



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Integración de la entrada sináptica GABAérgica en las
neuronas de proyección del estriado

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

PAOLA SUÁREZ RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO

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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Suárez

Rodríguez

Paola

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

410089862

2. Datos del tutor

Dra.

Galarraga

Palacio

María Elvira

3. Datos del sinodal 1

Dra.

González

Gómez

Gertrudis Hortensia

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Fiordelisio

Coll

Tatiana

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Durán

Hernández

Pilar

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Prieto

Sagredo

Julio Alejandro

7. Datos del trabajo escrito

Integración de la entrada sináptica GABAérgica en las neuronas de proyección del estriado

103 pp

2015

*Education is the ability to perceive
the hidden connections between phenomena.*

Václav Havel

*No pienses en un elefante. Por supuesto que lo
acabas de hacer, y yo también. Pero ¿dónde está el
elefante? En tu mente.*

Gerald Edelman, *Bright air, brilliant fire:*
on the matter of the mind.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a la Dra. Elvira Galarraga por todas sus enseñanzas, largas pláticas y enorme paciencia para conmigo. Durante el tiempo que he pasado en su laboratorio he aprendido muchísimo y ese conocimiento me ha ayudado a consolidarme como bióloga, científica y mujer. También agradezco al Dr. José Bargas por su apoyo, oportunas recomendaciones e invaluable discusiones sobre la ciencia y la vida.

A mis sinodales: Dra. Hortensia González, Dra. Tatiana Fiordelisio, Dra. Pilar Durán y el M. en C. Julio Prieto, por tomarse el tiempo de leer mi trabajo y realizar aportaciones finales claves.

A la Ing. Adriana Hernández, Biól. Ariadna Aparicio y M. en IBB Gabriela X. Ayala por su enorme ayuda con el manejo de los ratones transgénicos utilizados en este trabajo.

A todos los miembros de los laboratorios BL-101 y -103 por transmitirme sus conocimientos con gusto. En especial a *sensei* Mario, pues sus enseñanzas y apoyo fueron fundamentales en la ejecución de este trabajo; a Beto Tapia, por su colaboración con la parte inmunohistoquímica; a Chuchín, por su gran ayuda con la electrónica del *set-up* y la programación; y a Janet, por guiarme en tantas preguntas científicas y muchas otras de distintas índoles, también.

En mi familia comienzo con mis padres, Reyna y Gerardo, ya que mucho de lo que soy es gracias a ellos. Gracias por todos los momentos que hemos compartido, sus cuidados, sus consejos y su cariño. A mis hermanos, Ado y Joshe, por permitirme ser un ejemplo en su vida, lo cual es muy valioso para mí. A Josefina, Luty y Willy, pues siempre han estado a mi lado siendo muy buenos amigos, cómplices y los abuelos más consentidores que haya podido tener. A todos mis tíos por ayudarme en distintas etapas de mi vida; especialmente agradezco a Víctor por abrirme las puertas de su casa durante un semestre de la universidad. A mis primos por crecer, jugar y aprender conmigo; uno especial a Dyck, por ser además de todo, mi amigo.

A mis amigos de la facultad, ya que con ellos he realizado uno de los viajes más divertidos y arduos en mi vida. De nuevo, especial a Mariana, Valeria y Vanessa por hacer que sea tan fácil compartir con ellas la vida y simplemente, por estar allí.

A Mariano. Por dejarme caminar en la playa de su alma.

Índice general

Abreviaturas	XI
Resumen	XIII
1. Introducción	1
1.1. El estriado y sus neuronas	4
1.1.1. Neuronas espinosas medianas de proyección	4
1.1.2. Interneuronas de disparo tónico	7
1.1.3. Interneuronas de disparo rápido	9
1.1.4. Interneuronas de disparo a bajo umbral	10
1.1.5. Otras poblaciones de interneuronas	11
1.2. Microcircuito cortico-estriatal	12
1.2.1. Características de la respuesta sináptica cortico-estriatal	17
1.2.2. Inhibición GABAérgica en la respuesta sináptica cortico-estriatal	19
Cotransportadores de cloro	21
Corrientes dendríticas de calcio	23
2. Planteamiento del problema	27
2.1. Hipótesis	29
2.2. Objetivos	31
2.3. Métodos	33
2.3.1. Animales	33
2.3.2. Preparación de tejido cerebral	33
2.3.3. Registros electrofisiológicos	33
2.3.4. Fármacos	35
2.3.5. Inmunohistoquímica	36
2.3.6. Análisis de datos	36

3. Resultados	39
3.1. Caracterización electrofisiológica de las SPNs	39
3.2. Contribución GABAérgica en la integración sináptica cortico-estriatal	43
3.3. Expresión de cotransportadores de cloro	47
3.4. Participación de los VGCCs tipo T y L	53
3.5. Las diferencias en el efecto GABAérgico son mediadas por VGCCs tipo T y L . .	61
4. Discusión de resultados	69
4.1. Cotransportadores de cloro	70
4.2. Corrientes dendríticas de calcio	71
4.3. Relevancia fisiológica en el microcircuito estriatal	75
5. Conclusiones	79
Bibliografía	83

Abreviaturas

ACh	acetil colina
AVT	área ventral tegmental
BAC	cromosoma artificial de bacteria
bAP	propagación reversa de potenciales de acción (<i>back-propagation of action potentials</i>)
CD1	cluster de diferenciación 1
DA	dopamina
DRD1/2	receptor a dopamina tipo D1/D2
eGFP	proteína verde fluorescente realzada
ENK	encefalina
EPSP	potencial post-sináptico excitatorio (<i>excitatory post-synaptic potential</i>)
FSN	neurona de disparo rápido (<i>fast spiking neuron</i>)
GABA	ácido γ -aminobutírico
GB	ganglios basales
GPe	globo pálido externo
GPi	globo pálido interno
IPSP	potencial post-sináptico inhibitorio (<i>inhibitory post-synaptic potential</i>)
KCC2	cotransportador de potasio y cloro 2
LCA	líquido cefalorraquídeo artificial
LTSN	neurona de disparo a bajo umbral (<i>low threshold spiking neuron</i>)
NE	núcleo estriado
NKCC1	cotransportador de sodio, potasio y cloro 1
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	óxido nítrico sintasa
NPP	núcleo pedúnculo pontino

NPY	neuropéptido Y
NST	núcleo subtalámico
PMR	potencial de membrana en reposo (<i>resting mebrane potential</i>)
PV	parvalbúmina
SNC	sistema nervioso central
SNc	sustancia nigra <i>pars compacta</i>
SNr	sustancia nigra <i>pars reticulata</i>
SOM	somatostatina
SPN	neurona de proyección del estriado
TAN	neurona tónicamente activa (<i>tonically active neuron</i>)
VGCC	canal de calcio dependiente de voltaje (<i>voltage gated calcium channel</i>)

Resumen

Las neuronas espinosas de proyección del núcleo estriado (SPNs) se dividen en dos subpoblaciones de acuerdo al lugar donde proyectan sus axones: la mitad son neuronas de la vía directa (denominadas D1-SPNs porque poseen receptores a dopamina tipo D1) y la otra mitad, neuronas de la vía indirecta (D2-SPNs, pues expresan el receptor a dopamina tipo D2). Estudios sobre la respuesta sináptica de las SPNs ante estímulos corticales han descrito mesetas de voltaje prolongadas de origen polisináptico que son distintas en cada subpoblación. Dichas diferencias se han explicado, en parte, por una distinta contribución GABAérgica sobre las respuestas sinápticas de las SPNs. En las D1-SPNs el neurotransmisor GABA tiene un efecto bifásico, favoreciendo la meseta despolarizante durante la mayor parte de la respuesta. Mientras que en las D2-SPNs, el GABA restringe la despolarización membranal durante toda la respuesta sináptica.

El objetivo de este trabajo es conocer cuales son los mecanismos que subyacen las diferencias en la transmisión sináptica GABAérgica en las SPNs. Utilizando registros electrofisiológicos intracelulares y técnicas inmunohistoquímicas en rebanadas de cerebro de roedores se analizaron dos propiedades intrínsecas de las SPNs: las diferencias en la excitabilidad dendrítica mediada por canales de calcio y la expresión de un exportador (NKCC1) y un importador (KCC2) de cloro, como propuestas capaces de ocasionar un cambio en la transmisión sináptica GABAérgica. Se obtuvieron respuestas sinápticas ante estimulación ortodrómica cortical mediante el uso de un electrodo bipolar concéntrico de 50 μ m de diámetro. Por medio de antagonistas de canales de calcio (VGCCs): nicardipina (5 μ M) para los canales tipo L y NNC 55-0396 (10 μ M) para los tipo T, se estudió su participación en las respuestas sinápticas cortico-estriales.

