimos el experimento (Figura 15A) en la presencia de 1 $\mu$ M AM-251, el antagonista de los receptores CB<sub>1</sub>, tampoco se produjo facilitación sináptica significativa (resultados negativos no son mostrados). Así se concluye que la facilitación estriatonigral sólo se puede producir cuando los receptores NMDA están inactivos.

Las rutas de señalización para que esto ocurra no están claras: Tal vez se necesita de influencias polisinápticas inhibitorias sobre las neuronas dopaminérgicas (Iribe et al., 1999), la acción de los autorreceptores de dopamina tipo D<sub>2</sub> sobre las mismas neuronas dopaminérgicas (Giuffrida et al., 1999), o cascadas de señalización subsecuentes a la activación del receptor NMDA (Mulkey et al., 1994; Hashimoto et al., 2005; Massey y Bashir, 2007; Sergeeva et al., 2007; Szabadits et al., 2011; Xue et al., 2011), o bien, señalización que se expresa después de activar al receptor NMDA. Cualesquiera que sea la ruta se deja para futuras investigaciones. Incluso para la sinapsis corticoestriatal, algunas de estas vías de señalización son aun objeto de debate (Surmeier et al., 2009; Wickens, 2009) después de 20 años.



**Figura 14. Quelar el calcio intracelular postsináptico impide la depresión dependiente de cannabinoides. A)** Curso temporal de la amplitud de la IPSC estriatonigral antes y después de la HFS durante la adición del quelador de  $Ca^{2+}$  intracelular, 20  $\mu$ M de BAPTA, a través de la pipeta de registro (NMDA-R activos). El BAPTA impide la inducción de la depresión aunque sigue habiendo potenciación postetánica. Margen derecho: respuestas pareadas antes y después de la HFS ( $n = 8$ ; NS). **B)** Respuestas en fijación de corriente a la HFS en presencia de CNQX y en ausencia (trazo negro) o en presencia de APV (trazo gris). Las respuestas están separadas por un intervalo de 15 min. Las respuestas inhibitorias son despolarizantes por la presencia de alto cloro intracelular. **C)** La substracción de los trazos revela la contribución de los receptores NMDA ( $n = 6$ ;  $P < 0.02$ ). Media, trazo negro y límite de confianza de 95%, gris periférico.

#### 4.1.2.5 La señalización del receptor $CB_1$ prevalece sobre la señalización del receptor $D_1$

Tanto la facilitación como la depresión resultan ser provocadas por la activación de receptores presinápticos  $D_1$  y  $CB_1$ . Pero nos preguntamos ¿existe o queda algún tipo de plasticidad inducida por la HFS cuando ambos receptores son bloqueados?. Utilizamos los antagonistas, SCH 23390 ( $D_1$ ) y AM-251 ( $CB_1$ ), administrados de forma conjunta para observar los efectos de la HFS. No pudo ser provocado ningún cambio en la dinámica sináptica en presencia de los

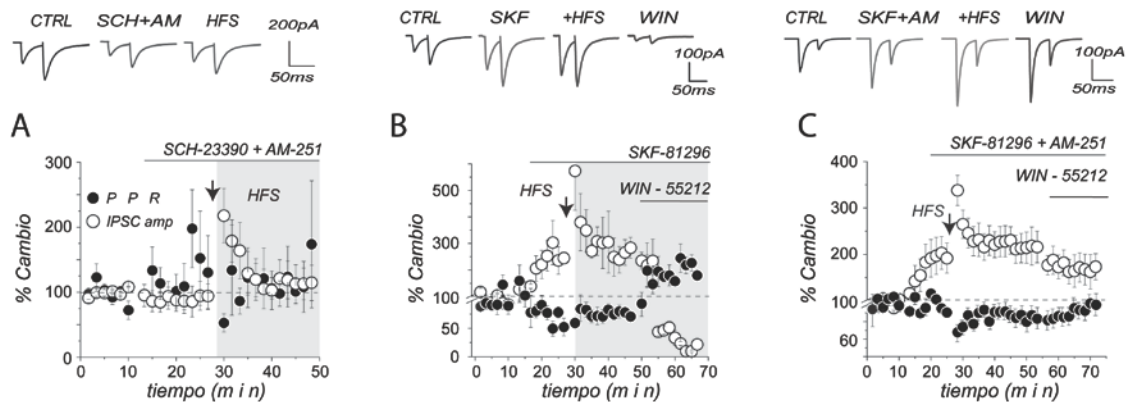
antagonistas (Figura 15 A). Sin embargo, la potenciación postetánica puede ser provocada en estas condiciones. Aunque estos experimentos no descartan otro tipo de plasticidad bajo diferentes paradigmas de estimulación, se apoya que las influencias opuestas, dopaminérgica y canabinérgica, pueden actuar como corre reguladores de la liberación de GABA en las conexiones estriatonigrales (Yanovsky et al., 2003).

Sin embargo, la LTD canabinérgica necesita al receptor NMDA activo para manifestarse, y aunque la sustancia nigra reticulata posee aferentes glutamatérgicas de otros sitios, no se puede dejar de pensar que una de las entradas glutamatérgicas más importantes proviene de la vía indirecta: la entrada subtálamonigral. En cambio, la facilitación sólo necesita de la vía directa.

Por lo tanto, para observar si estas podrían interactuar a nivel de la sustancia nigra reticulata es necesario saber cuál de las dos prevalece cuando ambos receptores presinápticos están activos. La Figura 15 ilustra qué pasa cuando la facilitación dopaminérgica es activada antes de que la depresión sea inducida por cannabinoides. La facilitación se provoca mediante la adición del agonista de los receptores  $D_1$ , 1  $\mu$ M SKF-81297, al baño de perfusión además de estimular (HFS). Cuando la facilitación alcanza un estado estable, se adiciona un agonista de los receptores  $CB_1$ , 10  $\mu$ M WIN-55212. Encontramos que la facilitación se convierte en depresión inmediatamente (Figura 15B, círculos vacíos;  $n = 8$ ;  $P < 0.002$ ) con un cambio concomitante en los pulsos pareados (Figura 15B, círculos llenos;  $P < 0.05$ ); lo cual corrobora que la facilitación no es una verdadera LTP. El siguiente experimento (Fig. 15C) muestra que la activación del receptor  $CB_1$ , es específica, puesto que puede ser bloqueada por su antagonista selectivo, 1  $\mu$ M AM-251. Por lo tanto, un antagonista de cannabinoides podría prolongar el incremento de la activación de la vía directa y así promover el movimiento (Kravitz et al., 2010).

Las terminales estriatonigrales están entonces sujetas a la influencia de los dos receptores presinápticos: el receptor  $D_1$  genera la facilitación y el receptor  $CB_1$  genera la depresión (Yanovsky et al., 2003), la facilitación es simplemente una modulación mientras que la depresión es una verdadera LTD dependiente de

cannabinoides actuando como mensajeros retrógrados, como se ha descrito en otras sinapsis (Gerdeman et al., 2002; Kreitzer y Malenka, 2005; 2007; Shen et al., 2008; Robbe et al., 2002; Chevaleyre et al., 2003; Safo y Regehr, 2005; Mendoza et al., 2006; Ohno-Shosaku et al., 2007). La actividad de las vías directa e indirecta puede llegar simultáneamente, o de forma alternada como se discute más adelante.



**Figura 15. La modulación canabinérgica puede suprimir a la dopaminérgica.** **A)** Medias normalizadas de la amplitud de las IPSCs (círculos vacíos) y sus correspondientes RPPs (círculos llenos) en una muestra de experimentos ( $n = 7$ ) en los cuales se agregó tanto el antagonista de los receptores D1,  $1 \mu\text{M}$  SCH-23390, como el de los receptores de cannabinoides CB1,  $1 \mu\text{M}$  AM-251, a la perfusión (NMDA-R inactivo). En estas condiciones ya no se puede inducir ni depresión ni facilitación. Margen superior: respuestas pareadas en un experimento representativo. **B)** Medias normalizadas de la amplitud de las IPSCs (círculos vacíos) y sus correspondientes RPPs (círculos llenos) en una muestra de experimentos ( $n = 8$ ) que exhiben facilitación mediada por  $500 \text{ nM}$  SKF 81297 y HFS. Una vez que la facilitación fue estable se activo el receptor CB1 con  $10 \mu\text{M}$  WIN-55212. La facilitación se tornó en depresión. Margen superior: respuestas pareadas representativas. **C)** Medias normalizadas de la amplitud de las IPSCs (círculos vacíos) y sus correspondientes RPPs (círculos llenos) en una muestra de experimentos ( $n = 8$ ) que exhiben facilitación mediada por el receptor D1 ( $500 \text{ nM}$  SKF-81297). Cuando se adiciona el antagonista de los receptores CB1,  $1 \text{ mM}$  AM-251, el agonista  $10 \mu\text{M}$  WIN-55212 ya no es capaz de cambiar la facilitación en depresión confirmando que las acciones presinápticas son específicas. Margen superior: respuestas pareadas representativas en cada condición.

## Capítulo V

### 5.1 Discusión

#### 5.1.1 Las IPSCs estriatonigrales son diferentes de las pálido-nigrales

Las IPSCs estriatonigrales son de menor amplitud y más lentas que las pálido-nigrales. Exhiben facilitación de corto plazo y son moduladas positivamente, esto es, aumentan su amplitud, cuando se activa al receptor  $D_1$  (Floran et al., 1990; Radnikow y Misgeld, 1998; Connelly et al., 2010; Chuma et al., 2011). En comparación, las IPSCs pálido-nigrales, además de ser de mayor amplitud, exhiben depresión de corto plazo (Connelly et al., 2010). Así que las dos aferencias inhibitorias exhiben características funcionales tan distintas que no pueden ser confundidas. Las IPSCs pálido-nigrales son reguladas negativamente por la activación de receptores de la clase  $D_2$  y no son moduladas por los receptores de la clase  $D_1$ . Como se sabe, la facilitación de corto plazo trabaja como filtro pasa altos mientras que la depresión de corto plazo sirve como filtro pasa bajos (Abbott y Regehr, 2004). Así que los papeles de ambos tipos de inhibición son muy diferentes en el microcircuito. Previamente se había reportado que las sinapsis excitadoras subtalamonigrales están controladas tanto por receptores de la familia  $D_1$  como de la familia  $D_2$  (Ibáñez-Sandoval et al., 2006).

Los agonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos ejercen sus acciones específicas a concentraciones nanomolares o sub-micromolares, a concentraciones mayores se vuelven inespecíficos, lo que explica contradicciones previas halladas en la literatura (Miyazaki y Lacey, 1998 vs. Radnikow y Misgeld, 1998), y muy probablemente, discrepancias similares con el circuito estriatal/accumbinal (Guzmán et al., 2003 vs. Taverna et al., 2005).

En esta Tesis demostramos que usando concentraciones sub-micromolares, la activación del receptor  $D_1$  con agonistas selectivos incrementa la liberación de

GABA en las terminales provenientes de las neuronas espinosas medianas de la vía directa. Mientras que la activación de receptores  $D_{3/4}$  reprime la liberación de GABA de las terminales palidonigrales.

### 5.1.2 Los receptores de dopamina estriatonigrales y pálido nigrales sensan las concentraciones de dopamina endógena del medio extracelular

La mayor sorpresa ha sido hallar que el nivel de funcionamiento de una conexión sináptica se corresponde con las concentraciones extracelulares de un transmisor modulador. Debido a que las concentraciones nanomolares de los agonistas selectivos del receptor son suficientes para modificar la transmisión GABAérgica en la sustancia nigra reticulata, hipotetizamos que la administración de antagonistas selectivos de los receptores a dopamina revelaría, de manera aguda, las consecuencias de la falta de dopamina en el medio extracelular. Por lo tanto, para revelar la función de la dopamina endógena aplicamos antagonistas selectivos para el receptor de la clase  $D_1$ , y agonistas selectivos para receptores de los tipos  $D_3$  y  $D_4$ .

Los resultados muestran que el efecto de suprimir la acción de la dopamina endógena reduce la amplitud de las IPSCs estriatonigrales y por lo tanto la transmisión GABAérgica, esto es, la función de la vía directa. El modelo de Parkinsonismo de las dos vías predice que la vía directa ha de estar inhabilitada para que haya bradicinesia y acinesia.

Por el contrario, suprimir la acción de la dopamina endógena en la vía pálido nigral incrementa la transmisión de esta vía; rama de la vía indirecta, como también lo hace en la vía subtáminigral (Ibañez-Sandoval et al., 2006), la rama clásica de la vía indirecta. De nuevo, el modelo de Parkinsonismo de las dos vías predice que la vía indirecta ha de estar potenciada para que además de la bradicinesia haya rigidez.



Estos resultados indican que los niveles basales de dopamina extracelular están regulando la probabilidad de liberación del transmisor en ambos tipos de conexiones, manteniendo relativamente alta la probabilidad de liberación en las sinapsis estriatonigrales y manteniendo relativamente baja la probabilidad de liberación en las sinapsis pálido-nigrales y subtalamo-nigrales (Ibañez-Sandoval et al., 2006). Los niveles basales de dopamina extracelular en la sustancia nigra reticulata son necesarios para mantener la función normal de las conexiones de las vías directa e indirecta. El nivel de inhibición dado por la vía pálido-nigral en condiciones control es el resultado de una especie de freno ejercido por la dopamina sobre estas terminales. Lo mismo se había encontrado para la sinapsis subtalamo-nigral (Ibañez-Sandoval et al., 2007). Por lo tanto, cuando falta la dopamina, e.g., en el Parkinsonismo, la inhibición de la vía directa se colapsa, mientras que la transmisión originada en la vía indirecta, tanto la pálido-nigral como la subtalamo-nigral, aumenta de manera desproporcionada produciendo así la pérdida del balance entre ambas vías en la misma estación de salida, la sustancia nigra reticulata. Esto está de acuerdo con el “modelo de las dos vías o de tasa de disparo”: se pierde el balance entre las vías directa e indirecta, con el predominio de la indirecta, lo que genera los cambios patológicos (Albin et al., 1989).

Un signo patognomónico del Parkinsonismo es el disparo oscilatorio en ráfagas recurrentes en las neuronas de la sustancia nigra reticulata, registrado tanto en modelos animales como en pacientes (Tseng 2009). Nuestra hipótesis fue que al disminuir la actividad basal de la dopamina sobre los receptores de las terminales aferentes que convergen en la sustancia nigra reticulata, reduciendo la actividad de la vía directa y aumentando la actividad de la vía indirecta deberíamos producir cambios en el patrón temporal de disparo de las neuronas de este núcleo.

Lo que encontramos fue que el disparo de las neuronas nigrales, de ser predominantemente tónico en el control, pasó a ser a predominantemente de tipo oscilatorio en ráfagas al inactivar agudamente los receptores dopaminérgicos, tal como predice el modelo oscilatorio del Parkinsonismo (Takakusaki et al., 2004; Rivlin-Etzion et al., 2006; Hammond et al., 2007; Ibañez-Sandoval et al., 2007;

Walters et al., 2007; Zold et al., 2009). Esto se traduce en temblor y rigidez de acuerdo a las proyecciones de la sustancia nigra reticulata hacia el tallo cerebral (Takakusaki et al., 2003; Deuschl et al., 2000; Helmich et al 2010). Por lo tanto, los resultados dan lugar a una especie de síntesis entre ambos modelos fisiopatológicos: el de las dos vías o tasas de disparo y el modelo oscilatorio. La diferencia con los modelos clásicos es que todo esto se supone que acontece en el neostriado, mientras que nosotros demostramos que sucede también en los núcleos de salida, e.g., la sustancia nigra reticulata, y que los receptores protagonistas son los presinápticos.

