



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

PLASTICIDAD SINÁPTICA EN LA SINAPSIS INHIBITORIA DEL GLOBO  
PÁLIDO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias

PRESENTA:  
RICARDO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ  
INSTITUTO DE FISILOGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ  
INSTITUTO DE FISILOGÍA CELULAR

DR. JOSE DE JESUS GARCIA VALDES  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. ENERO DEL 2015



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.

## Agradecimientos

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Neurociencia Cognitiva del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz quien me ha apoyado en todo momento, por su confianza, su excelente tutoría y amistad. También por la asesoría de mi comité tutorial conformado por el Dr. Juan Carlos Gómora Martínez y el Dr. José de Jesús García Valdés quienes me ayudaron con sus conocimientos en todos estos años para hacer un mejor trabajo.

A lo largo del Doctorado conté con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), se contó con el apoyo del Convenio Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Deutsche Forschungsgemeinschaft I0110/193/10 FON.INST.-29-10, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México: IN-202914 y IN-202814 y al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)

A los miembros del jurado por su apoyo en la revisión de este trabajo, sus valiosos comentarios y recomendaciones: Dr. Federico Bermúdez Rattoni, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Dr. Julio Moran Andrade, Dra. Angélica Zepeda Rivera y al Dr. León David Islas Suárez

A la Dra. Elvira Galarraga Palacio por todo el apoyo brindado desde siempre, sus buenos consejos y orientación.

A los técnicos del laboratorio que me ayudaron con su trabajo, y guía: Fis. Antonio Laville Conde, Biol. Dagoberto Tapia Ramírez, Mtra. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez, Biol. Ariadna Aparicio Juárez, y la Ing Bioq. Adriana Hernández.

Al bioterio, a su personal, en especial a la Dra. Claudia Rivera.

A la unidad de computo por los servicios prestados y pronta resolución en los problemas; Francisco Pérez Eugenio y Ana María Escalante

A las Sara Noriega, Leticia García y Miriam Morales por la paciencia, el apoyo recibido en este tiempo.

A los miembros del CCADET Alejandro Padrón Godínez, Rafael Prieto Meléndez y Alberto Herrera Becerra que me apoyaron en algunas dudas técnicas y me brindaron sus consejos.

A mi familia que siempre ha estado en las buenas y en las malas conmigo.

A mis mejores amigos de la UNAM que tuve la fortuna de conocer, de aprender juntos y vivir experiencias inolvidables en estos años: Mario, Chucho, Ale, Janet, Pepe Chuy, Pavel y Dey.

A mis compañeros del lab, del fut y del instituto: Brisa, Vlad, Gis, Mike, Veck, Pao, Pedro, Lalo, Carlos, JP, Neivys, Yusvel, Mirian, Eli, Bichito, Mata, Jonhy, Tona, Paty, Tzitzí, Uri, Manzana, Belén, Esther, Neto, Tere, Ari, Xochitl, Fatima, y la Sra Conchita.

A mis amigos: Laura Rosa, Oscar, Cynthia, Silvia, Susana, Hugo, Cecy, Mary, Raúl y Amalfi, Elena, Rebeca, Roberto e Irene, tío nacho, Nantis, Ahmed, Emmy, Nemi, y a todos los chacales de ENCB.

A mi primo Gelasio, Eusebia, mis tío sofo, primas y primos

Y a todos aquellos compañeros y amigos que por falta de tiempo no los incluí.

Gracias a todos ustedes

## **DEDICATORIA**

*Gracias por confiar en mí, por la paciencia y el apoyo brindado todo este tiempo, no hubiera llegado tan lejos sin ustedes. Los quiero mucho.*

*Deseo agradecerles por todo, me siento muy orgulloso de la familia tan grandiosa que tengo, y estoy contento de pertenecer a ella. Si puedo presumir algo en esta vida es a ustedes.*

*A mis padres:*

*Pedro Hernández Silva y María Angelina Martínez de la Cruz*

*A mis hermanos y familia:*

*Eliseo Hernández Martínez, Gabriel Hernández Martínez, Jazmín Rodríguez Jiménez, Stefany Hernández Rodríguez, Ángel Hernández Rodríguez.*

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	III
ÍNDICE GENRAL	IV
INDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VII
1.0 INTRODUCCIÓN	
1.1 Anatomía	1
1.2 Clasificación de las neuronas del globo pálido	3
1.3 Plasticidad sináptica de corto plazo.	8
1.4 Modulación presináptica	10
1.5 Modulación colinérgica en el GPe	12
1.6 Plasticidad sináptica de largo plazo	14
2.0 HIPÓTESIS	16
3.0 OBJETIVOS	17
4.0 MATERIALES Y METODOS	18
4.1 Obtención de rebanadas de cerebro de rata	18
4.2 Registro electrofisiológico	18
4.3 Inmunocitoquímica	21
4.4 Neuronas disociadas	22
4.3 Procesamiento de datos y estadísticas	23
5.0 RESULTADOS	24
SECCIÓN I	
5.1 STSP en sinapsis GABAérgicas registradas en neuronas del GPe	24
5.2 La activación de los receptores muscarínicos colinérgicos inhibe a ambas clases de sinapsis	27
5.3 La acción muscarínica sobre las sinapsis-STF es bloqueada por antagonistas selectivos al receptor muscarínico de la clase M1	29
5.4 El efecto de la muscarina en la sinapsis STF no es mediado por cannabinoides y sí lo es en la sinapsis STD	32

5.5 La quelación intracelular de calcio inhibe la actividad de la muscarina en sinapsis STD	34
SECCIÓN II	
5.6 Plasticidad sináptica de largo plazo en la sinapsis estriatopalidal	39
5.7 La sinapsis estriatopalidal presenta LTD	39
5.8 La LTD estriatopalidal depende de los receptores a NMDA	41
5.9 LTD del GPe es dependiente de cannabinoides	42
5.10 La LTD del GPe es dependiente de receptores metabotrópicos glutamatergicos.	43
6.0 DISCUSIÓN	
6.1 Las sinapsis-STF son moduladas por receptores muscarínicos	45
6.2 Las sinapsis depresoras son moduladas por los receptores muscarínicos de forma indirecta	48
6.3 Importancia fisiológica	49
7.0 CONCLUSIONES	
8.0 FÁRMACOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS	52
9.0 REFERENCIAS ELECTRÓNICAS Y BIBLIOGRÁFICAS	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo funcional de los ganglios basales	2
Figura 2. Registro electrofisiológico y arquitectura somatodendrítica de las neuronas tipo A	4
Figura 3. Registro electrofisiológico y arquitectura somatodendrítica de las neuronas tipo B	4
Figura 4. Registro electrofisiológico y arquitectura somatodendrítica de las neuronas tipo C	5
Figura 5. Registro electrofisiológico de los tipos neuronales en GPe in vivo en ratas	6
Figura 6. Dibujos de una sección coronal donde se muestra la distribución de las neuronas inmunoreactivas a marcadores celulares	7
Figura 7. Proyecciones de los diferentes tipos neuronales del GPe	8
Figura 8. Plasticidad sináptica de corto plazo	9

Figura 9. Estimulación pareada de una sinapsis	11
Figura 10. Condición general de los experimentos	23
Figura 11. Plasticidad sináptica de corto plazo	26
Figura 12. Modulación muscarínica de las sinapsis STF y STD	28
Figura 13. El efecto muscarínico en la sinapsis-STF es mediado por los receptores M <sub>1</sub>	30
Figura 14. Los antagonistas de los receptores M <sub>4</sub> no bloquean la acción muscarínica	31
Figura 15. La modulación difiere en las conexiones STF comparadas con las STD	34
Figura 16. El efecto muscarínico en las sinapsis-STD es bloqueado por la presencia de un quelante del calcio intracelular	36
Figura 17. Identificación de las neuronas del GPe	38
Figura 18. La sinapsis estriatopalidal presenta depresión de largo plazo	40
Figura 19. Algunas sinapsis STF presentan LTD después de un HFS	42
Figura 20. La LTD en la sinapsis estriatopalidal es dependiente de cannabinoides	43
Figura 21. La LTD en la sinapsis estriatopalidal no depende de la activación de receptores muscarínicos	44
Figura 22. Los mGluRs están involucrados en la LTD de la sinapsis estriatopalidal	45
Figura 23. Mecanismo propuesto para la modulación de la muscarina en la vía estriatopalidal	50
Figura 24. Mecanismo propuesto para la modulación de la muscarina en la vía palidopalidal	50



## RESUMEN

El globo pálido externo (GPe) es un núcleo muy importante para el procesamiento de la información de los ganglios basales, expresa receptores colinérgicos muscarínicos y recibe aferentes colinérgicas de los núcleos pedúnculo pontino (NPP) y otras regiones. Realizamos registros electrofisiológicos de patch clamp en la modalidad de célula entera utilizando rebanadas parasagitales de cerebro de rata para registrar a las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) evocadas por estimulación de campo en el estriado, de esta forma pudimos obtener diferentes formas de plasticidad de corto plazo que separan preferentemente el tipo de sinapsis. Denominamos a una STD (que mostraron depresión de corto plazo) y a otra STF (que mostraron facilitación de corto plazo) donde el agonista colinérgico del receptor muscarínico, muscarina, redujo significativamente la amplitud de los IPSCs de ambas sinapsis. Esta inhibición en las STF se asoció con aumentos significativos en los pulsos pareados y contenido quantal ( $CV^{-2}$ ). Fue proporcional a la amplitud de IPSC. Estas acciones fueron bloqueadas por la atropina, pirenzepina y mamba toxina-7; lo que sugiere que los receptores implicados eran  $M_1$ . Además, se encontró que algunas neuronas palidales tienen receptores  $M_1$  funcionales postsinápticos que son las que exhibieron STD y exhiben un tipo diferente de modulación: fueron modulados indirectamente por la muscarina a través de la activación de los receptores de cannabinoides tipo 1 ( $CB_1$ ). Por lo tanto, las sinapsis palidales presentan distintas formas de plasticidad a corto plazo y se modulan de forma diferente. Por otra parte en las STF se demostró que presentan depresión de largo plazo (LTD) y esta es modulada por los receptores NMDA, por el  $CB_1$  y receptores metabotrópicos a glutamato (mGluR) no así por los receptores muscarínicos.

# INTRODUCCIÓN.

## **Anatomía.**

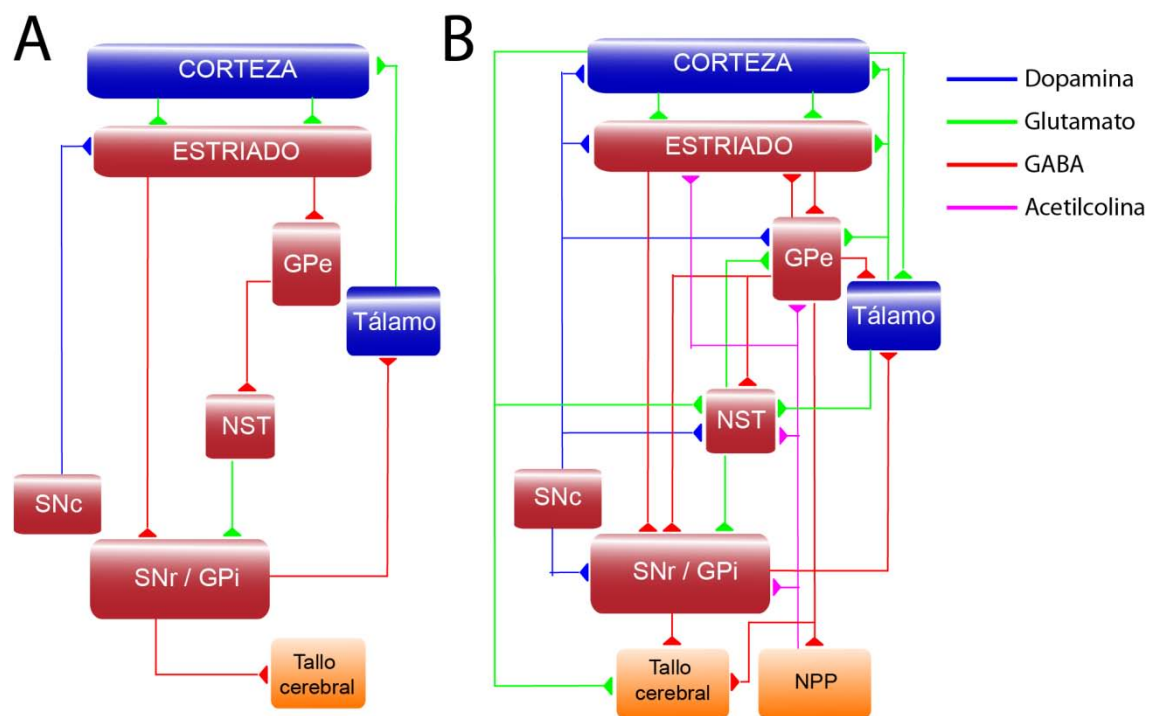
Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales relacionados que participan en el control motor, la asociación perceptual, la cognición y la memoria de procedimientos. Los GB incluyen al estriado (Str) (compuesto en primates por los núcleos caudado y putamen), el núcleo subtalámico (NST), el segmento externo del globo pálido (GPe), el segmento interno del globo pálido (GPi) (núcleo entopeduncular en el roedor), la sustancia nigra pars reticulata (SNr) y la sustancia nigra pars compacta (SNc) que incluye a las neuronas dopaminérgicas (Obeso et al. 2014).

El modelo funcional de los GB propuesto hace 25 años (Albin et al. 1989) sigue en vigencia con algunas modificaciones. En su versión original (Fig. 1A) el Str es la estructura de entrada y los núcleos GPi y SNr son los núcleos de salida. La conexión entre unos y otros se da de dos maneras: 1) a través de una vía monosináptica GABAérgica directa del estriado a GPi y SNr, y 2) a través de una vía polisináptica indirecta que va del Str al GPe y de ahí al NST. Este último conecta con GPi y SNr, es excitador y sus neuronas son glutamatérgicas. De esta manera, GPi y SNr reciben entradas inhibitorias de la vía directa y excitadoras de la vía indirecta cuya balance influye en su disparo, que es generalmente continuo tónico, irregular y decorrelacionado. Este disparo se convierte en sincrónico, correlacionado y regular durante la enfermedad de Parkinson.

Las proyecciones de GPi y SNr son GABAérgicas y proyectan a una variedad de núcleos: 1) los circuitos tálamo-corticales encargados de comandar el movimiento dirigido a metas, 2) el colículo, 3) la habénula y 4) el tallo cerebral donde dos núcleos son relevantes: el núcleo pedúnculo pontino (NPP) encargado de regular el tono muscular, y la formación región locomotora mesencefálica (MLR) encargada de regular movimientos habituales,

automáticos y posturales o de preparación (Bolam et al. 2000; Factor & Weiner, 2002; Takakusaki et al. 2013).

El GPe se ha considerado un núcleo de relevo (Kandel et al. 2012). Sin embargo, descubrimientos recientes han mostrado que el GPe envía proyecciones a múltiples blancos dentro y fuera de los GB, por lo que ejercen gran influencia en el procesamiento de la información (Fig. 1B; Chan et al. 2005; Kita, 2007).



**Figura 1. Modelo funcional de los ganglios basales.** A. Modelo propuesto en 1989 por Albin et al. B. Modelo modificado de Redgrave et al. 2010. Abreviaturas: GPe, Globo Pálido externo; GPi, Globo Pálido interno; NPP, Núcleo Pedúnculo pontino; NST, Núcleo Subtálmico; SNc, Sustancia Nigra pars compacta; SNr, Sustancia Nigra pars reticulata.

El GPe está constituido por neuronas GABAérgicas de proyección con disparo tónico, regular, irregular o en ráfagas (Smith et al. 1994). Envía proyecciones hacia: Str, NST, núcleo reticular del tálamo, SNr, GPi, la corteza auditiva, el NPP, la sustancia gris periacueductal y el colículo. Una sola neurona puede enviar sus axones hacia múltiples sitios (Okoyama et al. 1987; Parent et al. 1989; Moriizumi & Hattori, 1992; Charara et al. 1994; Shammah-Lagnado et al.

1996; Kita & Kita, 2001; Mena-Segovia et al. 2004; Kita, 2007; Chan et al. 2005; Aceves et al. 2011a; Jaeger & Kita, 2011; Mallet et al. 2012).

El GPe también recibe aferencias GABAérgicas del Str –principalmente de la vía "indirecta" de los GB–, glutamatérgicas del NST y del núcleo parafascicular del tálamo y serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe, su inervación colinérgica proviene del NPP y su inervación dopaminérgica de la SNc (Saper & Loewy, 1982; Kita & Kitai, 1991; Charara & Parent, 1994; Parent & Hazrati, 1995; Tepper et al. 2007; Bolam et al. 2000; Gorbachevskaya & Chivileva, 2006; Mena-Segovia et al. 2004; Kita, 2007; Mallet et al. 2012). Estas conexiones sugieren que el GPe es un importante centro integrativo y no sólo un núcleo de relevo (Mena-Segovia et al. 2004; Chan et al. 2005; Kita, 2007; Goldberg & Bergman, 2011; Schwab et al. 2013).

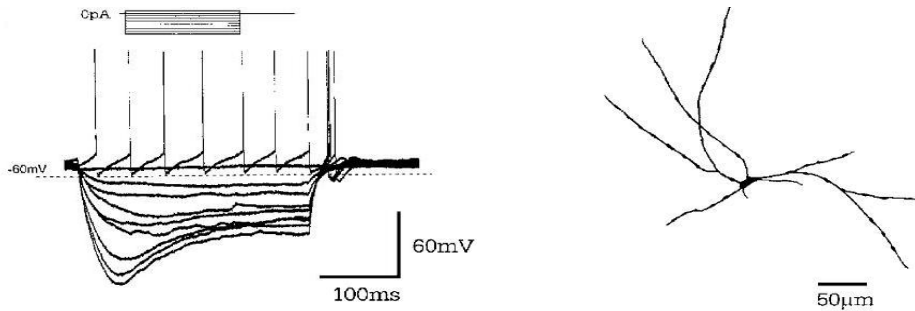
### ***Clasificación de las neuronas del GPe.***

Hay evidencia que nos indica que existen varias subpoblaciones de neuronas en el GPe, tanto de proyección como interneuronas. Se han encontrado diferencias en sus propiedades electrofisiológicas, inmunocitoquímicas y anatómicas –proyecciones– (Kita & Kitai, 1991; Kita, 1994; Nambu & Llinas, 1994; Hoover & Marshall, 1999; Hoover & Marshall, 2002; Cooper & Stanford, 2000; Cooper & Stanford, 2002; Mallet et al. 2012; Miguez et al. 2012).

Por sus propiedades intrínsecas hay diferencias en las propiedades de membrana; como la adaptación de la frecuencia de disparo, el cambio de voltaje inducido por una corriente entrante activada por hiperpolarización  $-I_h-$ , el disparo de rebote (disparo al "off"), una corriente temprana de  $K^+$  así como las propiedades morfológicas (Kita & Kitai, 1991; Nambu & Llinás, 1994; Cooper & Stanford, 2000).

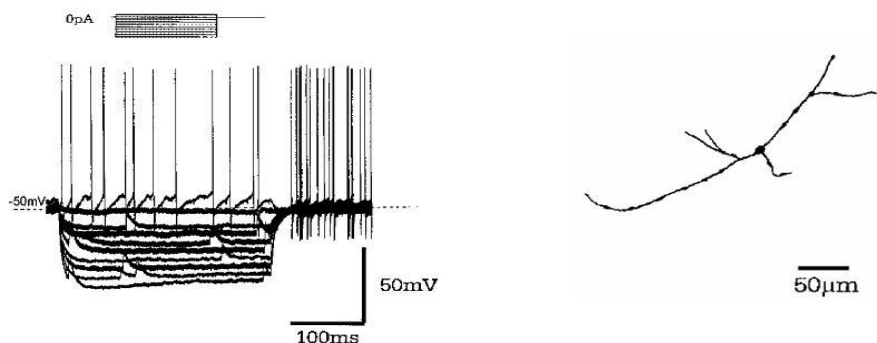
Se han podido diferenciar tres posibles tipos neuronales en el GPe: Las neuronas tipo A (Cooper & Stanford, 2000) o II (Nambu & Llinás, 1994; fig. 2) representan el 63 % del total. Poseen un cambio tiempo-voltaje dependiente de su potencial de membrana ocasionada por la corriente rectificadora  $-I_h-$ ,

disparan potenciales de acción espontáneos de manera regular, seguidos de una hiperpolarización bifásica, su potencial de membrana se mantiene alrededor de  $-66.3 \pm 0.8$  y tienen una resistencia de entrada de  $70 \pm 22 \text{ M}\Omega$  (Nambu & Llinas, 1994; Cooper & Stanford, 2000).



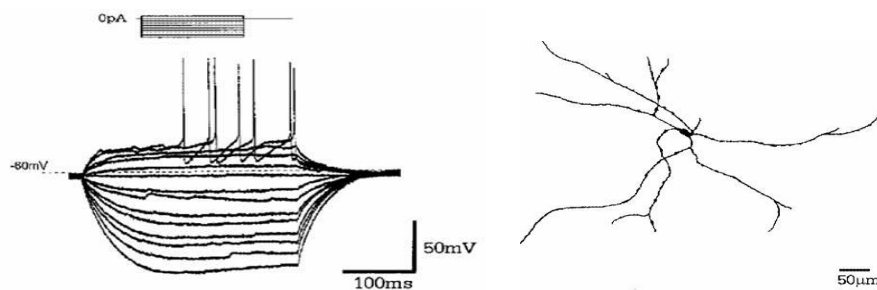
**Figura 2. Registro electrofisiológico y arquitectura somatodendrítica de las neuronas tipo A.** Tomado de Cooper & Stanford 2000.

Las neuronas tipo B –no correlacionan con las encontradas por Nambu, figura 3– representan el 32% de la población aproximadamente, no tienen una fuerte corriente rectificadora, y después de la hiperpolarización muestran una fase monofásica, actividad espontánea irregular, así como alta frecuencia de disparo, su potencial de membrana se mantiene alrededor de  $-68.1 \pm 1.1$ , morfológicamente estas neuronas son las más pequeñas del GPe, el soma tiene forma de ovalo y las dendritas tienen pocas varicosidades y arborizaciones (Nambu & Llinas, 1994; Cooper & Stanford, 2000).



**Figura 3. Registro electrofisiológico y arquitectura somatodendrítica de las neuronas tipo B.** Tomado de: Cooper & Stanford 2000.