Los resultados muestran que 1) los cotransportadores de cloro NKCC1 y KCC2 no son responsables de las diferencias en la transmisión sináptica GABAérgica de las SPNs. 2) Existe una mayor participación de la conductancia a través del canal de calcio tipo T en las D2-SPNs, respecto a las D1-SPNs. 3) La aplicación de bicuculina (10 μ M) evidencia una respuesta hiperpolarizante al GABA en las D2-SPNs, dicho efecto GABAérgico se muestra despolarizante si los canales de calcio (L y T) son bloqueados previamente. 4) Este resultado no se observa en las D1-SPNs. Se sugiere que la despolarización dendrítica excesiva causada por la entrada de calcio en las D2-SPNs puede explicar el efecto GABAérgico hiperpolarizante en estas neuronas. La relevancia fisiológica de estos resultados incluye el papel que la inhibición sináptica desempeña dentro del microcircuito estriatal al permitir la sincronización de diversos grupos de neuronas.

Palabras clave: inhibición GABAérgica, GABA despolarizante, canales de calcio L y T, NKCC1, KCC2, neuronas espinosas de proyección.

1 Introducción

En los vertebrados, el sistema nervioso central (SNC) se caracteriza por ser un conjunto de estructuras con alto grado de complejidad. Está constituido por diferentes células altamente especializadas y organizadas en distintos grupos que nos permiten percibir el medio que nos rodea, reaccionar ante ciertos estímulos, aprender, recordar, movernos y un sinnúmero de actividades más. Su estudio es esencial para entender nuestro comportamiento, el porqué de nuestras interacciones, las causas y remedios de ciertas enfermedades y los procedimientos que nos permiten desarrollarnos como seres humanos. La manera de aproximarse al conocimiento relacionado con el cerebro puede ser a través de distintos ángulos; desde el estudio de una sola neurona hasta la interacción entre varios conjuntos de neuronas, por medio de una vista anatómica hasta otra funcional, a través de procesos fisiológicos o conductuales. La neurociencia es un área científica respaldada por diversas disciplinas. Se encarga de acumular conocimiento entorno al sistema nervioso en general y alguna función de éste en particular.

Tomando en cuenta que en el SNC de los humanos hay alrededor de 86 mil millones de neuronas (Herculano-Houzel 2012) agrupadas en diversos núcleos, las cuales ejecutan una vasta cantidad de funciones e interactúan entre sí; es necesario desmenuzar toda la información que podamos obtener a partir de ellas, de cada núcleo, de la relación entre distintas neuronas o de la comunicación entre diferentes núcleos. Un conjunto de núcleos localizados debajo de la corteza cerebral, llamados ganglios basales (GB), se encargan de planear, controlar y ejecutar movimientos, almacenar memorias relacionadas con éstos y permitir el aprendizaje de procedimientos (Graybiel 1997; 2000, Barnes *et al.* 2005). Las neuronas que lo conforman forman microcircuitos capaces de procesar información proveniente de otras partes del cerebro y llevar a cabo una respuesta ante ciertas condiciones. Las interacciones entre dichas células permiten la codificación de estados de activación funcionales, los cuales se refuerzan a lo largo del tiempo mediante contactos sinápticos, generando una red plástica que es la base de nuestras conductas y hábitos motrices (Graybiel 2005, Carrillo-Reid *et al.* 2008). Cuando existe algún daño en los GB, ya sea a nivel de un tipo celular o en las conexiones entre sus células, sus funciones resultan compro-

metidas y surgen patologías relacionadas con el movimiento como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington o el síndrome de Tourett (Albin *et al.* 1989, Graybiel 2000). Por tanto, al entender el funcionamiento de los GB nos aproximamos a conocer las causas de dichas enfermedades neurodegenerativas y a encontrar una solución ante los efectos adversos que ocasionan.

Los núcleos que componen los GB son el núcleo estriado (NE), el globo pálido en sus componentes externo e interno (GPe y GPi, respectivamente), la sustancia *nigra pars compacta y reticulata* (SNc y SNr, respectivamente) y el núcleo subtalámico (NST). El NE es el principal núcleo de entrada del circuito; dado que allí se reciben las aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza y el tálamo, serotoninérgicas de los núcleos del rafe y dopaminérgicas de la SNc y el área ventral tegmental (AVT) (Albin *et al.* 1989). La información aferente se procesa en el NE y se envía a través de neuronas GABAérgicas de proyección hacia los núcleos de salida del circuito (GPi y SNr) mediante dos vías diferentes (Tepper *et al.* 2004). Los núcleos de salida envían sus proyecciones GABAérgicas de vuelta al tálamo, la corteza cerebral, el colículo superior, el núcleo pedúnculo pontino y a la región locomotora mesencefálica (Bennett & Wilson 2003, Wilson 2004). Cuando la corteza y el tálamo reciben las aferentes de los GB, se cierra el circuito corteza-GB-tálamo y se forma un bucle de información entre dichas regiones del SNC. De esta manera, se procesan y ejecutan comandos que activan e inhiben los músculos para llevar a cabo movimientos y, paralelamente, se almacena la memoria de dichos procedimientos.

Las dos vías de salida de información de los GB han sido muy estudiadas a lo largo de las últimas décadas y se les denomina, debido a los relevos sinápticos que realizan en el trayecto, como vía directa e indirecta (Fig. 1.0.1). La directa, como su nombre lo indica, envía proyecciones GABAérgicas del NE directamente hacia el GPi y la SNr (Wilson 2004). El resultado es una inhibición de la actividad tónica GABAérgica de los núcleos de salida y por consiguiente, una desinhibición de sus blancos: el tálamo y la corteza. De esta forma se logra la ejecución de alguna acción motora. Por lo cual, también se conoce a la vía directa como la vía de *go* (en inglés ir o andar) (Albin *et al.* 1989).

En cambio, la vía indirecta manda proyecciones GABAérgicas desde el NE al GPe, que a su vez se conecta mediante otras proyecciones GABAérgicas con el NST y este último, mediante terminales glutamatérgicas, con los núcleos de salida (Wilson 2004). Tanto el GPe como el NST poseen actividad tónica, pero el segundo permanecerá silente cuando el primero se encuentre

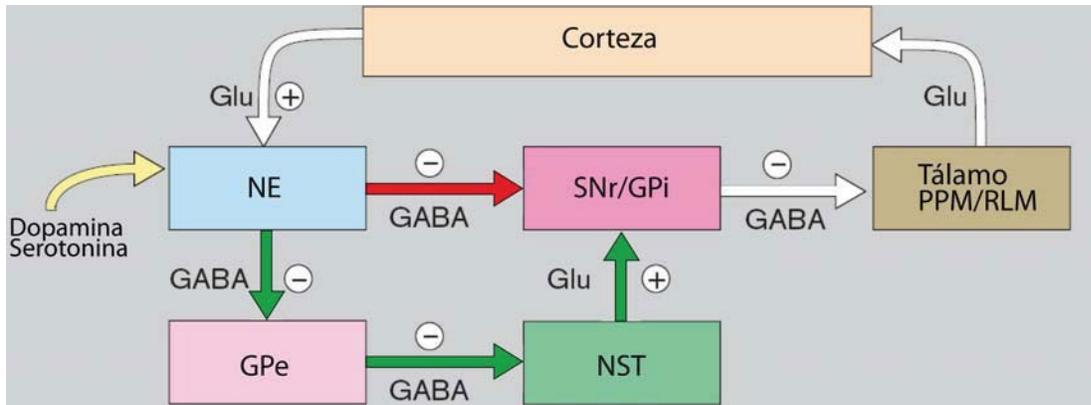


Figura 1.0.1. Esquema simplificado de las dos vías de los GB. Se muestran los núcleos de los GB, así como sus aferencias y eferencias. La flecha roja indica la vía directa y las verdes la vía indirecta. Los signos + y - indican si la sinapsis es excitatoria o inhibitoria, debido a la liberación de glutamato o GABA, respectivamente. NE, núcleo estriado; GPe, globo pálido externo; NST, núcleo subtalámico; SNr, sustancia nigra reticulata; GPi, globo pálido interno; NPP, núcleo pedúnculo pontino; RLM, región locomotora mesencefálica; Glu, glutamato; GABA, ácido γ -aminobutírico. Modificado de Graybiel (2000).

activo debido a la conexión inhibitoria que los une. Así, el resultado cuando el NE inhibe al GPe es una inhibición de su actividad tónica y por tanto, una desinhibición de las neuronas glutamatérgicas del NST, ocasionando una excitación en los núcleos de salida de los GB. Lo cual ocasiona que el GPi y la SNr, al aumentar su actividad, logren inhibir nuevamente a la corteza y al tálamo, evitando la ejecución de movimientos. Por lo que a esta vía se le denomina *no go* (no ir, en inglés), ya que el comando motor no se ejecuta (Graybiel 2000, Kravitz *et al.* 2010).