El disparo tónico y espontáneo se preserva en la preparación *in vitro* tanto en el globo pálido externo como en el núcleo subtalámico (e.g., Beurrier et al., 1999; Chan et al., 2011). Ambos núcleos se interconectan para producir un generador de oscilaciones (Plenz y Kitai, 1999). Tanto el globo pálido externo como el núcleo subtalámico convergen en la sustancia nigra reticulata (Nakanishi et al., 1987; Bevan et al., 1994; Chuhma et al., 2011), por lo tanto es de esperarse que el circuito oscilador que generan influya en la sustancia nigra reticulata. La proyección subtálamonigral es glutamatérgica. La subtalectomía parcial es uno de los procedimientos quirúrgicos más utilizados para aliviar los signos motores e incapacitantes del Parkinsonismo (Guridi et al., 2008; Blomstedt et al., 2009; Cerquetti et al., 2011). Para buscar un mejor *rationale* de este procedimiento se decidió bloquear parcialmente a los receptores glutamatérgicos de la vía subtálamonigral utilizando un antagonista selectivo de los receptores a NMDA, el APV. El resultado es que la oscilación en ráfagas disminuyó drásticamente, regresando a un disparo más tónico pero con fuertes interrupciones inhibitoras, probablemente originadas de la vía pálido-nigral. Así que queda para trabajos posteriores averiguar la relación entre el disparo oscilatorio en ráfagas de las neuronas de la sustancia nigra reticulata y las conexiones con el oscilador globo pálido externo-núcleo subtalámico.

### 5.1.3 Consecuencias Funcionales

Fue suficiente la inactivación (bloqueo) aguda de los receptores dopaminérgicos situados en las terminales aferentes a la sustancia nigra reticulata para que el patrón temporal de disparo de las neuronas cambiara de tónico a ráfagas. ¿Qué pasaría si la ausencia crónica de dopamina se prolonga por un largo periodo de tiempo? La ausencia de dopamina por tiempos prolongados (e.g., Parkinsonismo) podría reducir la función de la sinapsis de la vía directa de tal manera que la plasticidad de largo plazo provoque, primero una depresión continua, y después una pérdida estructural o anatómica de las sinapsis.

Por lo contrario, el mantener relativamente elevado el funcionamiento de las sinapsis pálido-nigrales y subtálamo-nigrales produciría potenciación de largo plazo de estas sinapsis. Todo lo anterior suponiendo que estas sinapsis pueden ser sujetas a la plasticidad de largo plazo, situación probada en esta Tesis para la sinapsis estriatonigral (falta probarla para las sinapsis pálido-nigrales y subtálamo-nigrales).

Pero suponiendo, en principio, que estas sinapsis pueden exhibir plasticidad de largo plazo, la ausencia prolongada de dopamina tendería a cambiar el circuito de manera permanente, lo que explicaría, en parte, porque el tratamiento con L-DOPA y demás agonistas utilizados para tratar los Parkinsonismos dejan de ser eficaces.

Un circuito crónicamente enfermo sería diferente del circuito control. El circuito patológico se haría más dependiente del oscilador globo pálido externo-núcleo subtalámico (Magill et al., 2001; Baufreton et al., 2009). El disparo en ráfagas de las neuronas de la sustancia nigra reticulata está correlacionado con la aparición del temblor y de la rigidez (Hemsley y Crocker, 1998; Takakusaki et al., 2004).

Por otra parte, la configuración patológica de los pesos sinápticos llevaría a la pérdida del filtro pasa altos de las entradas de la vía directa e incrementaría el filtro pasa bajos de las entradas del oscilador globo pálido externo-núcleo subtalámico (depresión de corto plazo pálido-nigral; Abbott y Regehr, 2004). Este

escenario favorecería la aparición de las frecuencias bajas productoras de acinesia (Hutchison et al., 2004; Ávila et al., 2010). En consecuencia, las vías terapéuticas que lleven a la activación de la vía directa y a impedir que estas se pierdan en el paciente crónico parecen fundamentales. Se trataría de evitar los cambios plásticos irreversibles en la red (Hammond et al., 2007; Walters et al., 2007; Walters y Bergstrom, 2009; Zold et al., 2009; Bateup et al., 2010; Kravitz et al., 2010).

#### 5.1.4 Plasticidad sináptica en la vía directa

En la sustancia nigra reticulata se llega a un balance en la actividad de las vías directa e indirecta de los GB (Deniau et al., 2007). ¿Cómo se realiza este balance?

Los experimentos de esta Tesis mostraron que la misma sinapsis estriatonigral (vía directa) muestra tanto facilitación como depresión de larga duración (Yanovsky et al., 2003). La facilitación resultó ser la modulación dopaminérgica dependiente del receptor  $D_1$  (Floran et al., 1990; Radnikow y Misgeld, 1998; Aceves et al., 2011; Chuhma et al., 2011), la cual se presenta, preferentemente, en la preparación parasagital (Radnikow y Misgeld, 1998; Beurrier et al., 2006; Connelly et al., 2010; Aceves et al., 2011). La depresión resultó ser una LTD verdadera dependiente del receptor NMDA postsináptico, la síntesis de endocannabinoides y la actuación retrógrada de los mismos en receptores localizados en la terminal presináptica estriatonigral (Wallmichrath y Szabo 2002).

Los hallazgos son originales porque se demostró que la facilitación puede ser provocada por estimulación fisiológica (HFS) de las aferentes; es decir, con la liberación endógena de dopamina, la facilitación puede durar varios minutos (e.g., Reynolds et al., 2001; Wickens, 2009) y para poder observar este fenómeno, los receptores NMDA deben estar inactivos.

Como la facilitación puede ser revertida, una vez alcanzadas las condiciones estables, por el antagonista selectivo del receptor de la clase  $D_1$ , así como por el agonista selectivo del receptor a cannabinoides  $CB_1$ , no consideramos que dicha facilitación sea una verdadera potenciación de largo plazo (LTP; Kreitzer y

Malenka, 2008). Además de ser bloqueada por un antagonista, la acción debida al estímulo de las aferentes (HFS) puede ser ocluida por la adición de un agonista selectivo del receptor de la clase  $D_1$ . Por lo tanto, es necesario aceptar que aunque la facilitación se deba a la dopamina endógena, y se pueda provocar con estimulación fisiológica, no es capaz de producir cambios estructurales de carácter permanente, ya que puede ser revertida u ocluida farmacológicamente.

Las neuronas de la sustancia nigra reticulata expresan receptores postsinápticos de clase  $D_1$  (sub-tipo  $D_5$ ; Zhou et al., 2009). Sin embargo, descartamos que estos receptores tengan un papel en nuestras condiciones experimentales ya que el potencial de membrana de las células fue fijado a  $-80$  mV, que junto con la solución intracelular que contiene  $Cs^+$  y QX-314, hace muy difícil afectar corrientes intrínsecas postsinápticas dependientes de voltaje. Por último, los cambios plásticos fueron acompañados por cambios correspondientes en las respuestas a los pulsos pareados, sin cambios aparentes en la resistencia de entrada de las neuronas. Por lo tanto, la evidencia indica que la facilitación de las IPSCs estriatonigrales depende del receptor  $D_1$  y se debe a la modulación ya descrita (Radnikow y Misgeld, 1998; Aceves et al., 2011; Chuhma et al., 2011); y no a LTP. De todas maneras, el papel de la cascada de señalización asociada con el receptor tipo  $D_5$  en la sustancia nigra reticulata debe ser analizado (Zhou et al., 2009).

Respecto de la depresión dependiente de la activación del receptor  $CB_1$ , encontramos que depende asu vez de receptores NMDA postsinápticos activos (Ohno-Shosaku et al., 2007). Que pueda inducirse por estimulación fisiológica (HFS) indica que depende de cannabinoides endógenos, lo que es apoyado por el hecho de ser bloqueable por un quelador de calcio intracelular en la neurona postsináptica, lo que sugiere que la estimulación produce la síntesis y liberación de los endocannabinoides en la postsinapsis, para actuar como transmisores retrógrados en la presinapsis (Gerdeman et al., 2002; Kreitzer y Malenka, 2007; Shen et al., 2008; Robbe et al., 2002; Chevayleyre et al., 2003; Yanovsky et al., 2003; Massey y Bashir, 2007; Ohno-Shosaku et al., 2007; Safo y Regehr, 2005).

El cambio correspondiente en la RPP, confirma la participación de la presinapsis. Sin embargo, y al contrario de lo que sucede con la facilitación mediada por el receptor  $D_1$ , la depresión mediada por el receptor  $CB_1$  no puede ser revertida por los antagonistas del receptor una vez que se ha alcanzado un estado estable (después de algunos minutos). Esto sugiere cambios estructurales y el establecimiento de una verdadera LTD (Gerdeman et al., 2002; Robbe et al., 2002; Chevaleyre et al., 2003; Gerdeman y Lovinger, 2003; Kreitzer y Malenka, 2005; 2007; 2008; Shen et al., 2008; Massey y Bashir, 2007; Surmeier et al., 2009; Lovinger, 2010).

De los dos mecanismos que regulan las sinapsis estriatonigrales, el mediado por el receptor  $D_1$  y el mediado por el receptor  $CB_1$  (Szabo et al., 2000; Yanovsky et al., 2003; Aceves et al., 2011; Misqueld et al., 2007), sólo el último da origen a un cambio estructural que tiende a ser permanente (e.g., Mulkey et al., 1994; Iribe et al., 1999; Massey y Bashir, 2007; Szabadits et al., 2011; Xue et al., 2011) y por lo tanto, componente potencial de la memoria de procedimientos .

### 5.1.5 Las neuronas de la sustancia nigra reticulata son detectores de coincidencias

La facilitación dependiente de dopamina o la depresión dependiente de endocannabinoides depende de si los receptores a NMDA de las neuronas nigrales están activos durante la operación de la vía directa.

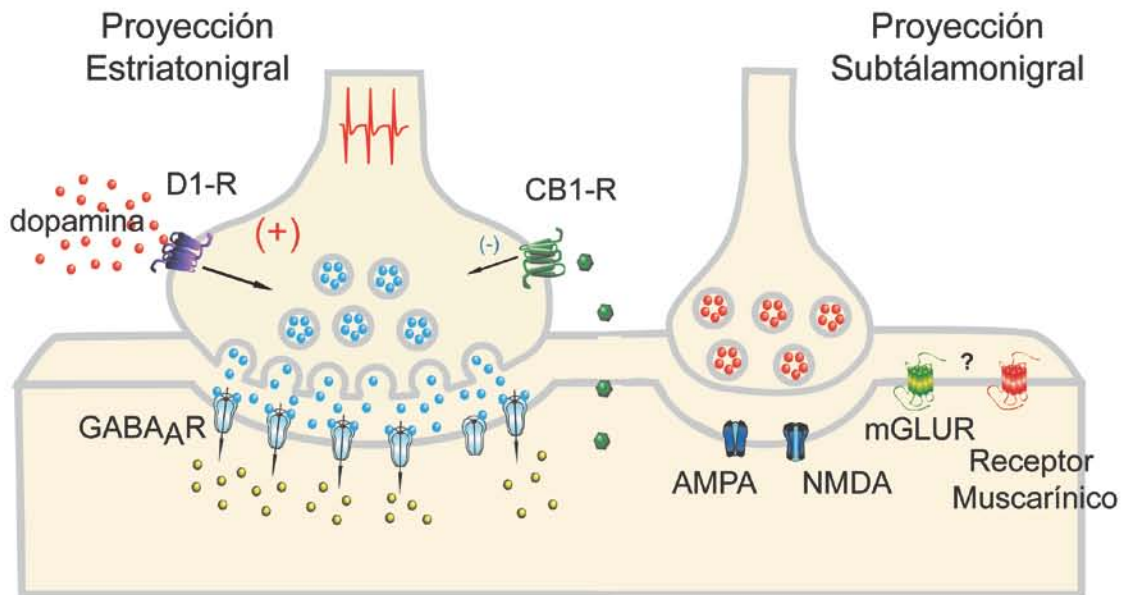
Cuando están inactivos, se produce facilitación de la vía directa y, por lo tanto, deben de facilitarse los movimientos (Kravitz et al., 2010).

Sin embargo, cuando están activos se produce LTD. Esto sucede si al mismo tiempo está siendo activada la vía indirecta, cuya sinapsis final es la entrada subtalamonigral glutamatérgica. Así que si las terminales subtalámicas están

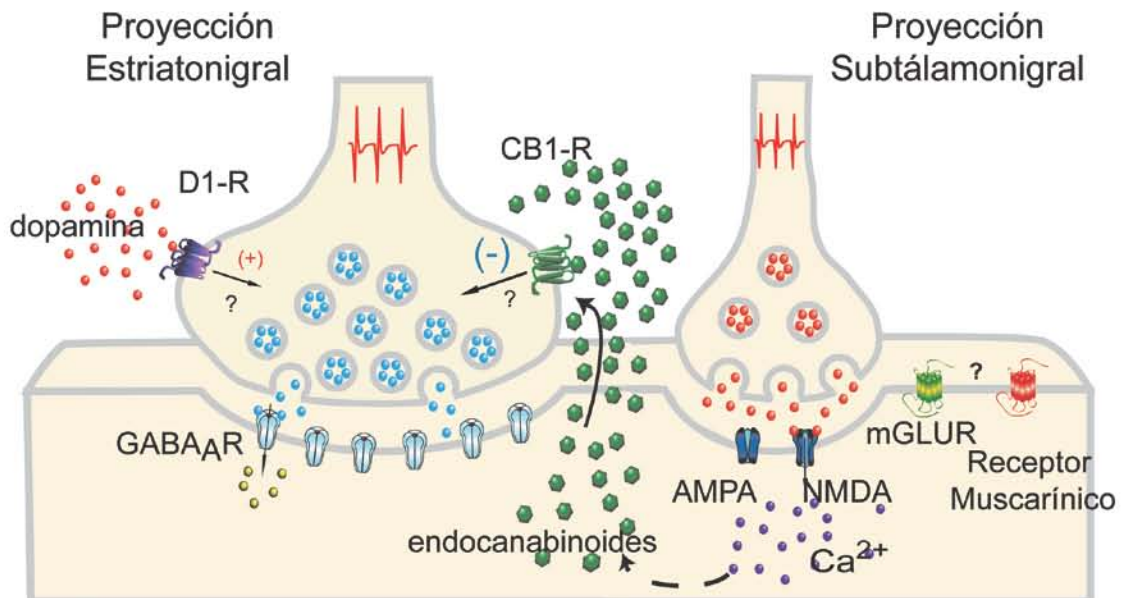
activas los receptores a NMDA lo estarán, en cuyo caso, se producirá depresión y represión de los movimientos o hipocinesia (Kravitz et al., 2010).

Hay que notar que la convergencia o falta de convergencia en la actividad de las vías directa e indirecta se realiza de neurona a neurona, lo que ajusta de manera quasi-digital el mapa somatotópico de los músculos del cuerpo en los núcleos de salida (Beurrier et al., 2006; Ibáñez-Sandoval et al., 2006, 2007). Si ambas vías coinciden (convergen) en su actividad, se reprimen los movimientos. Sólo si la vía directa se activa de manera aislada se facilitan los movimientos. Así, la vía indirecta influye las acciones de la vía directa a través de la activación de los receptores a NMDA: los detectores de coincidencias por antonomasia. Este hallazgo sienta las bases para un nuevo mecanismo de balance entre las dos vías de los GB (Figura 16 y Tabla 2). Sin embargo, otras interacciones no están siendo descartadas.

### A) Modulación Estriatonigral por el D1-R = incremento IPSC



### B) LTD Estriatonigral dependiente del CB1-R



**Figura 16. Interacción de las regulaciones dopaminérgica y canabínica en la sinapsis estriatonigral. A)** Los receptores a NMDA están inactivos cuando la vía indirecta (la proyección subtalamonigral) no está operando. En esas condiciones, la activación de la vía directa (la proyección estriatonigral) es facilitada presinápticamente por la dopamina a través de la acción de los receptores a dopamina D1. **B)** Cuando la vía indirecta es activada, los receptores a NMDA se activan permitiendo la entrada de calcio a las neuronas de la SNr promoviendo así, la síntesis de endocannabinoides, los cuales actúan como mensajeros retrógrados para deprimir la liberación de GABA de la vía directa. Esta última acción puede convertirse en LTD (aprendizaje motor).