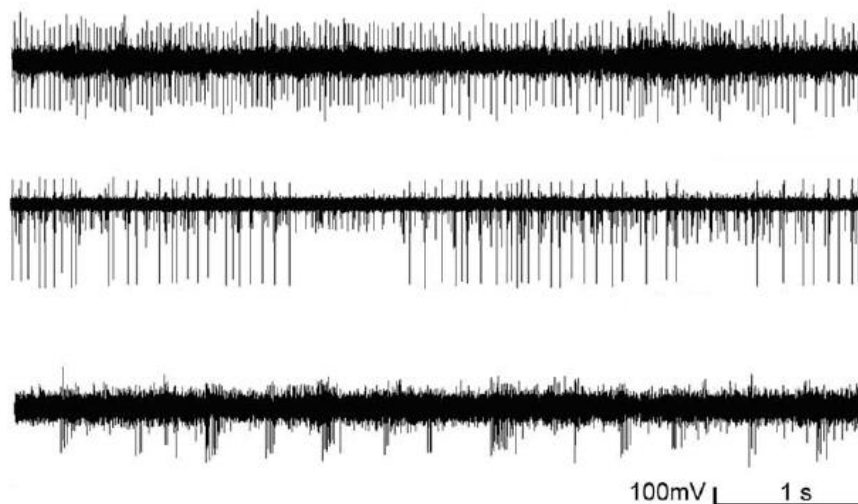
Las neuronas tipo C –para Nambu y Llinás son las tipo I para Cooper y Stanford, figura 4– son el 5% de la población, cifra que no está de acuerdo con el porcentaje encontrado por Nambu y Llinás que las consideran el 59% de las neuronas estudiadas–, no tienen corriente rectificadora, disparan potenciales de acción espontáneos irregulares, su potencial de membrana se mantiene alrededor de  $-66.6 \pm 2.4$ . Son las neuronas más grandes del GPe, también con el árbol dendrítico más grande (Nambu & Llinas, 1994; Kita & Kitai, 1994; Cooper & Stanford, 2000).



**Figura 4. Registro electrofisiológico y arquitectura somatodendrítica de las neuronas tipo C** Tomado de: Cooper & Stanford 2000

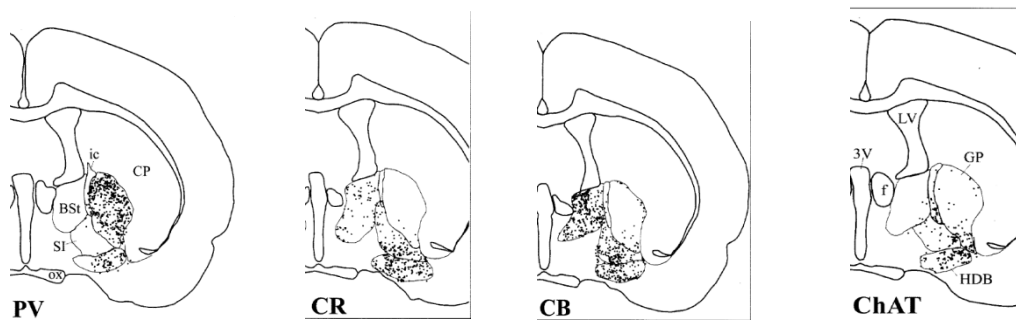
La comparación entre las neuronas de estos estudios es divergente y posiblemente las diferencias entre ellos se deban a la utilización de diferentes especies y/o técnicas de registro.

Los estudios *in vivo* han sugerido la existencia de al menos 2 tipos de neuronas en el GPe (DeLong, 1971; Bugaysen et al. 2010; Benhamou et al. 2012) de acuerdo a su tasa de disparo. Las LFB (Low Frequency Bursterst; por sus siglas en ingles; disparo a baja frecuencias con disparo en ráfagas) son neuronas que se caracterizan por una tasa de disparo baja, disparo en ráfagas intermitente a alta frecuencia y las HFP (High-Frequency Pausers; por sus siglas en ingles; Disparo de alta frecuencia con pausas) son neuronas que se caracterizan por una tasa de disparo alta, o irregular con pausas —Figura 5– (DeLong, 1971), tanto en primate como en rata. Existen diferencias en la forma de la espiga extracelular (Kelland et al. 1995).



**Figura 5. Registro electrofisiológico de los tipos neuronales en GPe *in vivo* en ratas.** En la parte superior se observa el disparo espontaneo sin pausas y en la sección de en medio se observa el disparo de alta frecuencia con pausas –HFP–. En la parte inferior se observa el disparo a baja frecuencias con disparo en ráfagas –LFB–. Tomado de: Benhamou et al. 2012.

También se han identificado subpoblaciones de neuronas GABAérgicas en el GPe por el tipo de proteínas que regulan el calcio intracelular, ya sea porque está presente o por su ausencia. En dos terceras partes se expresa la parvalbumina (PV+) y una tercera parte no la expresa (PV-) (Kita, 1994). Las neuronas PV+ son grandes y de proyección. Además, hay neuronas de proyección con calbindina, aunque la población es de alrededor del 2%. Un tercer tipo neuronal son inmunopositivas a calretinina, no se marcan retrógradamente, son alrededor del 1% y podrían ser interneuronas (Hontanilla et al. 1998; Zaborszky et al. 1999; Cooper & Stanford, 2002). Otra subpoblación de neuronas de alrededor del 40% expresa el mRNA de la preproencefalina (PPE; Hoover & Marshall, 1999). Es posible que estas neuronas sean las LFB *in vivo* y que las PV+ sean las HFP, ya que hay poca co-localización entre las PPE+ y las PV+, están bastante segregadas. Por otra parte, algunos estudios han mencionado la posibilidad de que haya neuronas ChAT+ en el GPe (Zaborszky et al. 1999), algunos autores mencionan que estas neuronas son una pequeña intersección con el pálido ventral (Bengtson & Osborne, 2000).

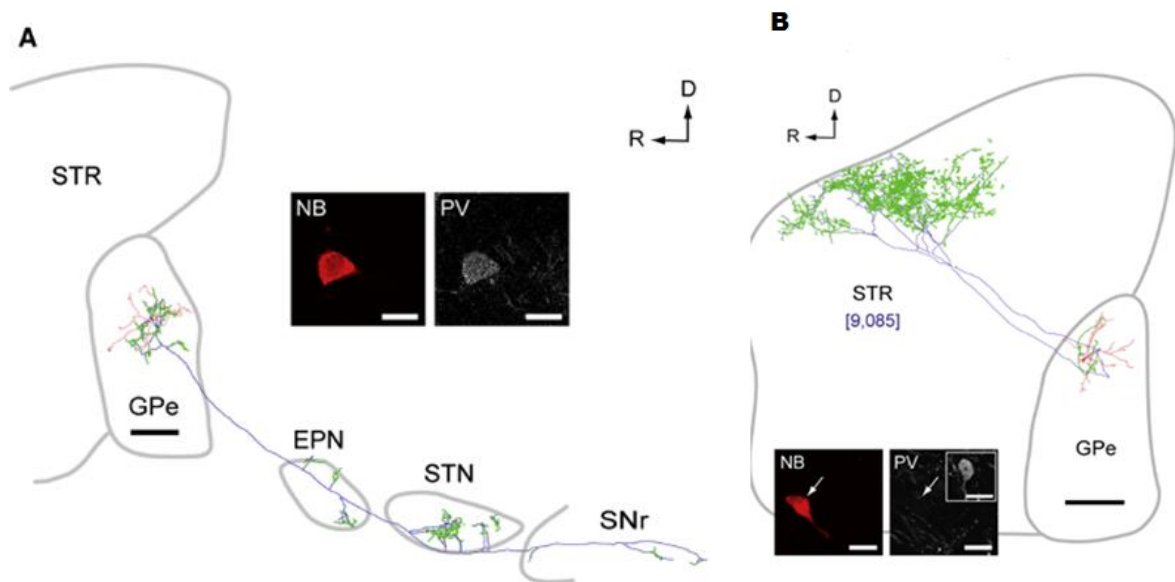


**Figura 6. Dibujos de una sección coronal** donde se muestra la distribución de las neuronas inmunoreactivas a parvalbumina (PV+), calretinina (CR+), calbindina (CB+), y colina acetiltransferasa (ChAT+) en el GPe. Tomado de: Zaborszky et al. 1999.

Por sus proyecciones pueden diferenciarse subpoblaciones de neuronas pudiéndose identificar dos tipos de neuronas de proyección con morfología dendrítica diferente: con espinas y sin espinas, ambas proyectan hacia las diferentes estructuras de los GB (Kita & Kitai, 1994).

Las neuronas que expresan PPE+ son aquellas que proyectan preferencialmente hacia el estriado, y rara vez hacia el NST el GPi o la SNr (Hoover & Marshall, 1999; Hoover & Marshall, 2002). En cambio las PV+ envían sus axones hacia el NST, GPi y SNr (Kita & Kita 2001; Sadek et al. 2007; Mallet et al. 2012) y rara vez al estriado. Las neuronas calretinina positivas (CR+) podrían ser las interneuronas del GPe ya que no proyectan fuera del núcleo (Cooper & Stanford, 2002). Las neuronas del GPe que proyectan hacia el estriado inervan preferencialmente a interneuronas PV+ del mismo estriado así como a las que expresan óxido nítrico sintasa (NOS) (Bevan et al. 1998). Las interneuronas estriatales PV+ median la inhibición por retroalimentación –feed-forward inhibition– y están involucradas en la sincronización de las neuronas espinosas medianas (NEMs) durante periodos de activación desde la corteza. Esto sugiere que el GPe juega un papel importante en la sincronización y la estructura espacio-temporal de la respuesta dinámica de los GB en respuesta a un estímulo cortical. Recientemente se ha caracterizado otra subpoblación de neuronas del GPe que contienen el gen Lhx6 (Lim homeobox 6) y que envían proyecciones al NST, SNr y la SNC (Mastro et al. 2014).





**Figura 7. Proyecciones de los diferentes tipos neuronales del GPe.** En **A** se muestra un ejemplo de neuronas que proyectan hacia los núcleos de salida, siendo PV+. En **B** se muestra un ejemplo de una neurona que proyecta hacia el Str, siendo PV-. (Note que las diferentes proyecciones de las neuronas palidales existe una separación radical entre las que van al estriado y las que se dirigen a los núcleos de salida). Tomado de: Mallet et al. 2012. Abreviaturas: NB, Neurobiotina; PV, parvalbumina; EPN, Núcleo entopeduncular; STR, Estriado; GPe, Globo Pálido externo; STN, Núcleo subtalámico; D, dorsal; R, rostral. Barra de la escala (negra) 0.5 mm; Barra de la escala (blanca) 20  $\mu$ M

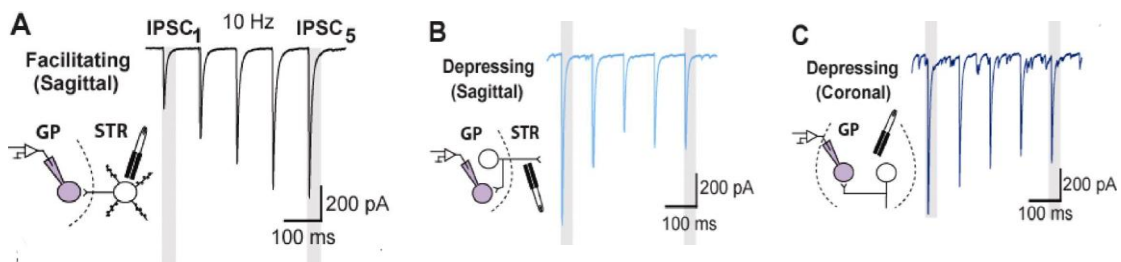
Hay controversia acerca de si las propiedades intrínsecas pueden ser usadas para separar los diferentes grupos de neuronas del GPe, porque estas propiedades varían constantemente a través del tiempo (Gunay et al. 2008; Deisert et al. 2012).

### ***Plasticidad sináptica de corto plazo.***

Las sinapsis pueden clasificarse por el tipo de plasticidad sináptica de corto plazo (short-term synaptic plasticity; STSP, por sus siglas en inglés) que las terminales sinápticas exhiben. En este trabajo nos interesan en particular las sinapsis estriatopalidales (entre neuronas del Str y del GPe) y las palidopalidales (entre neuronas del mismo GPe).

La sinapsis estriatopalidal –estimulando en el Str y registrando en neuronas palidales en un corte sagital– muestran facilitación de corto plazo (STF; short-term facilitation; por sus siglas en inglés): la respuesta sináptica aumenta en función del número de estímulos. Esto se ve en frecuencias entre 10 y 50 Hz (ver figura 8A). La sinapsis palidopalidal presenta depresión de corto plazo (STD; short-term depression; por sus siglas en inglés): la respuesta sináptica disminuye en función del número de estímulos. Igual utilizando trenes entre 10 y 50 Hz (fig. 8B; Sims et al. 2008; Miguelez et al. 2012).

Se ha descrito que en un corte sagital se puede obtener depresión de corto plazo estimulando antidrómicamente las fibras de las neuronas del GPe que proyectan al estriado (Mallet et al. 2012), esto a su vez activa las fibras colaterales que interconectan a las neuronas palidales entre sí (Sims et al. 2008; Jaeger & Kita, 2011; Miguelez et al. 2012), de forma que podemos registrar sinapsis palidopalidales.



**Figura 8. Plasticidad sináptica de corto plazo (STSP)** característica de la sinapsis estriatopalidal **(A)**, palidopalidal, estimulando en Str **(B)** y palidopalidal estimulando en GPe **(C)**. Tomado de: Miguelez et al. 2012. Abreviaturas; IPSC, corriente postsináptica inhibitoria.

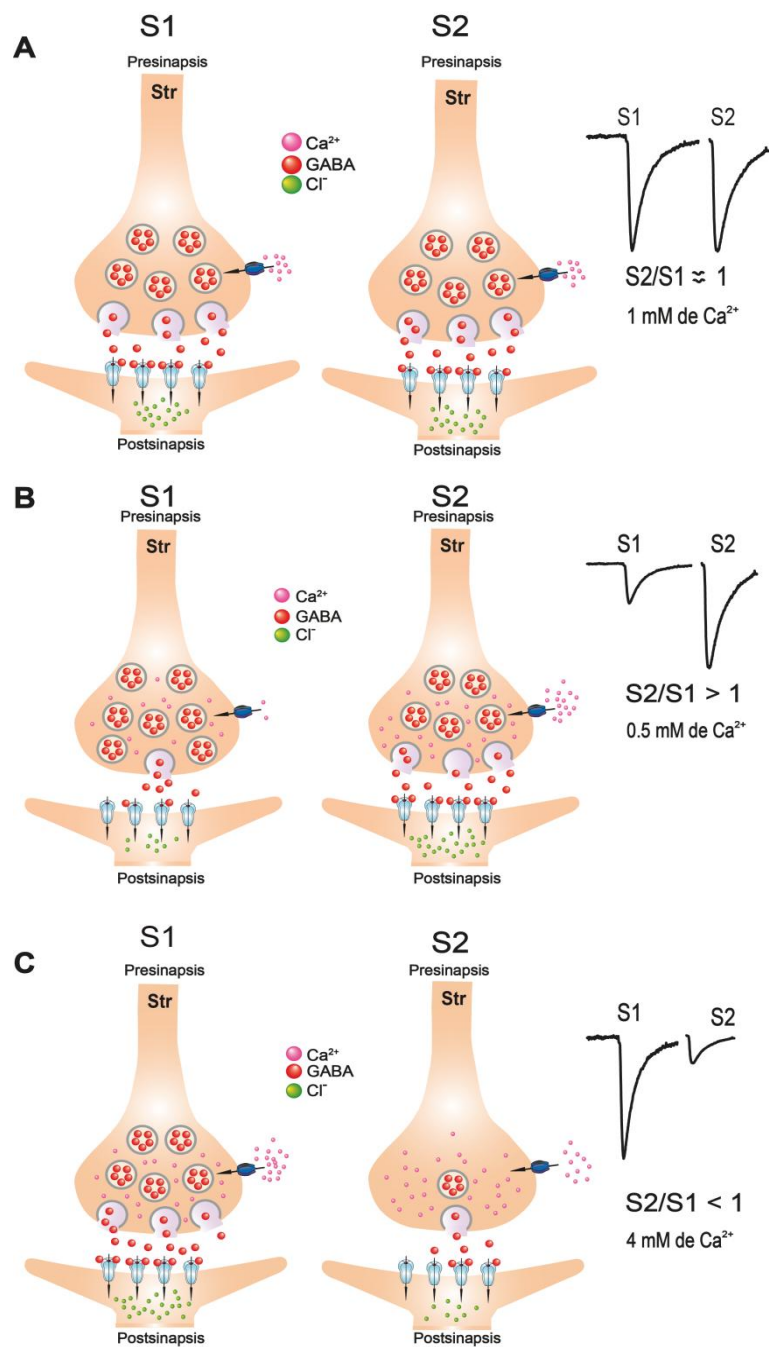
Diversos patrones de actividad temporal pueden ser modificados por la STSP, estos incluyen; el cambio fásico para la ejecución de tareas sensoriomotoras, cambios en la asincronía durante el disparo irregular o durante el desvelo, el disparo en ráfagas durante el sueño, la anestesia o la enfermedad como es el caso de la enfermedad de Parkinson. En el último caso, estos patrones se cree que se deben a las interacciones de retroalimentación entre el NST y el GPe (Hanson & Jaeger, 2002).

## ***Modulación presináptica***

Cuando un neurotransmisor se libera en la terminal presináptica puede tener diversos blancos de acción, puede actuar en el mismo sitio donde es liberado – en la presinapsis–, o en la célula blanco –en la postsinapsis– (Kandel et al. 2012). Para saber si la modulación está en la pre- o la post-sinapsis, se utilizan diversos análisis y protocolos uno de ellos es el protocolo de pulsos pareados. Este consiste en dar dos estímulos eléctricos sobre los axones que van hacia la célula blanco, con un intervalo menor a 200 ms. Siendo la amplitud de la corriente de la respuesta al primer estímulo denominada S1 y la respuesta de la amplitud de la corriente al segundo estímulo denominada S2. Estas respuestas son medidas con la técnica de Patch-clamp en célula entera en la modalidad de fijación de voltaje en la postsinapsis de la célula (fig. 9). La relación de los pulsos pareados (RPP) se mide como la amplitud promedio de la corriente de la segunda respuesta entre la amplitud promedio de la corriente de la primera respuesta ( $RPP = S2/S1$ ). Cuando se dan los estímulos con una intensidad de estimulación apropiada puede lograrse que la respuesta S2 se igual a la respuesta S1 y por lo tanto  $RPP = S2/S1 = 1$  (fig. 9A). Pero si con la misma intensidad de estimulación disminuimos el calcio extracelular, la respuesta de S1 será más pequeña que la de S2, haciendo que  $RPP = S2/S1 > 1$ . Esto se debe a que el bajo calcio disminuye la probabilidad de liberación para S1, pero como el intervalo entre S1 y S2 es muy corto permite que el calcio se acumule, y probabilidad de liberación para S2 se incremente (fig. 9B). En cambio, si para la misma intensidad de estimulación aumentamos la concentración de calcio, la respuesta de S1 será más grande  $RPP = S2/S1 < 1$ , lo que se explica por el mecanismo inverso, más calcio hace que aumente la probabilidad de liberación para S1, lo que depleta al sitio activo de vesículas, así que cuando se da la respuesta S2 no habrá suficientes vesículas para liberar y S2 podrá ser menor que S1 (fig. 9C). Como tanto S1 como S2 se generan en la postsinapsis, un transmisor modulador que actúe postsinápticamente debería provocar un cambio igual en S1 y en S2, esto es, los cambios postsinápticos no tienen porque modificar la RPP. Por lo mismo, un cambio en la RPP es indicativo que el modulador actuó en la presinapsis

cambiando la probabilidad de liberación, por ejemplo modificando la entrada de calcio (Bargas & Galarraga, 2008).

Asimismo, si se observan eventos sinápticos espontáneos o miniatura, se verá que éstos aumentan o disminuyen en amplitud pero no en frecuencia si la modulación es postsináptica. Pero si no cambia la amplitud y sí la frecuencia, se asume que la modificación es presináptica (Bargas & Galarraga, 2008).



**Figura 9. Estimulación pareada de una sinapsis.** **A.** Se puede ajustar la intensidad de estimulación de un estímulo eléctrico pareado para que con una determinada concentración de calcio ambas respuestas sinápticas sean similares (ver las corrientes postsinápticas a la derecha). **B.** Si con la misma intensidad de estimulación de disminuye el calcio extracelular  $S2/S1 > 1$ . **C.** Si con la misma intensidad de estimulación aumenta el calcio extracelular  $S2/S1 < 1$ . Ver explicación en el texto. Modificado de: (Bargas & Galarraga, 2008).

También hay una manera gráfica para ilustrar si un cambio es pre- o post-sináptico. Para el caso de una liberación que sigue la distribución binomial el contenido cuántico de un evento sináptico esta dado por el inverso del coeficiente de variación ( $Mcv = CV^{-2}$ ). Lo que quiere decir que si  $CV^{-2}$  es función de la amplitud de los eventos sinápticos, es el contenido cuántico lo que cambia, lo cual depende de la presinapsis. Si no hubiese correlación entre amplitud y  $CV^{-2}$ , el cambio en la amplitud se atribuye a la postsinapsis (Bekkers & Stevens, 1990; Rodriguez-Moreno et al. 1997; Lupica et al. 1992; Johnston, 1995). Note que:

$$Mcv = (M^2/\sigma^2) = Np(1-p)$$

Donde M es la amplitud promedio de las corrientes sinápticas,  $\sigma^2$  es la varianza de los eventos, p es la probabilidad de liberación del cuanto y N son los sitios de liberación.

De esta manera, tenemos varias maneras de saber cuando un transmisor modulador modifica la amplitud de las respuestas sinápticas debido a que actúa en la presinapsis.