Para llevar a cabo actividades motoras de forma espontánea, es necesario un balance y alterancia de la información procesada por ambas vías. Por ejemplo, al caminar se necesitan generar comandos motores en los músculos de la pierna que dará el paso, pero también se necesita que la pierna de apoyo permanezca inmóvil manteniendo el tono muscular. Así, la vía directa actúa sobre la pierna a mover, mientras que la indirecta sobre la pierna de apoyo. De esta manera, cuando se genera un desbalance en la actividad de dichas vías se compromete la actividad motora, imposibilitando acciones tan simples como el caminar.

1.1. El estriado y sus neuronas

El NE corresponde al núcleo de mayor tamaño de los GB, es la entrada principal de dichos núcleos y participa en la planeación y ejecución de movimientos, específicamente como un filtro selector y refinador de movimientos (Kravitz *et al.* 2010, Wilson 2004, Graybiel 2000). Esto se debe a que, generalmente, es capaz de integrar información proveniente de todas las áreas de la corteza cerebral, los núcleos intralaminares del tálamo, los núcleos del rafe, la SNc y el AVT, procesar dicha información y mandar una salida relacionada con proceso motores (Wilson 2004). Se subdivide en dos partes: caudado y putamen, que forman el estriado dorsal, y el núcleo accumbens o estriado ventral. Dicha subdivisión reconoce una segregación funcional: el estriado dorsal se relaciona con tareas motoras y de memoria y aprendizaje de procedimientos. El ventral se involucra con procesos del sistema límbico, por ejemplo: el circuito subyacente de las adicciones y las conductas de reforzamiento o espera de recompensa (Graybiel 2000). Las aferencias dopaminérgicas que reciben ambas partes del estriado también están segregadas: las neuronas dopaminérgicas de la SNc inervan al estriado dorsal, mientras que las del VTA mandan sus proyecciones al ventral (Wilson 2004).

La población neuronal del NE está compuesta por neuronas espinosas medianas de proyección (SPNs, por sus siglas en inglés) e interneuronas GABAérgicas y colinérgicas (Fig. 1.1.1). Las primeras, son las neuronas encargadas de proyectar a otros núcleos fuera del estriado; mientras que las interneuronas, por definición son aquellas que sólo poseen contactos sinápticos dentro del núcleo del que forman parte. Generalmente se reportan tres grupos de interneuronas: las gigantes colinérgicas que poseen disparo tónico (TANs, por sus siglas en inglés), las positivas a parvalbúmina/calretinina o de disparo en ráfagas (FSNs, por sus siglas en inglés) y las positivas a somatostatina/óxido nítrico o de disparo a bajo umbral (LTSNs, por sus siglas en inglés) (Fig. 1.1.2). En el NE de roedores alrededor del 90-95% de las neuronas son SPNs, mientras que su porción en primates es menor (77%) (Bennett & Wilson 2003, Tepper & Bolam 2004, Tepper, Tecuapetla, Koós & Ibáñez-Sandoval 2010). Las interneuronas del NE comprenden el 10-5% y el 23-25% de la población neuronal en roedores y primates, respectivamente.

1.1.1. Neuronas espinosas medianas de proyección

Las SPNs son neuronas de naturaleza GABAérgica con somas de 12 a 20 μm de diámetro, sus procesos dendríticos abarcan alcanzan un radio entre 300-500 μm y poseen alta densidad de espi-

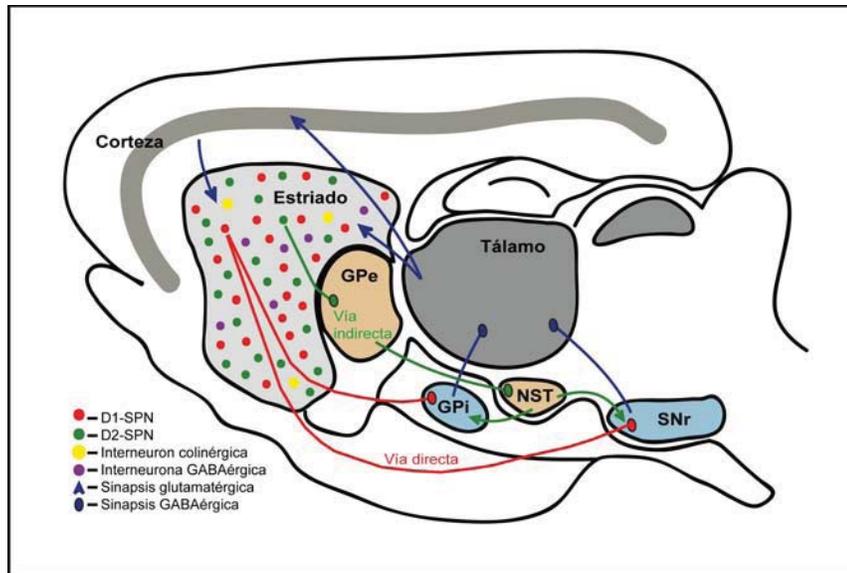


Figura 1.1.1. Componentes estriales en el circuito de los GB. Se identifica la población neuronal del estriado y las dos vías de salida de información a través de los GB (directa e indirecta). También se esquematizan las aferentes corticales y talámicas hacia el estriado. El esquema representa la anatomía de una rebanada sagital del cerebro de roedores y enfatiza los núcleos que forman parte del circuito de los GB. GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; NST, núcleo subtalámico; SNr, sustancia *nigra reticulata*.

nas¹. En estos sitios se originan los contactos sinápticos (Bennett & Wilson 2003, Wilson 2004) (Fig. 1.1.2A). Las SPNs tienen aferencias glutamatergicas de piramidales corticales, de neuronas de los núcleos intralaminares del tálamo, GABAérgicas y colinérgicas de interneuronas estriales y de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas. Se calcula que cada neurona piramidal contacta a una SPN en uno o dos botones sinápticos y que, además, una misma piramidal puede inervar hasta 10,000 SPNs (Bennett & Wilson 2003, Kress *et al.* 2013). El axón de las SPNs se ramifica desde un segmento definido del núcleo, no posee espinas y deja inervaciones colaterales dentro del mismo estriado (Wilson 2004). Estas neuronas se encuentran altamente interconectadas entre sí, formando de 1200 a 1800 sinapsis recurrentes por cada célula a nivel poblacional. Además, también se conectan con la mayoría de las interneuronas estriales (Tepper & Bolam 2004, Tecuapetla *et al.* 2007).

En el ámbito fisiológico, las SPNs son células silentes que poseen un potencial de membrana en reposo (PMR) alrededor de -85 mV registrado *in vitro*. Pero durante registros *in vivo*, poseen dos estados funcionales: un estado hiperpolarizado (estado *down*, alrededor de -80 mV) y otro

¹Entre cuatro y seis espinas por cada micrómetro de longitud (Bennett & Wilson 2003).

despolarizado (estado *up*, cerca de -50 mV) desde el cual se disparan potenciales de acción (Wilson 2004). Existen algunos reportes *in vitro* donde se ha logrado registrar a SPNs que presentan ambos estados funcionales (Vergara *et al.* 2003, Flores-Barrera *et al.* 2009). Se sabe que para producir un estado *up*, se necesita una activación sincronizada y convergente de las aferencias glutamatérgicas corticales (Wilson 2004) y que las SPNs presentan oscilaciones constantes entre uno y otro estado (Carter & Sabatini 2004). A la capacidad que una célula tiene de presentar dos estados funcionales se le conoce como bi-estabilidad. Y en estas células en específico, ocurre debido a que son capaces de producir despolarizaciones prolongadas y periodos de disparo sostenidos ante estimulación sináptica o permanecer silentes ante la ausencia de ésta (Vergara *et al.* 2003).