### 5.1.6 Balance “digital” de las vías directa e indirecta en los núcleos de salida

**“x” y No “y”**

Vía directa	Vía indirecta	$\neg$ (via indirecta)	Salida
0	0	1	0
0	1	0	0
1	0	1	1
1	1	0	0

**Tabla 2.** Las neuronas de la SNr funcionan como compuerta digitales siguiendo la regla “x y no y”. Las señales de la vía directa (movimientos) solo pueden pasar si se activan solas. Todas las otras posibilidades: vía indirecta activa, ambas vías activas o ambas inactivas, no permiten la salida de movimiento.

Cada neurona de los núcleos de salida de los ganglios basales, e.g., de la sustancia nigra reticulata, sería una “compuerta” que decide el movimiento a ejecutar. De la salida de los ganglios basales depende la ejecución de diferentes clases de procedimientos motores, desde los movimientos generados por los “generadores centrales de pautas” (CPGs = *central pattern generators*) (Grillner et al., 2005) hasta los hábitos aprendidos y las tareas complejas dirigidas a metas (Takakusaki et al., 2003; 2004; Graybiel, 2004; 2008; Yin y Knowlton, 2006; Wickens, 2009). Sugerimos que cada neurona de la sustancia nigra reticulata sería un puerto lógico que permitiría pasar, o no, el comando motor (Sarvestani et al., 2011). Por lo tanto, se propone como primera aproximación que cada neurona de la sustancia nigra reticulata actúa con una lógica binaria siguiendo la regla “**X y no Y**”, donde X y Y son las dos entradas principales (ver Tabla 2): las vías directa e indirecta, ésta última con sus dos ramas: subtálamonigral y pálido-nigral, que

conectan a los núcleos de salida con el generador de oscilaciones de baja frecuencia globo pálido externo-núcleo subtalámico (Figura 16 y Tabla 2). La única combinación de entradas sinápticas que permite el movimiento es la que activa la vía directa pero no la vía indirecta (e.g., “X” y no “Y” o compuerta:  $x \wedge \neg y$ ) (Tabla 2). Todas las otras combinaciones: las dos vías activas, solo la vía indirecta activa, las dos vías inactivas, lleva a la represión del movimiento. La compuerta binaria “X AND NOT Y” tiene los siguientes equivalentes:  $x \wedge \neg y = \neg (x \rightarrow y) = \neg (\neg x \vee y)$  (donde:  $\wedge$  = AND;  $\vee$  = OR;  $\neg$  = NOT,  $y \rightarrow$  representa implicación) (Manon, 1987) . Al tener esta compuerta en cada una de las aproximadamente 150,000 neuronas de la sustancia nigra reticulata, se dejaría salir los movimientos activando de manera precisa una determinada sinergia muscular en un determinado orden espacio temporal dictado por las secuencias de los estados de la red estriatal (Carrillo-Reid et al., 2008).

## Capítulo VI

### Conclusiones Generales

1. Las IPSC estriatonigrales son diferentes a las palidonigrales, es decir, las IPSC estriatonigrales son más lentas y de menor amplitud.
2. La dopamina endógena activa tónicamente a los receptores dopamiérgicos de la clase D1 a nivel presináptico, incrementando la liberación de GABA de la vía estriatonigral.
3. La dopamina endógena activa tónicamente a los receptores dopaminérgicos de la clase D2 a nivel presináptico, decrementando la liberación de GABA de la vía pálido-nigral.
4. La inactivación aguda de los receptores de dopamina, revela la función de la dopamina endógena sobre las aferentes modificando el patrón de disparo de tónico a oscilador.
5. La vía estriatonigral puede mostrar tanto facilitación como depresión de larga duración.
6. La facilitación de larga duración en la vía estriatonigral es dependiente de la actividad del receptor D<sub>1</sub>; en ausencia de actividad de los receptores NMDA.
7. La depresión de larga duración en la vía estriatonigral es realmente una LTD dependiente del NMDA postsináptico, la síntesis de endocannabinoides y la actuación de éstos en la presinápsis sobre su receptor (CB<sub>1</sub>).
8. Las neuronas de la sustancia nigra reticulata son detectores de coincidencias entre las dos vías es decir: si ambas vías coinciden (convergen) en su actividad, se reprimen los movimientos. Sólo si la vía directa se activa de manera aislada se facilitan los movimientos.

## Referencias

- Abbott LF, y Regehr WG (2004). Synaptic computation. *Nature* 431: 796–803.
- Aceves JJ, Rueda-Orozco PE, Hernández R, Plata V, Ibañez-Sandoval O, Galarraga E, Bargas J. (2011). Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons. *Front Syst Neurosci* 5: 1-10.
- Acosta-García J, Hernández-Chan N, Paz-Bermúdez F, Sierra A, Erij D, Aceves J, Florán B. (2009). D<sub>4</sub> and D<sub>1</sub> dopamine receptors modulate [<sup>3</sup>H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 57: 725-730.
- Adermark L, Talani G, Lovinger D. (2009). Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *Eur J Neurosci* 29: 32-41.
- Albin R, Young A, Penney J. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander G, Crutcher M. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13: 266-271.
- Alexander G, DeLong M, Strick P. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9: 357-381.
- Altar C, Hauser K. (1987). Topography of substantia nigra innervation by D1 receptor-containing striatal neurons. *Brain Research* 410: 1-11.
- Atherton J, Kitano K, Baufreton J, Fan K, Wokosin D, Tkatch T, Shigemoto R, Surmeier D, Bevan M. (2010). Selective participation of somatodendritic HCN channels in inhibitory but not excitatory synaptic integration in neurons of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 30(47): 16025-16040.

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

Avila I, Parr-Brownlie L, Brazhnik E, Castañeda E, Bergstrom D, Walters J. (2010). Beta frequency synchronization in basal ganglia output during rest and walk in a hemiparkinsonian rat. *Exp Neurol* 221:307-319.

Barbour B, Brunel N, Hakim V, Nadal J. (2007). What can we learn from synaptic weight distributions?. *Trends Neurosci* 30:622-629.

Bateup H, Santini E, Shen W, Birnbaum S, Valjent E, Surmeier D, Fisone G, Nestler E, Greengard P. (2010). Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:14845–14850.

Baufreton J, Bevan M. (2008). D2-like dopamine receptor-mediated modulation of activity-dependent plasticity at GABAergic synapses in the subthalamic nucleus. *J Physiol* 586(8):2121-2142.

Baufreton J, Kirkham E, Atherton J, Menard A., Magill P, Bolam J. (2009). Sparse but selective and potent synaptic transmission from the globus pallidus to the subthalamic nucleus. *J Neurophysiol* 102:532-545.

Belluscio M, Kasanetz F, Riquelme L, Murer M. (2003). Spreading of slow cortical rhythms to the basal ganglia output nuclei in rats with nigrostriatal lesions. *Eur J Neurosci* 17:1046-1052.

Belluscio M, Riquelme L, Murer M. (2007). Striatal dysfunction increases basal ganglia output during motor cortex activation in parkinsonian rats. *Eur J Neurosci* 9:2791-2804.

Bergman H, Wichmann T, DeLong MR. (1990). Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436–1438

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

Bergman H, Deuschl G. (2002) Pathophysiology of Parkinson's disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back. *Mov Disord. Suppl* 3:S28-40

Beurrier C, Ben-Ari Y, Hammond C. (2006). Preservation of the direct and indirect pathways in an in vitro preparation of the mouse basal ganglia. *Neurosci* 140:77-86.

Beurrier C, Congar P, Bioulac B, Hammond C. (1999). Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode *J Neurosci* 19:599-609.

Bevan M, Bolam J, Crossman A. (1994). Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat. *Eur J Neurosci.* 6:320-334.

Bevan M, Magill P, Terman D, Bolam J, Wilson C. (2002). Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci* 25:525-31.

Bevan M, Smith A, Bolam J. (1996). The substantia nigra as a site of synaptic integration of functionally diverse information arising from the ventral pallidum and the globus pallidus in the rat. *Neurosci* 75:5-12.

Blomstedt P, Sandvik U, Fytagoridis A, Tisch S.(2009). The posterior subthalamic area in the treatment of movement disorders: past, present, and future. *Neurosurgery.*64:1029-38

Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross C. (2002). From single extracellular unit recording in experimental and human parkinsonism to the development of a

functional concept of the role played by the basal ganglia in motor control. *Progress in Neurobiol* 66:265-283.

Bouthenet M, Souil E, Martres M, Sokoloff P, Giros B, Schwartz J. (1991). Localization of dopamine D<sub>3</sub> receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D<sub>2</sub> receptor mRNA. *Brain Res* 564:203-219.

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

Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M. (2007). Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30:211-219.

Cameron D, Williams J. (1993). Dopamine D1 receptors facilitate transmitter release. *Nature* 366:344-347.

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

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.

Castillo P, Chiu C, Carroll R. (2011). Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 21:328-338.

Cerquetti D, Obeso JA, Merello M. (2011). Neuronal discharge patterns in the Globus Pallidus pars interna in a patient with Parkinson's disease and hemiballismus secondary to subthalamotomy. *Exp Brain Res*.213:447-55.

Chang H, Kita H, Kitai S. (1983). The fine structure of the rat subthalamic nucleus: An electron microscopic study. *J Comp Neurol* 221:113-123.

Chase T. (1998). The significance of continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs* 55:1-9.

Cheramy A, Leviel V, Glowinski J. (1981). Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289:537-542.

Chevaleyre V, Castillo P. (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38:461-472.

Chevaleyre V, Takahashi K, Castillo P. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29:37–76.

Chevalier G, Vacher S, Deniau J, Desban M. (1985). Desinhibition as a basic process in the expression of striatal function. I. The striato-nigral influence on tecto-spinal/tecto-diencephalic neurons. *Brain Res* 334:215-226.

Chuhma N, Tanaka K, Hen R, Rayport S. (2011). Functional connectome of the striatal medium-spiny neuron. *J Neurosci* 31:1183–1192.

Connelly W, Schulz J, Lees G, Reynolds J. (2010). Differential short-term plasticity at convergent inhibitory synapses to the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 30:14854-14861.

Cools A. (1984). Basal ganglia and Parkinson's disease: neurobiological and pharmacological aspects in animals and man. *Clin Neurol Neurosurg* 86:178-195.

Cooper J, Stanford I. (2001) Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA<sub>A</sub> IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41:62-71.



- Cossart R, Ikegaya Y, Yuste R. (2005). Calcium imaging of cortical networks dynamics *Cell Calcium* 37:451-457.
- 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.
- DeLong M, Wichmann T. (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64:20-24.
- Deniau J, Mailly P, Maurice N, Charpier S. (2007). The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog Brain Res* 160:151-172.
- Deniau J, Menetrey A, Charpier S. (1996). The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationships to the topography of corticostriatal projections. *J. Neurosci* 73:761-781.
- Deschênes M, Bourassa J, Doan V, Parent A. (1996). A single-cell study of the axonal projections arising from the posterior intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Eur J Neurosci* 2:329-343.
- Deuschl G, Raethjen J, Baron R, (2000). The pathophysiology of parkinsonian tremor: a review. *J Neurol.* 247:V33–V48
- Di Filippo M, Picconi B, Tantucci M, Ghiglieri V, Bagetta V, Sgobio C, Tozzi A, Parnetti L, Calabresi P. (2009). Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory. *Behav Brain Res* 199:108-118.

Ding S, Wei W, Zhou FM. (2011).Molecular and functional differences in voltage-activated sodium currents between GABA projection neurons and dopamine neurons in the substantia nigra.J Neurophysiol.In Press

Egertova M, Elphick M. (2000). Localization of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. J Comp Neurol 422:159-171.

Féger J, Bevan M, Crossman A. (1994). The projections from the parafascicular thalamic nucleus to the subthalamic nucleus and the striatum arise from separate neuronal populations: a comparison with the corticostriatal and corticosubthalamic efferents in a retrograde fluorescent double-labelling study. Neuroscience 60:125-132.

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

Flores G, Liang J, Sierra A, Matínez-Fong D, Quirión R, Aceves J, Srivastava L. (1999). Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction an autoradiography. Neuroscience 91:549-556.

François C, Tande D, Yelnik J, Hirsch E. (2002). Distribution and morphology of nigral axons projecting to the thalamus in primates. J Comp Neurol. 447:249-246.

Fujimoto K, Kita H. (1993). Response characteristics of subthalamic neurons to the stimulations of the sensorimotor cortex in the rat. Brain Res 609:185-192.

Fujiyama F, Sohn J, Nakano T, Furuta T, Nakamura K, Matsuda W, Kaneko T. (2011). Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. Eur J Neurosci. 33:668-677.

Galarraga E, Bargas J, Martínez-Fong D, Aceves J. (1987). Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neurosci Lett* 81:351-355.

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

Gale S, Perkel D. (2010). Anatomy of a songbird basal ganglia circuit essential for vocal learning and plasticity. *J Chem Neuroanat* 39:124-131.

Gerdeman G, Lovinger D. (2003). Emerging roles for endocannabinoids in longterm synaptic plasticity. *Br J Pharmacol* 140:781–789.

Gerdeman G, Ronesi J, Lovinger D. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5:446-451.

Gerfen C, Keefe K, Gauda E. (1995). D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1 and D2-dopamine receptor on separate populations of neurons results in potentiated early gene response in D1 containing neurons. *J Neurosci* 15:8167-8176.

Giros B, Sokoloff P, Martres M, Riou J, Emorine L , Schwartz J. (1989). Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342:923-926.

Giuffrida A, Parsons L, Kerr T, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2:358–363.

González-Hernández T, Rodríguez M. (2000). Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the Substantia Nigra of the rat. *J Comp Neurol* 421:107-135.

Gordon I, Whelan P. (2006). Deciphering the organization and modulation of spinal locomotor central pattern generators. *J Exp Biol*; 209:2007-2014.

Graybiel A. (2004). Network-level neuroplasticity in cortico-basal ganglia pathways. *Parkinsonism. Relat Disord* 10:293-296.

Graybiel A. (2008). Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci* 31:359-387.

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

Grillner S, Wallén P, Saitoh K, Kozlov A. (2008). Robertson Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates an overview. *Brain Res Rev* 57:2-12.

Grofová I, Rinvik, E. (1970). An experimental electron microscopic study on the striatonigral projection in the cat. *Exp Brain Res* 11:249-262.

Guertin P, Hounsgaard J. (1998). NMDA-Induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles. *J Neurophysiol.* 6:3380-3382.

Guridi J, Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Lozano AA, Manrique M.(2008).L-dopa-induced dyskinesia and stereotactic surgery for Parkinson's disease.*Neurosurgery.*62:311-23

Guzmán J, 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.

Haber S. (2003). The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat* 26:317-330.

Haber S, Groenewegen H, Grove E, Nauta W. (1985). Efferent connections of the ventral pallidum: evidence of a dual striato pallidofugal pathway. *J Comp Neurol* 235:322-335.

Haber S, Lynd-Balta E, Mitchell S. (1993). The organization of the descending ventral pallidal projections in the monkey. *J Comp Neurol* 329:111-128.

Hammond C, Bergman H, Brown P. (2007). Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci* 30:357-364.

Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. (2007).  $Ca^{2+}$ -assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Curr Opin Neurobiol* 17:360–365.

Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, Araishi K, Shin H, Kano M. (2005). Phospholipase  $C\beta$  serves as a coincidence detector through its  $Ca^{2+}$  dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* 45:257–268.

Heckman C, Lee R. (1999). Synaptic integration in bistable motoneurons. *Prog Brain Res* 123:49-56.

Hedin K, Duerson K, Clapham D. (1993). Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell Signal* 5:505-518.

Heimer L. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41:89-125.

Heimer L, Zahm D, Churchill L, Kalivas P, Wohltmann C. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41:89-125.

Helmich RC, Janssen MJ, Oyen WJ, Bloem BR, Toni I. (2011). Pallidal dysfunction drives a cerebellothalamic circuit into Parkinson tremor. *Ann Neurol*. 69:269-81

Hemsley KM, and Crocker AD. (1998). The effects of an irreversible dopamine receptor antagonist, N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ), on

the regulation of muscle tone in the rat: the role of the substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 251, 77–80.