### ***Modulación colinérgica en el GPe***

Los estudios más importantes realizados en el GPe se han centrado en las acciones de las sinapsis glutamatérgicas, GABAérgicas y dopaminérgicas (Cooper & Stanford, 2001; Anaya-Martínez et al. 2006; Jaeger & Kita, 2011; Abedi et al. 2013). Las acciones de la inervación colinérgica han recibido menos atención. Se conoce qué receptores muscarínicos se han localizado

presinápticamente y postsinápticamente en el Str (Galarraga et al. 1999; Figueroa et al. 2002; Pérez-Rosello et al. 2004, Pérez-Burgos et al. 2008; Pérez-Burgos et al. 2010). Pero los axones cuyas terminales son moduladas por receptores muscarínicos en el Str son los mismos que proyectan al GPe (Galarraga et al. 1999; Figueroa et al. 2002; Pérez-Rosello et al. 2004, Pérez-Burgos et al. 2008; Pérez-Burgos et al. 2010). Entonces es lógico suponer que las terminales estriatopallidales sean también moduladas por receptores muscarínicos. Se han caracterizado los receptores M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, y M<sub>4</sub> en el Str por estudios de autorradiografía, e inmunoprecipitación (Waelbroeck et al. 1990; Wall et al. 1991; Li et al. 1991; Yasuda et al. 1992; Ferrari-Dileo et al. 1994; Tice et al. 1996), así también se ha determinado la presencia del ARNm de dichos receptores (Bernard et al. 1992).

Las NEM expresan predominantemente dos tipos de receptores muscarínicos: M<sub>1</sub>R y M<sub>4</sub>R (Bernard, 1992; Yan, 2001). Los M<sub>4</sub>R se expresan con mayor abundancia en la vía directa (Santiago & Potter, 2001). Estudios en el Str han determinado el papel que juega la actividad de los M<sub>1</sub>R: reducen corrientes entrantes de Ca<sup>2+</sup> (ICa) acarreadas por los canales CaV1, CaV2.1 y CaV2.2 a través de dos mecanismos independientes de voltaje y dependientes de la activación de la proteína cinasa C (PKC; Pérez-Rosello et al. 2004, Pérez-Burgos et al. 2008).

Estudios similares por autorradiografía han determinado la presencia de receptores muscarínicos M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub> en el GPe de rata, mono y humano (Cortés et al. 1987; Wang et al. 1990; Piggott et al. 2002; Miyoshi et al. 1989). Pero ¿qué papel juegan? Así, el problema que este trabajo abarca es el de la modulación colinérgica muscarínica en el GPe. La respuesta a esta pregunta es importante ya que hay aferentes colinérgicas que conectan al NPP con el GPe (Saper & Loewy, 1982; Jackson & Crossman, 1983; Woolf & Butcher, 1986; Gorbachevskaya & Chivileva, 2006). Adicionalmente el GPe podría tener neuronas colinérgicas locales (Rodrigo et al. 1998) e inervación colinérgica proveniente del pálido ventral (Bengtson & Osborne 2000).

Otra cuestión importante es saber si esta modulación colinérgica es mediada de forma directa o indirecta ya que se sabe que la activación de los MRs en el hipocampo suprime la transmisión sináptica inhibitoria a través de dos mecanismos distintos, uno que depende de cannabinoides y otro independiente de los mismos. Mientras la activación de  $M_2R$ s en las terminales presinápticas suprime la liberación de GABA de manera directa, en otras sinapsis, la activación de  $M_1R/M_3R$  causa la producción de cannabinoides postsinápticamente y subsecuentemente la supresión de la liberación de GABA por activación de los receptores  $CB_1$  situados en la terminal presináptica, para lo cual los cannabinoides actúan de manera retrógrada (Ohno-Shosaku et al. 2003; Fukodome et al. 2004).

En trabajos más recientes en la sustancia gris periacueductal (PAG) se mostró que la muscarina actúa a través de dos mecanismos distintos: induce la inhibición de la transmisión GABAérgica mediada por endocannabinoides por medio de la activación de los  $M_1R$  en un tipo de neuronas, y en otro tipo de neuronas también se inhibe la transmisión GABAérgica pero no mediante cannabinoides, si no por la activación directa de  $M_2R$ . (Lau & Vaughan, 2008).

Así, se ha mostrado un vínculo entre la activación de MRs y la producción de endocannabinoides. En el GPe se ha demostrado que la activación de los receptores  $CB_1$  por cannabinoides exógenos y endógenos da como resultado una inhibición presináptica de la neurotransmisión GABAérgica (Engler et al. 2005).

### ***Plasticidad sináptica de largo plazo***

Una de las más importantes propiedades del tejido nervioso es la plasticidad de largo plazo, esto es, la capacidad de modificar el peso de las conexiones sinápticas de un circuito de manera robusta y prolongada. La función de un circuito neuronal mediante el cambio en sus pesos sinápticos puede modificar, subsecuentemente, el comportamiento del circuito y de la conducta asociada al mismo.



Una sinapsis es más fuerte si la probabilidad de lograr la comunicación entre dos neuronas aumenta. Esto es, si hay pocas fallas y a cada potencial de acción de la presinapsis casi siempre corresponde una respuesta sináptica y, mejor, un potencial de acción en la postsinapsis (Hebb, 1949).

Una sinapsis se hace débil si disminuye la probabilidad de que produzca potenciales sinápticos en la célula postsináptica (Hebb, 1949; Bargas & Galarraga, 2008). La plasticidad sináptica de largo plazo (LTSP; long term synaptic plasticity; por sus siglas en inglés) ha sido asociada al aprendizaje y a la memoria (Kandel et al. 2012), en la actualidad se sabe que cuando un circuito cambia sus pesos sinápticos la potenciación de largo plazo (LTP; Long-Term Potentiation; por sus siglas en inglés), que es un proceso mediante el cual, breves períodos de actividad sináptica puede producir un aumento de larga duración en la fuerza de una sinapsis, y la depresión de largo plazo (LTD; Long-Term Depression; por sus siglas en inglés), que es una disminución de larga duración en la respuesta sináptica de las neuronas a la estimulación de sus aferentes tras un largo patrón estímulo (por ejemplo, 15 minutos de estimulación a 1 Hz), (Kandel et al. 2012) ambos procesos suceden al mismo tiempo (Le Bé & Markram, 2006). Pero fue hasta 1973 que Bliss y Lomo demuestran que una estimulación repetida de una sinapsis excitadora del hipocampo causa un aumento en la fuerza sináptica que dura varias horas, días o más. Sin embargo, desde el punto de vista teórico esto había sido predicho desde 1949 como el substrato necesario para entender el aprendizaje (Hebb, 1949).

También las sinapsis GABAérgicas exhiben plasticidad sináptica de largo plazo: LTP y LTD (Mendoza et al. 2006; Sjöström et al. 2008; Castillo et al. 2011; Adermark et al. 2009; Rueda-Orozco et al. 2009, Aceves et al 2011b). Como los GB están íntimamente relacionados con el aprendizaje y la memoria de procedimientos (Packard & Knowlton, 2002), descubrir y entender los procesos de plasticidad de largo plazo que se dan en estos núcleos es de gran importancia. Sin embargo, hasta el momento, existe un vacío en la literatura en cuanto a describir los procesos de LTP y LTD en los GB en general. Casi toda



la investigación ha descansado en la sinapsis glutamatérgica cortico-estriatal (Shen et al. 2008; Lovinger, 2010), las razones de esto no son nada claras. Es por esto que, en el presente trabajo, estudiaremos la plasticidad de largo plazo en el GPe.

Ahora imaginemos: en un circuito hay sinapsis inhibitoras y excitadoras y ambas pueden sufrir LTP y LTD de manera cuasi-simultánea mientras la red aprende. ¿Cuál es resultado final? Es obvio que asociar una sinapsis cualquiera a una conducta aprendida no es un experimento apropiado. En el presente trabajo aislamos las sinapsis inhibitoras GABAérgicas de manera funcional, esto es, de acuerdo a la STSP que exhiben y nos preguntamos si es que son moduladas por la muscarina, y en caso de que así sea, de qué manera se modulan, o si bien lo hacen de diferentes maneras.

## HIPÓTESIS

**General:** hay respuestas colinérgicas muscarínicas en el GPe. Algunas de esas respuestas podrán encontrarse en las sinapsis estriatopalidales. Es posible que existan más respuestas pre- y post-sinápticas. Descubrir las demostraría que el balance dopamina-acetil-colina no es exclusivo del STR y que hay que prestar atención al resto de los GB.

### Particulares:

1. Las terminales estriatopalidales poseen receptores colinérgicos muscarínicos que modulan presinápticamente la liberación de GABA.
2. Los receptores colinérgicos muscarínicos que modulen la liberación de GABA en la sinapsis estriatopalidal lo deberán hacer a través de un efecto directo sobre los M1Rs puesto que así sucede con las terminales intraestriatales provenientes del mismo axón (Galarraga et al. 1999; Figueroa et al. 2002; Pérez-Rosello et al. 2004, Pérez-Burgos et al. 2008).

3. También podría haber receptores muscarínicos en la sinapsis palidopalidal regulando la liberación de GABA. Aunque es posible que esta modulación no ocurra de manera directa y si a través de endocannabinoides.

4. También es posible que algunas neuronas del GPe expresen receptores muscarínicos postsinápticamente.

5. La sinapsis estriatopalidal presenta plasticidad de largo plazo y ésta es dependiente de cannabinoides.

## **OBJETIVOS**

Estudiar la modulación de las sinapsis GABAérgica del GPe mediada por receptores colinérgicos muscarínicos.

Mediante la técnica de registro de fijación de voltaje en célula entera (whole-cell voltage-clamp) registrar corrientes postsinápticas GABAérgicas estriatopalidales en neuronas del GPe

Utilizar el protocolo de pulsos pareados para observar la modulación presináptica producida por los agonistas a los receptores muscarínicos.

Dividir a las neuronas GABAérgicas del GPe por el tipo de plasticidad de corto plazo que exhiben.

Explorar la estimulación de alta frecuencia como protocolo para generar plasticidad de largo plazo en neuronas GABAérgicas del GPe.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Obtención de las rebanadas de cerebro de rata***

Se ocuparon ratas de la cepa Wistar de días postnatales de 13 a 15. Se anestesiaron profundamente, se perfundieron intracardiamente con solución de colina cuya composición fue (en mM): 124 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> N (Cl) CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, 2.5 KCl, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, y 10 glucosa saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, después se decapitaron. Nótese que durante la perfusión y la obtención de las rebanadas el cloruro de sodio se sustituye por cloruro de colina para mejorar la viabilidad celular. Usando como base la parte media de cada uno de los hemisferios cerebrales, cada hemisferio se adhirió por separado, con cianocrilato, a una base de agar con inclinación de 10° y esta a su vez al piso de una caja de Petri. Se obtuvieron rebanadas parasagitales con un ángulo anteroposterior de 10°, de 300 μm de espesor (Beurrier et al. 2006) usando un vibratomo (Vibratome® 1000 Classic, Warner instruments). Una vez obtenidas, las rebanadas de cerebro se dejaron equilibrar durante una hora a temperatura ambiente (≈ 25°C) en una solución con líquido cerebral artificial (CSF) cuya composición fue (en mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 0.2 ácido ascórbico y 0.2 tiourea (pH=7.4; 25-27°C; 298 mOsm/L)

La solución se mantuvo en burbujeo constante saturada con carbógeno: 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> durante un período de una hora para su recuperación y estabilización antes del registro electrofisiológico.

### ***Registros electrofisiológicos***

Las rebanadas se colocaron en una cámara de registro fija a la platina de un microscopio (Eclipse E600FN, Nikon Instruments Inc) y se perfundieron por gravedad con la solución salina extracelular (4–5 ml/min). Las fibras aferentes fueron estimuladas con un electrodo concéntrico bipolar (Frederick Haer & Co, Bowdoinham ME), que se colocó sobre la superficie de la rebanada cerebral a

nivel del Str, se registraron corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC; Inhibitory postsynaptic currents; por sus siglas en ingles) de las neuronas del GPe ( $\geq 500 \mu\text{m}$  dentro del GPe) con la técnica de patch-clamp en célula entera en la modalidad de fijación de voltaje, a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) con microelectrodos de vidrio (Borosilicato, WorldPrecision Instruments) hechos en un estirador de pipetas (Sutter Instrument Corp, Novato, CA) y pulidos en la punta mediante una microforja con una resistencia final de 4–6  $\text{M}\Omega$  (MF-830, Narishige; Tokio, Japón). Los electrodos fueron llenados previamente con un solución interna de alto cloro (en mM): 72  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 36  $\text{KCl}$ , 10  $\text{NaCl}$ , 10  $\text{EGTA}$ , 10  $\text{HEPES}$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 2.5  $\text{MgCl}_2$ , 2.4  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP, 0.4  $\text{Na}^+$ -GTP, 5 lidocaína N-etil-bromida –QX-314– y 1% biocitina ( $\text{pH}=7.2$ , 282  $\text{mOsM/L}$ ). En esas condiciones las IPSC son corrientes entrantes ya que fueron registradas a  $-80 \text{ mV}$

Los registros se obtuvieron con un amplificador Axopatch 1D (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), Durante cada experimento la señal electrofisiológica se monitoreó con un osciloscopio (Tektronix, TDS 3012.), y se filmaron con un monitor (DAGE-MTI, HR-120), para el control del voltaje y la manipulación del electrodo se utilizó un micromanipulador (MP-285, Sutter Instrument Corp, Novato, CA). El rango de la resistencia en serie de 5 a 20  $\text{M}\Omega$  y fue compensada hasta el 80%. La resistencia de entrada y de acceso fue continuamente monitoreada durante el experimento con un comando de voltaje y los experimentos fueron descartados si el cambio fue mayor al 20%. Se filtro la señal a 2  $\text{KHz}$ .

Los registros se realizaron en presencia de CNQX ( $10 \mu\text{M}$ ; antagonista de los receptores AMPA/KA; dosis saturante) y APV ( $50 \mu\text{M}$ ; antagonista de los receptores NMDA; dosis saturante) para evitar la contaminación con sinapsis excitadoras. Se comprobó que las corrientes sinápticas eran puramente inhibitoras pues las respuestas eran totalmente bloqueadas con  $10 \mu\text{M}$  de bicuculina o de gabazina (antagonista de los receptores  $\text{GABA}_A$ ) (ver figuras 15A, 15C, 16A; Ibañez-Sandoval et al. 2006; Pérez-Rosello et al. 2005; Tecuapetla et al. 2007). Para obtener las IPSCs con el protocolo de pulsos

pareados se dieron dos estímulos con un intervalo de 50 ms entre cada pulso cada 10 s (0.1Hz; 100-500 pA)

Para provocar la STSP se dieron 10 estímulos a 20 Hz cada 10s, los parámetros de estimulación se ajustaron para obtener corrientes entre 100-500 pA durante el control lo cual es alrededor de la mitad de la amplitud máxima (Tecuapetla et al. 2005). La amplitud de los IPSC fueron medidos de la línea base al pico de la primera respuesta en el tren ( $S_1 = IPSC_1$ ). Para las respuestas subsecuentes ( $S_2, \dots, n = IPSC_n$ ), la línea base restante fue sustraída. Nuestra medida plasticidad siguió la relación  $STSP = IPSC_{7-10}$  (promedio de las 3 respuestas)/  $IPSC_1$ .

La amplitud máxima de cada IPSCs (son 10 en total) después de los trenes de estimulación que mostraron STD fueron normalizados y ajustados *ad hoc* con una exponencial de decaimiento simple (primer orden):

$$IPSC(t) = y_0 + A_1 e^{-t/\tau}$$

Donde  $y_0$  es la línea base asintótica.  $A_1$  es el coeficiente de la exponencial,  $t$  es tiempo y  $\tau$  es la constante de tiempo en milisegundos.

Para las IPSCs que mostraron STF se hizo un ajuste con una función exponencial invertida de primer orden:

$$IPSC(t) = y_0 - A_1 e^{-x/\tau}$$

Los parámetros quieren decir lo mismo.

Para inducir la LTSP se utilizó el protocolo de estimulación de alta frecuencia (HFS), que consistió en dos trenes de 100 Hz (de 1 segundo cada uno; 200 estímulos en total) con un intervalo entre los trenes de 10 segundos (Rueda-Orozco et al. 2011). La LTSP fue considerada si el cambio en la amplitud del evento sináptico duraba al menos 20 minutos.

Al terminar el experimento la rebanada registrada fue fijada en 4 % de paraformaldehído y 1 % de ácido pícrico disueltos en amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 7.40).

### ***Inmunocitoquímica***

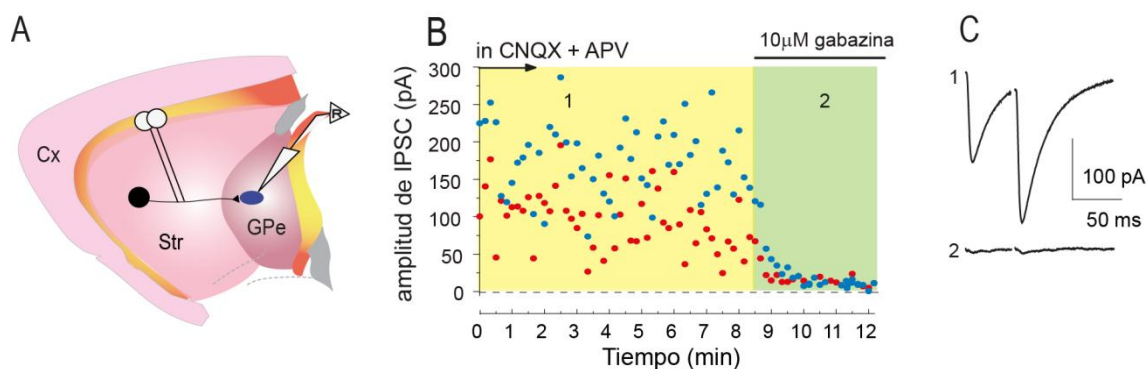
Para identificar algunas neuronas registradas se adicionó 1% de biocitina a la solución interna de registro (Sigma-Aldrich, St Louis. USA) y luego se siguió un método inmunocitoquímico (ver Ibáñez-Sandoval et al. 2006). Las neuronas que se llenaron con biocitina se fijaron en una solución de 4% de paraformaldehído y 1% de ácido pícrico durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron con una solución amortiguadora de fosfato de potasio (KPBS) durante 10 minutos, por tres veces para quitar el exceso de fijador. Al terminarse de lavar, las rebanadas se incluyeron en agar al 7%, después y se cortaron en un vibratomo (Vibratome® 1000 Classic, Warner instruments) hasta obtener rebanadas de 40 µm de espesor en presencia de KPBS. Las rebanadas se incubaron con estreptavidina conjugada con Cy3 (1:200 disuelta en PBS, Zymed Laboratorios, San Francisco, CA). Esto nos permitió visualizar la neurona registrada. Después ésta se incubó 30 minutos con albumina bovina al 1% para bloquear los sitios inespecíficos. A continuación cada rebanada se incubó por 36 horas con un anticuerpo monoclonal de conejo contra parvalbumina (anti-PV; 1:2000, Abcam, disuelto en PBS conteniendo 0.25% de Triton-X). Las rebanadas luego se enjuagaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anticonejo, extraído de cabra, durante una hora y conjugado con FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Después las rebanadas fueron montadas con vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y puestas en portaobjetos y cubiertas con cubreobjetos para ser observadas con diferentes filtros de fluorescencia (Para FITC el filtro pasabandas de excitación es de 450-490 nm y la emisión 515-530; Para Cy3 el filtro pasabandas de excitación es de 445-465 nm y la emisión 580-620 nm) en un microscopio confocal Olympus FV-1000.

## ***Neuronas disociadas***

Las rebanadas parasagitales de cerebro de 300  $\mu\text{m}$  conteniendo en el GPe se incubaron 20 min con 1 mg/ml de papaína (Calbiochem, Billerica, MA) a 34 °C para luego transferirlas a una solución salina baja en  $\text{Ca}^{2+}$  (0.4 mM  $\text{CaCl}_2$ ) para obtener las células por disociación mecánica mediante una serie de pipetas Pasteur de diferente grosor. La suspensión se sembró en una caja de Petri montada en una base de un microscopio invertido (Nikon, Melville, NY, EE.UU) con una solución salina que contenía (en mM): 0.001 tetrodotoxina, 130 NaCl, 3 KCl, 5  $\text{BaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, y 10 glucosa, pH = 7.4 con NaOH y  $300 \pm 5$  mOsm/L con glucosa. Los registros en fijación de voltaje se realizaron del GPe central que medían 13 a 30 micrómetros de diámetro con capacitancias de 12 a 13 pF). La solución interna de registro contenía (en mM): 180 N-metil-D – glucamina (NMDG), 40 HEPES, 10 EGTA, 4 de  $\text{MgCl}_2$ , 2 ATP, 0.4 GTP, y de 0.1 leupeptina, pH = 7,2 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $280 \pm 5$  mOsm/L. Los registros en la modalidad de célula entera se obtuvieron con un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments) y se monitorearon con pClamp v.8 y una interfaz DMA de 125 kHz (Axon Instruments). Las corrientes que pasan por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se registraron utilizando  $\text{Ba}^{2+}$  (5 mM) como acarreador de carga, mientras se bloquearon los canales de  $\text{Na}^+$  con 1  $\mu\text{M}$  de tetrodotoxina y los de  $\text{K}^+$  con el mismo  $\text{Ba}^{2+}$  además de tener NMDG en la solución intracelular. Se realizaron curvas corriente-voltaje (I-V) completas antes y después de las aplicación de algún fármaco con las corrientes obtenidas por comandos de voltaje rectangulares de -80 a + 50 mV y 20 ms de duración (en pasos de 10 mV) o con comandos en forma de rampas de voltaje (0,7 mV/ms; -80 a 50 mV) de 200 ms de duración. Ambos comandos arrojaron resultados similares (Pérez-Burgos et al. 2008) que se superponían.

## Procesamiento de datos y estadísticas

Los registros digitalizados fueron importados para ser analizados con un programa comercial (Origin v. 7. Microcal, Northampton, MA). Las estadísticas realizadas se hicieron en el programa Systat 11 (SYSTAT Software, Inc.). Cuando los casos fueron comparados antes y después del tratamiento se usó la T de Wilcoxon, cuando los tratamientos fueron múltiples se utilizó el test de Friedman con pruebas *post hoc* de Tukey. Cuando las muestras no fueron apareadas se utilizó el test de U Mann-Whitney o en el caso de tratamientos múltiples el test de Kruskal-Wallis con *post hoc* de Dunn.  $P < 0.05$  fue utilizado para considerar un cambio significativo. El análisis estadístico de la variabilidad sináptica fue evaluado con el coeficiente de variación ( $CV = \text{desviación estándar de la amplitud de los IPSCs} / \text{la amplitud promedio de la amplitud de los IPSCs}$ ), el contenido cuántico (Mcv) fue aproximado por  $Mcv \approx CV^{-2} (\text{Amplitud promedio de los IPSCs})^2 / (\text{La varianza de la amplitud de los IPSCs})$  (Bekkers & Stevens, 1990; Rodriguez-Moreno et al. 1997; Lupica et al. 1992; y Johnston, 1995 Lupica et al. 1992; Sims et al. 2008).