Las SPNs tienen una resistencia de entrada relativamente baja (entre 60 y 150 M Ω) registrada en neuronas adultas *in vitro* (Bargas *et al.* 1989, Wilson 2004). Además, las SPNs disparan de forma tónica y con latencia al primer potencial de acción ante una estimulación somática despolarizante sostenida. Diversos estudios han establecido que el retraso en el disparo es debido a la presencia de una corriente saliente y persistente de potasio (K⁺) (Bargas *et al.* 1989, Nisenbaum & Berger 1992), un rectificador entrante anómalo y rápido (Galarraga *et al.* 1994) y un intervalo interespiga modulado por corrientes de K⁺ dependientes de calcio (Ca²⁺) (Galarraga *et al.* 1989, Pineda *et al.* 1992). Por su parte, la rampa despolarizante en las SPNs se debe a corrientes entrantes de sodio (Na⁺) en la parte inicial (Bargas *et al.* 1989); y en la parte final, a la activación de canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje (VGCCs), los cuales facilitan la generación del primer potencial de acción (Hernández-López *et al.* 1997).

Las SPNs se dividen en dos subpoblaciones según el blanco donde proyectan sus axones, una subpoblación manda eferencias que conectan directamente con los núcleos de salida de los GB (GPe y SNr). Mientras que la otra envía sus eferencias al GPi. A la primera subpoblación se le conoce como neuronas pertenecientes a la vía directa y a la segunda, a la vía indirecta. El 50% de SPNs son de la vía directa y el otro 50%, de la vía indirecta (Bennett & Wilson 2003, Wilson 2004, Tepper *et al.* 2004). Las SPNs de la vía directa expresan el receptor a dopamina (DA) tipo D1 (DRD1), mientras que las de la vía indirecta, el tipo D2 (DRD2)² (Bennett & Wilson 2003, Wilson 2004, Gertler *et al.* 2008) (Fig. 1.1.1). Esta disparidad resulta muy importante al estu-

²Para diferencia a una neurona espinosa de proyección (SPN) de la otra, de aquí en adelante se les denominará D1-SPNs a las neuronas de la vía directa y D2-SPNs a las de la vía indirecta. Esto debido a la segregación de receptores a dopamina que expresa cada subpoblación.

diar la modulación dopaminérgica, donde se ha comprobado que el efecto de la DA a través del receptor D1 aumenta la despolarización; mientras que en el DRD2, la disminuye (Hernández-López *et al.* 1997; 2000, Flores-Barrera *et al.* 2011). Además, se ha visto que la expresión del DRD1, generalmente corresponde a neuronas que también expresan sustancia P y dinorfina (Wilson 2004, Tepper *et al.* 2004). En cambio, las neuronas que tienen el DRD2, colocalizan con la expresión de encefalina (Wilson 2004, Tepper *et al.* 2004). Otro tipo de receptores que expresan de manera diferencial son los receptores muscarínicos a acetilcolina (ACh) M1 y M4; las neuronas D1-SPNs presentan ambos receptores en su membrana, mientras que las D2-SPNs expresan preferentemente el M1 (Hernández-Flores *et al.* 2015).

Distinguir una SPNs de la otra en base a su anatomía y propiedades electrofisiológicas somáticas no es tarea fácil. Se ha sugerido que existen diferencias en la anatomía dendrítica entre las SPNs, debido a reportes donde se localizaron una o dos dendritas primarias más en promedio en las D1-SPNs en comparación con las D2-SPNs (Gertler *et al.* 2008, Fujiyama *et al.* 2011). Sin embargo, otros estudios recientes no muestran tales diferencias entre las SPNs al inspeccionar su anatomía dendrítica mediante microscopía electrónica y reconstruirla en tres dimensiones (Huerta-Ocampo *et al.* 2014). Entonces, la diferencia en la configuración de los árboles dendríticos entre las SPNs aún es un tema controversial. Existen otros estudios que muestran diferencias en las respuestas electrofisiológicas registradas a partir de pulsos de corriente somática en las SPNs. Entre los cuales se encuentran los que sugieren una heterogeneidad en su capacidad para generar plasticidad sináptica (Kreitzer & Malenka 2008, Gertler *et al.* 2008) y en las diferencias en su excitabilidad dendrítica (Day *et al.* 2008, Flores-Barrera *et al.* 2010). Es importante recordar que los trabajos en esta área se desarrollan y discuten actualmente, pero o cierto es que al realizar registros electrofisiológicos en el NE es casi imposible diferenciar un tipo de SPN del otro, basándose simplemente en su anatomía.

1.1.2. Interneuronas de disparo tónico

Las interneuronas gigantes colinérgicas o tónicamente activas (TANs) son las neuronas más grandes del NE, poseen somas con diámetros mayores a 40 μm , un árbol dendrítico que sobrepasa un milímetro de diámetro y un axón que se ramifica múltiples veces abarcando una arborización mayor que las dendritas (Bennett & Wilson 2003, Tepper & Bolam 2004) (Fig. 1.1.2B). Este tipo de interneuronas sintetizan acetilcolina (ACh) y representan sólo el 3% de la población estriatal en roedores (Tepper & Bolam 2004, Wilson 2004).

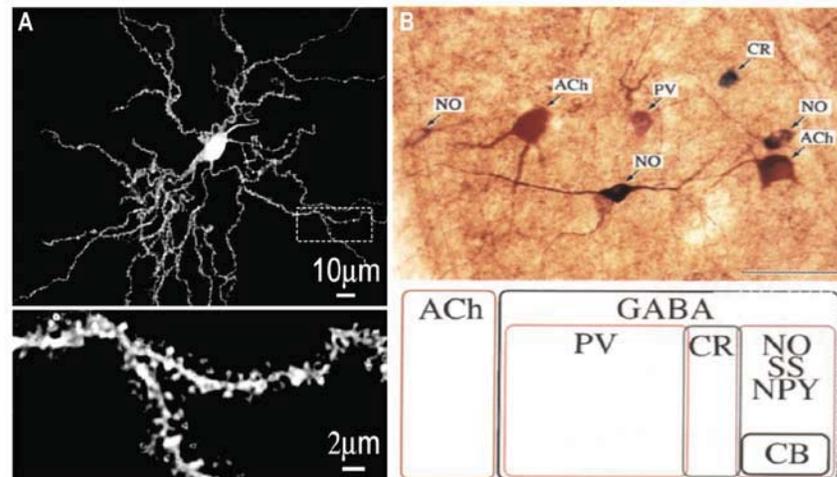


Figura 1.1.2. Anatomía de las neuronas estriatales. En A se observa la imagen de una SPN, donde se aprecian con detalle las espinas dendríticas (abajo). Modificado de Flores-Barrera *et al.* (2009). En B encontramos a las interneuronas estriatales clasificadas histoquímicamente. El recuadro inferior muestra la composición química compartida entre estas neuronas. Modificado de Kawaguchi *et al.* (1995).

El blanco principal de estas interneuronas son las SPNs y se reconoce que están muy involucradas en la modulación de su actividad a través de receptores metabotrópicos tipo muscarínicos. Debido a que dichos receptores activan canales de K^+ tipo KCNQ, las aferencias colinérgicas intervienen en la respuesta sináptica de las SPNs ante estímulos glutamatergicos y en su capacidad para generar potenciales de acción (Pérez-Ramírez *et al.* En prensa). Las TANs proyectan axones hacia las FSNs (descritas a continuación) y reciben inervaciones de SPNs, FSNs y otras aferentes dopaminérgicas y glutamatergicas provenientes del tálamo y la corteza (Tepper *et al.* 2004, Wilson 2004). Además, se tienen registros de que estas interneuronas se encuentran muy activas durante tareas de recompensa y se consideran muy importantes en el aprendizaje dirigido hacia una meta (Wilson 2004). El funcionamiento correcto de las TANs depende en gran medida de sus aferentes dopaminérgicas, talámicas y corticales glutamatergicas.

Electrofisiológicamente, las TANs se caracterizan por tener un disparo lento y regular (con frecuencia de 2 a 10 Hz) debido a que poseen corrientes entrantes de Na^+ y corrientes catiónicas activadas por hiperpolarización (Bennett & Wilson 2003). Los potenciales de acción que exhiben son de larga duración y están restringidos por una corriente persistente post-hiperpolarizante. En actividad espontánea disparan siguiendo un ritmo marcapaso, lo cual indica que su PMR es despolarizado (Kawaguchi *et al.* 1995, Wilson 2004).