Hernández A, Ibáñez-Sandoval O, Sierra A, Valdiosera R, Tapia D, Anaya V, Galarraga E, Bargas J, Aceves J. (2006). Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors *J Neurophysiol.* 96:2877-88

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

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

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

Hutchison WD, Lozano AM, Tasker RR, Lang AE, Dostrovsky JO (1997). Identification and characterisation of neurons with tremor-frequency activity in human globus pallidus. *Exp Brain Res* 113:557–563.

Hutchison W, Dostrovsky J, Walters J, 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.

Ibáñez-Sandoval O, Carrillo-Reid L, Galarraga E, Tapia D, Mendoza E, Gomora J, Aceves J, Bargas J. (2007). Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: possible relevance for Parkinson disease. *J Neurophysiol* 98:2311-2323.

Ibáñez-Sandoval O, Hernández A, Florán B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erij D, Aceves J, Bargas J. (2006). Control of the subthalamic innervation of

substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 95:1800-1811.

Iribe Y, Moore K, Pang K, Tepper J. (1999). Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro. *J Neurophysiol* 82:925-933.

Jiang H, Stein B, McHaffie J. (2003). Opposing basal ganglia processes shape midbrain visuomotor activity bilaterally. *Nature* 423:982-986.

Joyce J, Gurevich E. (1999). D3 receptors and the actions of neuroleptics in the ventral striatopallidal system of schizophrenics. *Ann N Y Acad Sci.* 877:595-613.

Katz B, Miledi R.(1967). Ionic requirements of synaptic transmitter release.*Nature.* 215:651.

Katz B, Miledi R. (1967).A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses.*J Physiol.*192:407-36

Katz B, Miledi R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation.*J Physiol.*195:481-92

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

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

Kita H. (2001). Neostriatal and globus pallidus stimulation induced inhibitory postsynaptic potentials in entopeduncular neurons in rat brain slice preparations. *Neuroscience* 105:871-879.

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

- Kita H, Chang H, Kitai S. (1983b). Pallidal inputs to subthalamus: intracellular analysis. *Brain Res* 264:255-265.
- Kita H, Kitai S. (1988). Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res* 447(2):346-352.
- Kravitz A, Freeze B, Kay K, Thwin M, Deisseroth K, Kreitzer A. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622-626.
- Kreiss D, Anderson L, Walters J. (1996). Apomorphine and dopamine D(1) receptor agonists increase the firing rates of subthalamic nucleus neurons *Neuroscience* 72:863-876.
- Kreitzer A, Malenka R. (2005). Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J Neurosci* 25: 10537–10545.
- Kreitzer A, Malenka R. (2007). Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445:643-647.
- Kreitzer A, Malenka R. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543-554.
- Lee R, Heckman C. (1998). Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic variations in rhythmic firing patterns. *J Neurophysiol* 80:572-582.
- Lee R, Heckman C. (2001). Essential role of a fast persistent inward current in action potential initiation and control of rhythmic firing *J Neurophysiol* 85:472-475.
- Le Moine C, Normand E, Guitteny A, Fouque B, Teoule R and Bloch B. (1990). Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:230-234.



- Levy R, Hutchison W, Lozano A, Dostrovsky J. (2000). High-frequency synchronization of neuronal activity in the subthalamic nucleus of parkinsonian patients with limb tremor. *J Neurosci* 20:7766-7775.
- Lo F, Mize R. (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
- Lovinger D. (2010). Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacol* 58:951-961.
- Magill P, Bolam J, Bevan M. (2000). Relationship of activity in the subthalamic nucleus-globus pallidus network to cortical electroencephalogram. *J Neurosci* 20:820-833.
- Magill P, Bolam J, Bevan M. (2001). Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106:313-330.
- Mailly P, Charpier S, Mahon S, Menetrey A, Thierry A, Glowinski J, Deniau J. (2001). Dendritic arborizations of the rat substantia nigra pars reticulata neurons: spatial organization and relation to the lamellar compartmentation of striato-nigral projections. *J Neurosci* 21:6874-6888.
- Mailly P, Charpier S, Menetrey A, Deniau J. (2003). Three-dimensional organization of the recurrent axon collateral network of the substantia nigra pars reticulata neurons in the rat. *J Neurosci* 23:5247-5257.
- Mansour A, Meador-Woodruff J, Zhou Q, Civelli O, Akil H and Watson S. (1992). A comparison of D1 receptor binding and mRNA in the brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience* 46:959-971.

Marshall J, Henry B, Billings L, Hoover B. (2001). The role of the globus pallidus D2 subfamily of dopamine receptors in pallidal immediate early gene expression. *Neuroscience* 105:365-378.

Massey P, Bashir Z. (2007). Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci* 30:176-184.

Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T.(2009). Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci.*29:444-53

Matuszewich L, Yamamoto B. (1999). Modulation of GABA Release by Dopamine in the Substantia Nigra. *Synapse* 32:29–36.

Mátyás F, Yanovsky Y, Mackie K, Kelsch W, Misgeld U, Freund TF. (2006). Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 137:337-361.

Maurice N, Deniau JM, Glowinski J, Thierry AM. (1999). Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the cortico-nigral circuits. *J Neurosci.* 19:4674-81

Mendoza E, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Hernández-Echeagaray E, Bargas J. (2006). Differential Induction of Long Term Synaptic Plasticity in Inhibitory Synapses of the Hippocampus. *Synapse* 60:533–542.

Mink JW. (1996). The basal Ganglia: focused Selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol.*50 :381-425

Misgeld U. (2004). Innervation of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318:107-114.

Misgeld U, Drew G, Yanovsky Y. (2007). Presynaptic modulation of GABA release in the basal ganglia. *Prog Brain Res* 160:245-259.

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

Miyazaki T, Lacey M. (1998). Presynaptic inhibition by dopamine of a discrete component of GABA release in rat substantia nigra pars reticulata. *J Physiol* 513:805-817.

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

Monsma Jr, Mahan L, McVittie L, Gerfen C. (1990). Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6723-6727.

Monsma Jr, McVittie L, Gerfen C, Mahan L, Sibley D. (1989). Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342:926-929.

Morris M, Lanssek R, Matyas T, Summers J.J. (1994). The pathogenesis of gait hypokinesia in Parkinson's disease. *Brain*.117:1169-1181.

Mouroux M, Hassani O, Féger J. (1995). Electrophysiological study of the excitatory parafascicular projection to the subthalamic nucleus and evidence for ipsi- and contralateral controls. *Neuroscience* 67:399-407.

Mulkey R, Endo S, Shenolikar S, Malenka R. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369:486–488.

Murer M, Riquelme L, Tseng K, Pazo J. (1997). Substantia nigra pars reticulata single unit activity in normal and 60HDA-lesioned rats: effects of intrastriatal apomorphine and subthalamic lesions. *Synapse* 27:278-93.

Nakanishi H, Kita H, Kitai S. (1987). Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an in vitro slice preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation. *Brain Res* 437:45-55.

Nambu A. (2007). Globus pallidus internal segment. GABA and the basal ganglia: from molecules to systems. Edited by Tepper J. *Progress in Brain Research* 160:135-150

Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Ano M, Takeda S, Tsubokawa H, Kano M. (2007). Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. *J Physiol* 584:407-18.

Parent A, Smith Y, Fillion M, and Dumas J. (1989). Distinct afferents to internal and external pallidal segments in the squirrel monkey. *Neurosci. Lett.* 96, 140–144.

Plenz D, Kitai S. (1999). A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* 400:677-682.

Porceddu M, Giorgi O, Ongini E, Mele S, Biggio G. (1986). <sup>3</sup>H-SCH 23390 binding sites in the rat substantia nigra: evidence for a presynaptic localization and innervation by dopamine. *Life Sci* 39:321-328.

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

Prensa L, Giménez-Amaya JM, Parent A, Bernácer J, Cebrián C. (2009). The nigrostriatal pathway: axonal collateralization and compartmental specificity. *J Neural Transm Suppl* 73:49-58.

Raz A, Vaadia E, Bergman H (2000) Firing patterns and correlations of spontaneous discharge of pallidal neurons in the normal and the tremulous 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine vervet model of parkinsonism. *J Neurosci* 20:8559–8571

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

Redgrave P, Coizet V, Comoli E, McHaffie JG, Leriche M, Vautrelle N, Hayes LM, Overton P. (2010). Interactions between the Midbrain Superior Colliculus and the Basal Ganglia. *Front Neuroanat.* 4. pii: 132

Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz M, Lehericy S, Bergman H, Agid Y, DeLong M, Obeso J. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 11:760-772.

Redgrave P, Vautrelle N, Reynolds JN. (2011). Functional properties of the basal ganglia's re-entrant loop architecture: selection and reinforcement. *Neuroscience.* In Press

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

Reynolds J, Hyland B, Wickens J. (2001). A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature* 413:67–70.

Rivlin-Etzion M, Marmor O, Heimer G, Raz A, Nini A, Bergman H. (2006). Basal ganglia oscillations and pathophysiology of movement disorders. *Curr Opin Neurobiol* 16:629-637.

Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni O. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens *Proc Natl Acad Sci USA* 99:83884-83888.

Robbe D, Montgomery S, Thome A, Rueda-Orozco P, McNaughton B, Buzsaki G. (2006). Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci* 9:1526-1533.

Robledo P, Feger J. (1990). Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data. *Brain Res* 518:47-54.

Rommelfanger K, Wichmann T. (2010). Extrastriatal dopaminergic circuits of the basal ganglia. *Front. Neuroanat.* 4: 139.

Romo-Parra H, Misgeld U, Yanovsky Y. (2009). Regular firing of a single output neuron reduces its own inhibition through endocannabinoids in substantia nigra pars reticulata of juvenile mice. *Neurosci* 160:596-605.

Rueda-Orozco P, Mendoza E, Hernandez R, Aceves JJ, Ibañez-Sandoval O, Galarraga E, Vargas J. (2009). Diversity in long-term synaptic plasticity at inhibitory synapses of striatal spiny neurons. *Learn Mem* 16:474-478.

Ruskin DN, Bergstrom DA, Walters JR. (2002). Nigrostriatal lesion and dopamine agonists affect firing patterns of rodent entopeduncular nucleus neurons. *J Neurophysiol* 88: 487–496

Ruskin D, Bergstrom D, Walters J. (1999). Multisecond oscillations in firing rate in the globus pallidus: synergistic modulation by D1 and D2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 290:1493-501.

Ruskin D, Bergstrom D, Tierney P, Walters J. (2003). Correlated multisecond oscillations in firing rate in the basal ganglia: Modulation by dopamine and the subthalamic nucleus. *Neuroscience* 117:427-38.

Safo P, Regehr W. (2005). Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron* 48:647-659.

Sanchez-Vives M, McCormick D. (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex *Nat Neurosci* 3:1027-1034.

- Santiago M, Westerink B. (1991). Characterization and pharmacological responsiveness of dopamine release recorded by microdialysis in the substantia nigra of conscious rats. *J Neurochem* 57:738-747.
- Sarvestani I, Lindahl M, Hellgren-Kotaleski J, Ekeberg O. (2011). The arbitration-extension hypothesis: a hierarchical interpretation of the functional organization of the Basal Ganglia. *Front Syst Neurosci* 5: 13.
- Savarese T, Fraser C. (1992). In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* 283:1-19.
- Seeman P, Wilson A, Gmeiner P, Kapur S. (2006). Dopamine D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptors in human putamen, caudate nucleus, and globus pallidus. *Synapse* 60:205-211.
- Sergeeva O, Doreulee N, Chepkova A, Kazmierczak T, Haas H. (2007). Long-term depression of cortico-striatal synaptic transmission by DHPG depends on endocannabinoid release and nitric oxide synthesis. *Eur J Neurosci* 26:1889-1894.
- Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier D. (2008). Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 321:848-851.
- Sjöström P, Rancz E, Roth A, Häusser M. (2008). Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 88:769-840.
- Smeets W, Marín O, González A. (2000). Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *J Anat* 196:501-517.
- Smith Y, Bevan M, Shink E, Bolam J. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neurosci* 86:353-387.
- Smith Y, Bolam J. (1989). Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res* 493:160-167.

Smith Y, Bolam J. (1991). Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labelling study. *Neuroscience* 144:45-73.

Smith Y, Kieval J. (2000). Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in Neurosci* 23:528-533.

Smith Y, Wichmann T, DeLong M. (1994). Synaptic innervation of neurones in the internal pallidal segment by the subthalamic nucleus and the external pallidum in monkeys *J Comp Neurol* 343:297-318.

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

Stephenson-Jones M, Samuelsson E, Ericsson J, Robertson B, Grillner S. (2011). Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. *Curr Biol*.21:1081-91.

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

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

Surmeier D, Plotkin J, Shen W. (2009). Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr Op Neurobiol* 19:621–628.

Surmeier DJ, Carrillo-Reid L, Bargas J. (2011). Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience*. In Press



Szabadits E, Cserép C, Szonyi A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Watanabe M, Itohara S, Freund T, Nyiri G. (2011). NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling. *J Neurosci* 31:5893-5904.

Szabo B, Wallmichrath I, Mathonia P, Pfreundtner C. (2000). Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neurosci* 97:89-97.

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

Takakusaki K, Oohinata-Sugimoto J, Saitoh K, Habaguchi T. (2004). Role of basal ganglia-brainstem systems in the control of postural muscle tone and locomotion. *Prog Brain Res* 143:231-237.

Takakusaki K, Tomita N, Yano M. (2008). Substrates for normal gait and pathophysiology of gait disturbances with respect to the basal ganglia dysfunction. *J Neurol* 255 19-29.

Taverna S, Canciani B, Pennartz C. (2005). Dopamine D<sub>1</sub>-receptors modulate lateral inhibition between principal cells of the nucleus accumbens. *J Neurophysiol*. 93:1816-1819.

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 J, Galarraga E, Bargas J. (2005). Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *Neurophysiol* 93:1119-1126.

Tepper J, Tecuapetla F, Koós T, Ibáñez-Sandoval O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat* 4: 150.

Tiberi M, Jarvie K, Silvia C, Falardeau P, Gingrich N, Bertrand L, Yang-Feng T, Fremeau Jr. (1991). Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: Differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7491-7495.

Tripathi A, Prensa L, Cebrián C, Mengual E. (2010). Axonal branching patterns of nucleus accumbens neurons in the rat. *J Comp Neurol*. 518:4649-73.

Tseng K, Kargieman L, Gacio S, Riquelme L, Murer M. (2005). Consequences of partial and severe dopaminergic lesion on basal ganglia oscillatory activity and akinesia *Eur J Neurosci* 22:2579-86.

Tseng K, Riquelme L, Belforte J, Pazo J, Murer M. (2000). Substantia nigra pars reticulata units in 6-hydroxydopamine-lesioned rats: responses to striatal D2 dopamine receptor stimulation and subthalamic lesions. *Eur J Neurosci* 12:247-256.

Tseng K, Snyder-Keller A, O'Donnell P. (2007). Dopaminergic modulation of striatal plateau depolarizations in corticostriatal organotypic cocultures *Psychopharmacology (Berl)* 191:627-640.

Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena M, Mackie K, Walker J. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci* 83:393-411.

Tsumori T, Yokota S, Ono K, Yasui Y. (2002). Synaptic organization of GABAergic projections from the substantia nigra pars reticulata and the reticular thalamic nucleus to the parafascicular thalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 957:231-241.

- Van Tol H, Bunzow J, Guan H, Sunahara R, Seeman P, Niznik H, Civelli O. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-619.
- Vergara R, Rick C, Hernández-López S, Laville J, Guzman J, Galarraga E, Surmeier D, Bargas J. (2003). Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice *J Physiol* 553:169-182.
- Wallmichrath I, Szabo B. (2002). Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neurosci* 113:671-682.
- Walters JR, and Bergstrom DA. (2009). "Basal ganglia network synchronization in animal models of Parkinson's disease," in *Cortico Subcortical Dynamics in Parkinson's Disease Contemporary Neuroscience*, ed. K.-Y. Tseng (New York: Humana Press), 117–142
- Walters J, Hu D, Itoga C, Parr-Brownlie L, Bergstrom D. (2007). Phase relationships support a role for coordinated activity in the indirect pathway in organizing slow oscillations in basal ganglia output after loss of dopamine. *Neuroscience* 19:762–776.
- Waszczak B, Martin L, Greif G, Freedman J. (1998). Expression of a dopamine D2 receptor-activated K<sup>+</sup> channel on identified striatopallidal and striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11440-11444.
- Wichmann T, DeLong M. (1996). Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 6:751-758.
- Wichmann T, DeLong M. (2003). Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 91:9-18.
- Wichmann T, DeLong MR. (2011). Deep-Brain Stimulation for Basal Ganglia Disorders. *Basal Ganglia* 1:65-77.