**Figura 10. Condición general de los experimentos.** **A.** Arreglo experimental donde R, es el electrodo de registro (en *whole cell voltage-clamp*); Cx, corteza; Str, estriado; GPe, Globo pálido externo; pA, picoamperios. **B.** Curso temporal de las amplitudes de los IPSCs (ver la variación cuántica en presencia de los antagonistas glutamatergicos CNQX (10 µM) y APV (50 µM). Se muestra el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> con el antagonista gabazina (10 µM). **C.** Trazos representativos del curso temporal, en 1 tenemos control y en 2 la corriente es bloqueada por la gabazina.



## RESULTADOS

### SECCIÓN I

#### ***Hay dos tipos de plasticidad sináptica de corto plazo en sinapsis GABAérgicas registradas en neuronas del GPe.***

Con estimulación de campo dentro del estriado se activan las fibras estriatopalidales (fig. 11A; Goldberg & Bergman, 2011). Esos axones hacen sinapsis con las neuronas del GPe; la mayoría de las conexiones corresponden a la vía indirecta de los GB. Pero algunas neuronas palidales envían sus axones al Str (Kita, 2007) y también pueden ser activadas antidrómicamente con cierta frecuencia con un estímulo intraestriatal, lo que permite activar la sinapsis palidopalidal (fig. 11D; Mallet et al. 2012). La estimulación eléctrica en el Str entonces puede activar ambas conexiones: la estriatopalidal y la palidopalidal (Kita, et 2007; Goldberg & Bergman 2011; Mallet et al. 2012; Schwab et al. 2013).

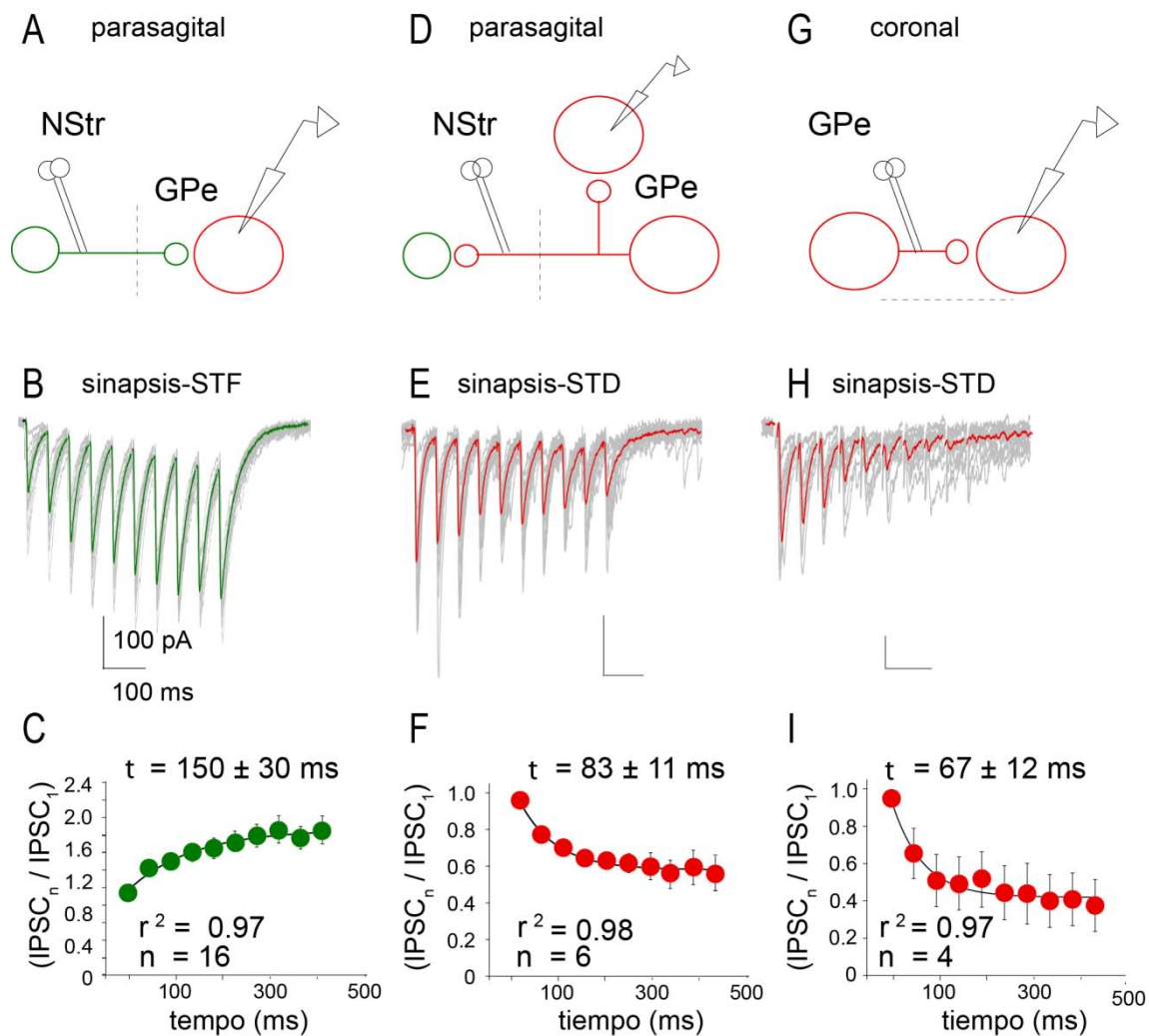
Cuando se aplica un estímulo apropiado, las latencias no pueden distinguir entre las sinapsis estriatopalidales y palidopalidales (Ogura & Kita 2000). Por lo tanto, en el presente trabajo designamos funcionalmente las respuestas que se presentan por la clase de plasticidad de corto plazo que manifiestan: STD o STF.

Así en una de nuestras muestras un electrodo (ver materiales y métodos) localizado en el Str provocó IPSCs que exhibían STF en la mayoría de los casos: 16 de 22 células registradas (fig 11B). En el resto, 6 de 22 células registradas (1/3) mostró STD (fig 11E; Beurrier et al. 2006). Ya se ha descrito que las sinapsis que muestran STF corresponden a las estriatopalidales mientras que aquellas que muestran STD corresponden a las sinapsis palidopalidales (Sims et al. 2008; Miguez et al. 2012). En este trabajo nos referiremos a las sinapsis que muestran STF y o que muestran STD debido a la posible contaminación cuando usamos la estimulación de campo. Además, no

todas las posibles fuentes de GABA que tienen como blanco al GPe se han identificado (Mena-Segovia et al. 2004).

Así, dando un tren de estímulos a 20 Hz en el Str la mayoría de las IPSCs registradas en el GPe muestran STF y mayoritariamente se trata de sinapsis estriatopalidales. Medimos la relación de facilitación como la amplitud promedio de las últimas 3 IPSCs (7 a 10) entre la amplitud promedio del primer IPSC:  $IPSC_{7-10}/IPSC_1$ . En el control esta medida arrojó (promedio  $\pm$  error estándar):  $1.72 \pm 0.023$  ( $n = 10$ ; mediana 1.59; figs. 11A, 11B, 11C). El ajuste de una función exponencial invertida arroja una constante de tiempo,  $\tau = 150 \pm 30$  ms con  $r^2 = 0.97$  (Fig. 11C), (donde  $r^2$  es el coeficiente de correlación de pearson)

El resto de las sinapsis mostró STD, que se ha descrito corresponde a las sinapsis palidopalidales activadas antidrómicamente en rebanadas parasagitales (figs. 12D, 12E; Miguez et al. 2012). La relación usada para cuantificar la depresión:  $IPSC_{7-10}/IPSC_1 = 0.60 \pm 0.01$  ( $n = 6$ ; mediana = 0.6). Una exponencial simple produjo una  $\tau = 83 \pm 11$  ms ( $r^2 = 0.98$ ; fig. 11H). El estímulo intrapalidal en rebanadas coronales (Fig. 11C) produjo una depresión de  $0.45 \pm 0.01$  (Fig. 11H;  $n = 4$ ; mediana 0.46) con una  $\tau = 67 \pm 12$  ms ( $r^2 = 0.97$ ; Fig. 11I; NS). Estos resultados corroboran que la estimulación de campo en el Str puede producir IPSCs en la postsinapsis de las neuronas palidales con 2 diferentes tipos de plasticidad: STF y STD, la mayor proporción corresponde a las sinapsis-STF cuando el estímulo es dado en el Str, cuando el estímulo es dado dentro del GPe únicamente son registradas las sinapsis-STD.



**Figura 11. Plasticidad sináptica de corto plazo (STSP).** A, B, C. El esquema muestra el protocolo de estimulación en la sinapsis STF (probablemente estriatopalidal), en rebanadas sagitales, mientras se registra una neurona del GPe (A). Un tren de estímulos a 20 Hz produce facilitación de corto plazo (STF) de las corrientes postsinápticas inhibitorias (sinapsis-STF). El promedio es el trazo más grueso (15 eventos), la variación cuántica se ilustra con los trazos más delgados (B). La relación entre las amplitudes muestra facilitación (C). D, E, F. Esquema que ilustra el protocolo de estimulación en sinapsis-STD en rebanadas sagitales (el estímulo probablemente activa los axones de las conexiones palidostriatales antidrómicamente), mientras que una neurona del GPe postsináptica se registra la sinapsis palidopalidal debido a la colateral del axón estimulado (D). El tren de estímulos a 20 Hz produce depresión de corto plazo (STD): el promedio (trazo rojo) es de 6 experimentos (E). La relación entre las amplitudes muestra depresión (F). G, H, I. El esquema ilustra el protocolo de estimulación de las sinapsis-STD en rebanadas coronales. El electrodo estimula neuronas dentro del GPe las cuales activan axones colaterales que interconectan con otras neuronas palidales mientras se registra una neurona del GPe (G). La activación de estas sinapsis exhibe STD.

***La activación de los receptores muscarínicos colinérgicos inhibe a ambas clases de sinapsis.***

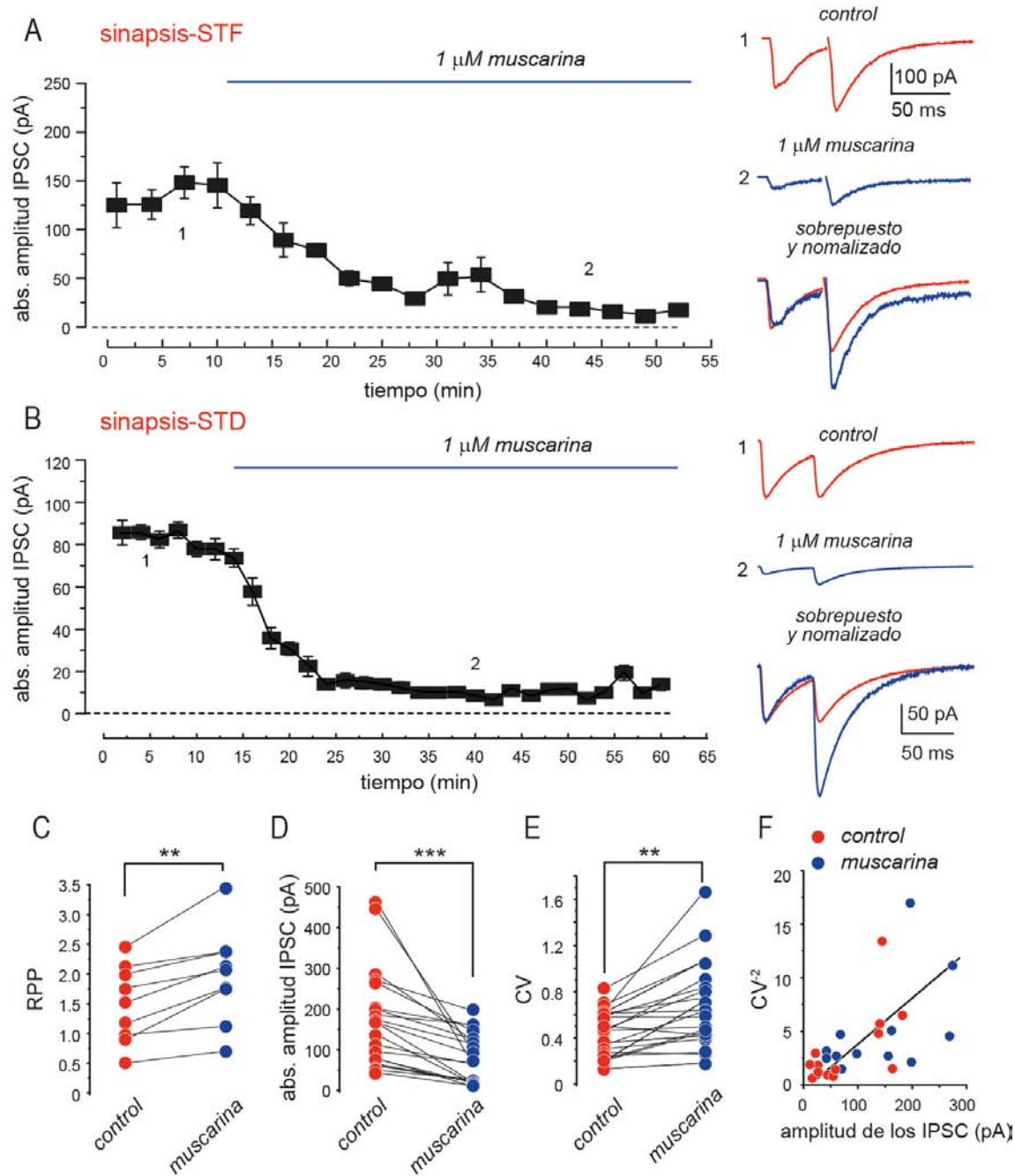
Examinamos el efecto de la activación de los receptores muscarínicos sobre las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) registradas en neuronas del GPe que mostraron STF (se muestra el primer par de corrientes; Cooper & Stanford 2001; Engler et al. 2006). La activación muscarínica en las sinapsis-STF produjo una disminución de la liberación del neurotransmisor en todas las neuronas registradas (fig. 12A). La muscarina redujo la amplitud de la primera IPSCs en  $63 \pm 5\%$  ( $n = 16/16 = 100\%$ ;  $P < 0.001$ ; T de Wilcoxon).

Cuando se aplica muscarina estimulando desde el Str las sinapsis que presentaron STD también respondieron con una disminución en la liberación de GABA en todos los casos. La amplitud de los IPSCs disminuye un  $48 \pm 13\%$  ( $n = 6$ ;  $P < 0.01$ ; T de Wilcoxon).

La acción de la muscarina fue similar en ambas sinapsis. En ambas sinapsis aumenta la RPP (fig.12C), disminuye la amplitud y el coeficiente de variación y la recíproca del coeficiente de variación al cuadrado es función lineal del cambio de la amplitud lo que confirma que el efecto es presináptico (fig.12F; (Bekkers & Stevens, 1990; Rodríguez-Moreno et al. 1997; Lupica et al. 1992; Johnston, 1995; Lupica et al. 1992; Salgado et al. 2005; Tecuapetla et al. 2007; Sims et al. 2008) En otras palabras, la reducción en la amplitud disminuye la cantidad de cuantos liberados.

De lo anterior se obtiene las siguientes conclusiones parciales: estimulando en el estriado una neuronas del GPe responde con IPSCs que pueden exhibir STF y STD. El incremento de la RRP, la disminución en la amplitud y la relación del  $CV^{-2}$  con la amplitud son indicativos de que la activación de receptores muscarínicos presinápticos regulan la liberación en ambas sinapsis.

Por lo tanto, una función de la entradas colinérgica sobre el GPe es regular la liberación de GABA de la presinapsis, como previamente se mostró para las colaterales axónicas entre las NEM (Perez-Rosello et al. 2005).



**Figura 12. Modulación muscarínica de las sinapsis STF y STD.** **A.** Curso temporal de la acción de la muscarina sobre las IPSC evocadas mediante la estimulación de una sinapsis STF (en presencia de 10  $\mu\text{M}$  CNQX y 50  $\mu\text{M}$  APV) Las IPSCs se reducen después de la aplicación de 1  $\mu\text{M}$  de muscarina. La amplitud promedio  $\pm$  error estándar del primer IPSCs de los pares es gráfico. A la derecha se muestran los trazos representativos de la respuesta al estímulo tomada en diferentes momentos del curso temporal indicada por números. Las barras indican el tiempo de aplicación de la muscarina. El trazo sobrepuesto se normaliza a la amplitud del primer IPSC. **B.** Curso temporal de la acción de la muscarina sobre las IPSC evocadas mediante la estimulación de una sinapsis STD con el protocolo de pulsos pareados. Las IPSCs también se reducen después de la aplicación de 1  $\mu\text{M}$  de muscarina. **C.** Los cambios producidos por la muscarina son similares en ambas sinapsis. Los cambios en la relación de los pulsos pareados, RPP = segundo IPSC / primer IPSC, por acción de la

muscarina se incrementa (\*\*P < 0.01). **D.** Las amplitudes absolutas de la primera IPSC disminuye en todos los casos de la muestra (\*\*P < 0.001). **E.** El coeficiente de variación (CV) se incrementó en todos los casos (\*\*P < 0.001). **F.** El contenido cuántico ( $m_{CV} = CV^2$ ) es función de la amplitud.

***La acción muscarínica sobre las sinapsis-STF es bloqueada por antagonistas selectivos al receptor muscarínico de la clase M<sub>1</sub>***

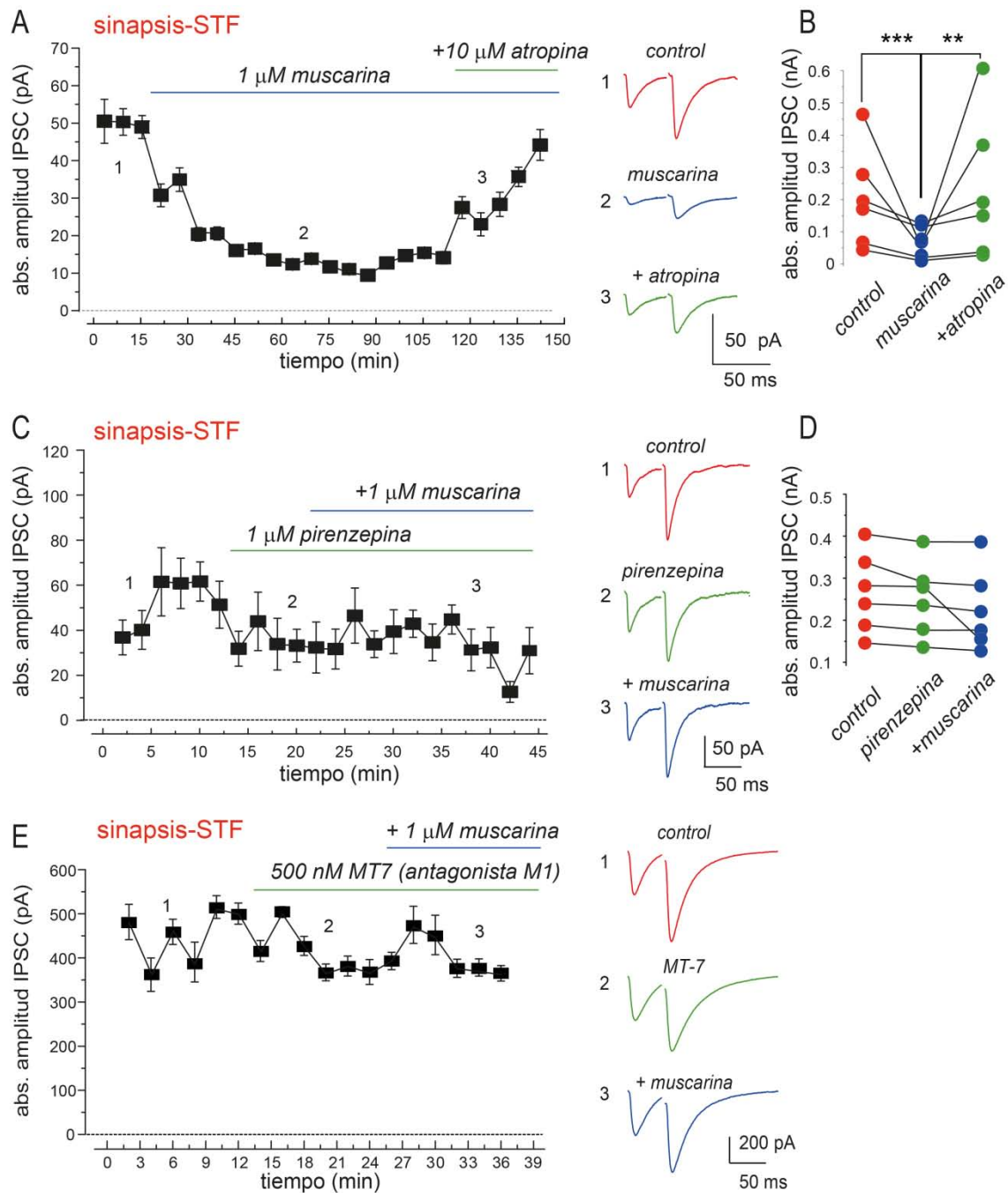
La figura 13A ilustra que el efecto de 1 μM de muscarina: disminuye la amplitud de las corrientes en todas las neuronas evaluadas. El efecto es específico y se revierte con 10 μM de atropina (n = 6; \*\*P < 0.03; Friedman *post hoc* Tukey). Los insertos (derecha) son trazos representativos tomados del curso temporal – indicados con números–. La gráfica pareada resume los experimentos de la muestra (fig. 13B).

La figura 13C ilustra un protocolo utilizando un antagonista más selectivo por los M<sub>1</sub>R: 1 μM de pirenzepina. El efecto muscarínico fue bloqueado. A la derecha están las respuestas pareadas durante el curso temporal señaladas con números. La figura 13D ilustra los experimentos de la muestra (n = 6).

Los mismos resultados se obtuvieron cuando se usó la toxina de la mamba verde, MT-7, que es un bloqueador específico del M<sub>1</sub>R (Kukkonen et al. 2004). 500 nM de esta toxina (fig. 13E) también bloquea la acción muscarínica (n = 3).