1.1.3. Interneuronas de disparo rápido

Las interneuronas de disparo rápido (FSNs) se consideran células bipolares de tipo canasta, debido a que su axón se ramifica masivamente alrededor del soma y las dendritas proximales de sus células blanco (Kawaguchi *et al.* 1995). El axón puede ramificarse en la vecindad (200-300 μm) o extenderse hasta 500-600 μm de longitud. Las FSNs poseen un soma de entre 16 y 18 μm y dendritas no espinosas y poco ramificadas. Las dendritas proximales son completamente lisas, mientras que las distales contienen varicosidades (Wilson 2004) (Fig. 1.1.2B). Se consideran neuronas reactivas a parvalbúmina (PV) y se encuentran en mayor abundancia en el estriado lateral en comparación con el medial, sugiriendo que juegan un papel importante en la integración sensomotora. En el NE de roedores forman el 1% de la población neuronal total (Wilson 2004, Tepper & Bolam 2004).

Las FSNs son de naturaleza GABAérgica y presentan uniones comunicantes (*gap junctions*, en inglés), lo cual les permite interactuar con mayor rapidez al acoplarse eléctricamente y así formar una red de inhibición más fuerte que aquella generada por una sola célula (Tepper & Bolam 2004). La inhibición sináptica que las FSNs ejercen sobre las SPNs, sus blancos principales, equivale a una hiperpolarización de 1 mV a partir de un potencial de acción en la pre-sinapsis y hasta 7 mV cuando la presinapsis dispara en ráfagas (Wilson 2004). Por si fuera poco, se sabe que una SPNs recibe sinapsis inhibitorias de 4 a 27 FSNs, en las cuales cada una hace de 135-541 contactos sinápticos, la mayoría perisomáticos y en las dendritas proximales (Tepper & Bolam 2004, Tepper *et al.* 2008). Estas interneuronas también tienen eferentes con TANs, y aferentes excitatorias glutamatérgicas de la corteza y el tálamo, colinérgicas de las TANs y GABAérgicas de neuronas palidales (Bennett & Wilson 2003, Tepper *et al.* 2010).

Se ha comprobado que la entrada cortical sobre estas interneuronas es muy fuerte y difiere de la entrada sobre las SPNs, pues un estímulo cortical débil (que no genera una respuesta excitatoria en las SPNs) produce una respuesta inmediata y en gran escala en las FSNs, a tal grado de generar disparo en ráfagas (Tepper *et al.* 2008). Además, las FSNs presentan contactos sinápticos de aferentes glutamatérgicas y colinérgicas más abundantes que en las SPNs. De esta manera, estas interneuronas desarrollan un papel fundamental en el control de la actividad de las SPNs.

Electrofisiológicamente, las FSNs poseen características únicas. La principal es que su frecuencia de disparo puede ser mayor a 200 Hz y no presentan adaptación (Tepper *et al.* 2010),

de ahí que se denomine neurona de disparo rápido o en ráfaga. Esto lo logran gracias a que presentan un potencial de acción corto en duración y contienen quelantes de Ca^{2+} intracelular (parvalbúmina, PV), evitando así toxicidad alguna debida a potenciales de acción masivos. Las FSNs tienen una resistencia de entrada baja (50-150 $\text{m}\Omega$), similar a la de las SPNs, pero con una rectificación entrante menor (Tepper *et al.* 2010). Además, la actividad de las FSNs es silente, su PMR se encuentra alrededor de -80 mV y presentan un potencial post-hiperpolarizante breve (Wilson 2004).

1.1.4. Interneuronas de disparo a bajo umbral

Las neuronas de disparo a bajo umbral (LTSNs) son neuronas de tipo bipolar GABAérgica como las FSNs, pero éstas también son positivas a somatostatina (SOM), neuropéptido Y (NPY), óxido nítrico sintasa (NOS) y NADPH diaforasa (Tepper & Bolam 2004). De hecho, estas interneuronas presentan menor síntesis del neurotransmisor GABA en comparación con las FSNs, pero debido a que también liberan SOM, NOS y NPY resultan importantes en el microcircuito estriatal (Tepper *et al.* 2010). Las LTSNs son de tamaño mediano, con somas de entre 10 a 20 μm , su árbol dendrítico es el menos denso de todas las interneuronas estriatales y sus campos axonales son aun más extensos que las FSNs, sin llegar a formar canastas (Bennett & Wilson 2003) (Fig. 1.1.2B). Las LTSNs representan cerca del 0.8 % de la población neuronal estriatal total. Sus aferentes principales son glutamatérgicas, tanto de la corteza como del tálamo, dopaminérgicas, colinérgicas y GABAérgicas provenientes de las FSNs y de neuronas palidales (Wilson 2004, Tepper *et al.* 2010).

La principal eferencia de las LTSNs es hacia las SPNs, en donde la activación única de estas interneuronas provoca IPSPs de gran magnitud, capaces de silenciar el disparo en las neuronas post-sinápticas (Tepper *et al.* 2008). Aunque, en la actualidad existe controversia sobre la inhibición que estas neuronas ejercen en las SPNs, puesto que con ayuda de técnicas optogenéticas se encontraron corrientes inhibitorias post-sinápticas (IPSCs, por sus siglas en inglés) muy débiles entre la sinapsis LTSN-SPN, en comparación con aquellas más robustas entre FSN-SPN (Gittis *et al.* 2010). Otros estudio, donde se analiza la plasticidad sináptica inhibitoria sobre las SPNs reporta que existen al menos tres dinámicas de plasticidad diferentes, lo cual es un indicador de que poseen innervaciones presinápticas distintas (Barroso-Flores *et al.* En prensa), una de las cuales probablemente provenga de las LTSNs. Dichas interneuronas forman contactos sinápticos con interneuronas colinérgicas, donde generan IPSCs muy pequeños (Tepper *et al.* 2010). Por

otro lado, se tienen registros de que el neuromodulador SOM, liberado por las LTSNs ejerce una inhibición presináptica muy potente entre la conexión SPN-SPN, donde es capaz de disminuir la liberación del neurotransmisor GABA en las SPNs (López-Huerta *et al.* 2008).

Las LTSNs poseen una huella electrofisiológica peculiar, ya que presentan espigas de calcio de bajo umbral (de ahí su nombre) y mesetas de despolarización prolongadas dependientes de VGCCs tipo T (Vizcarra-Chacón *et al.* 2013). Además, estas interneuronas también presentan excitación en rebote (*off-rebound*, en inglés), tienen una resistencia de entrada alta y un PMR relativamente despolarizado (Kawaguchi *et al.* 1995).

1.1.5. Otras poblaciones de interneuronas

Aparte de las interneuronas ya mencionadas, se conocen otras interneuronas que se encuentran en minoría dentro de la población estriatal. Un grupo lo comprenden las interneuronas positivas a calretinina, una proteína amortiguadora de Ca^{2+} . Éstas forman el 0.5% de la población estriatal total, también son de naturaleza GABAérgica, son de tamaño medio con somas de 9-17 μm y pocas dendritas sin espinas. Aún no se conocen registros electrofisiológicos de este tipo de neuronas, pero se ha detectado que colocalizan con aquellas que expresan PV (Tepper & Bolam 2004, Tepper *et al.* 2010).

También existen interneuronas tirosil-hidroxilasa positivas (TH+), las cuales son neuronas bipolares, tienen somas medianos (10-20 μm), escasas ramificaciones de dendritas lisas y se estima existen alrededor de 10,000 en la población estriatal (Tepper *et al.* 2010). De acuerdo a su electrofisiología, se conocen cuatro subtipos de dichas interneuronas (Ibáñez-Sandoval *et al.* 2010). Por último, existen otras interneuronas poco descritas, de las cuales aún se ignoran sus propiedades electrofisiológicas, sus acciones sinápticas y su función dentro del microcircuito estriatal. Aquí encontramos a neuronas sin espinas que expresan calbindina (una proteína semejante a la calretinina), otras que expresan colesistoquinina y algunas más que contienen polipéptido vasoactivo intestinal (Bennett & Wilson 2003, Tepper *et al.* 2010).

Debido a que estas neuronas comprenden una minoría en la población estriatal, su efecto en el microcircuito es descartado. Por consiguiente, para propósitos de este trabajo se aludirá a los tres principales grupos de interneuronas: las TANs, FSNs y LTSNs.