- Wickens J. (2009). Synaptic plasticity in the basal ganglia. *Behav Brain Res* 199:119–128.
- Wilson CJ, Chang HT y Kitai ST. (1983). Disfacilitation and long-lasting inhibition of neostriatal neuron in the rat. *Exp Brain Res* 51,227–235.
- Wilson C, Bevan M. (2011). Intrinsic dynamics and synaptic inputs control the activity patterns of subthalamic nucleus neurons in health and in Parkinson's disease. *Neuroscience*. In Prepress
- Windels F, Kiyatkin E. (2006). Dopamine action in the substantia nigra pars reticulata: iontophoretic studies in awake, unrestrained rats. *Eur J Neurosci* 5:1385-1394.
- Xue J, Masuoka T, Gong X, Chen K, Yanagawa Y, Law S, Konishi S. (2011). NMDA receptor activation enhances inhibitory GABAergic transmission onto hippocampal pyramidal neurons via presynaptic and postsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol* 105:2897-2906.
- Yanovsky Y, Mades S, Misgeld U. (2003). Retrograde signaling changes the venue of postsynaptic inhibition in rat substantia nigra. *Neurosci* 122:317-328.
- Yin H, Knowlton B. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* 7:464-476.
- Yoshida M, Precht W. (1971). Monosynaptic inhibition of neurons of the substantia nigra by caudato-nigral fibers. *Brain Res*. 32: 225-228.
- Yuste R, MacLean J, Smith J, Lansner A.(2005). The cortex as a central pattern generator. *Nat Rev Neurosci* 6:477-83.
- Zhou F, Jin Y, Matta S, Xu M, Zhou F. (2009). An ultra-short dopamine pathway regulates basal ganglia output. *J Neurosci* 29:10424-10435.

Zhou FM, Lee CR.(2011). Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons.Neuroscience. In Press

Zold C, Belluscio M, Kasanetz F, Pomata P, Riquelme L, Gonon F, Murer M. (2009). Converging into a Unified Model of Parkinson's Disease Pathophysiology, K.-Y.Tseng. Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson's Disease Contemporary Neuroscience Humana. Editorial Press, pp. 252-259.

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



# Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons

José de Jesús Aceves, Pavel E. Rueda-Orozco, Ricardo Hernández, Víctor Plata, Osvaldo Ibañez-Sandoval, Elvira Galarraga and José Bargas\*

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

## Edited by:

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

## Reviewed by:

Christian Lee, New York University School of Medicine, USA

Carlos A. Paladini, University of Texas at San Antonio, USA

## \*Correspondence:

José Bargas, Division of Neuroscience, Institute of Cell Physiology, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box: 70-253, Distrito Federal México 04510, México.  
e-mail: jrbargas@ifc.unam.mx

Previous work has shown the functions associated with activation of dopamine presynaptic receptors in some substantia nigra pars reticulata (SNr) afferents: (i) striatonigral terminals (direct pathway) possess presynaptic dopamine D<sub>1</sub>-class receptors whose action is to enhance inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) and GABA transmission. (ii) Subthalamonigral terminals possess D<sub>1</sub>- and D<sub>2</sub>-class receptors where D<sub>1</sub>-class receptor activation enhances and D<sub>2</sub>-class receptor activation decreases excitatory postsynaptic currents. Here we report that pallidonigral afferents possess D<sub>2</sub>-class receptors (D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub> types) that decrease inhibitory synaptic transmission via presynaptic modulation. No action of D<sub>1</sub>-class agonists was found on pallidonigral synapses. In contrast, administration of D<sub>1</sub>-receptor antagonists greatly decreased striatonigral IPSCs in the same preparation, suggesting that tonic dopamine levels help in maintaining the function of the striatonigral (direct) pathway. When both D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub> type receptors were blocked, pallidonigral IPSCs increased in amplitude while striatonigral connections had no significant change, suggesting that tonic dopamine levels are repressing a powerful inhibition conveyed by pallidonigral synapses (a branch of the indirect pathway). We then blocked both D<sub>1</sub>- and D<sub>2</sub>-class receptors to acutely decrease direct pathway (striatonigral) and enhance indirect pathways (subthalamonigral and pallidonigral) synaptic force. The result was that most SNr projection neurons entered a recurrent bursting firing mode similar to that observed during Parkinsonism in both patients and animal models. These results raise the question as to whether the lack of dopamine in basal ganglia output nuclei is enough to generate some pathological signs of Parkinsonism.

**Keywords:** basal ganglia, striatum, substantia nigra pars reticulata, dopamine function, striatonigral synapses, pallidonigral synapses, D<sub>1</sub>-receptors, D<sub>2</sub>-receptors

## INTRODUCTION

The internal globus pallidus (GPi) and substantia nigra pars reticulata (SNr) are the basal ganglia (BG) output nuclei. Besides projecting to the thalamus to form the cortico-BG loops (Chevalier et al., 1985; Albin et al., 1989; Smith and Bolam, 1989; Alexander and Crutcher, 1990; DeLong, 1990; Smith et al., 1998; Haber, 2003), output nuclei also project to pons and brain stem to control descending pathways and central pattern generators (CPGs) that regulate muscular tone and automatic or rhythmic motor responses (Takakusaki et al., 2003, 2004; Grillner et al., 2008). In birds, reptiles, and lower vertebrates in which the cortex is not well developed, the control of brain stem nuclei is a main function of the BG (Reiner et al., 1998; Grillner et al., 2005, 2008; Gale and Perkel, 2010). In the SNr, inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) are in part provided by striatonigral direct pathway terminals (Grofová and Rinvik, 1970; Chevalier et al., 1985; Smith and Bolam, 1991; Deniau et al., 1996; Matuszewich and Yamamoto, 1999), which possess functional presynaptic dopamine D<sub>1</sub>-receptors whose activation increases direct pathway inhibition (Porceddu et al., 1986; Altar and Hauser, 1987; Floran et al., 1990; Radnikow and Misgeld, 1998; Chuhma et al., 2011). Enhancement of direct pathway inhibition facilitates movements while its reduction represses them (Albin

et al., 1989; Bateup et al., 2010; Kravitz et al., 2010; Redgrave et al., 2010). In contrast, subthalamonigral afferents compose the last step of the indirect pathway (Nakanishi et al., 1987; Bevan et al., 1994). Presynaptic modulation of subthalamonigral terminals by dopamine uses both classes of dopamine receptors: D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> (Ibañez-Sandoval et al., 2006). Activation of D<sub>1</sub> enhances while activation of D<sub>2</sub> depresses subthalamonigral excitatory postsynaptic currents (EPSCs). Interestingly, simultaneous blockade of both receptors induced larger evoked EPSCs, suggesting that D<sub>2</sub>-receptors have more influence than D<sub>1</sub>-receptors in the modulation of transmission (Ibañez-Sandoval et al., 2006).

In parallel, the external globus pallidus (GPe) also sends an inhibitory input to SNr (Bevan et al., 1996; Kita, 2007; Connelly et al., 2010). In the present work we investigated dopaminergic presynaptic modulation of inhibitory pallidonigral afferents. We found that D<sub>2</sub>-class receptors regulate these terminals with no sign of D<sub>1</sub>-receptor modulation as compared to striatonigral D<sub>1</sub>-mediated modulation in the same preparation. Interestingly, and as shown before for subthalamonigral afferents (Ibañez-Sandoval et al., 2006), we found that addition of selective receptor antagonists disclose a tonic action of ambient dopamine levels on both, striatonigral and pallidonigral afferents, supporting the notion that dopamine

receptors are sensing extracellular dopamine continuously (Yanovsky et al., 2003). Furthermore, the blockade of all dopamine receptor types altogether induced a recurrent bursting firing pattern in SNr projection neurons, a mode of firing typically seen in both Parkinsonian humans and animals (e.g., Magill et al., 2001; Walters et al., 2007; Walters and Bergstrom, 2009; Zold et al., 2009). This finding indicates that it is enough to acutely block dopamine receptors to induce a Parkinsonian firing pattern in SNr neurons. Given the direct projection of SNr to brain stem nuclei controlling muscular tone and CPGs activation, a question as to whether dopamine dysfunction in the output nuclei is enough to produce some Parkinsonian signs (Morris et al., 1994; Hemsley and Crocker, 1998; Hikosaka et al., 2000; Takakusaki et al., 2003) is set forth.

## MATERIALS AND METHODS

Procedures were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1996) and were approved by the Institutional Animal Care Committee of UNAM. Methods have been reported elsewhere (Beurrier et al., 2006; Ibáñez-Sandoval et al., 2006). Briefly, Wistar rats (15–40 postnatal day), were anesthetized with isoflurane, decapitated, and their brains removed. Parasagittal or parahorizontal slices (300  $\mu$ m) containing the neostriatum (NSt), globus pallidus (GP), and substantia nigra pars reticulata (SNr) were obtained with a vibratome in saline of the following composition (in millimolar): 124 choline chloride, 2.5 KCl, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, and 10 glucose ( $-4^{\circ}$ C 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Whole-cell patch-clamp recordings were performed on rat SNr neurons (Ibáñez-Sandoval et al., 2006, 2007). Neurons within the SNr were visualized with infrared differential interference videomicroscopy using a X60 water-immersion objective. For voltage-clamp recordings micropipettes 2–5 M $\Omega$  resistance were filled with internal saline containing high Cl<sup>-</sup> (in millimolar): 70 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 36 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na<sub>2</sub>ATP, 0.2 Na<sub>3</sub>GTP, 5 mM QX-314, 5 mM CsCl, and 0.1% biocytin (pH 7.2; 275 mOsm/l) that allowed to record inward IPSCs from SNr neurons after field stimulation in the internal capsule (IC) 0.5–1.0 mm outside the SNr border (Radnikow and Misgeld, 1998; Wallmichrath and Szabo, 2002). Bipolar pencil shaped concentric tungsten electrodes, 11.5  $\mu$ m at the tip, and 1 k $\Omega$  DC resistance were used. For current-clamp recordings we used internal saline of the following composition (in millimolar): 120 KSO<sub>3</sub>CH<sub>4</sub>, 10 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP-Mg, 0.3 GTP-Na (pH 7.3, 290 mOsm/l). Superfusion saline contained antagonists for glutamatergic receptors: 10  $\mu$ M 6-cyano-7-nitroquinoline-2,3-dione (CNQX) and 50  $\mu$ M D-(–)-2-amino-5-phosphopentanoic acid (APV) to isolate IPSCs. In parasagittal slices, 3 out of 10 recordings evoked pallidonigral IPSCs and the rest evoked striatonigral IPSCs (Figure 1). In parahorizontal slices 6 out of 10 recordings evoked pallidonigral IPSCs and the rest evoked striatonigral IPSCs. IPSCs from each source were easily discernible with electrophysiological techniques (Figure 1; Connelly et al., 2010) so that when an obvious mixture of IPSCs from both sources was obtained, it was discarded from the present analysis. Holding potential was  $-80$  mV. A paired-pulse protocol was employed with inter-pulse intervals of 50 ms to evaluate changes in the paired-pulse ratio (PPR) of evoked IPSCs (PPR = 2nd IPSC/1st IPSC) to verify presynaptic actions of

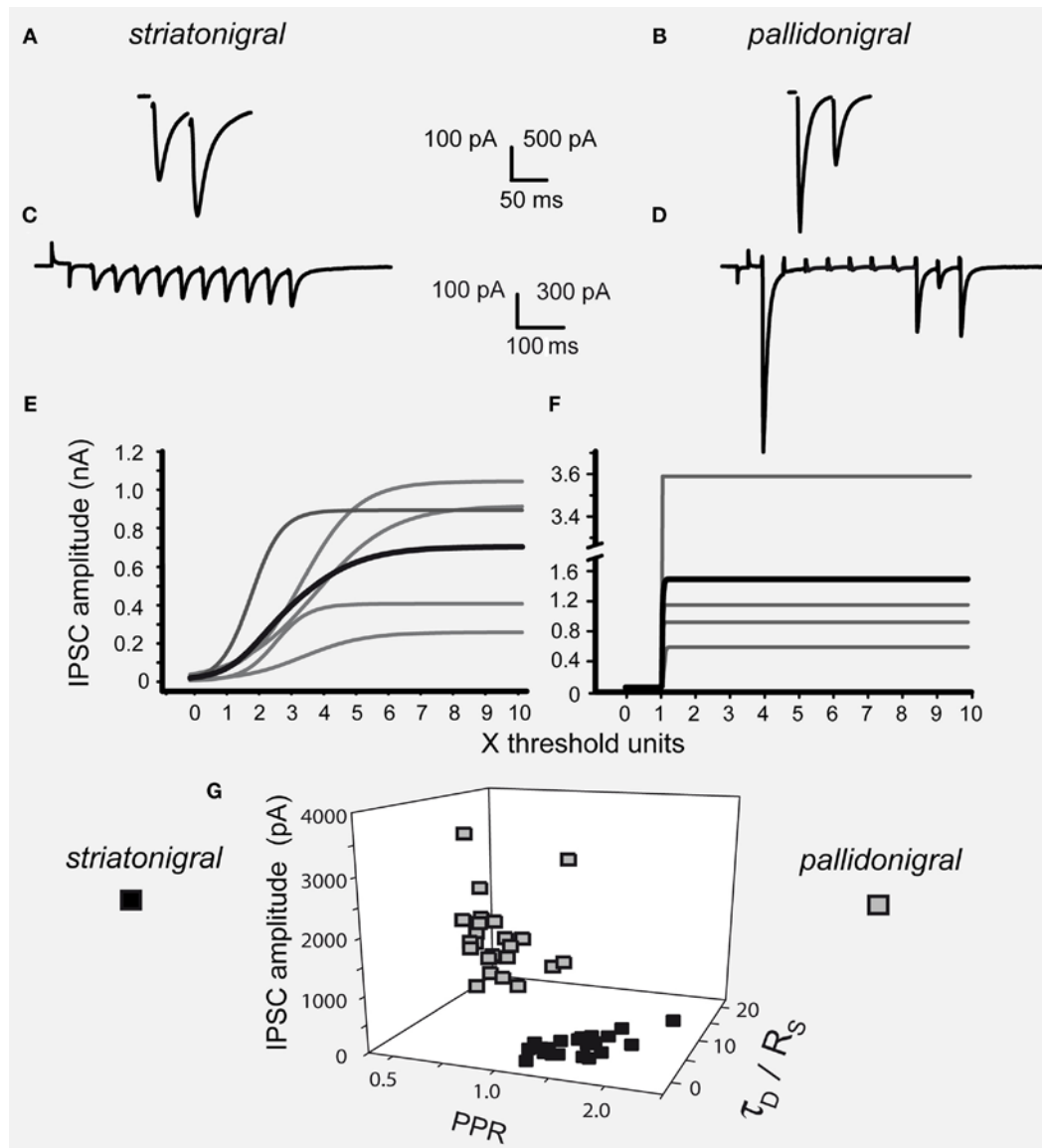
transmitters (Ibáñez-Sandoval et al., 2006). Amplitude of first IPSC was used to build time courses of dopaminergic actions. Because striatonigral fibers pass through the GPe, D<sub>2</sub>-class selective agonists were tested in slices taken from animals with a stereotaxic lesion (ibotenic acid) of the GPe (1.4 mm AP, 3.4 L, and 4.7 mm V) and compared to recordings obtained without a lesion. The lesion further confirmed the differences of IPSCs from both sources. Ibotenic acid solution (dissolved in PBS adjusted to pH 7.4 with NaOH 3.0  $\mu$ g/0.4  $\mu$ l) was used to lesion the GPe. These values closely followed Paxinos and Watson (1982) coordinates system.