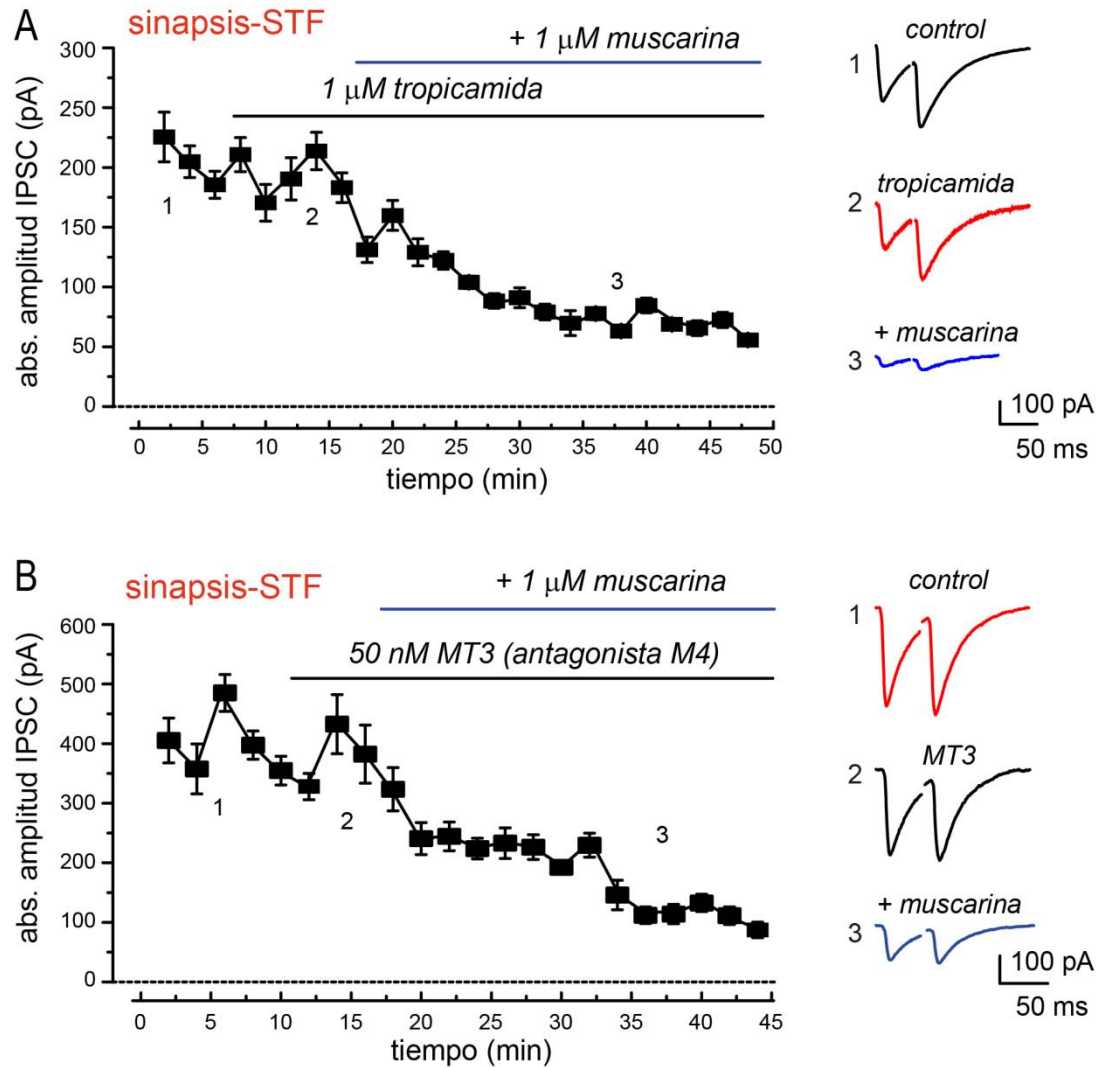
En cambio, el antagonista selectivo para los receptores M<sub>4</sub>, la tropicamida, (Betz et al. 2007), no bloqueó el efecto de la muscarina (n = 3; fig.14A). La acción de la muscarina fue similar al control: 62.34 +/-5.58. Así mismo se probó un antagonista específico, 50 nM de la toxina de la mamba verde MT-3 con resultados también negativos (n = 3; fig. 14B). Estos resultados sugieren que las sinapsis-STF son reguladas presinápticamente por receptores M<sub>1</sub>, como sucede intraestriatalmente en terminales que provienen de los mismos axones (Perez-Rosello et al. 2005).





**Figura 13. El efecto muscarínico en la sinapsis-STF es mediado por los receptores  $M_1$ .** **A.** Curso temporal de la amplitud de las IPSCs antes y durante la acción de  $1\mu\text{M}$  de muscarina: la amplitud de las IPSCs disminuye. Lo cual se revierte con  $10\mu\text{M}$  de atropina. Las barras muestran el tiempo de aplicación de los fármacos, cada símbolo representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 12 eventos sinápticos individuales. A la derecha se ilustra el trazo representativo de la respuesta pareada obtenida del curso temporal indicada por los números. **B.** Gráfica de líneas pareadas que muestra el porcentaje de cambio de la amplitud de los IPSC durante el efecto de la ( $n = 6$ ;  $***P < 0.01$ ). La adición subsecuente de atropina recupera significativamente la amplitud de los IPSCs ( $n = 6$ ;  $**P < 0.03$ ). **C.** Curso temporal de la amplitud de los IPSCs en las sinapsis-STF cuando  $1\mu\text{M}$  de pirenzepina es administrada antes de la muscarina. La pirenzepina no tiene efecto significativo por sí misma pero bloquea la

adición de 1  $\mu\text{M}$  muscarina. A la derecha se ilustra trazos tomados a diferentes momentos. **D.** Gráfica que resume la muestra. **E.** Curso temporal mostrando que 500 nM de toxina de mamba verde (MT-7) bloquean la acción de la muscarina.



**Figura 14. Los antagonistas de los receptores  $M_4$  no bloquean la acción muscarínica.** **A.** Curso temporal de la amplitud de las IPSCs de la sinapsis-STF cuando se administrar 1  $\mu\text{M}$  de tropicamida: la muscarina exhibe su acción usual. A la derecha hay trazos representativos. **B.** Tampoco 50 nM de la toxina MT3 afecta la acción de la muscarina. A la derecha se ilustran trazos representativos.



***El efecto de la muscarina en la sinapsis STF no es mediado por cannabinoides y sí lo es en la sinapsis STD***

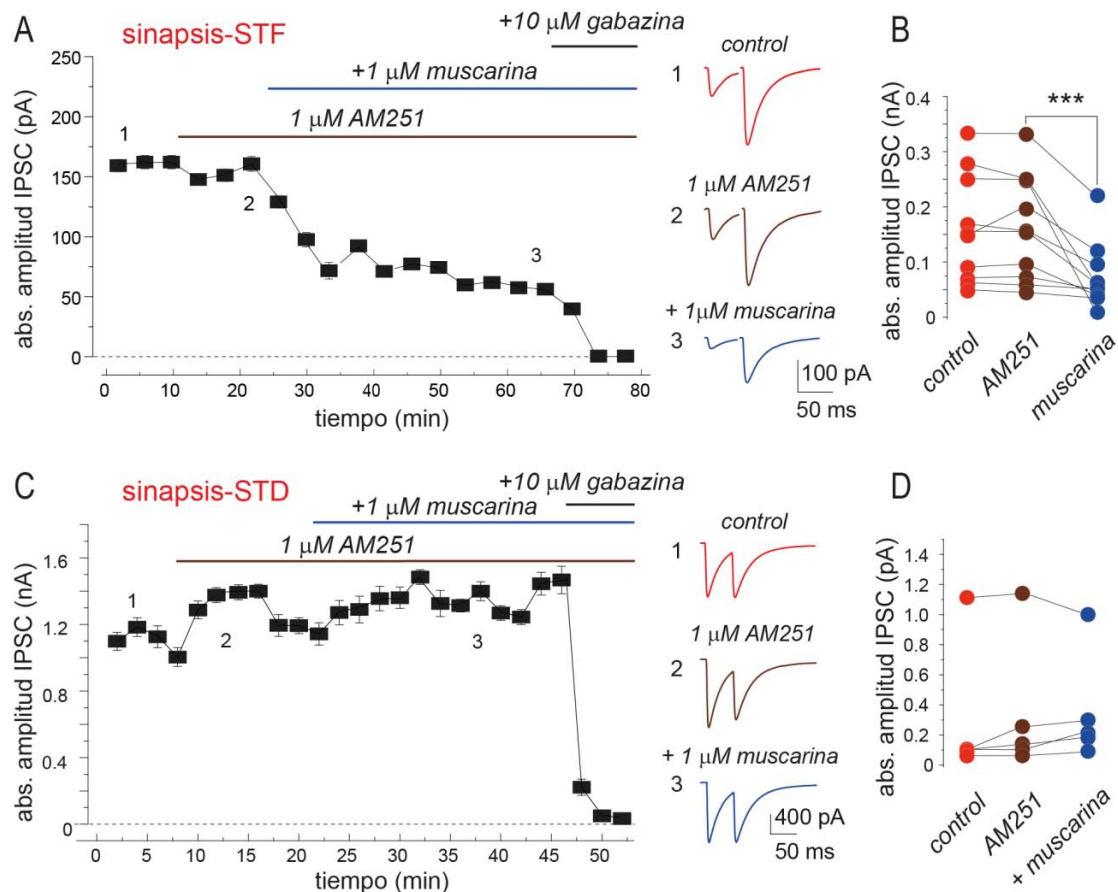
Se ha descrito que la modulación muscarínica de la transmisión sináptica puede estar mediada por cannabinoides (Ohno-Shosaku et al. 2003; Fukudome et al. 2004; Lau & Vaughan, 2008). Examinamos esa posibilidad tanto en sinapsis de tipo STF como del tipo STD pues en el GPe se expresa una gran cantidad de receptores CB<sub>1</sub> (Herkenham, 1991; Engler et al. 2006; Ergetová & Elphick, 2000) y su activación inhibe la liberación de GABA de la sinapsis estriatopalidal (Engler et al. 2006).

Para ver si el efecto de la muscarina es mediada de manera directa o indirecta por endocannabinoides de forma presináptica, en las sinapsis-STF y STD, se utilizó un antagonista selectivo de los receptores CB<sub>1</sub>, el AM 251. Nos preguntamos si el bloqueo de los receptores CB<sub>1</sub> inhibe o no las acciones muscarínicas en la sinapsis-STF. La figura 15A ilustra el curso temporal de la amplitud de los IPSCs antes y durante la adición de 1  $\mu$ M AM 251. El fármaco no tuvo efecto por sí mismo, sugiriendo que los endocannabinoides se encuentran en concentraciones muy bajas en el fluido extracelular de esta preparación. En presencia de este antagonista, la adición de 1  $\mu$ M de muscarina tuvo su efecto habitual: disminuyó la amplitud de las IPSCs. Estos resultados sugieren que en las sinapsis STF los endocannabinoides no median la acción muscarínica. Observe que un antagonista a los receptores GABA<sub>A</sub>, 10  $\mu$ M gabazina, bloquea la corriente remanente demostrando que es mediada por GABA en su totalidad. La gráfica de la figura 15B ilustra los experimentos individuales de la muestra de sinapsis-STF. La muscarina tuvo efecto en presencia de AM 251 en 12 de 18 neuronas registradas en el GPe cuando se estimula desde el estriado: 49 +/- 7% (\*\*P < 0.001; Friedman).

Se realizó un experimento similar en las sinapsis-STD (fig. 15C). Igualmente, las amplitudes de las IPSCs registradas no mostraron cambios al adicionar AM 251. Las barras indican los tiempos de administración. Pero en este caso, si en presencia de AM 251 se adiciona muscarina las acciones de la misma son

anuladas. A la derecha se muestran las corrientes representativas. La gráfica en 15D muestra los experimentos individuales en sinapsis STD ( $n = 6$ ). También acá, la gabazina inhibe todas las corrientes indicando que son mediadas por GABA. Cuando comparamos las acciones de los cannabinoides en las sinapsis STF y STD las diferencias fueron significativas ( $P < 0.035$ ; Mann Whitney).

Estos resultados sugieren que los cannabinoides liberados al espacio extracelular actúan como un transmisor retrogrado (Engler et al. 2006), mediando el efecto muscarínico. Si esta conclusión es correcta, entonces, en la sinapsis STD deberían de expresar presinápticamente los receptores  $CB_1$ . Como todas las acciones directas o indirectas se bloquearon con antagonistas del receptor  $M_1$  es entonces posible que algunas neuronas del GPe lo expresen postsinápticamente. Estos receptores pueden acoplarse a proteínas  $G_{q/11}$  lo que podría inducir cambios en el calcio intracelular (Pérez-Burgos et al. 2008). Así, decidimos indagar si hay algunas neuronas del GPe que expresen receptores muscarínicos de manera postsináptica. Y si esto fuese cierto, la quelación del calcio intracelular – por ejemplo con 20 mM de BAPTA –debería bloquear la modulación presináptica por cannabinoides.



**Figura 15. La modulación difiere en las conexiones STF comparadas con las STD.** **A.** Curso temporal de la amplitud de las IPSCs antes (1) y durante (2) la adición de 1  $\mu$ M AM 251 –antagonista selectivo de los receptores CB<sub>1</sub>–. El antagonista no tiene efecto por sí mismo. Pero la adición posterior de 1  $\mu$ M de muscarina tiene el efecto usual: la reducción en la amplitud de las IPSCs. Por lo tanto, el bloqueo de los receptores CB<sub>1</sub> no reduce el efecto muscarínico. **B.** A la derecha se muestra trazos representativos de las IPSCs así como experimentos individuales de la muestra (n = 10; \*\*\*P < 0.001; Friedman, comparando con AM 251 vs. AM 251 más muscarina). **C.** Curso temporal de la amplitud de las IPSCs en conexiones STD. El antagonista a CB<sub>1</sub> no tiene efecto por sí mismo. Sin embargo, se pierde todo el efecto de la adición de 1  $\mu$ M de muscarina. A la derecha se muestran trazos representativos. **D.** La muestra enseña que no hay acciones muscarínicas cuando el AM 251 bloquea los receptores CB<sub>1</sub>.

### **La quelación intracelular de calcio inhibe la actividad de la muscarina en sinapsis STD**

Para que haya síntesis de cannabinoides en las neuronas del GPe y estos puedan actuar como mensajeros retrógrados, debe de haber un incremento en las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Engler et al. 2006). Las cascadas de señalización asociadas con los receptores muscarínicos del tipo M<sub>1</sub>

incrementan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Pérez-Burgos et al. 2008). Por lo tanto, la quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en neuronas en que la modulación muscarínica está regulada por cannabinoides debería de suprimir las acciones colinérgicas mediadas por cannabinoides endógenos, pero no impediría las acciones de los cannabinoides exógenos.

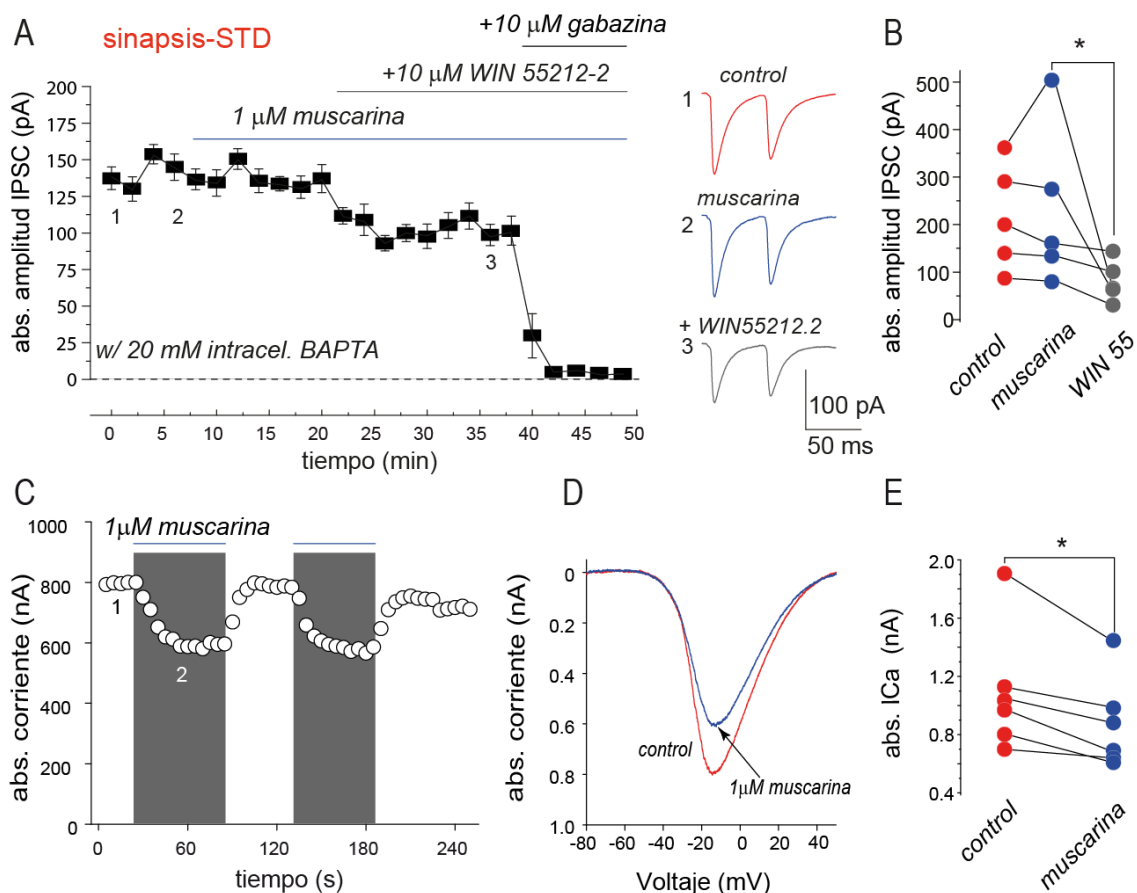
Un experimento representativo se ejemplifica en el curso temporal de la figura 16A. La adición de 20 mM de BAPTA –un quelante de calcio– en la pipeta de registro bloqueó el efecto de la muscarina ( $n = 5$ ) en las sinapsis-STD. Sin embargo, el agonista a los receptores  $\text{CB}_1$ , WIN5212-2, pudo reducir la amplitud de las IPSCs en presencia de BAPTA intracelular en un  $54 \pm 14 \%$ . Estos resultados sugieren que los receptores  $\text{CB}_1$  están presentes en las terminales de la sinapsis STD, y que las acciones muscarínicas podría deberse a la síntesis de cannabinoides endógenos por algunas neuronas postsinápticas. Los experimentos individuales de esta muestras se ilustran el la figura 16B ( $n = 5$ ;  $*P < 0.05$ ; Friedman)

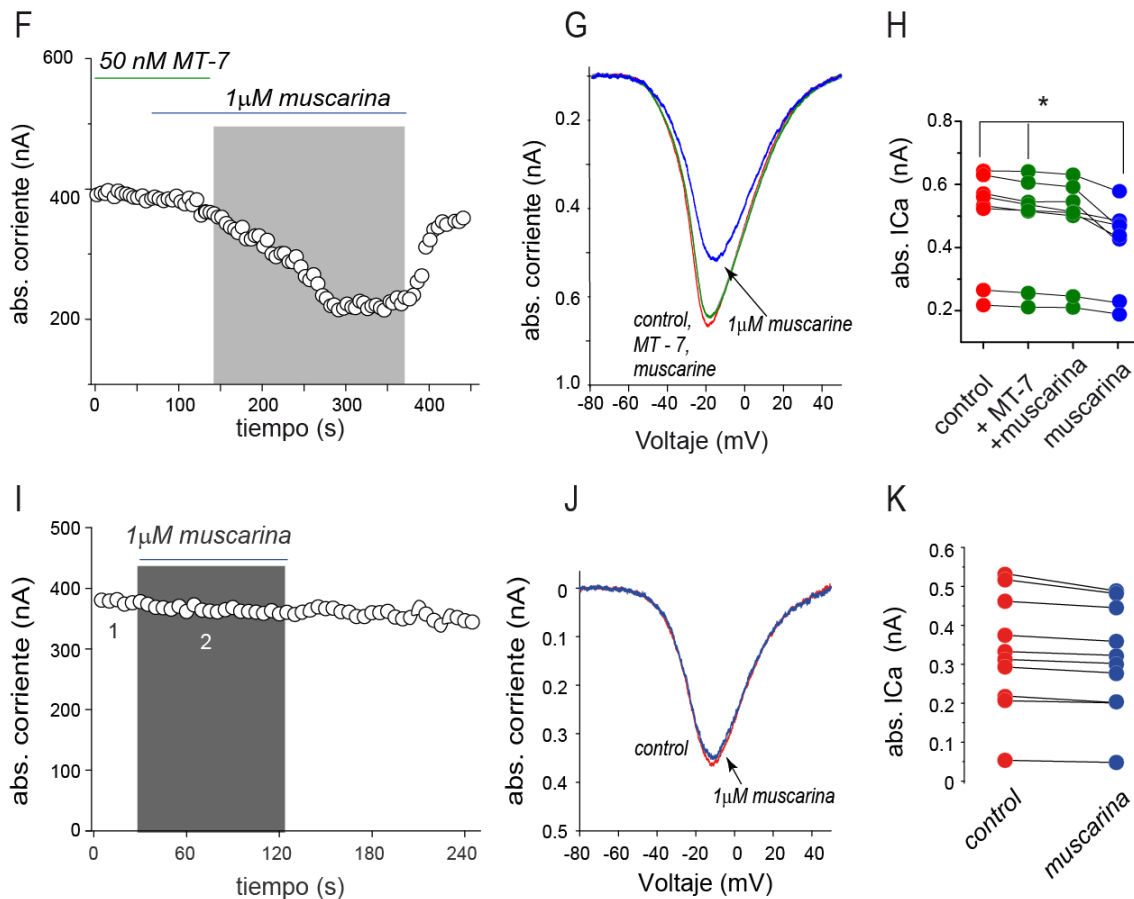
Los resultados implican que algunas neuronas del GPe poseen receptores muscarínicos postsinápticos funcionales. Para estar seguros de que esto es así, registramos neuronas disociadas del GPe, quitando toda influencia presináptica. En la figura 16C se muestra el curso temporal de la amplitud de las corrientes de calcio de una neurona del GPe (Pérez-Rosello et al. 2005; Pérez-Burgos et al. 2008).  $1\mu\text{M}$  de muscarina redujo la corriente de calcio y la acción fue reversible. Esto se observó en 6 de 16 neuronas registradas (37%). En una fracción de células del GPe la reducción fue de  $21 \pm 6\%$  ( $n = 6$ ;  $*P < 0.05$ ; T Wilcoxon).