1.2. Microcircuito cortico-estriatal

La principal aferencia del NE proviene de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral, las cuales realizan contactos mono-sinápticos glutamatérgicos tanto con las SPNs, como con las interneuronas estriatales. Estudios previos han descrito la respuesta de activación de la población estriatal ante estimulación ortodrómica cortico-estriatal y reportan que las interneuronas FSNs y TANs poseen una menor latencia de activación en comparación con las SPNs y demás interneuronas (Vizcarra-Chacón *et al.* 2013). De esta manera, la estimulación cortico-estriatal genera respuestas polisinápticas de cientos de milisegundos de duración en las SPNs, capaces de disparar trenes de potenciales de acción (Vizcarra-Chacón *et al.* 2013). Así, cuando la información de un potencial sináptico cortical se registra en una SPN, se observa no sólo el efecto glutamatérgico de éste, sino que la conjunción de la excitación glutamatérgica con la modulación colinérgica y la inhibición GABAérgica de interneuronas y otras SPNs (Fig. 1.2.1).

Específicamente, se sabe que las SPNs poseen receptores a glutamato de tipo NMDA, AMPA y kainato. La activación de dichos receptores ante la liberación glutamatérgica por parte de las neuronas piramidales genera potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSPs) en las SPNs, los cuales pueden aumentarse, tanto en número como en amplitud, por la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCCs) en sus dendritas (Galarraga *et al.* 1997, Higley & Sabatini 2008, Flores-Barrera *et al.* 2011). Las SPNs poseen VGCCs tipo P/Q en la presinapsis; tipo N en el soma; tipo L, como se ha mencionado y tipo R y T, pero estos últimos generan conductancias muy pequeñas o se desconoce su aportación exacta (Bargas *et al.* 1994, Song & Surmeier 1996, Bargas *et al.* 1998, Carter & Sabatini 2004, Salgado *et al.* 2005, Higley & Sabatini 2008). Diversos estudios en las SPNs proponen que el mantenimiento y amplificación de la respuesta sináptica cortico-estriatal está dada por la participación de las conductancias de VGCCs tipo L, específicamente (Galarraga *et al.* 1997, Pérez-Garci *et al.* 2003, Cepeda *et al.* 2008, Flores-Barrera *et al.* 2011, Arias-García *et al.* 2013). Los potenciales en meseta que se generan como respuesta ante la estimulación cortical se consideran ventanas de sincronización entre la actividad de distintos grupos de SPNs, puesto que subyacen la oscilación entre los estados *up* y *down* en dichas neuronas. Por tanto, comprenden una parte fundamental en la dinámica de la red estriatal debido a que dichas transiciones modulan la función de los GB al permitir o no la salida de información estriatal (Carter & Sabatini 2004, Vizcarra-Chacón *et al.* 2013). Más adelante se detallará este tipo de respuestas en las SPNs evocadas por estimulación ortodrómica cortico-estriatal.

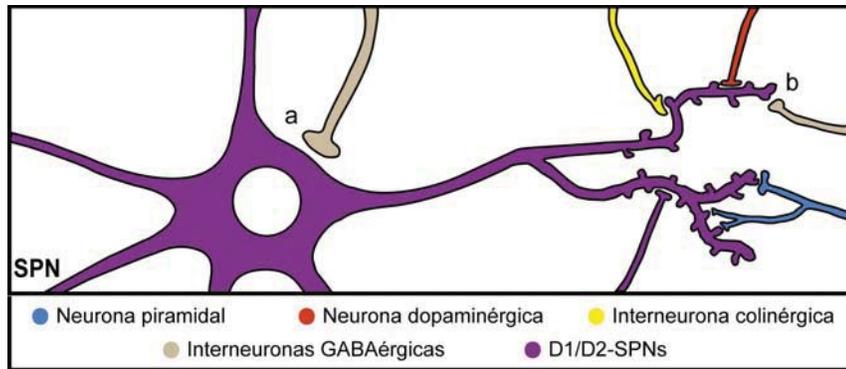


Figura 1.2.1. Aferencias participantes en la integración sináptica de una SPN. Debido a que las SPNs reciben terminales glutamatérgicas de la corteza, dopaminérgicas de la SNc, colinérgicas de las TANs y GABAérgicas de FSNs, LTSNs y otras SPNs; su respuesta sináptica es compleja e integra tanto el componente dendrítico como el somático. Ver abreviaturas al inicio.

Las SPNs también poseen receptores GABA tipo A y B en su membrana, pero de forma diferencial: los primeros son ionotrópicos y se encuentran tanto en el soma como en las dendritas, mientras que los segundos son receptores metabotrópicos y se encuentran en las terminales axónicas, donde funcionan como autorreceptores (Tepper *et al.* 2007). Por ende, los receptores GABA_A de las SPNs son aquellos que se activan ante la estimulación ortodrómica corticoestriatal.

El receptor GABA_A es una proteína transmembranal pentamérica que forma un poro permeable al ión Cl⁻ y, en menor medida, al HCO₃⁻ (Tepper *et al.* 2007). Produce una respuesta sináptica rápida (en cuestión de milisegundos) y también, debido a la presencia de receptores GABA_A extrasinápticos, puede ocasionar inhibición tónica (Tepper *et al.* 2007). El flujo de Cl⁻ a través del receptor GABA_A está delimitado por el gradiente electroquímico entre el interior y el exterior celular. Por una parte, se debe a la concentración de Cl⁻ intracelular y por otra, al flujo neto de cargas positivas y negativas a través de la membrana. Al final de la introducción se ahondará en el tema de la concentración intracelular del ión Cl⁻ en las SPNs. Mientras tanto, basta decir que en la mayoría de las células la concentración intracelular de Cl⁻ es alta y el potencial de reposo se encuentra por arriba del potencial de inversión de la conductancia GABAérgica, por lo que la activación de los receptores GABA_A genera IPSPs (Kita *et al.* 1985). Sin embargo, en las SPNs registradas *in vitro* la respuesta GABAérgica muestra un potencial de inversión (E_{Cl}⁻³)

³Como el ión más permeable a través del receptor GABA_A es el cloro (Cl⁻), el potencial de inversión de la respuesta GABAérgica se aproxima al potencial de inversión del ión Cl⁻. Debido a esto en algunos trabajos se consideran

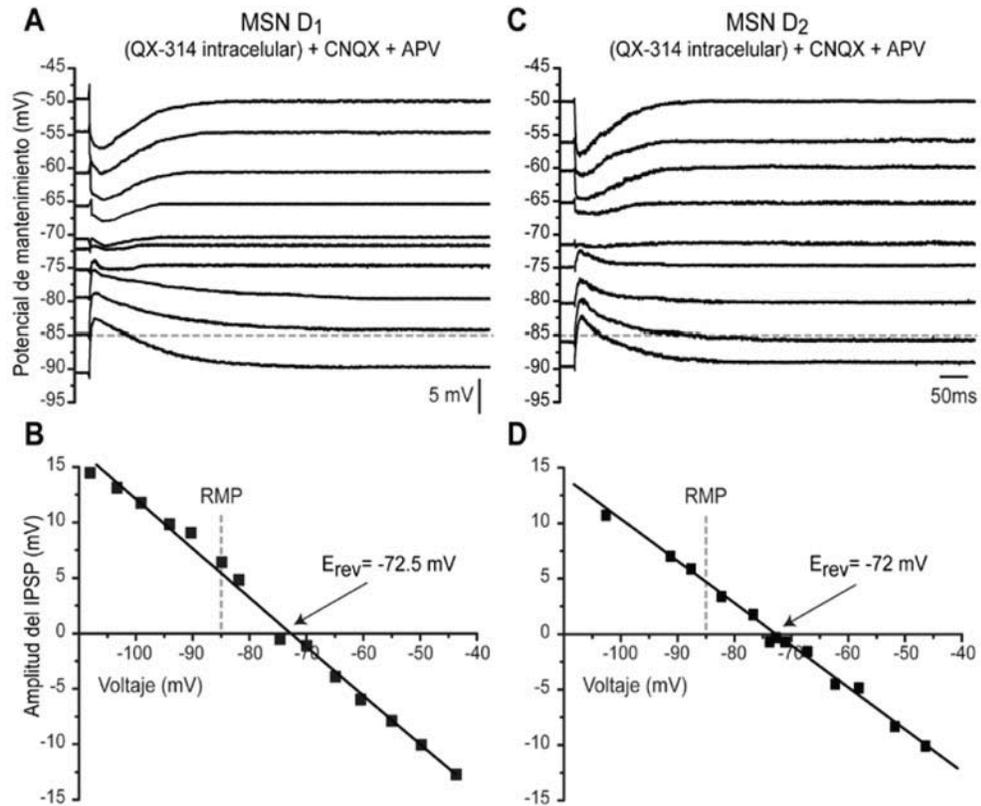


Figura 1.2.2. Potencial de inversión de la respuesta GABAérgica en el soma de las SPNs. En A y C se muestran registros intracelulares de IPSPs e EPSPs en fijación de corriente a diferentes PMR. En B y D se observan las gráficas de la amplitud del IPSPs en función del RPM, para representar que el potencial de inversión de la respuesta GABAérgica está alrededor de -70 mV en las SPNs. Todos los registros se llevaron a cabo por estimulación cortico-estriatal y en presencia de QX-314, CNQX y APV. Modificado de Flores-Barrera *et al.* (2009).

de alrededor de -70 mV registrado en el soma (Fig. 1.2.2) y como su PMR se encuentra cercano a -85 mV, el efecto de la activación de los receptores GABA_A es despolarizante (Jiang & North 1991, Tepper *et al.* 2007, Flores-Barrera *et al.* 2009).