Drugs were stored as dry aliquots and stock solutions were prepared prior to each experiment and added to the perfusion solution in the final concentration indicated. SKF 81297: ( $\pm$ )-6-Chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-phenyl-1H-3-benzazepine hydrobromide (10 nM–50  $\mu$ M); SCH 23390: 7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine (50 nM and 1  $\mu$ M); CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoline-2,3-dione (10  $\mu$ M), D-AP-5: D-(–)-2-amino-5-phosphopentanoic acid (50  $\mu$ M), bicuculline methiodide or methchloride (10  $\mu$ M), and QX-314 (5 mM inside the recording pipette), all were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). The neurons in the present work were SNr projection neurons ( $n = 250$ ; see: Ibáñez-Sandoval et al., 2006). IPSCs parameters from different afferents, i.e., striatonigral and pallidonigral were compared with Mann–Whitney's *U*-tests. IPSCs parameters in the same synapses before and after adding a given drug were compared with Wilcoxon's *t*-tests. At least 10 min of stable recordings before and after administering the drugs were used to reach stable average IPSCs amplitudes. Each symbol represents mean and SEM of quantal variation in a single representative experiment. Sample averages are given in the text. Differences in parameters of fitted functions were compared by using their estimation error and Student's *t*-tests.

## RESULTS

Figure 1 shows that striatonigral and pallidonigral synaptic inputs cannot be confused (Connelly et al., 2010). For similar stimulus, evoked striatonigral IPSCs were significantly smaller than pallidonigral IPSCs (mean  $\pm$  SEM for the first IPSC of a paired response): 235  $\pm$  50 pA ( $n = 32$ ) vs. 1399  $\pm$  152 pA ( $n = 20$ ;  $P < 0.0001$ ), respectively. Responses to paired-pulse stimulation were also different: striatonigral IPSCs showed paired-pulse facilitation: PPR = 1.41  $\pm$  0.07 (Figures 1A,G;  $n = 30$ ) whereas pallidonigral IPSCs always exhibited paired-pulse depression: PPR = 0.4  $\pm$  0.06 (Figures 1B,G;  $n = 19$ ;  $P < 0.0001$ ), although not always as strong as that depicted in Figure 1D. Short-term plasticity (10 pulses at 20 Hz) exhibited facilitation without failures in striatonigral connections (Figure 1C;  $n = 8$ ), whereas it exhibited depression with intermittent failures in pallidonigral synapses (Figure 1D;  $n = 4$ ). The decay time constant/rise time ratio was also different: 4.5  $\pm$  0.5 ( $n = 30$ ) in striatonigral synapses and 12.6  $\pm$  0.8 in pallidonigral synapses ( $n = 19$ ;  $P < 0.0001$ ) showing that pallidonigral IPSCs are briefer than striatonigral ones (Connelly et al., 2010). Intensity–Amplitude (I–A) relationships were also constructed and fitted to a three parameter sigmoidal function (Tecuapetla et al., 2005):

$$A(I) = \frac{A_{\max}}{1 + e^{-k(I-I_h)}}$$



**FIGURE 1 | Differences between striatonigral and pallidonigral inhibitory postsynaptic currents.** (A) Striatonigral inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) exhibited paired-pulse facilitation. (B) Pallidonigral IPSCs exhibit paired-pulse depression. (C) Short-term synaptic plasticity (STP) from striatonigral afferents is facilitation. (D) STP from pallidonigral afferents is depression with numerous failures. (E) Intensity–amplitude plots (I–A plots) from striatonigral IPSCs exhibit a sigmoidal shape. (F) I–A plots from pallidonigral IPSCs exhibit a jump to

maximal amplitude after reaching threshold. I–A plots were fitted to:  $A(I) = A_{max} / (1 + e^{-k(I-I_h)})$  where  $A(I)$  = IPSC amplitude as a function of stimulus intensity,  $A_{max}$  = maximal amplitude reached,  $k$  = slope factor, and  $I_h$  = stimulus intensity necessary to reach IPSC amplitude equal to half maximal amplitude. All parameters were significantly different. (G) Cluster plot showing that IPSCs from these sources can be separated. PPR = paired-pulse ratio.  $\tau_D$  = decay time constant of IPSCs.  $R_S$  = rise time of IPSCs.

where  $A(I)$  = IPSC amplitude as a function of stimulus intensity,  $A_{max}$  = maximal amplitude reached,  $k$  = slope factor, and  $I_h$  = stimulus intensity necessary to reach IPSC amplitude equal to half maximal amplitude. All three parameters were significantly different when comparing IPSCs from striatonigral vs. pallidonigral afferents:  $A_{max}$ :  $430 \pm 3$  pA vs.  $1512 \pm 10$  pA ( $n = 8$ ;  $P < 0.0001$ );  $k$ :  $3.6 \pm 0.3$  vs.  $14 \pm 5$  ( $n = 8$ ;  $P < 0.0001$ ) and  $I_h$ :  $2.3 \pm 0.2$  vs.  $1.1 \pm 0.1$  ( $n = 8$ ;  $P < 0.005$ ).

These features coincide with a previous report (Connelly et al., 2010) and were verified qualitatively by evoking IPSCs from either the subthalamic nucleus (NST) or the GPe, however, in these

occasions IPSCs were considerably smaller and amplitude could not be compared by itself given the different distances from stimulating and recording electrodes (not shown). Striatonigral IPSCs features have been well described (Radnikow and Misgeld, 1998; Wallmichrath and Szabo, 2002; Beurrier et al., 2006; Chuhma et al., 2011) as well as IPSCs from pallidal origin making synapses into the SNr and other nuclei (Tecuapetla et al., 2005; Baufreton et al., 2009; Connelly et al., 2010). Finally, three of these variables were used to build a cluster plot (Figure 1G) which confirmed the easiness to separate IPSCs from each source.



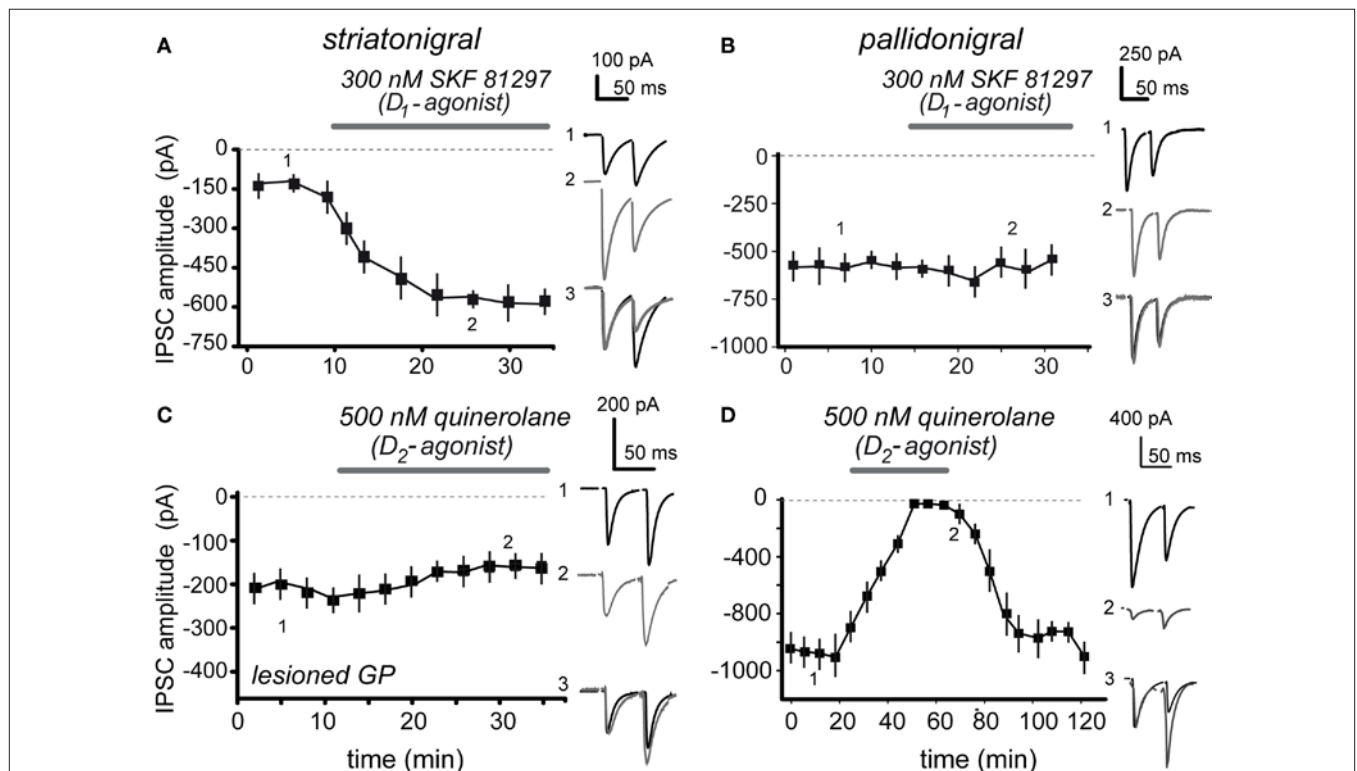
The actions of selective dopamine receptor agonists for  $D_1$ - and  $D_2$ -receptor classes were tested. As it has been repeatedly demonstrated, the action of dopaminergic  $D_1$ -class selective agonists at nanomolar concentrations was that of enhancing striatonigral IPSCs (Floran et al., 1990; Radnikow and Misgeld, 1998; Chuhma et al., 2011): striatonigral IPSC increased  $153 \pm 10\%$  after 300 nM SKF 81297 ( $n = 15$ ;  $P < 0.001$ ) and the paired-pulse ratio (PPR = IPSC2/IPSC1) decreased from  $1.4 \pm 0.13$  in the control to  $1.0 \pm 0.12$  during SKF 81297 ( $P < 0.001$ ), confirming a presynaptic modulation. These actions were reversible and blocked by 100 nM of the  $D_1$ -antagonist SCH 23390 ( $n = 5$ ; not shown here but see below) indicating that at these concentrations the action is specific. In addition, here we show that the agonists have no significant action on pallidonigral IPSCs (cf., **Figures 2A,B**).

Contrasting results were obtained when a selective  $D_2$ -class receptor agonist, 500 nM quinelorane, was employed: striatonigral IPSCs suffered no significant alteration (**Figure 2C**;  $n = 5$  NS; Chuhma et al., 2011) whereas pallidonigral IPSCs were significantly inhibited (**Figure 2D**) by  $73 \pm 18\%$  (**Figure 2D**;  $n = 19$ ;  $P < 0.0001$ ). PPR increased from  $0.76 \pm 0.1$  to  $1.83 \pm 0.2$  ( $P < 0.001$ ), suggesting a presynaptic action. These actions were reversible and blocked by 500 nM sulpiride, a  $D_2$ -antagonist ( $n = 5$ ; not shown but see below).

Summarizing, physiological action of  $D_1$ -receptor agonists on striatonigral terminals is that of IPSC enhancement as previously shown (Floran et al., 1990; Radnikow and Misgeld, 1998; Chuhma

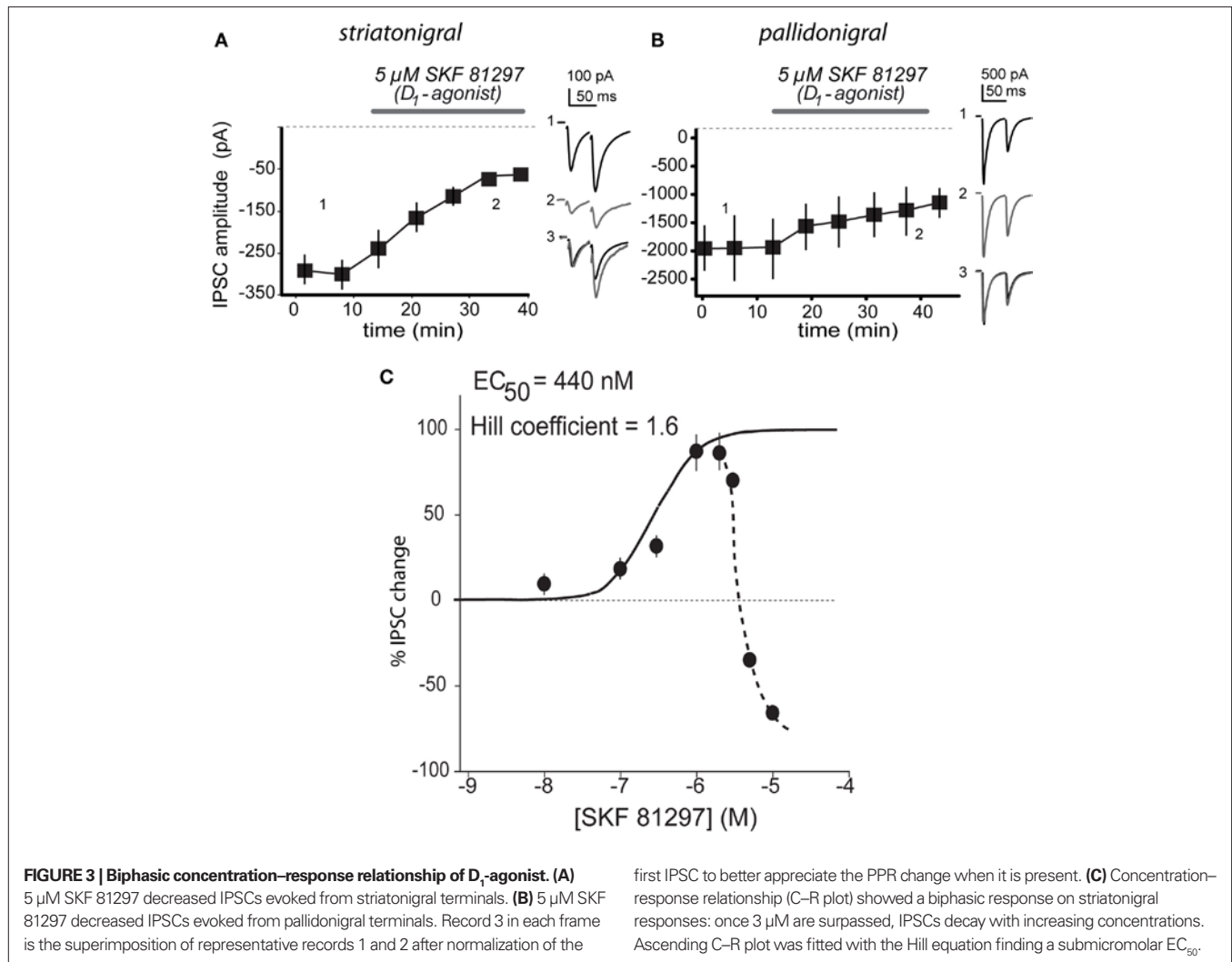
et al., 2011) with no action on pallidonigral terminals. On the other hand, physiological action of  $D_2$ -receptor agonists on pallidonigral IPSCs is that of depression with no significant action on striatonigral terminals.

Therefore we were forced to infer that reports about  $D_1$ -mediated inhibition of striatonigral terminals (Miyazaki and Lacey, 1998) were either involving a non-specific action, a pallidal contamination, or both. To test this hypothesis we used larger micromolar concentrations of the  $D_1$ -agonist while evoking IPSCs from both pathways. **Figures 3A,B** show that 5  $\mu$ M SKF 81297 decreased IPSCs evoked from both set of terminals. Striatonigral IPSC decreased  $82 \pm 13\%$  ( $n = 18$ ;  $P < 0.001$ ) and pallidonigral responses decreased by  $35 \pm 15\%$  ( $n = 6$ ;  $P < 0.005$ ). These actions could not be blocked by micromolar concentrations of SCH 23390 (not shown), suggesting that they were not specific. In view of these results we built a concentration–response relationship (C–R plot) using a wide range of SKF 81297 concentrations while stimulating striatonigral afferents. This C–R plot can be seen in **Figure 3C**: it is biphasic. When the Hill equation was fitted to the ascending (specific part)  $EC_{50}$  was  $440 \pm 60$  nM and the Hill coefficient  $1.6 \pm 0.2$ , suggesting cooperativity and a specific action at submicromolar concentrations. Moreover, the fact that pallidonigral inputs are also affected when they do not respond when submicromolar concentrations of agonists are used confirmed non-specific actions.