También se utilizó el antagonista selectivo a los receptores  $\text{M}_1$ , MT-7, para estar seguros si es el mismo receptor el que actúa en la postsinapsis y por ende en la sinapsis-STD ( $n = n = 9$ ;  $***P < 0.001$ ; Friedman). En presencia de este fármaco no se presento ningún efecto, en cambio cuando se lavo la muscarina revelo su efecto.

Sin embargo, en la mayoría de las neuronas del GPe las corrientes de calcio no respondieron a la muscarina (n = 10/16 o 63%; figuras. 16 I-K). Esto sugiere que la población neuronal del GPe es heterogénea (Nambu & Llinas 1994; Cooper & Stanford, 2000; Kita 2007; Goldberg & Bergman, 2011; Mallet et al. 2012).

En resumen, mostramos efectos postsinápticos de la muscarina en algunas neuronas del GPe. Esto implica que podrían poseer vías de señalización para la síntesis de cannabinoideas. También mostramos que la sinapsis STD puede ser modulada por receptores CB1. Los receptores muscarínicos expresados en la postsinapsis al ser activados pueden producir endocannabinoideas. En conjunto, la cantidad de sinapsis-STD es mucho menor las sinapsis-STF, cuando la estimulación se da en el Str (Schwab et al. 2013).

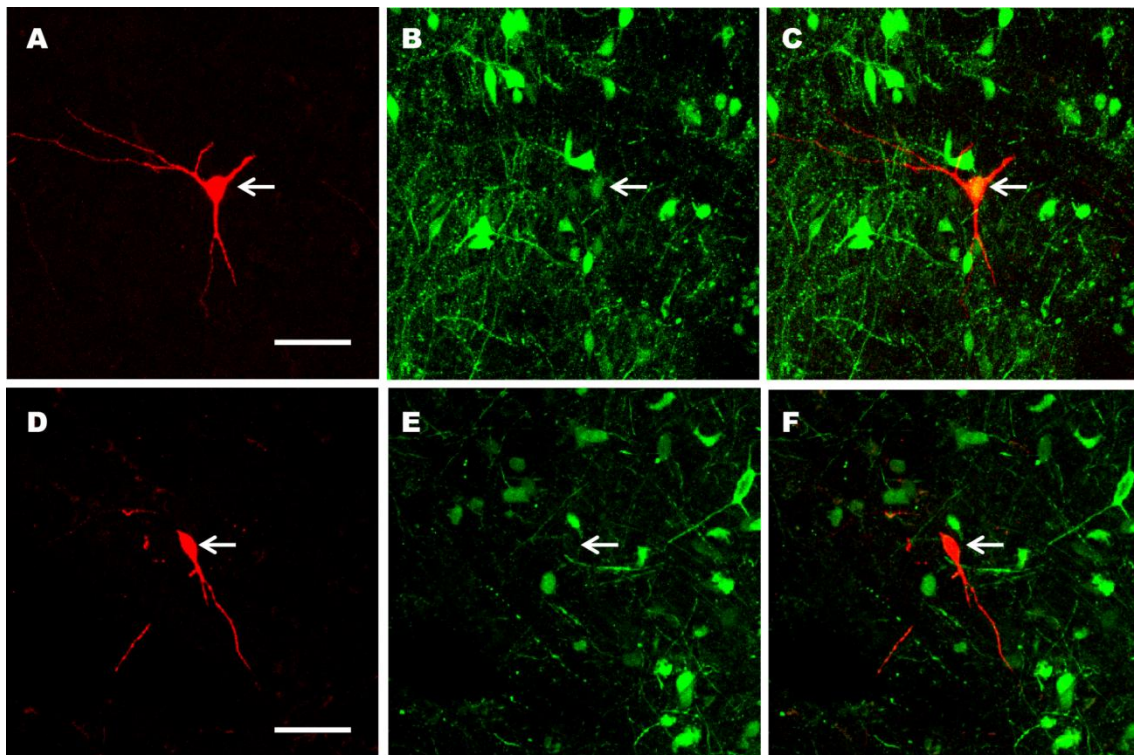




**Figura 16. El efecto muscarínico en las sinapsis-STD es bloqueado por la presencia de un quelante del calcio intracelular.** **A.** Curso temporal de las amplitudes de los IPSC de una sinapsis-STD en presencia de 20 mM de BAPTA intracelular (1). Las barras indican el tiempo de aplicación de los fármacos. El efecto de la muscarina es bloqueado después de la quelar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (2). La adición subsiguiente de 10  $\mu\text{M}$  de WIN 55212-2 -3, agonista de los receptores  $\text{CB}_1$ , disminuye la amplitud de las IPSCs, sugiriendo que en las sinapsis depresoras también expresan receptores  $\text{CB}_1$ . A la derecha podemos observar trazos representativos de los IPSC tomados del curso temporal, denotados por números. **B.** Una muestra de sinapsis depresoras ( $n = 5$ ;  $*P < 0.05$ ; Friedman). **C.** Curso temporal de la modulación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por 1  $\mu\text{M}$  de muscarina en neuronas del GPe disociadas; la modulación fue reversible. **D.** Relación corriente-voltaje antes y durante el efecto de la muscarina (obtenida con comandos en forma de rampa). **E.** Gráfica de líneas pareadas muestran una muestra de células sensibles a muscarina ( $n = 6$ ;  $*P < 0.05$ ; T Wilcoxon). **F.** Curso temporal de una célula palidial en presencia de MT-7 antagonista selectivo de los receptores M1, cuando se lava este fármaco se revela la acción de la muscarina. **G.** Gráfica I-V de la célula antes y durante la muscarina en presencia de o ausencia de MT-7. **H.** Gráfica de líneas pareadas muestran la muestra de células tratadas con MT-7 en presencia o ausencia de muscarina ( $n = 9$ ;  $*P < 0.001$ ; Friedman). **I.** Curso temporal de una célula del GPe que no respondió a la muscarina. **J.** Gráficas I-V de las células no sensibles antes y después de la aplicación de muscarina. **K.** Gráfica que ilustra la muestra de neuronas insensibles a la muscarina; note las diferentes escalas en comparación con E.



A algunas neuronas registradas con sinapsis-STF y sinapsis-STD se les realizó inmunocitoquímica contra parvalbumina (PV). En la figura 17A se muestra una neurona registrada en el centro del GPe, que presentó STF y está llena con biocitina. Se observa el soma y algunas dendritas. Esta célula fue positiva a PV. Junto a ella se observan otras neuronas positivas a PV. En la fg. 17C se ven las dos imágenes superpuestas indicando con la flecha blanca que son la misma neurona –color amarillo–. De las 12 neuronas registradas que presentaron STF en 4 casos pudimos recuperar las células y encontramos que eran PV+. En la figura 17D también podemos observar una célula marcada con biocitina que presentó STD. Al realizar la inmunocitoquímica contra PV dio negativa –observe que hay somas inmunopositivos a PV a su alrededor. La superposición muestra que la célula es negativa –solo color rojo–. Tres de las neuronas registradas con STD fueron recuperadas con inmunocitoquímica y fueron negativas a PV.



**Figura 17. Identificación de las neuronas del GPe.** A. Micrografía de fluorescencia confocal de una neurona registrada en el centro del GPe y llena con biocitina, en rojo y que presentó STF. En B se muestra la inmunoreacción contra PV (en verde). Note que la neurona registrada está rodeada de otras PV+. En C podemos ver la superposición de A y B: se observa que es la misma neurona con doble marca (amarillo). D. Otra célula llena con biocitina (rojo) que presentó STD y que fue PV-no

expresa PV aunque está rodeada de neuronas PV+ **E. F:** la sobreposición de D y E muestra que la neurona registrada sólo está contiene biocitina. Escala = 50  $\mu\text{m}$ .

## **SECCIÓN II**

### ***Plasticidad sináptica de largo plazo en la sinapsis estriatopalidal***

La potenciación sináptica de largo plazo (LTP) es el incremento duradero en la probabilidad de liberación de neurotransmisor. Puede generarse después de un tren de estímulos.

En cambio, la depresión sináptica de largo plazo (LTD) es la disminución de largo plazo en la probabilidad de liberar neurotransmisor.

Estos fenómenos han sido estudiado ampliamente en hipocampo y corteza (Malenka 2002; Chevaleyre 2006; Mendoza et al. 2006; Sjöström et al. 2007; Bliss & Collingridge, 2013) en sinapsis excitadoras e inhibitoras. En los GB la sinapsis más estudiada es la corticostriatal entre las piramidales y las NEM (Shen et al. 2008; Adelman et al. 2009; Berreta et al. 2009). Más recientemente se han abordado otras sinapsis de los GB (Rueda-Orozco et al. 2009, Aceves et al 2011b; Dupuis et al. 2014). En todas estas estructuras se han descrito LTP, LTD tanto en sinapsis inhibitoras como excitadoras.

Aquí indagamos si la sinapsis GABAérgica estriatopalidal (STF) exhibe LTP o LTD. Usamos un protocolo de 2 trenes de estimulación a alta frecuencia –100 Hz– en el Str (Mendoza et al. 2006).

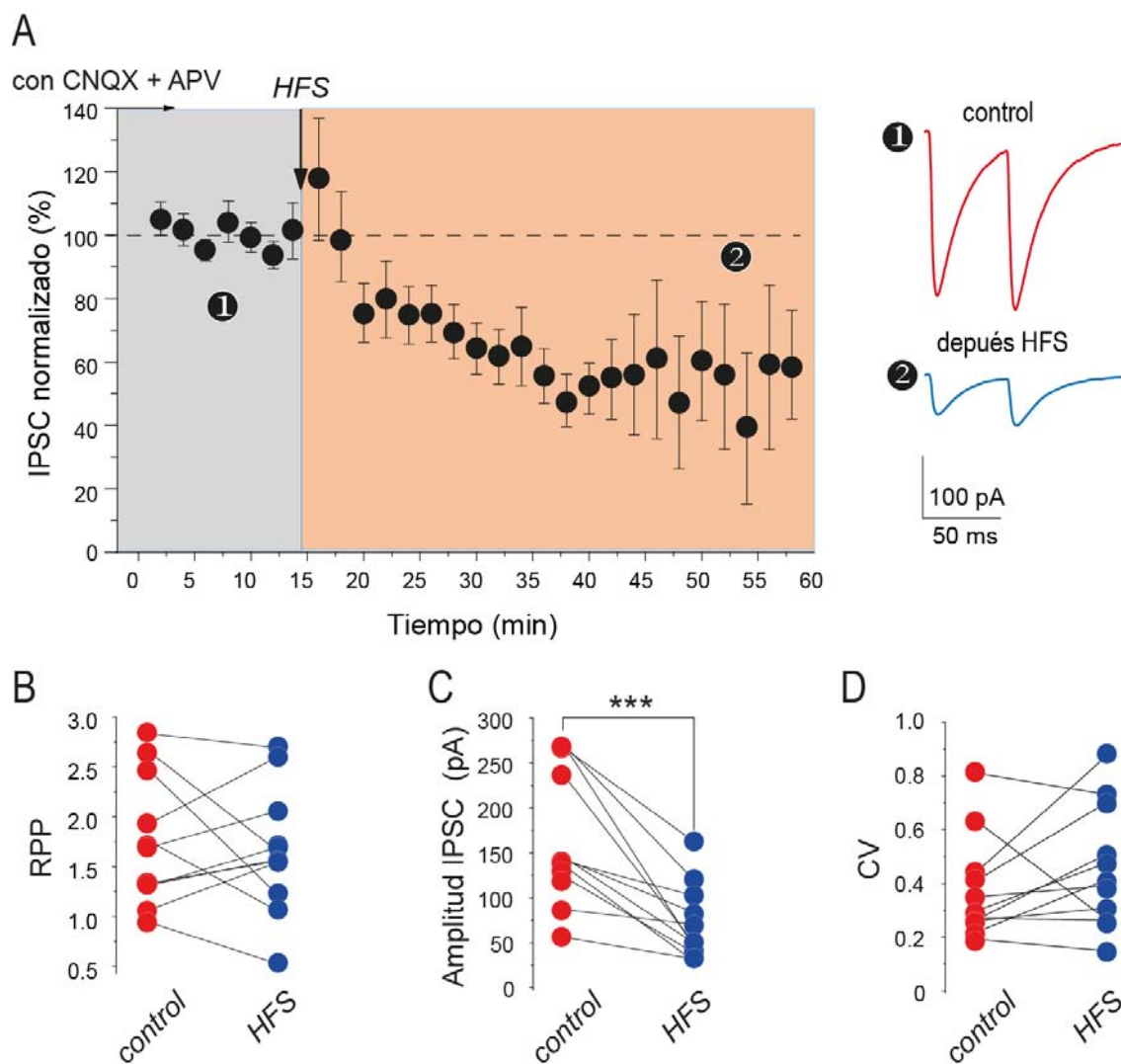
### ***La sinapsis estriatopalidal presenta LTD***

En la figura 18A se muestra el curso temporal de la amplitud de las IPSCs normalizando  $n = 11$  experimentos. Después de la estimulación de alta frecuencia (HFS) la sinapsis se deprimió y el cambio duró varios minutos ( $n = 11$ ;  $50.4\% \pm 7.33$ ;  $P < 0.001$ ; T de Wilcoxon). Todo esto en presencia de 10



$\mu\text{M}$  de CNQX y  $50 \mu\text{M}$  de APV para bloquear los NMDA\_R. A la derecha se muestran trazos representativos antes y después de la HFS.

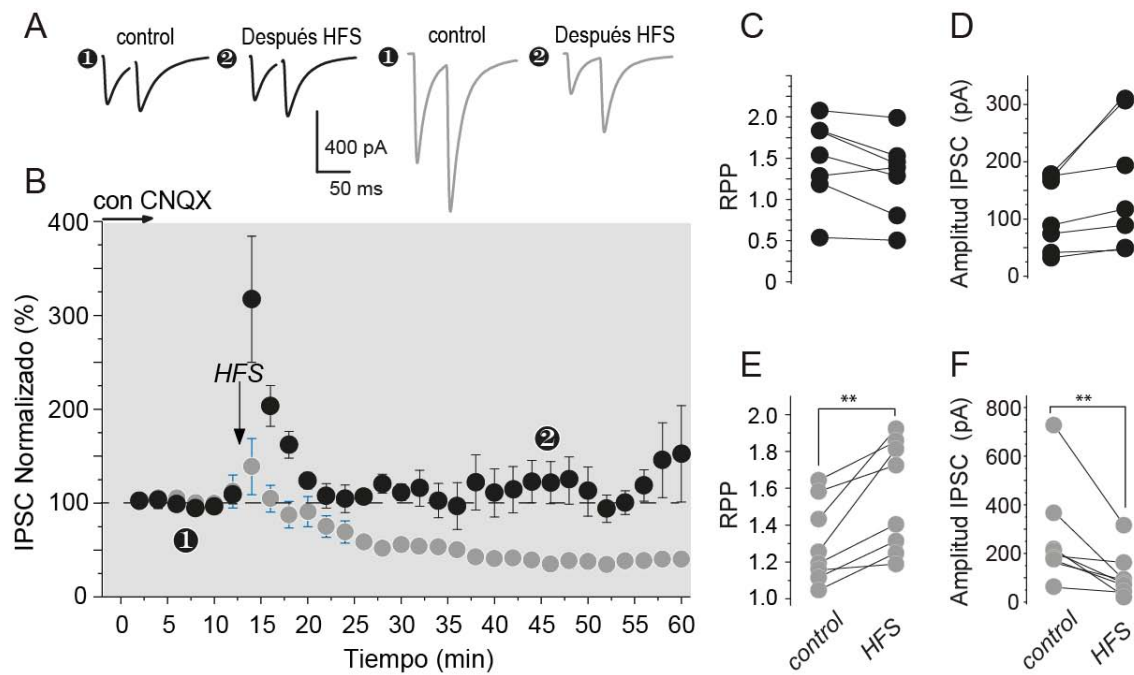
Usamos pulsos pareados, la RPP y el coeficiente de variación para tratar de averiguar si el cambio es pre- o post-sináptico (Faber & Korn, 1991; Guzmán et al 2003; López-Huerta et al. 2008). En la figura 18B se muestra que la RPP no cambia. En la figura 18C se ilustran los casos individuales de la muestra: la disminución en la amplitud es significativa ( $P < 0.001$ ; T de Wilcoxon). En los experimentos realizados bajo estas condiciones se presentó una LTD estable y duradera. Los cambios en el CV no nos permiten dilucidar si el fenómeno es pre- o post-sináptico. Por lo que habría que realizar más análisis (Faber & Korn, 1991).



**Figura 18. La sinapsis estriatopalidal presenta depresión de largo plazo (LTD) ante un tren de HFS.** **A.** Curso temporal de la inducción de LTD por estimulación de 2 trenes de alta frecuencia a 100 Hz usando el protocolo de pulsos pareados en presencia de 10  $\mu$ M CNQX y 50  $\mu$ M APV. Cada símbolo representa el promedio  $\pm$  error estándar de 12 eventos sinápticos individuales de la primera corriente postsináptica inhibitoria. A la derecha se muestran trazos representativos. **B.** Los cambios en la RPP no son significativos. **C.** La amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias disminuyen en todos los casos de la muestra ( $***P \leq 0.001$ ; T de Wilcoxon). **C.** El CV no presenta cambios significativos.

### ***La LTD estriatopalidal depende de los receptores a NMDA***

Los receptores N-metil D-aspartato (NMDA) pueden participar en la LTD (Kauer & Malenka, 2007; Citri & Malenka, 2008). El GPe presenta este receptor (Bernard & Bolam, 2001). Por esto, decidimos evaluar el efecto de la activación de estos receptores en la LTD de la sinapsis estriatopalidal. El resultado fue que la activación de los NMDA\_R abolió la LTD en la mitad de las sinapsis. En la figura 19B se muestra el curso temporal de la sinapsis estriatopalidal después de 2 trenes de HFS cuando no se bloquean los receptores NMDA, podemos ver 2 efectos: uno en el cual no se presenta la LTD (rojo) y otro en que sí se presenta (azul). Cuando no hubo un cambio significativo en el tamaño de los sinápticos 19D, tampoco cambió la RPP (fig. 19C;  $n = 7$ ; NS). Cuando hubo LTD disminuyó la amplitud de los IPSCs en un  $58 \pm 8\%$  (fig. 19E;  $n = 8$ ;  $p < 0.01$ ; T de Wilcoxon) y se acompañó de con un cambio en la RPP (fig. 19F).

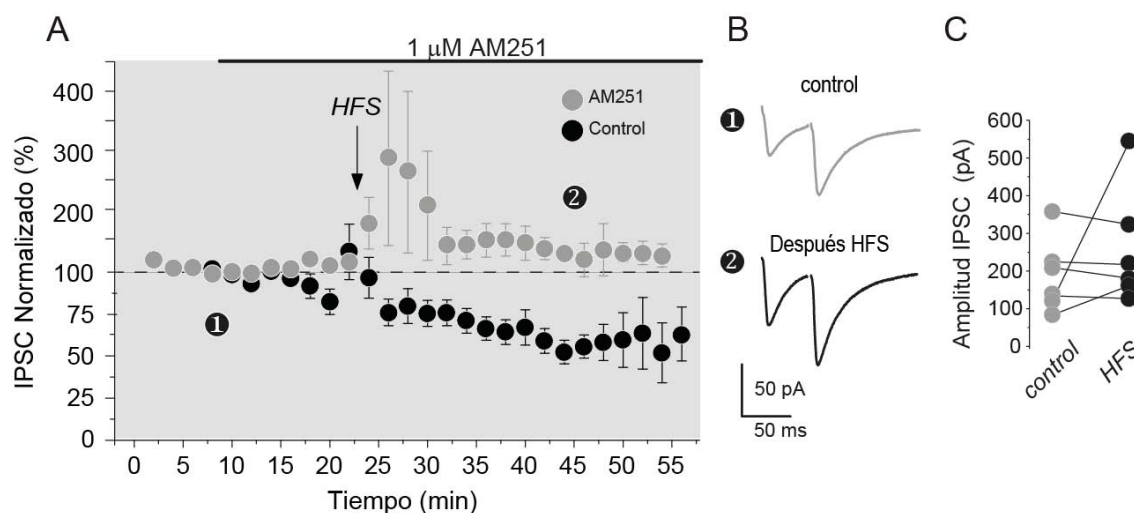


**Figura 19. Algunas sinapsis STF presentan LTD después de un HFS.** **A** Rojo: Trazos que no presentaron LTD. Azul trazos que sí presentaron LTD. **B.** Curso temporal de la inducción de LTD por estimulación de 2 trenes HFS a 100 Hz registrando pulsos pareados en presencia de 50  $\mu$ M APV; en la sinapsis GABAérgica estriatopalidal. Cada símbolo representa el promedio  $\pm$  error estándar de 12 eventos sinápticos individuales de la primera corriente postsináptica inhibitoria. Rojo: promedio y normalización de los experimentos que no respondieron a la HFS. Azul: experimentos que si respondieron a la HFS. Flecha: momento de la HFS. **C, D.** No cambia la RPP ni la amplitud. ( $n = 7$ ; NS). **E, F.** Aumento en la RPP (\*\* $P < 0.01$ ; T de Wilcoxon) y en las amplitudes de las corrientes (\*\* $P \leq 0.01$ ; T de Wilcoxon).

### ***LTD del GPe es dependiente de cannabinoides***

Por otra parte se ha demostrado que el GPe es un núcleo que expresa una cantidad importante del receptor  $CB_1$  (Herkenham et al. 2001) y que la depresión de largo plazo en algunas sinapsis es dependiente de cannabinoides (Kreitzer & Malenka, 2007; Shen et al. 2008), por eso nos dimos a la tarea de saber si existe una relación estrecha entre los cannabinoides y la LTD en el GPe. En efecto, es posible que los receptores  $CB_1$  estén involucrados en la generación de la LTD en la sinapsis estriatopalidal, porque cuando adicionamos el antagonista a los receptores  $CB_1$  -1  $\mu$ M AM251- la LTD se ocluye en 50% de los casos, se muestra el curso temporal normalizado de 6

experimentos en la figura 20A, note que no hay ningún efecto del AM251 por sí solo, no hay cambio significativo en los IPSC después de la HFS –figura 20B– en todos los experimentos realizados –figura 20C–.