Pero, ¿cómo puede existir inhibición sináptica despolarizante? A pesar de que el nombre suena contradictorio porque nuestra idea de inhibición va acorde con la hiperpolarización, existe un caso donde la transmisión sináptica GABAérgica sí puede ser despolarizante. El término se denomina *shunting inhibition* (debido a la derivación que ejerce sobre la inhibición; en español se traduce como inhibición en corto circuito), y se refiere al caso específico cuando el PMR es

valores intercambiables y en éste nos referiremos por igual a ambos potenciales de inversión.

menor al potencial de inversión de la conductancia del receptor GABA_A y éste a su vez es menor que el umbral de disparo (Tepper *et al.* 2004; 2007, Bartos *et al.* 2007, Flores-Barrera *et al.* 2009). Tomando en cuenta que durante la inhibición clásica, la despolarización en forma de EPSCs mediada por una sinapsis excitatoria y los IPSCs de una sinapsis inhibitoria se encuentran al interior de la célula y se suman linealmente, provocando una hiperpolarización membranal siempre que la sinapsis inhibitoria sea más fuerte que la excitatoria. Lo que ocurre durante la inhibición en *shunting* es lo siguiente, los IPSCs se integran en la membrana somato-dendrítica de manera no lineal, ocasionando dos fases: en la primera, la conductancia sináptica provoca una reducción en la excitabilidad de la célula que presenta despolarización simultánea (Bartos *et al.* 2007). En cambio, en la segunda fase la conductancia sináptica decrece, a la vez que la despolarización persiste, lo cual provoca un aumento en la excitabilidad (Bartos *et al.* 2007). Además, la contribución de las dos fases temporales depende de factores espaciales. En este sentido, si la sinapsis GABAérgica de tipo *shunting* se encuentra cercana al sitio donde se originan los potenciales de acción, ambas fases son relevantes. Pero si se encuentra alejada, sólo la segunda fase despolarizante será significativa, ya que el componente que logra propagarse electrotonicamente es únicamente la despolarización y no la conductancia sináptica (Bartos *et al.* 2007). En este último caso, la sinapsis en *shunting* es completamente excitatoria. Dicho de otra forma, la inhibición GABAérgica de tipo *shunting* genera IPSCs que pueden resultar en la hiperpolarización o despolarización del potencial de membrana en la célula post-sináptica, según el cambio neto en el flujo de iones de la conductancia inhibitoria y los factores temporales y espaciales mencionados.

Ahora bien, el NE es un núcleo mayoritariamente GABAérgico y la inhibición que se lleva a cabo en el microcircuito estriatal ocurre tanto entre SPNs, como entre interneuronas y SPNs. En base a esto, se reconocen dos tipos de inhibición sobre las SPNs: la inhibición mediada por las colaterales axónicas que las SPNs dejan en el NE se conoce como inhibición lateral o en retroalimentación (*feedback*, en inglés) (Kita 1996, Tepper *et al.* 2007; 2008). Y la inhibición que las interneuronas GABAérgicas ejercen sobre las SPNs, la cual se denomina *feedforward inhibition*, que en español se puede traducir como inhibición anterógrada, en el sentido de que las interneuronas se anticipan a la respuesta de las SPNs (Kita 1996, Tepper *et al.* 2007; 2008). Antes se creía que la inhibición lateral tenía un efecto muy fuerte debido al alto porcentaje de SPNs en la población estriatal y a su alta conectividad de forma recíproca, cuyo efecto podría ser similar al de una red competitiva o de tipo “el ganador se lo lleva todo” (*winner takes all*, en inglés). Brevemente, las SPNs más activadas por la corteza ejercerán una inhibición sobre las menos activadas, impidiendo así su participación en los estados *up* y filtrando cierto ruido

de la entrada cortical (Tepper *et al.* 2007). Sin embargo, al estudiar estas sinapsis en registros unitarios, se comprobó que generan IPSCs débiles y que, en comparación con la inhibición *feed-forward*, su efecto es poco significativo al momento de permitir o suprimir una salida sináptica del estriado (Tepper *et al.* 2007; 2008). Estos estudios mencionan a la inhibición *feedforward* como la encargada de regular con precisión la sincronización del disparo en las SPNs; mientras que la inhibición lateral se delimita a procesos que ocurren en las dendritas, tal vez influyendo en la plasticidad sináptica ante estímulos provenientes del tálamo y corteza (Tepper *et al.* 2008). Por tanto, durante algún tiempo la importancia de la inhibición lateral permaneció en controversia. Pero, estudios recientes y específicos sobre este tipo de inhibición muestran que su efecto es clave a la hora de controlar ensambles neuronales en el microcircuito estriatal (López-Huerta *et al.* 2013). El hallazgo menciona que la inhibición lateral, para ser eficiente, debe provenir de un grupo sincronizado de SPNs que convergen sobre otras SPNs. De esta manera, la inhibición lateral no se da de neurona a neurona, sino que de un ensamble neuronal a otro, permitiendo la alternancia entre uno u otro ensamble (López-Huerta *et al.* 2013).

En cuestión del microcircuito estriatal, el nuevo modelo propone a las interneuronas como comandantes de la dinámica de selección de grupos de SPNs para habilitar salidas de información (estados de activación); mientras que las SPNs al ser dirigidas por las interneuronas, filtran la información de entrada, participan en múltiples estados de activación de la red estriatal y al alternarse se logra mantener una memoria del comando motor ejecutado (Carrillo-Reid *et al.* 2008, López-Huerta *et al.* 2013, Vizcarra-Chacón *et al.* 2013).

En resumen, la entrada cortical combinada con la información aportada por las conexiones intra-estriatales y las propiedades intrínsecas de las SPNs, logran de forma sincronizada y reverberante que grupos de neuronas se activen mientras otros permanecen silentes (Carter *et al.* 2007). En especial, la inhibición GABAérgica juega un rol de suma importancia en la salida de información del estriado y es mediada principalmente por las interneuronas GABAérgicas (Tepper *et al.* 2008). Además, si se recuerda, la actividad del estriado aumenta al realizar movimientos voluntarios o simplemente al prepararse para realizar una conducta (Kravitz *et al.* 2010); entonces, la dinámica del microcircuito cortico-estriatal representa un segmento del correlato neural de programas motores que permiten la ejecución de movimientos (Carrillo-Reid *et al.* 2008, Kreitzer & Malenka 2008). Una vez que una secuencia es aprendida, los pesos sinápticos de las conexiones estriatales se modifican mediante plasticidad sináptica y este hecho subyace a la codificación de memorias de procedimiento (Carrillo-Reid *et al.* 2008, Kreitzer & Malenka 2008).

Así, se logra la ejecución de acciones sin esfuerzo, como, por mencionar unas cuantas: andar en bicicleta, manejar un auto o tocar el piano. En el NE se almacenan cientos de programas motores de este tipo, por tanto el mal funcionamiento de éstos provoca, por lo general, la ocurrencia de desórdenes motores. Sin duda alguna, se debe estudiar al microcircuito cortico-estriatal con la intención de reconocer la dinámica de éste y sus diferencias en las distintas patologías relacionadas con los GB. En este trabajo se estudia dicho microcircuito en base a la integración sináptica de las SPNs ante estímulos corticales.