**FIGURE 2 | Contrasting actions of  $D_1$ - and  $D_2$ -receptor agonists on striatonigral and pallidonigral IPSCs.** (A) 100 nM of the selective  $D_1$ -class receptor agonist, SKF 81297, enhanced striatonigral IPSCs. (B) 100 nM SKF 81297, had no action on pallidonigral IPSCs. (C) 500 nM of the selective  $D_2$ -class receptor agonist, quinelorane, had no significant action on striatonigral IPSCs. In

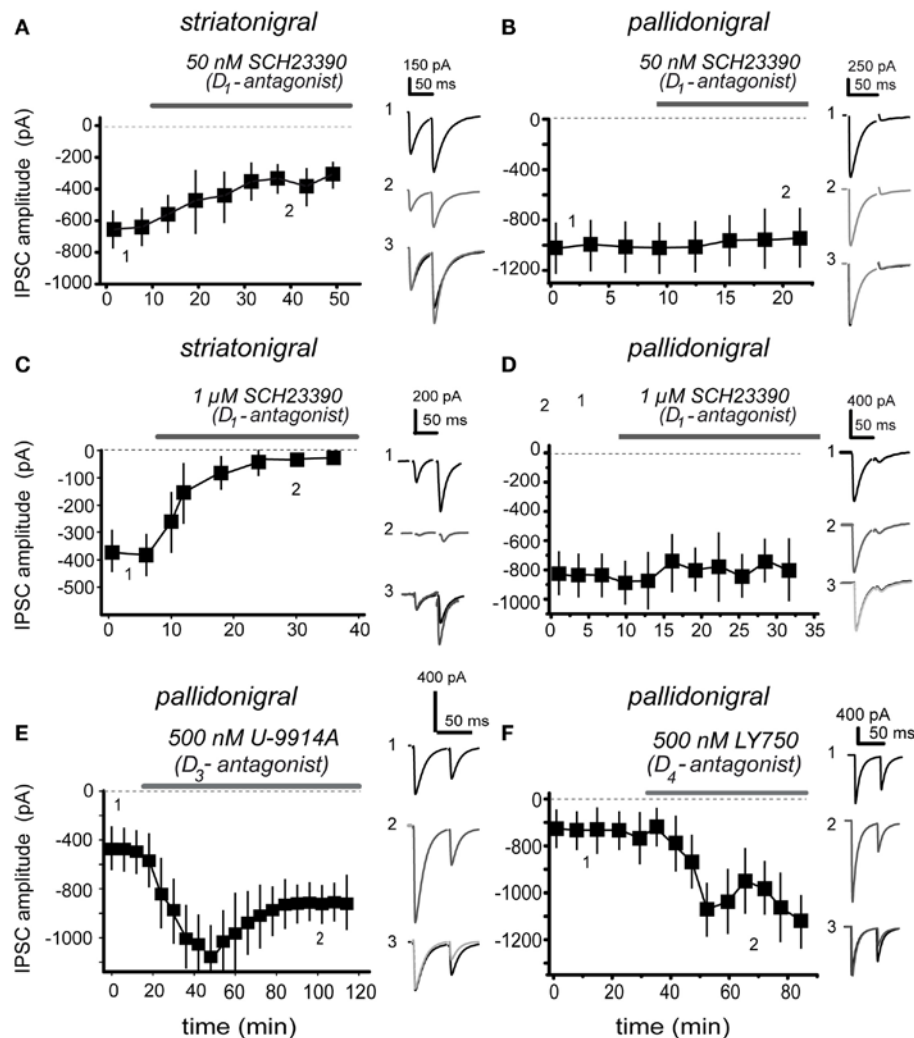
some cases the GPe was lesioned to better avoid contamination from pallidonigral afferents. (D) 500 nM quinelorane greatly reduced pallidonigral IPSCs. Note changes in PPR accompanying significant effects. Record 3 in each frame is the superimposition of records 1 and 2 after normalization of the first IPSC to better appreciate the PPR change when it is present.



Given the low concentrations of agonists needed to activate  $D_1$ - and  $D_2$ -class receptors in their respective terminals (striatonigral and pallidonigral) we inferred that, perhaps, endogenous extracellular dopamine exerts a tonic action on these receptors. **Figure 4** shows that this hypothesis is correct. **Figures 4A,B** show that 50 nM of a  $D_1$ -class receptor selective antagonist, SCH 23390, are enough to inhibit striatonigral IPSCs with no significant action on pallidonigral IPSC. Striatonigral IPSC decreased from  $319 \pm 75$  in the control to  $150 \pm 11$  pA after 50 nM SCH 23390 ( $n = 12$ ;  $P < 0.02$ ). **Figures 4C,D** confirm these findings and further show that potency and speediness of  $D_1$ -action is concentration dependent. Striatonigral IPSC is greatly reduced – almost abolished – when a low micromolar antagonist concentration is maintained in the superfusion (**Figure 4C**). The effect is reversible (not shown). Traces chosen at different times during the time course, superimposed, and normalized to the amplitude of the first IPSC, show that the PPR is greatly increased from  $1.9 \pm 0.4$  in the control to  $2.4 \pm 0.6$  after SCH 23390 ( $n = 21$ ;  $P < 0.001$ ; when the IPSC is abolished PPR cannot be measured); confirming a presynaptic site of action. On the other hand, SCH 23390 did not produce any action on pallidonigral IPSC at any concentration (**Figure 4D**). In summary,

$D_1$ -receptors in direct pathway striatonigral terminals are sensitive detectors of extracellular dopamine. Moreover, blockade of dopaminergic action can reduce striatonigral synaptic reliability to a minimum.

In addition, **Figures 4E,F** illustrate the actions of selective antagonists for  $D_3$ - and  $D_4$ -type dopamine receptors: 500 nM U-9914A, a selective  $D_3$ -type receptor antagonist enhanced pallidonigral IPSCs by  $262 \pm 16\%$  after ( $n = 12$ ;  $P < 0.001$ ) while the PPR decreased from  $0.87 \pm 0.08$  in the control to  $0.51 \pm 0.1$  during the antagonist. On the other hand, 500 nM LY7550, a selective  $D_4$ -type receptor antagonist increased pallidonigral IPSCs by  $170 \pm 20\%$  ( $n = 7$ ;  $P < 0.001$ ) while PPR decreased from  $0.78 \pm 0.07$  in the control to  $0.57 \pm 0.09$  during the blockade. Sulpiride a generic  $D_2$ -class receptor antagonist had similar actions (not shown): pallidonigral IPSCs increased by  $150 \pm 14\%$  ( $n = 3$ ) while PPR decreased from  $0.77 \pm 0.03$  in the control to  $0.35 \pm 0.01$  during blockade. To summarize,  $D_{3/4}$ -receptors in pallidonigral terminals (Murray et al., 1994; Bevan et al., 1996; Marshall et al., 2001; Rivera et al., 2003; Seeman et al., 2006; Acosta-García et al., 2009; Gasca-Martinez et al., 2010) are sensitive to extracellular dopamine, which has the role of tonically repressing the force



**FIGURE 4 | Presynaptic dopamine receptors sense endogenous extracellular dopamine. (A)** 50 nM of selective dopamine  $D_1$ -receptor antagonist, SCH 3390, are enough to reduce striatonigral IPSC amplitude. **(B)** The same antagonist concentration has no action on pallidonigral IPSC. **(C)** Increasing  $D_1$ -antagonist concentration (1  $\mu$ M) greatly reduced IPSC while speeding up dopamine actions on striatonigral IPSC, suggesting a concentration dependent mechanism. **(D)** The same antagonist

concentration has no action on pallidonigral IPSC. **(E)** 500 nM U-9914A, a selective  $D_2$ -type receptor antagonist, significantly enhanced pallidonigral IPSC. Note a partial reversion. **(F)** 500 nM LY750, a selective  $D_4$ -type receptor antagonist, significantly increased pallidonigral IPSC. Record 3 in each frame is the superimposition of representative records 1 and 2 after normalization of the first IPSC to better appreciate the PPR change when it is present.

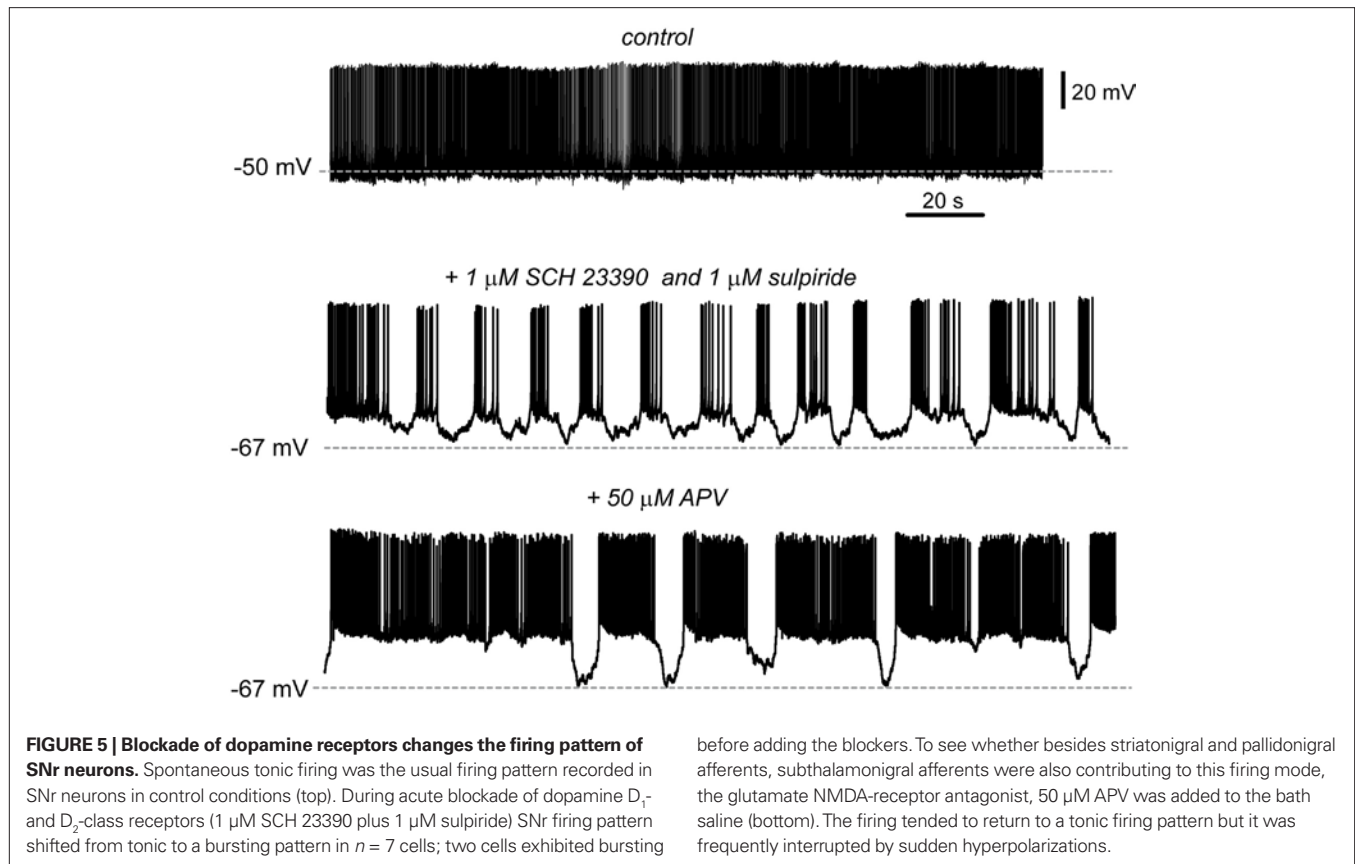
of these synapses. Some functional differences in the actions of these receptor types perhaps deserve further investigation (cf., **Figures 4E,F**).

Finally, because subthalamonigral terminals are also tonically controlled by presynaptic dopamine receptors ( $D_1$ - and  $D_2$ -class; Ibáñez-Sandoval et al., 2006) and because blockade of these receptors enhance subthalamonigral EPSCs (Ibáñez-Sandoval et al., 2006), we propose the following hypothesis based in the present and previous results (Radnikow and Misgeld, 1998; Acosta-García et al., 2009; Chuhma et al., 2011): that acute blockade of both  $D_1$ - and  $D_2$ -class (including  $D_{3/4}$ -types) receptors (by 1  $\mu$ M SCH 23390 plus 1  $\mu$ M sulpiride) altogether may decrease direct pathway synapses (striatonigral) and, at the same time, enhance indirect pathway synapses (subthalamonigral and pallidonigral), both actions being required in physiopathological

models of Parkinsonism to elicit the signs of the disease. The result can be seen in **Figure 5**: SNr neurons shifted from a tonic firing pattern in the control to a bursting firing pattern after blockade of dopamine receptors ( $n = 7$  neurons; Ibáñez-Sandoval et al., 2007).

One of the most supported neuronal correlates of Parkinsonism: recurrent bursting in SNr neurons, was similar to that previously reported *in vivo* and *in vitro* (Hammond et al., 2007; Ibáñez-Sandoval et al., 2007; Walters et al., 2007; Walters and Bergstrom, 2009; Zold et al., 2009). Transitions from tonic to bursting firing mode can rarely be seen spontaneously in control preparations (Ibáñez-Sandoval et al., 2007).

To see whether excitatory subthalamonigral afferents, that is, the STN-GP circuit, was participating in this firing behavior, we added the NMDA-receptor antagonist APV (50  $\mu$ M) to provoke a partial



block of STN influence. The result was that the firing pattern became less bursty and more tonic (Ibáñez-Sandoval et al., 2007), however, firing was still abruptly interrupted by sudden hyperpolarizations, probably coming from enhanced pallidonigral inputs.

## DISCUSSION

The present work shows that extracellular dopamine concentrations are tonically being sensed by the synaptic terminals of inhibitory inputs to the SNr in opposite ways. Thus, blockade of D<sub>1</sub>-type receptors in striatonigral (direct pathway) afferents decreased striatonigral inhibition while blockade of D<sub>3/4</sub>-types receptors in pallidonigral terminals enhanced pallidonigral inhibition. Pallidonigral afferents are presynaptically controlled by D<sub>2</sub>-class but not D<sub>1</sub>-class receptors. Still other inputs to the SNr have to be studied to see whether they are presynaptically modulated.

### STRIATONIGRAL AND PALLIDONIGRAL IPSCs ARE DIFFERENT

Striatonigral IPSCs are smaller but last longer than pallidonigral IPSCs. In addition, they exhibit short-term facilitation and are positively regulated by D<sub>1</sub>-receptors (Floran et al., 1990; Radnikow and Misgeld, 1998; Connelly et al., 2010). Strong evidence for the last property has been obtained with optogenetic techniques (Chuhma et al., 2011), supporting the present and previous reports. In comparison, pallidonigral IPSCs are larger and exhibit different degrees of short-term depression (Connelly et al., 2010). The two classes of inhibition are so different that cannot be confused. Pallidonigral IPSCs are negatively regulated by D<sub>2</sub>-class receptors and have no

D<sub>1</sub>-modulation. Notably, short-term facilitation works as a high pass filter of incoming inputs whereas short-term depression works as a low pass filter (Abbott and Regehr, 2004). In contrast, subthalamonigral excitatory synapses are controlled by both D<sub>1</sub>- and D<sub>2</sub>-class receptors (Ibáñez-Sandoval et al., 2006).

Selective dopamine receptor agonists exert their specific actions at nanomolar or low micromolar concentrations but higher concentrations become non-specific, thus explaining previous contradictions (cf., Miyazaki and Lacey, 1998; Radnikow and Misgeld, 1998) and probably similar discrepancies within the striatal/accumbinal circuitry (Guzman et al., 2003; Taverna et al., 2005). To summarize: D<sub>1</sub>-receptor activation enhances GABA release in terminals from medium spiny neurons of the direct pathway whereas D<sub>3/4</sub>-receptor activation represses GABA release from pallidonigral terminals.