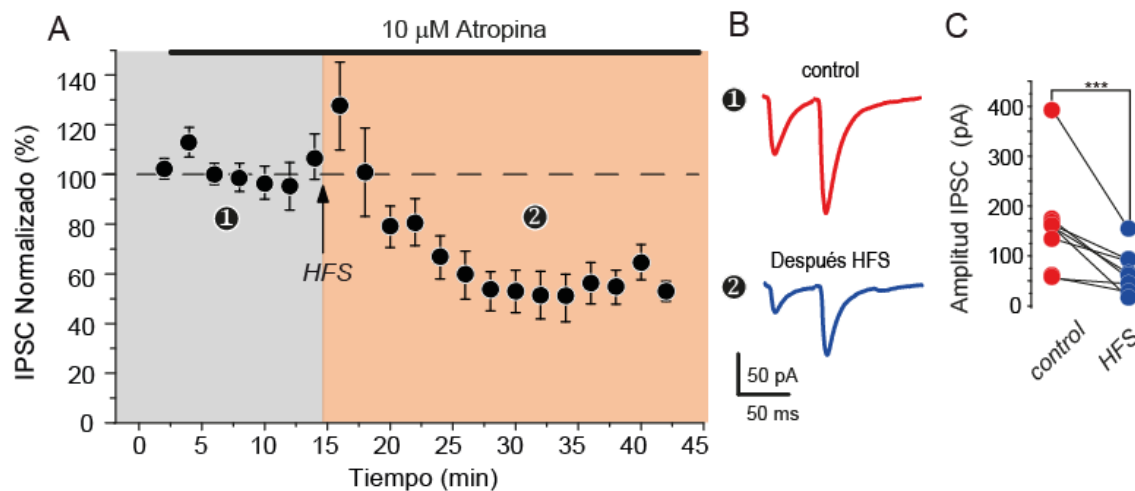
**Figura 20. La LTD en la sinapsis estriatopalidal es dependiente de cannabinoides.** **A.** Curso temporal de la oclusión de la LTD –en presencia de 10  $\mu$ M CNQX, 50  $\mu$ M APV y 1  $\mu$ M de AM251; en la sinapsis GABAérgica estriatopalidal en rojo–. Cada símbolo representa el promedio  $\pm$  error estándar de 12 eventos sinápticos individuales de los IPSC. En negro se muestra la comparación cuando no se adiciona el bloqueador de los CB<sub>1</sub>R –solo CNQX y APV. **B.** Se muestran los trazos representativos de la respuesta al estímulo tomada en diferentes momentos del curso temporal indicada por números, la flecha –negra– indica el tiempo cuando se dieron los estímulos. **C.** No hay cambios significativos de los IPSC antes y después del HFS cuando es bloqueado el CB<sub>1</sub>R.

### ***La LTD del GPe dependiente de receptores metabotrópicos glutamatérgicos.***

Se ha demostrado que la síntesis y producción de endocannabinoides podría estar desencadenada por la activación de receptores metabotrópicos tanto muscarínicos (Ohno-Shosaku et al. 2003; Fukudome et al. 2004; Jo et al. 2010; Ahumada et al. 2013) como glutamatérgicos (Oilet et al. 1997; Collingridge et al. 2010; Tang et al. 2013). En el GPe se expresan ambos receptores (Hanson & Smith, 1999; Cortés et al. 1987; Wang et al. 1990) y modulan la liberación de

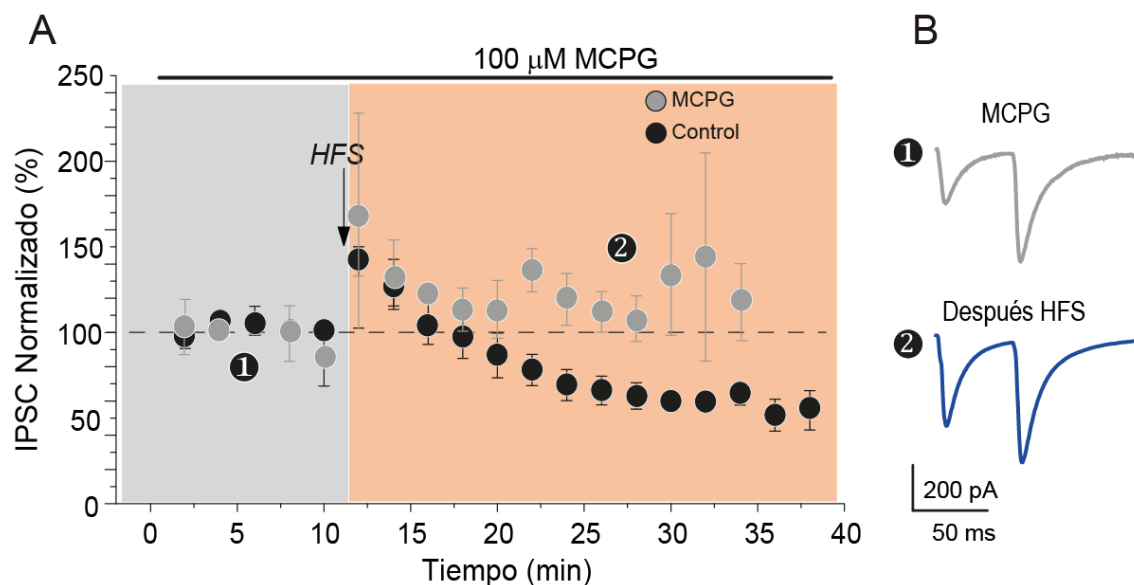
GABA, (Poisik et al. 2003) por eso es importante ver si tienen una participación en la LTD de la sinapsis estriatopalidal.

En el caso de la activación de los MR en la generación de la LTD, no se observó ningún efecto cuando se bloquearon previamente los receptores muscarínicos con atropina, antes y después del HFS. Esto es, estos receptores no bloquearon la LTD. En la figura 21A podemos observar el curso temporal de los IPSC normalizados de 8 experimentos realizados en presencia de 10  $\mu$ M de atropina. En la fig. 21B se muestran trazos representativos. En la fig. 21C la gráfica resume la muestra. Las IPSCS disminuyen: 42.5% +/- 5.5; ( $P < 0.006$ ; friedman).



**Figura 21. La LTD en la sinapsis estriatopalidal no depende de la activación de receptores muscarínicos.** **A.** Curso temporal de la inducción de LTD –en presencia de 10  $\mu$ M CNQX, 50  $\mu$ M APV y 10  $\mu$ M de atropina. **B.** Se muestran los trazos representativos **C.** Las amplitudes de las corrientes absolutas IPSCs disminuyen en todos los casos de la muestra ( $***P \leq 0.006$ ; Friedman) a pesar de la atropina.

Después utilizamos un antagonista a receptores de la familia mGluR I/II: 100  $\mu$ M MCPG. En estas condiciones la HFS ya no produce LTD. En la figura 22A observamos el curso temporal de los IPSC normalizados de 3 neuronas –rojo; en presencia de CNQX, APV y 100  $\mu$ M de MCPG– comparado con el control – negro; solo CNQ y APV–. En 22B vemos los trazos representativos de los IPSC antes y después del protocolo de estimulación.



**Figura 22. Los mGluRs están involucrados en la LTD de la sinapsis estriatopalidal.** **A.** Curso temporal de la oclusión de la LTD –en presencia de 10  $\mu$ M CNQX, 50  $\mu$ M APV y 100  $\mu$ M de MCPG; en la sinapsis GABAérgica estriatopalidal en rojo–. Cada símbolo representa el promedio  $\pm$  error estándar de 12 eventos sinápticos individuales de los IPSC. En negro se muestra la comparación cuando no se adiciona el bloqueador de los mGluR I –solo CNQX y APV. **B.** Se muestran los trazos representativos de la respuesta al estímulo tomada en diferentes momentos del curso temporal indicada por números, la flecha –negra– indica el tiempo cuando se dieron los estímulos.

Estos resultados sugieren que la activación de los CB1Rs y los NMDA\_R pueden modular la plasticidad de la transmisión sináptica en la sinapsis GABAérgica estriatopalidal pre y postsinápticamente.

## DISCUSIÓN

### *Las sinapsis-STF son moduladas por receptores muscarínicos*

La estimulación de campo de las proyecciones estriatopalidales en rebanadas parasagitales (Beurrier et al. 2006) produce IPSCs en las neuronas postsinápticas del GPe (Cooper & Stanford, 2001; Engler et al. 2006; López-Huerta et al. 2008) en presencia de CNQX y APV (ver métodos). Las respuestas sinápticas son GABAérgicas ya que son bloqueadas completamente con bicuculina o gabazina (Jaeger & Kita, 2011; Goldberg &

Bergman, 2011). La muscarina reduce significativamente la amplitud de las IPSCs provocadas y la inhibición es similar a la observada para las IPSCs registradas entre las NEMs dentro del Str (Pérez-Rosello et al. 2005). El efecto de la muscarina es probable que sea presináptico ya que es acompañada con un cambio en la RPP y el CV (Cooper & Stanford, 2001; Engler et al. 2006), así un contenido cuántico ( $CV^{-2}$ ) en función de la amplitud de las corrientes sinápticas. Estos análisis sugieren que el efecto colinérgico es presináptico. Estas respuestas pueden ser registradas en las sinapsis que presentan facilitación de corto plazo, que previamente se mostró está presente en la sinapsis estriatopalidal (Miguelé et al. 2012) y no en la sinapsis palidopalidal.

En este trabajo se consolidó la idea de que la STSP es una forma de distinguir el tipo de sinapsis estimulada preferentemente (Sims et al. 2008; Miguelé et al. 2012). La diferencia en la plasticidad sináptica de corto plazo que presentan las sinapsis GPe-GPe y Str-GPe es probable que sea debido a que tienen diferentes probabilidades de liberación, la palidopalidal es mayor que la estriatopalidal (Sims et al. 2008), esta diferencia se observó en otros núcleos como en las proyecciones que envía el GPe hacia la SNr (Aceves et al. 2011a).

En todas las células el efecto de la muscarina es disminuir las IPSCs, tanto en las que presentan STF como en las STD, el efecto de la muscarina es específico en ambas sinapsis, en las STF es bloqueado por el antagonista competitivo atropina en todas las células registradas. La evidencia también sugiere que sea mediada a través del receptor muscarínico de la clase  $M_1$  por que el antagonista selectivo a  $M_1R$ , pirenzepina, bloquea la respuesta mientras que el antagonista selectivo a los receptores  $M_4$ , tropicamida, no impidió la acción de la muscarina. Por último, el antagonista específico para los receptores  $M_4$ , la toxina MT3, tampoco bloqueó el efecto de la muscarina, mientras que el antagonista específico MT-7 sí lo hizo.

En el caso de las STD se probó directamente el uso de la toxina específica MT-7 para bloquear los receptores  $M_1$  sobre las células del GPe, y en efecto también la modulación colinérgica es llevada a través del  $M_1$ .



Los receptores  $M_1$  y  $M_4$  son los receptores muscarínicos encontrados en las NEMs. Los receptores  $M_4$  son preferencialmente expresados en las neuronas de la vía directa mientras que los receptores  $M_1$  son virtualmente el único receptor funcional en las neuronas de la vía indirecta (Yan et al. 2001). Así, como ésta es la vía que dirige sus terminales al GPe de manera primordial de alguna manera se esperaba que los causantes de la modulación sean estos receptores.

También descartamos que la modulación presináptica muscarínica de la transmisión estriatopalidal sea mediada indirectamente vía la síntesis de endocannabinoides, aun conociendo que los  $CB_1R$  se encuentran en esas terminales. Sucedió que el bloqueo de los  $CB_1R$  por el antagonista, AM 251, no redujo la modulación muscarínica (Engler et al. 2006; Fukudome et al. 2004; Lau & Vaughan, 2008). Además, como en el caso de la terminales intraestriatales, las terminales estriatopalidales fueron reguladas directamente (Pérez-Rosello et al. 2005) por la acetilcolina endógena.

Hay dos diferencias importantes entre las terminales estriatopalidales y las terminales interestriatales que ramifican de los mismos axones de las NEMs: uno es el tipo de plasticidad de corto plazo, el primero muestra facilitación (Migueluez et al. 2012) y el segundo muestra depresión (Tecuapetla et al. 2007). La segunda diferencia es el origen de la acetilcolina, la primera es muy probable que provenga del NPP (Woolf & Butcher, 1986) Aunque no se descartan otros sitios de inervación de colinérgica como el pálido ventral (Bengtson y Osborne 2000), para ello habría que estimular en estos núcleos y ver si hay modulación de los IPSCs, en el estriado provienen tanto de interneuronas colinérgicas como del NPP (Dautan et al. 2014).

Esta serie de experimentos se resumen en la figura 23, donde se muestra que la modulación colinérgica es muy probable que sea directa sobre los receptores  $M_1$  en las terminales estriatopalidales.



### ***Las sinapsis depresoras son moduladas por los receptores muscarínicos de forma indirecta***

Los resultados sugieren hasta el momento que existen al menos 2 mecanismos distintos por lo cual se modula la inhibición mediada por la muscarina. En las sinapsis-STD la acción de la muscarina es inhibida con un bloqueo previo de los receptores CB1. Esto es, la acción es indirecta y mediada por cannabinoides como se ha demostrado en otros núcleos (Ohno-Shosaku et al. 2003; Fukodome et al. 2004; Lau & Vaughan 2008).

De la misma forma, al quelar el calcio intracelular con BAPTA en la célula postsináptica, evitamos la síntesis de los cannabinoides endógenos lo que también evita la acción muscarínica.

Una cuestión también importante es que esta modulación es mediada también por los receptores M<sub>1</sub>, ya que al bloquearlos de manera selectiva ya no se observa el efecto de la muscarina.

Estos mecanismos propuestos se resumen en la figura 24 donde esquematizamos las posibles vías de la activación de los receptores CB<sub>1</sub> y del M<sub>1</sub>R en el GPe. Otra diferencia notable entre estas sinapsis estudiadas es que las STD preferentemente expresan PV (-), y estas neuronas son las que proyectan hacia el estriado, estimulando antidrómicamente las fibras en el estriado en cambio las que presentan STF preferentemente expresan PV (+), confirmando trabajos previos (Hoover y Marshall 1999; Hoover y Marshall 2002).

Estos descubrimientos cambian la percepción del modelo de los ganglios basales que propuso Albin y colaboradores en 1989, ya que existen varias fuentes de modulación extrínseca diferentes a las dopamina (ejemplo acetilcolina y serotonina), y que el desbalance de algunos de estos moduladores puede generar enfermedades. Una de las aportaciones más interesantes de este trabajo es que abre el modelo tradicional de los ganglios basales a una nueva interpretación donde los núcleos que tradicionalmente se

consideraban relevos como es el caso del GPe participen en la integración de todo el circuito de manera integral.

Otro apartado muy importante de esta investigación corresponde a la plasticidad sináptica de largo plazo, en el que la sinapsis-STF genera LTD en todos los casos con un protocolo que tradicionalmente desencadena LTP, lo que nos dice que las sinapsis inhibitorias pueden estar funcionando de manera diferente que las tradicionalmente estudiadas. En el GPe la plasticidad es modulada por los receptores NMDA y CB<sub>1</sub>. Lo que le da su carácter pre y post sináptico, es posible que la síntesis de los endocannabinoides esté sujeta a la activación de receptores metabotrópicos de glutamato, ya que la adición previa de estos ocluye la LTD, es una sorpresa que el bloqueo de los receptores metabotrópicos muscarínicos no ocluyan esta respuesta.

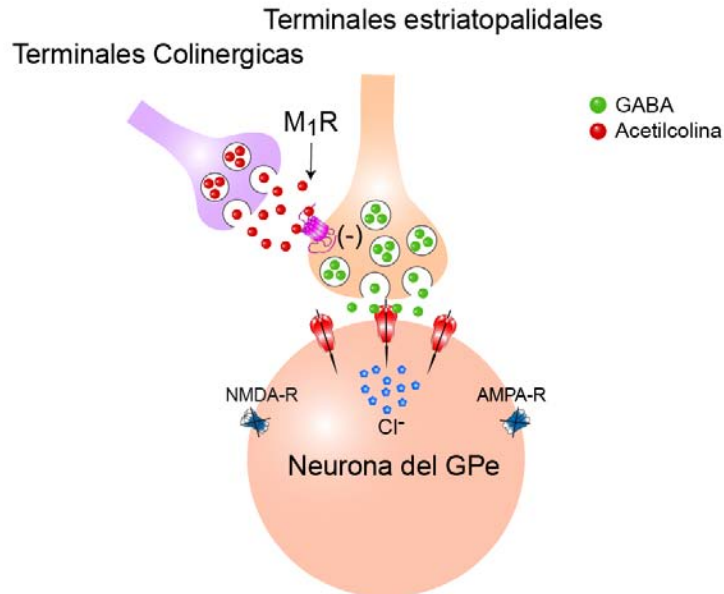
### ***Importancia fisiológica***

In vivo, las neuronas de GP tienen un disparo tónico (DeLong, 1971) o irregular con pausas. Una disminución en las IPSCs GABAérgicas induce un disparo tónico sin pausas (Bronfeld et al. 2010; Chang et al. 2004, Chang et al. 2005). Sin embargo, una hiperpolarización fuerte induce disparo en ráfagas con intervalos de nula actividad (Kita & Hashimoto, 2006). La actividad del GPe inhibe las oscilaciones espontáneas de las neuronas del STN (Bevan et al. 2002). El GPe y el STN forman un circuito en el cual pueden acoplar sus disparos cuya alternancia genera oscilaciones que se correlacionan con movimientos irregulares e involuntarios así como con rigidez (Bronfeld et al. 2010). Y es que la salida de ambos núcleos llega de manera alternada a la SNr que adopta un disparo en ráfagas que su vez afecta a la MLR y al NPP (Takakusaki, 2013). Esto produce temblor y rigidez.

Durante la enfermedad del Parkinson degenera alrededor del 50% de las neuronas colinérgicas de la parte lateral del NPP (Pahapill & Lozano, 2000) lo que disminuye la inervación colinérgica existente del NPP hacia los GB incluyendo el GPe (Charara & Parent, 1994; Gorbachevskaya & Chivileva,

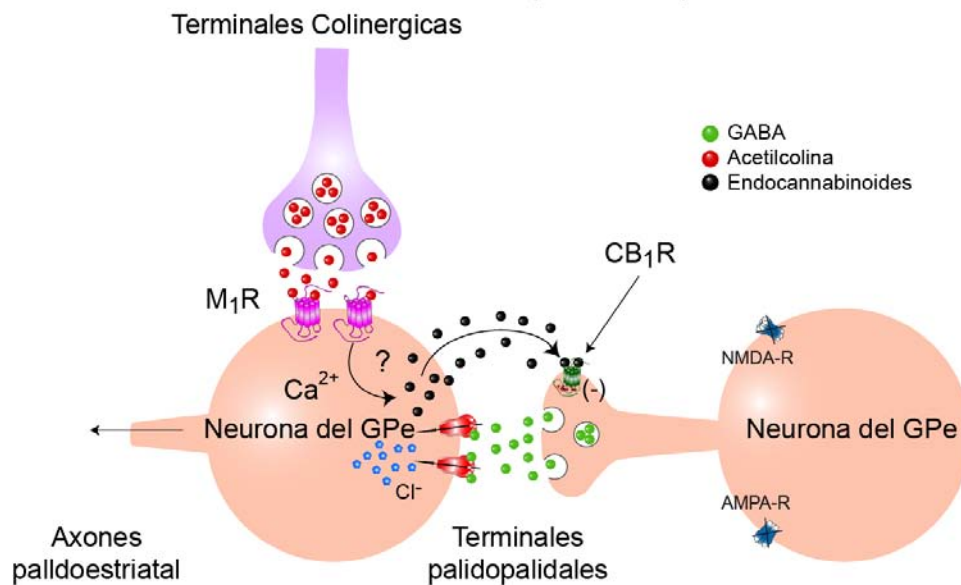
2006). Por lo tanto, estudiar la modulación colinérgica al GPe podría ayudarnos a entender su papel en la enfermedad del Parkinson.

Modulación muscarínica directa de las terminales estriatopalidales a través receptores M<sub>1</sub>



**Figura 23. Mecanismo propuesto para la modulación de la muscarina en la vía estriatopalidal.** En la figura se muestra un mecanismo propuesto para la modulación colinérgica en las sinapsis facilitadoras (estriatopalidales) de forma directa por los receptores M<sub>1</sub>.

Modulación muscarínica indirecta de las terminales palidopalidales a través receptores CB<sub>1</sub>



**Figura 24. Mecanismo propuesto para la modulación de la muscarina en la vía palidopalidal.** En la figura se muestra un mecanismo propuesto para la modulación colinérgica en las sinapsis depresoras (palidopalidales) de forma indirecta a través de la activación de los receptores a cannabinoides CB<sub>1</sub>.

## **CONCLUSIONES**

La activación de los receptores colinérgicos muscarínicos regula, presinápticamente las sinapsis GABAérgicas del GPe

Esta modulación involucra a los receptores M<sub>1</sub>

En un grupo de neuronas ( $\pm$  62.5%) la modulación parece ser directa: los receptores M<sub>1</sub> se encontrarían en las terminales estriatopalidales. O cuando menos faltaría investigar sobre la presencia de otros mediadores.

En otro grupo de neuronas ( $\pm$  37.5%) la modulación muscarínica parece ser indirecta, a través de la transmisión retrógrada de cannabinoides, pues hay bloqueo de la acción muscarínica debido a la activación del receptor CB<sub>1</sub>,

## ***FARMACOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS***

Antagonista de receptores-canal GABA GABA<sub>A</sub>:

Bicuculinametil-iodinada (10  $\mu$ M; RBISigma St. Louis, MO)

Antagonista de receptores-canal a glutamato de tipo NMDA:

Sal de litio del ácido DL-2-amino-5-fosfonoaléxico (APV 50  $\mu$ M; RBI-Sigma St. Louis, MO)

Antagonista competitivo de receptores-canal a glutamato de tipo AMPA y kainato: Sal disódica del ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico (10  $\mu$ M; CNQX; RBI-Sigma St. Louis, MO)

Agonista de los receptores de acetilcolina muscarínicos:

Cloruro de tetrahidro-4-hidroxi-N,N,N,5-tetrametil-2-furanmetanamonio

Cloruro de muscarina (1  $\mu$ M; RBI-Sigma St. Louis, MO)

Agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato mGluRI/II  
(RS)- $\alpha$ -Methyl-4-carboxyphenylglycine  
MCPG (100 mM; Tocris Bioscience, R&D Systems, Inc. Ellisville, Missouri, USA)

Antagonista competitivo no selectivo de los receptores de muscarina  
Atropina (10  $\mu$ M; RBI-Sigma St. Louis, MO)

Bloqueador de canales de sodio activados e inactivados con cinética rápida  
Bromuro de N-etilidocaina (QX-314) (3  $\mu$ M; RBI-Sigma St. Louis, MO)

GTP funciona como un portador de fosfatos y pirofosfatos que participan en la canalización de la energía química específica en las vías biosintéticas  
Sal hidratada de Guanosina 5'-trifosfato de sodio  
GTP (0.4  $\mu$ M; RBI-Sigma St. Louis, MO)

ATP es un agonista purinérgico P<sub>2</sub>; aumenta la actividad del Ca<sup>2+</sup> activados por los canales de K<sup>+</sup>; sustrato de sistemas dependientes de ATP  
Sal de magnesio de ATP (2.4  $\mu$ M; RBI-Sigma St. Louis, MO)

Biocitina hidroclicorada es un marcador celular  
Biocitina hidroclicorada (5  $\mu$ M; RBI-Sigma St. Louis, MO)

AM251 Antagonista selectivo a los receptores CB<sub>1</sub>. (Tocris Bioscience Ellisville, Missouri, USA). N-(Piperidin-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida

WIN 55,212-2 mesilato Agonista a los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>  
(R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanona mesilato

Estos reactivos fueron preparados al momento del experimento.