### STRIATONIGRAL AND PALLIDONIGRAL DOPAMINE RECEPTORS SENSE EXTRACELLULAR AMBIENT ENDOGENOUS DOPAMINE

Because nanomolar concentrations of selective receptor agonist are needed to modify transmission, we hypothesized that administrations of selective dopamine receptor antagonist would disclose the actions of endogenous dopamine present in the extracellular space. Therefore, to disclose the action of ambient endogenous dopamine we applied selective D<sub>1</sub>- and D<sub>3/4</sub>-receptor antagonists. Our findings were that according to the concentration, suppression of endogenous dopamine action greatly reduced striatonigral transmission while it enhanced pallidonigral transmission. These results indicated that extracellular dopamine concentrations are



regulating synaptic release probability in both types of connections, increasing release probability in striatonigral synapses and decreasing release probability in pallidonigral synapses.

Therefore, the following working hypothesis resulted from the present experiments: tonic levels of dopamine in SNr are necessary to maintain the normal function of direct pathway connections and maintain in check indirect pathway synapses from both pallidonigral terminals (present work) and subthalamonigral terminals (Ibáñez-Sandoval et al., 2007). The logical functional consequence of this hypothesis was tested: blockade of tonic dopamine action would enhance indirect pathway transmission and reduce direct pathway input thus yielding a previously observed neuronal correlate of Parkinsonism: SNr neurons shifted their tonic firing pattern to a bursting firing pattern typical of subjects with the disease (Takakusaki et al., 2004; Rivlin-Etzion et al., 2006; Hammond et al., 2007; Ibáñez-Sandoval et al., 2007; Walters et al., 2007; Zold et al., 2009).

Tonic spontaneous firing is preserved in the slice preparation in both GPe and STN (e.g., Beurrier et al., 1999; Chan et al., 2011). Calcium imaging techniques recording dozens of cells simultaneously within the striatal circuit show that there is always some spontaneous activity in striatal spiny neurons in control conditions (Carrillo-Reid et al., 2008). Moreover, there is a great amount of convergence between the striatum and the substantia nigra and inhibitory striatonigral events are of large amplitude (e.g., Chuhma et al., 2011). Thus, for a SNr neuron there always may be some striatal cell firing. Therefore, the lost balance between direct and indirect pathways by the acute blockade of dopamine receptors is the most probable cause of bursting in SNr neurons during the present experiments.

Postsynaptic dopamine receptors on SNr neurons cannot explain bursting because their function is to increase tonic firing frequency via a cation current; their blockade resulting in lower tonic frequency with irregularities, but not continuous bursting behavior (Lee and Tepper, 2007; Zhou et al., 2009).

## FUNCTIONAL CONSEQUENCES

Because the change in firing pattern of SNr neurons was achieved acutely by blocking dopamine receptors one can speculate what would happen during a chronic absence of dopamine in the output

nuclei of the BG. The absence of dopamine (e.g., Parkinsonism) may reduce the function of direct pathway synapses in such a way that maintaining this state of affairs in the long-time would lead to loss of direct pathway synapses due to long-term synaptic plasticity. In contrast, maintaining a high function in pallidonigral and subthalamonigral synapses would produce long-term potentiation of these synapses. These events taken together may tend to change the circuitry permanently, making not only L-DOPA inefficient but, perhaps, making the chronic diseased circuitry radically different than the control or healthy circuit: that is, more dependent on the subthalamopallidal loop (Magill et al., 2001; Baufreton et al., 2009).

Bursting in SNr neurons leads to tremor and rigidity (Hemsley and Crocker, 1998; Takakusaki et al., 2004). Moreover, this configuration of synaptic weights would lead to the loss of high pass filtering of SNr inputs (direct pathway's short-term facilitation) and an increase in low pass filtering of SNr inputs (pallidonigral short-term depression; Abbott and Regehr, 2004) setting the stage to favor the entrance to an akinetic frequency lock (Hutchison et al., 2004; Avila et al., 2010). Consequently, therapeutic ways of activating the direct pathway in the chronic patient may be fundamental to avoid irreversible plastic changes in the network (Hammond et al., 2007; Walters et al., 2007; Walters and Bergstrom, 2009; Zold et al., 2009; Bateup et al., 2010; Kravitz et al., 2010).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Laville, D. Tapia and G. X. Ayala for helpful comments and technical support. This work was funded by Investigacion Multidisciplinaria de Proyectos Universitarios de Liderazgo y Superacion Academica (IMPULSA)-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) 03, Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM Grants IN-205610 to José Bargas, and IN-206010 to Elvira Galarraga. Fundación Miguel Alemán AC to José Bargas. Pavel E. Rueda-Orozco was postdoctoral fellow at UNAM. Osvaldo Ibáñez-Sandoval Ricardo Hernandez, José de Jesús Aceves, and Víctor Plata had or have CONACyT-Mexico doctoral fellowships.

## REFERENCES

- Abbott, L. F., and Regehr, W. G. (2004). Synaptic computation. *Nature* 431, 796–803.
- Acosta-García, J., Hernández-Chan, N., Paz-Bermúdez, F., Sierra, A., Erijl, D., Aceves, J., and Florán, B. (2009). D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 57, 725–730.
- Albin, R. L., Young, A. B., and Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366–375.
- Alexander, G. E., and Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13, 266–271.
- Altar, C. A., and Hauser, K. (1987). Topography of substantia nigra innervation by D1 receptor-containing striatal neurons. *Brain Res.* 410, 1–11.
- Avila, I., Parr-Brownlie, L. C., Brazhnik, E., Castaneda, E., Bergstrom, D. A., and Walters, J. R. (2010). Beta frequency synchronization in basal ganglia output during rest and walk in a hemiparkinsonian rat. *Exp. Neurol.* 221, 307–319.
- 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.
- Baufreton, J., Kirkham, E., Atherton, J. F., Menard, A., Magill, P. J., Bolam, J. P., and Bevan, M. D. (2009). Sparse but selective and potent synaptic transmission from the globus pallidus to the subthalamic nucleus. *J. Neurophysiol.* 102, 532–545.
- Beurrier, C., Ben-Ari, Y., and Hammond, C. (2006). Preservation of the direct and indirect pathways in an in vitro preparation of the mouse basal ganglia. *Neuroscience* 140, 77–86.
- Beurrier, C., Congar, P., Bioulac, B., and Hammond, C. (1999). Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode. *J. Neurosci.* 19, 599–609.
- Bevan, M. D., Bolam, J. P., and Crossman, A. R. (1994). Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 16, 320–334.
- Bevan, M. D., Smith, A. D., and Bolam, J. P. (1996). The substantia nigra as a site of synaptic integration of functionally diverse information arising from the ventral pallidum and the globus pallidus in the rat. *Neuroscience* 75, 5–12.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., and Bargas, J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435–1450.
- Chan, C. S., Glajch, K. E., Gertler, T. S., Guzman, J. N., Mercer, J. N., Lewis, A. S., Goldberg, A. B., Tkatch, T., Shigemoto, R., Fleming, S. M., Chetkovich, D. M., Osten, P., Kita, H., and Surmeier, D. J. (2011). HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models

- of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 14, 85–92.
- Chevalier, G., Vacher, S., Deniau, J. M., and Desban, M. (1985). Disinhibition as a basic process in the expression of striatal function. I. The striato-nigral influence on tecto-spinal/tecto-diencephalic neurons. *Brain Res.* 334, 215–226.
- Chuhma, N., Tanaka, K. F., Hen, R., and Rayport, S. (2011). Functional connectome of the striatal medium-spiny neuron. *J. Neurosci.* 31, 1183–1192.
- Connelly, W. M., Schulz, J. M., Lees, G., and Reynolds, J. N. (2010). Differential short-term plasticity at convergent inhibitory synapses to the substantia nigra pars reticulata. *J. Neurosci.* 30, 14854–14861.
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281–285.
- Deniau, J. M., Menetrey, A., and Charpier, S. (1996). The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *J. Neurosci.* 16, 761–781.
- Floran, B., Aceves, J., Sierra, A., and Martinez-Fong, D. (1990). Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci. Lett.* 116, 136–140.
- Gale, S. D., and Perkel, D. J. (2010). Anatomy of a songbird basal ganglia circuit essential for vocal learning and plasticity. *J. Chem. Neuroanat.* 39, 124–131.
- Gasca-Martinez, D., Hernandez, A., Sierra, A., Valdiosera, R., Anaya-Martinez, V., Floran, B., Erlij, D., and Aceves, J. (2010). Dopamine inhibits GABA transmission from the globus pallidus to the thalamic reticular nucleus via presynaptic D4 receptors. *Neuroscience* 169, 1672–1681.
- Grillner, S., Markram, H., De Schutter, E., Silberberg, G., and LeBeau, F. E. (2005). Microcircuits in action from CPGs to neocortex. *Trends Neurosci.* 28, 525–533.
- Grillner, S., Wallén, P., Saitoh, K., and Kozlov, A. B. (2008). Robertson neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates an overview. *Brain Res. Rev.* 57, 2–12.
- Grofová, I., and Rinvik, E. (1970). An experimental electron microscopic study on the striatonigral projection in the cat. *Exp. Brain Res.* 11, 249–262.
- 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.
- Haber, S. N. (2003). The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J. Chem. Neuroanat.* 26, 317–330.
- Hammond, C., Bergman, H., and Brown, P. (2007). Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci.* 30, 357–364.
- Hemsley, K. M., and Crocker, A. D. (1998). The effects of an irreversible dopamine receptor antagonist, N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ), on the regulation of muscle tone in the rat: the role of the substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 251, 77–80.
- Hikosaka, O., Takikawa, Y., and Kawagoe, R. (2000). Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol. Rev.* 80, 953–978.
- 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.
- Ibáñez-Sandoval, O., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Mendoza, E., Gomora, J. C., Aceves, J., and Bargas, J. (2007). Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: possible relevance for Parkinson disease. *J. Neurophysiol.* 98, 2311–2323.
- Ibáñez-Sandoval, O., Hernandez, A., Floran, B., Galarraga, E., Tapia, D., Valdiosera, R., Erlij, D., Aceves, J., and Bargas, J. (2006). Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J. Neurophysiol.* 95, 1800–1811.
- Kita, H. (2007). Globus pallidus external segment. *Prog. Brain Res.* 160, 111–133.
- 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.
- Lee, C. R., and Tepper, J. M. (2007). A calcium-activated nonselective cation conductance underlies the plateau potential in rat substantia nigra GABAergic neurons. *J. Neurosci.* 27, 6531–6541.
- Magill, P. J., Bolam, J. P., and Bevan, M. D. (2001). Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106, 313–330.
- Marshall, J. F., Henry, B. L., Billings, L. M., and Hoover, B. R. (2001). The role of the globus pallidus D2 subfamily of dopamine receptors in pallidal immediate early gene expression. *Neuroscience* 105, 365–378.
- Matuszewich, L., and Yamamoto, B. K. (1999). Modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra. *Synapse* 32, 29–36.
- Miyazaki, T., and Lacey, M. G. (1998). Presynaptic inhibition by dopamine of a discrete component of GABA release in rat substantia nigra pars reticulata. *J. Physiol.* 513, 805–817.
- Morris, M. E., Inasek, R., Matyas, T. A., and Summers, J. J. (1994). The pathogenesis of gait hypokinesia in Parkinson's disease. *Brain* 117, 1169–1181.
- Murray, A. M., Ryoo, H. L., Gurevich, E., and Joyce, J. N. (1994). Localization of dopamine D3 receptors to mesolimbic and D2 receptors to mesostriatal regions of human forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11271–11275.
- Nakanishi, H., Kita, H., and Kitai, S. T. (1987). Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an in vitro slice preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation. *Brain Res.* 437, 45–55.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1982). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Porceddu, M. L., Giorgi, O., Ongini, E., Mele, S., and Biggio, G. (1986). 3H-SCH 23390 binding sites in the rat substantia nigra: evidence for a presynaptic localization and innervation by dopamine. *Life Sci.* 39, 321–328.
- Radnikow, G., and Miggelid, U. (1998). Dopamine D1 receptors facilitate GABA synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J. Neurosci.* 18, 2009–2016.
- 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.
- Reiner, A., Medina, L., and Veenman, C. L. (1998). Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res. Rev.* 28, 235–285.
- Rivera, A., Trias, S., Peñafiel, A., Angel Narváez, J., Díaz-Cabiale, Z., Moratalla, R., and de la Calle, A. (2003). Expression of D4 dopamine receptors in striatonigral and striatopallidal neurons in the rat striatum. *Brain Res.* 989, 35–41.
- Rivlin-Etzion, M., Marmor, O., Heimer, G., Raz, A., Nini, A., and Bergman, H. (2006). Basal ganglia oscillations and pathophysiology of movement disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 629–637.
- Seeman, P., Wilson, A., Gmeiner, P., and Kapur, S. (2006). Dopamine D2 and D3 receptors in human putamen, caudate nucleus, and globus pallidus. *Synapse* 60, 205–211.
- Smith, Y., Bevan, M. D., Shink, E., and Bolam, J. P. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86, 353–387.
- Smith, Y., and Bolam, J. P. (1989). Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res.* 493, 160–167.
- Smith, Y., and Bolam, J. P. (1991). Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labelling study. *Neuroscience* 44, 45–73.
- Takakusaki, K., Habaguchi, T., Ohtinata-Sugimoto, J., Saitoh, K., and Sakamoto, T. (2003). Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience* 119, 293–308.
- Takakusaki, K., Saitoh, K., Harada, H., and Kashiwayanagi, M. (2004). Role of basal ganglia-brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neurosci. Res.* 50, 137–151.
- Taverna, S., Canciani, B., and Pennartz, C. M. (2005). Dopamine D1-receptors modulate lateral inhibition between principal cells of the nucleus accumbens. *J. Neurophysiol.* 93, 1816–1819.
- Tecuapetla, F., Carrillo-Reid, L., Guzmán, 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.
- Wallmichrath, I., and Szabo, B. (2002). Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience* 113, 671–682.
- Walters, J. R., and Bergstrom, D. A. (2009). “Basal ganglia network synchronization in animal models of Parkinson's disease,” in *Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson's Disease Contemporary Neuroscience*, ed. K.-Y. Tseng (New York: Humana Press), 117–142.
- Walters, J. R., Hu, D., Itoga, C. A., Parr-Brownlie, L. C., and Bergstrom, D. A. (2007). Phase relationships support a role for coordinated activity in the indirect pathway in organizing slow oscillations in basal ganglia output after loss of dopamine. *Neuroscience* 149, 762–776.

- Yanovsky, Y., Mades, S., and Misgeld, U. (2003). Retrograde signaling changes the venue of postsynaptic inhibition in rat substantia nigra. *Neuroscience* 122, 317–328.
- Zhou, F. W., Jin, Y., Matta, S. G., Xu, M., and Zhou, F. M. (2009). An ultra-short dopamine pathway regulates basal ganglia output. *J. Neurosci.* 29, 10424–10435.
- Zold, C. L., Belluscio, M., Kasanetz, F., Pomata, P. E., Riquelme, L. A., Gonon, F., and Murer, M. G. (2009). “Converging into a unified model of Parkinson’s disease pathophysiology,” in *Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson’s Disease Contemporary Neuroscience*, ed. K.-Y. Tseng (New York: Humana Press), 252–259.
- 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: 15 December 2010; paper pending published: 04 January 2011; accepted: 23 January 2011; published online: 10 February 2011.
- Citation: Aceves JJ, Rueda-Orozco PE, Hernández R, Plata V, Ibañez-Sandoval O, Galarraga E and Bargas J (2011) Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons. *Front. Syst. Neurosci.* 5:6. doi: 10.3389/fnsys.2011.00006
- Copyright © 2011 Aceves, Rueda-Orozco, Hernández, Plata, Ibañez-Sandoval, Galarraga and Bargas. 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.



# LEARNING & MEMORY