## REFERENCIAS

Abedi PM, Delaville C, De Deurwaerdère P, Benjelloun W, Benazzouz A. 2013. Intrapallidal administration of 6-hydroxydopamine mimics in large part the electrophysiological and behavioral consequences of major dopamine depletion in the rat. *Neuroscience* 236, 289–297.

Aceves JJ, Rueda-Orozco PE, Hernández R, Plata V, Ibañez-Sandoval O, Galarraga E, Bargas J. 2011a. Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons. *Frontiers in Systems Neuroscience* 5, 1-1.

Aceves JJ, Rueda-Orozco PE, Hernández-Martínez R, Galarraga E, Bargas J. 2011b. Bidirectional plasticity in striatonigral synapses: A switch to balance direct and indirect basal ganglia pathways. *Learning & Memory* 18, 764–773.

Adermark L, Talani G, Lovinger DM. 2009. Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *European Journal of Neuroscience* 29, 32–41.

Ahumada J, Fernández de Sevilla D, Couve A, Buño W, Fuenzalida M. 2013. Long-term depression of inhibitory synaptic transmission induced by spike-timing dependent plasticity requires coactivation of endocannabinoid and muscarinic receptors. *Hippocampus* 23, 1439-52.

Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neuroscience* 12, 366–375.

Anaya-Martinez V, Martinez-Marcos A, Martinez-Fong D, Aceves J, Erij D. 2006. Substantia nigra compacta neurons that innervate the reticular thalamic nucleus in the rat also project to striatum or globus pallidus: Implications for abnormal motor behavior. *Neuroscience* 143, 477–486.

Bargas J, Galarraga E. Transmisión sináptica **En:** Fanjul ML., Hiriart M. 2008. *Biología funcional de los animales II*. México, Siglo XXI editores. 2008, pag. 86-139.

Bekkers J, Stevens CF. 1990. Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 346, 724-728.

Bengtson CP, Osborne PB. 2000. Electrophysiological properties of cholinergic and noncholinergic neurons in the ventral pallidal region of the nucleus basalis in rat brain slices. *Journal of Neurophysiology* 83, 2649–2660.

Benhamou L, Bronfeld M, Bar-Gad I, Cohen D. 2012. Globus pallidus external segment neuron classification in freely moving rats: A comparison to primates. *PLOS ONE* 7 (9), e45421.

Bernard V, Normand E, Bloch B. 1992. Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptors genes. *Journal of Neuroscience* 12 (9), 3591–3600.

Bernard V, Bolam JP. 2001. Subcellular and subsynaptic distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor in the neostriatum and globus pallidus of the rat: co-localization at synapses with the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor. *European Journal of Neuroscience* 10 (12), 3721–3736.

Berretta N, Nistico R, Bernardi G, Mercuri NB. 2008. Synaptic plasticity in the basal ganglia: A similar code for physiological and pathological conditions. *Progress in Neurobiology* 84 (4), 343-62.

Betz AJ, McLaughlin PJ, Burgos M, Weber SM, Salamone JD. 2007. The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4 receptor. *Psychopharmacology* 194, 347-359.

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. *Neuroscience* 140, 77-86.

Bevan MD, Booth PA, Eaton SA, Bolam JP. 1998. Selective innervation of neostriatal interneurons. *The Journal of Neuroscience* 18 (22), 9438–9452.

Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology* 232, 331–356.

Bliss TVP, Collingridge. 2013. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. *Molecular Brain* 6 (5), 1-14.

Bolam JP, Hanley JJ, Booth PAC, Bevan MD. 2000. Synaptic organization of the basal ganglia. *Journal of anatomy* 196 (4), 527-542.

Bugaysen J, Bronfeld M, Tischler H, Bar-Gad I, Korngreen A. 2010. Electrophysiological Characteristics of Globus Pallidus Neurons. *PLOS ONE* 5 (8), e12001.

Castillo P, Chiu C, Carroll R. 2011. Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Current Opinion in Neurobiology* 21, 328-338.

Chan CS, Surmeier DJ, Yung WH. 2005. Striatal information signaling and integration in globus pallidus: timing matters. *Neurosignals* 14, 281-289.

Charara A, Parent A. 1994. Brainstem dopaminergic, cholinergic and serotonergic afferents to the pallidum in the squirrel monkey. *Brain Research* 640, 155-170.

Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. 2006. Endocannabinoid-Mediated Synaptic Plasticity in the CNS. *Annual Review of Neuroscience* 29, 37–76.



Citri A & Malenka RC. 2008. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology Reviews* 33, 18–41.

Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. 2010. Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience* 11 (7), 459-73.

Cooper AJ, Stanford IM. 2000. Electrophysiological and morphological characteristics of three subtypes of rat globus pallidus neurone in vitro. *Journal of Physiology* 527, 291-304.

Cooper AJ, Stanford IM. 2001. Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABAA IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41, 62–71.

Cooper AJ, Stanford IM. 2002. Calbindin D-28k positive projection neurones and calretinin positive interneurons of the rat globus pallidus. *Brain Research* 929, 243–251.

Cortés R, Probst A, Palacios M. 1987. Quantitative light microscopic autoradiographic localization of cholinergic muscarinic receptors in the human brain: forebrain. *Neuroscience* 20 (1), 65-107.

Deister CA, Dodla R, Barraza D, Kita H, Wilson CJ. 2013. Firing rate and pattern heterogeneity in the globus pallidus arise from a single neuronal population. *Journal of Neurophysiology* 109, 497-506.

DeLong MR. 1971. Activity of pallidal neurons during movement. *Journal of Neurophysiology* 34, 414-427.

Dupuis JP, Bioulac BH, Baufreton J. 2014. Long-term depression at distinct glutamatergic synapses in the basal ganglia. *Reviews in Neuroscience* 25 (6), 741-54.

Elphick MR, Ergetová M. 2001. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 356 (1407), 381-408.

Engler B, Freiman I, Urbanski M, Szabo B. 2005. Effects of exogenous and endogenous cannabinoids on GABAergic neurotransmission between the caudate-putamen and the globus pallidus in the mouse. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 316, 608-617.

Ergetová M, Elphick MR. 2000. Localization of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB1. *Journal of Computational Neurology* 422, 159-171.

Factor SA, Weiner WJ. 2002. Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management. New York: Demos Medical Publishing, Inc.

Ferrari-Dileo G, Waelbroeck M, Mash CD, Flynn DD. 1994. Selective labeling and localization of the M<sub>4</sub> (m4) muscarinic receptor subtype. *Molecular Pharmacology* 46, 1028-1035.

Figuroa A, Galarraga E, Bargas J. 2002. Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons. *Synapse* 46, 215–223.

Fukudome Y, Ohno-Shosaku T, Matsui M, Omori Y, Fukaya M, Tsubokawa H, Taketo MM, Watanabe M, Manabe T, Kano M. 2004. Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M<sub>2</sub>-mediated direct suppression and M<sub>1</sub>/M<sub>3</sub>-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 19, 2682–2692.

Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J. 1999. Cholinergic modulation of neostriatal output: A

functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *The Journal of Neuroscience*, 19 (9), 3629–3638.

Gorbachevskaya AI, Chivileva OG. 2006. Organization of the efferent projections of the pedunculo pontine tegmental nucleus of the midbrain of the dog pallidum. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 36 4, 423-428.

Goldberg JA, Bergman H. 2011. Computational physiology of the neural networks of the primate globus pallidus: function and dysfunction. *Neuroscience* 198, 171-192.

Günay C, Edgerton JR, Jaeger D. 2008. Channel density distributions explain spiking variability in the globus pallidus: a combined physiology and computer simulation database approach. *The Journal of Neuroscience* 28 (30), 7476 – 7491.

Guzmán JN, Hernández A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J, Bargas J. 2003. Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *The Journal of Neuroscience* 23 (26), 8931-40.

Hanson JH, Jaeger D. 2002. Short-term plasticity shapes the response to simulated normal and parkinsonian input patterns in the globus pallidus. *The Journal of Neuroscience* 22 (12), 5164-5172.

Hebb DO. 1949. *The organization of behavior: A Neuropsychological Theory*, John Wiley, NY.

Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK. 1991. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Research* 547, 267-274.

Horikawa K, Armstrong WE. 1988. A versatile means of intracellular labeling:

injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *Journal of Neuroscience Methods* 25, 1–11.

Hontanilla B, Parent A, Heras S, Giménez-Amaya JM. 1998. Distribution of calbindin D-28k and parvalbumin neurons and fibers in the rat basal ganglia. *Brain Research Bulletin* 47 (2), 107-116.

Hoover BR, Marshall JF. 1999. Population characteristics of preproenkephalin mRNA-containing neurons in the globus pallidus of the rat. *Neuroscience Letters* 265, 199-202.

Hoover BR, Marshall JF. 2002. Further characterization of preproenkephalin mRNA-containing cells in the rodent globus pallidus. *Neuroscience* 111 (1), 111-125.

Ibañez-Sandoval O, Hernández A, Florán B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erlij D, Aceves J, Vargas J. 2006. Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *Journal Neurophysiology* 95, 1800–1811.

Jackson A, Crossman RA. 1983. Nucleus tegmenti pedunculo-pontinus: efferent connections with special reference to the basal ganglia, studied in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 10, 725-765.

Jaeger D, Kita H. 2011. Functional connectivity and integrative properties of globus pallidus neurons. *Neuroscience* 198, 44-53.

Johnston D, Miao-sin wu S. 1995. Foundations of cellular neurophysiology. The MIT press Cambridge, Massachusetts, London, England.

Jo J, Son GH, Winters BL, Kim MJ, Whitcomb DJ, Dickinson BA, Lee YB, Futai K, Amici M, Sheng M, Collingridge GL, Cho K. 2010. Muscarinic receptors

induce LTD of NMDAR EPSCs via a mechanism involving hippocalcin, AP2 and PSD-95. *Nature Neuroscience* 10, 1216-24.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. 2012. Principles of neural science. Fifth Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc.

Kauer, JA, Malenka RC. 2007. Synaptic plasticity and addiction. *Nature Review Neuroscience* 8 (11), 844-58.

Kelland MD, Soltis RP, Anderson LA, Bergstrom DA, Walters JR. 1995. In vivo characterization of two cell types in the rat globus pallidus which have opposite responses to dopamine receptor stimulation: comparison of electrophysiological properties and responses to apomorphine, dizocilpine, and ketamine anesthesia. *Synapse* 20 (4), 338-50.

Kita H, Kitai ST. 1991. Intracellular study of rat globus pallidus neurons: membrane properties and responses to neostriatal, subthalamic and nigral stimulation. *Brain Research* 564, 296-305.

Kita H. 1994. Parvalbumin-immunopositive neurons in rat globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Brain Research* 57, 31-41.

Kita H, Kitai ST. 1994. The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain Research* 636, 308-319.

Kita H, Kita T. 2001. Number, origins, and chemical types of rat pallidostriatal projection neurons. *The journal of comparative neurology* 437, 438-448.

Kita H. 2007. Globus pallidus external segment. *Progress in Brain Research* 160, 111-133.

Kreitzer AC, Malenka RC. 2007. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445 (8), 643-647.

Kukkonen A, Peräkylä M, Akerman KE, Näsman J. 2004. Muscarinic toxin 7 selectivity is dictated by extracellular receptor loops. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (49), 50923-50929.

Lau KB, Vaughan WC. 2008. Muscarinic modulation of synaptic transmission via endocannabinoid signalling in the rat midbrain periaqueductal grey. *Molecular Pharmacology* 74 (5), 1392-8.

Le Bé JV, Markram H. 2006. Spontaneous and evoked synaptic rewiring in the neonatal neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103 (35), 13214-13219.

Li M, Yasuda P, Wall JS, Wellstein A, Wolfe BB. 1991. Distribution of M<sub>2</sub> muscarinic receptors in rat brain using antisera selective for M<sub>2</sub> receptors. *Molecular Pharmacology* 40, 28-35.

Lopez-Huerta VG, Tecuapetla F, Guzman JN, Bargas J, Galarraga E. 2008. Presynaptic modulation by somatostatin in the neostriatum. *Neurochemistry Research*. 33 (8), 1452-8.

Lovinger DM. 2010. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* 58, 951-961.

Lupica CR, Proctor RW, Dunwiddie VT. 1992. Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by adenosine in rat hippocampus: analysis of unitary EPSP variance measured by whole-cell recording. *The Journal of Neuroscience*, 72 (10), 3753-3764.

Malenka RC. 2002. Synaptic Plasticity. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. 147-156.

Mallet N, Micklem RB, Henny P, Brown TM, Williams C, Bolam JP, Nakamura KC, Magill PJ. 2012. Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron* 74, 1075–1086.

Mastro KJ, Bouchard RS, Holt HAK, Gittis AH. 2014. Transgenic mouse lines subdivide external segment of the globus pallidus (GPe) neurons and reveal distinct GPe output pathways. *The Journal of Neuroscience* 34 (6), 2087-2099.

Mena-Segovia J, Bolam JP, Magill PJ. 2004. Pedunculo-pontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends in Neuroscience* 27, 585-588.

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.

Miguelé C, Morin S, Martínez A, Goillandeau M, Bezard E, Bioulac B, Baufreton J. 2012. Altered pallido-pallidal synaptic transmission leads to aberrant firing of Globus Pallidus neurons in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of Physiology* 590 (22), 5861-5875.

Miyoshi R, Kito S, Shimoyama M. 1989. Quantitative autoradiographic localization of the M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> subtypes of muscarinic acetylcholine receptors in the monkey brain. *Japan. Journal of Pharmacology* 51, 247-255.

Moriizumi T, Hattori T. 1992. Separate neuronal populations of the rat globus pallidus projecting to the subthalamic nucleus, auditory cortex and pedunculo-pontine tegmental area. *Neuroscience* 46 (3), 701-710.

Nambu A, Llinas R. 1994. Electrophysiology of globus pallidus neurons *in vitro*. *Journal of Neurophysiology* 72, 1127-1139.

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Stamelou M, Bhatia KP, Burn DJ. 2014. The expanding universe of disorders of the basal ganglia. *Lancet* 384 (9942), 523-531.

Ogura M, Kita H. 2000. Dynorphin exerts both postsynaptic and presynaptic effects in the Globus Pallidus of the rat. *Journal of Neurophysiology* 83, 3366-3376.

Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, Taketo MM, Manabe T, Kano M. 2003. Postsynaptic M<sub>1</sub> and M<sub>3</sub> receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 18, 109–116.

Okoyama S, Nakamura Y, Moriizumi T, Kitao Y. 1987. Electron Microscopic Analysis of the Synaptic Organization of the Globus Pallidus in the Cat. *The Journal of Comparative Neurology* 265, 323-331.

Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA. 1997. Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 18 6, 969-982.

Pahapill PA, Lozano MA. 2000. The pedunculo-pontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain* 123, 1767-1783.

Packard MG, Knowlton BJ. 2002. Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience* 25, 563–593.

Parent A, Smith Y, Filion M, Dumas J. 1989. Distinct afferents to internal and external pallidal segments in the squirrel monkey. *Neuroscience Letters* 96, 140-144.

Parent A, Hazrati LN. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia II; The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Research Review* 20,128-154.

Perez-Burgos A, Perez-Rosello T, Salgado H, Flores-Barrera E, Prieto AG, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J. 2008. Muscarinic M1 modulation of N and L types of calcium channels is mediated by protein kinase C in neostriatal neurons. *Neuroscience* 155, 1079–1097.



Perez-Burgos A, Prieto AG, Galarraga E, Bargas J. 2010. CaV2.1 channels are modulated by muscarinic M1 receptors through phosphoinositide hydrolysis in neostriatal neurons. *Neuroscience* 165, 293–299.

Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzmán NJ, Galarraga E, Bargas J. 2004. Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of Ca<sub>v</sub>2.1 and Ca<sub>v</sub>2.2 Ca<sup>2+</sup> Channels. *Journal of Neurophysiology* 93, 2507-2515.

Piggott M, Owens J, O'Brien J, Paling S, Wyper D, Fenwick J, Johnson M, Perry R, Perry E. (2002). Comparative distribution of binding of the muscarinic receptor ligands pirenzepine, AF-DX 384, (R,R)-I-QNB and (R,S)-I-QNB to human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 24, 211-223.

Poisik OV, Mannaioni G, Traynelis S, Smith Y, Conn JP. 2003. Distinct functional roles of the metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in the rat globus pallidus. *The Journal of Neuroscience* 23 (1),122–130.

Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, Agid Y, DeLong MR, Obeso JA. 2010. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nature neuroscience* 11, 760-772.

Rodrigo J, Fernández P, Bentura ML, Martínez de Velasco J, Serrano J, Uttenthal O, Martínez-Murillo R. 1998. Distribution of catecholaminergic afferent fibres in the rat Globus Pallidus and their relations with cholinergic neurons. *Journal of Chemistry Neuroanatomy* 15, 1-20.

Rodríguez-Moreno A, Herreras O, Lerma J. 1997. Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 19, 893–901.

Rueda-Orozco P, Mendoza E, Hernandez R, Aceves JJ, Ibañez-Sandoval O, Galarraga E, Bargas J. 2009. Diversity in long-term synaptic plasticity at inhibitory synapses of striatal spiny neurons. *Learning and Memory* 16, 474-478.

Sadek AR, Magill PJ, Bolam JP. 2007. A single-cell analysis of intrinsic connectivity in the rat globus pallidus. *The Journal of Neuroscience* 27 (24), 6352– 6362.

Salgado H, Tecuapetla F, Pérez-Rosello T, Pérez-Burgos A, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J. 2005. A reconfiguration of Cav<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> channel current and its dopaminergic D<sub>2</sub> modulation in developing neostriatal neurons. *Journal of Neurophysiology* 94, 3771–3787.

Santiago MP, Potter LT. 2001. Biotinylated m4-toxin demonstrates more M4 muscarinic receptor protein on direct than indirect striatal projection neurons. *Brain Research* 894, 12-20.

Saper CB, Loewy AD. 1982. Projections of the pedunculo-pontine tegmental nucleus in the rat: evidence for additional extrapyramidal circuitry. *Brain Research*, 252, 367-372.

Schwab BC, Heida T, Zhao Y, Marani E, van Gils SA, van Wezel RJ. 2013. Synchrony in Parkinson's disease: importance of intrinsic properties of the external globus pallidus. *Frontiers in Systems Neuroscience* 7, 60.

Shammah-Lagnado SJ, Alheid GF, Heimer L. 1996. Efferent connections of the caudal part of the globus pallidus in the rat. *The Journal of Comparative neurology* 376, 489-507.

Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ. 2008. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 321, 848-851.

Sims RE, Woodhall GL, Wilson CL, Stanford IM. 2008. Functional characterization of GABAergic pallidopallidal and striatopallidal synapses in the rat globus pallidus *in vitro*. *European Journal of Neuroscience* 28, 2401–2408.

Sjöström PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. 2007. Multiple forms of long-term plasticity at unitary neocortical layer 5 synapses. *Neuropharmacology* 52, 176-184.

Sjöström P, Rancz E, Roth A, Häusser M. (2008). Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiology Reviews* 88, 769-840.

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. *Journal of Comparative Neurology* 343, 297-318.

Takakusaki K. 2013. Neurophysiology of gait: from the spinal cord to the frontal lobe. *Movement Disorders* 28, 1483-1491.

Tang ZQ, Liu YW, Shi W, Dinh EH, Hamlet WR, Curry RJ, Lu Y. 2013. Activation of synaptic group II metabotropic glutamate receptors induces long-term depression at GABAergic synapses in CNS neurons. *Journal of Neuroscience* 33, 40, 15964-77.

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

Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J, Galárraga E. 2007. Dopaminergic modulation of short term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 10258-10263.

Tepper MJ, Abercrombie DE, Bolam PJ. 2007. GABA and the basal ganglia: from molecules to systems. First edition. Elsevier. Pag 111-128.

Tice MAB, Hashemi T, Taylor LA, McQuade DR. 1996. Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain from postnatal to old age. *Developmental Brain Research* 92, 70-76.

Waelbroeck M, Tastenoy M, Camus J, Christophe J. 1990. Binding of selective antagonists to four muscarinic receptors (M<sub>1</sub> to M<sub>4</sub>) in rat forebrain. *Molecular Pharmacology* 38, 267-263.

Wang JX, Roeske RW, Hawkins NK, Gehlert RD, Yamamura IH. 1988. Quantitative autoradiography of M<sub>2</sub> muscarinic receptors in the rat brain identified by using a selective radioligand [<sup>3</sup>H]AF-DX 116. *Brain Research* 477, 322-326.

Wall JS, Yasuda PR, Hory F, Flagg S, Martin MB, Ginns IE, Wolfe BB. 1991. Production of antisera selective for M<sub>1</sub> muscarinic receptors using fusion proteins: distribution of M<sub>1</sub> receptors in rat brain. *Molecular Pharmacology* 39, 643-649.

Wolf NJ, Butcher LL .1986. Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum the thalamus, tectum, basal to ganglia, and basal forebrain. *Brain Research Bulletin* 16, 603-637.

[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Yan Z, Flores-Hernández J, Surmeier DJ. 2001. Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103 (4), 1017-1024.

Yasuda P, Ciesla W, Flores RL, Wall JS, Min L, Satkus AS, Wellstein SJ, Spagnola VB, Wolfe BB. 1992. Development of antisera selective for M<sub>4</sub> and M<sub>5</sub> muscarinic cholinergic receptors: distribution of M<sub>4</sub> and M<sub>5</sub> receptors in rat brain. *Molecular Pharmacology* 43, 149-157.

Zaborszky L, Pang K, Somogyi J, Nadasdy Z, Kallo I. 1999. The basal forebrain corticopetal system revisited. *Annals New York Academy of Sciences* 29 (877), 339-67.