1.2.1. Características de la respuesta sináptica cortico-estriatal

En 2010, Flores-Barrera *et al.* describieron que ante la estimulación ortodrómica cortical, las dos subpoblaciones de SPNs generan potenciales polisinápticos en meseta con características diferentes entre sí. Utilizando ratones BAC-GFP-DRD1/2 lograron diferenciar las respuestas de las D1-SPNs y las D2-SPNs, obteniendo respuestas contrastantes: los registros sinápticos en las D1-SPNs poseen un potencial con una meseta de mayor duración, mayor área bajo la curva y con más potenciales de acción que lo de las D2-SPNs (Fig. 1.2.3A). En cambio, la respuesta en las D2-SPNs se caracteriza por ser breve, por exhibir potenciales de acción con mayor frecuencia que las D1-SPNs y por su capacidad para generar potenciales de Ca^{2+} dendríticos autorregenerativos (Fig. 1.2.3B, C y E). De hecho, el mismo trabajo demuestra que las diferencias se observan desde estimulaciones subumbrales, donde la respuesta en las D1-SPNs es nuevamente de mayor duración que en las D2-SPNs (Fig. 1.2.3D). Dicho reconocimiento manifiesta que la integración sináptica cortico-estriatal es diferente para cada subpoblación de SPNs a tal grado que puede utilizarse como un recurso para identificarlas durante el registro electrofisiológico. El mismo efecto se obtuvo al analizar las respuestas sinápticas cortico-estriatales en ratas Wistar, donde la identificación de las células se lograba al realizar un ensayo inmunocitoquímico contra los péptidos específicos para cada subpoblación de SPNs (sustancia P para las D1- y encefalina para las D2-SPNs).

Pero, ¿cómo es posible que la misma aferencia cortical genere respuestas sinápticas tan distintas en las SPNs? En realidad, la respuesta a dicha pregunta se contesta argumentando simplemente que las SPNs de ambas vías presentan propiedades intrínsecas distintas. Debido a que no existen diferencias anatómicas entre las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas que llegan a los dos tipos de SPNs y que incluso, el mismo protocolo de estimulación genera respuestas diferentes en toda la población neuronal del NE (Vizcarra-Chacón *et al.* 2013). De hecho, al es-

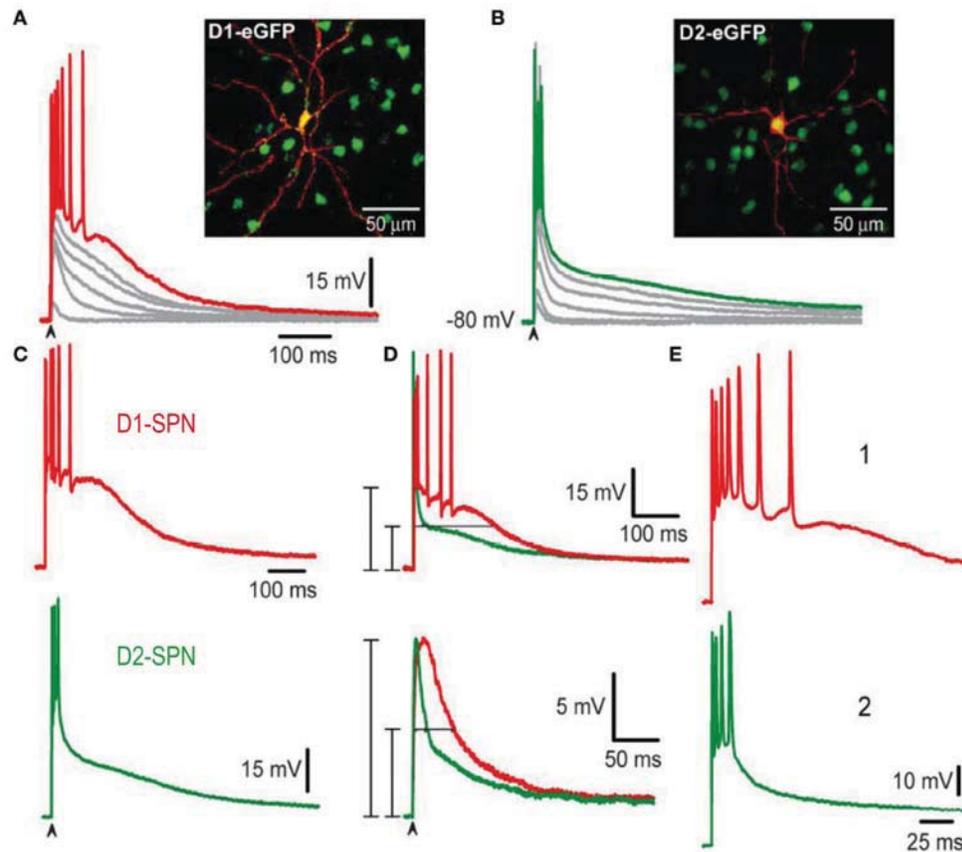


Figura 1.2.3. Diferencias en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs. *A* y *B* muestran las familias de respuestas sub y supraumbrales ante estimulación ortodrómica de SPNs. Los insertos señalan las células registradas y su colocalización con la eGFP de ratones transgénicos BAC-D1/D2. En *C* y *D* se observan trazos únicos para su comparación. Resalta que la respuesta en las D1-SPNs tiene mayor duración y área bajo la curva. *E* muestra la diferencia en la frecuencia de disparo de ambos tipos de respuesta, donde se reconoce que las D2-SPNs tienen una frecuencia mayor. Modificado de Flores-Barrera *et al.* (2010).

tudiar las conductancias de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} tipo BK y SK sobre la misma respuesta cortico-estriatal en las SPNs, se reconoció que dichas conductancias son propiedades determinantes en las diferencias en la integración sináptica entre ambos tipos de SPNs (Arias-García *et al.* 2013). La activación de los componentes BK y SK es más rápida en las D2-SPNs en comparación con las D1-SPNs; lo cual va acorde con la corta duración de las mesetas despolarizantes en las D2-SPNs y permite que dichas mesetas sean más prolongadas en las D1-SPNs. Además, se observó que al activar los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , la respuesta sináptica de las D1-SPNs se volvía muy parecida a aquella exhibida por las D2-SPNs; y que al inhibir dichas conductancias, las D2-SPNs presentaban una respuesta similar a la de las D1-SPNs en condiciones control.

1.2.2. Inhibición GABAérgica en la respuesta sináptica cortico-estriatal

Las SPNs, además de tener propiedades intrínsecas distintas, también integran la inhibición sináptica GABAérgica de manera diferente. De esta forma, la relación entre las propiedades intrínsecas de cada tipo neuronal y la inhibición sináptica que reciben de las conexiones GABAérgicas del microcircuito estriatal, es responsable de ocasionar las diferencias en los potenciales en meseta de las SPNs ante estimulación cortical.

El mismo grupo de investigación (Flores-Barrera *et al.* 2010), estudió el componente GABAérgico sobre la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs con la finalidad de probar si existían diferencias. El experimento consistió en eliminar la contribución GABAérgica mediante el bloqueo de los receptores GABA_A al aplicar bicuculina (10 μ M). Nuevamente, los resultados muestran efectos completamente diferentes entre las dos subpoblaciones de SPNs ante estímulos supraumbrales: en las D1-SPNs se obtiene un efecto dual o bifásico, en la parte inicial de la respuesta se aumenta la despolarización y en la parte tardía se reduce el potencial en meseta (Fig. 1.2.4A, B, C). Estos datos sugieren que la inhibición GABAérgica actúa restringiendo el disparo al inicio de la respuesta y después, mantiene la meseta de despolarización, siguiendo el efecto inhibitorio de tipo *shunting*. En cambio, los resultados para las D2-SPNs muestran un aumento en toda la duración de la respuesta sináptica en presencia de bicuculina (Fig. 1.2.4E, F, G). Entonces, el efecto GABAérgico está restringiendo el disparo en estas neuronas. Esta heterogeneidad es clara desde estimulaciones subumbrales (no se muestran la figura, ver Resultados); donde el efecto en las D2-SPNs permanece igual, el GABA restringe la despolarización y tiene un efecto inhibitorio clásico. Mientras que la transmisión sináptica GABAérgica en las D1-SPNs a nivel subumbral aumenta la despolarización durante toda la respuesta.

Este antecedente resulta sumamente importante para elucidar la integración sináptica cortico-estriatal y además, es de suma importancia para efectos del presente trabajo. Con ello se determina que la integración sináptica GABAérgica cortico-estriatal de las SPNs es distinta entre una y otra subpoblación, y que dicha diferencia explica, en parte, la variación entre las respuestas cortico-estriatales control, como se ha mencionado. Pero, si recordamos, ambos tipos de neuronas presentan inhibición de tipo *shunting* al registrar en el soma. Entonces, ¿cómo se puede explicar un efecto GABAérgico contrastante y diferencial en la integración sináptica cortico-estriatal de las SPNs? Dado que el potencial de inversión de la conductancia sináptica GABAérgica (ECI⁻)

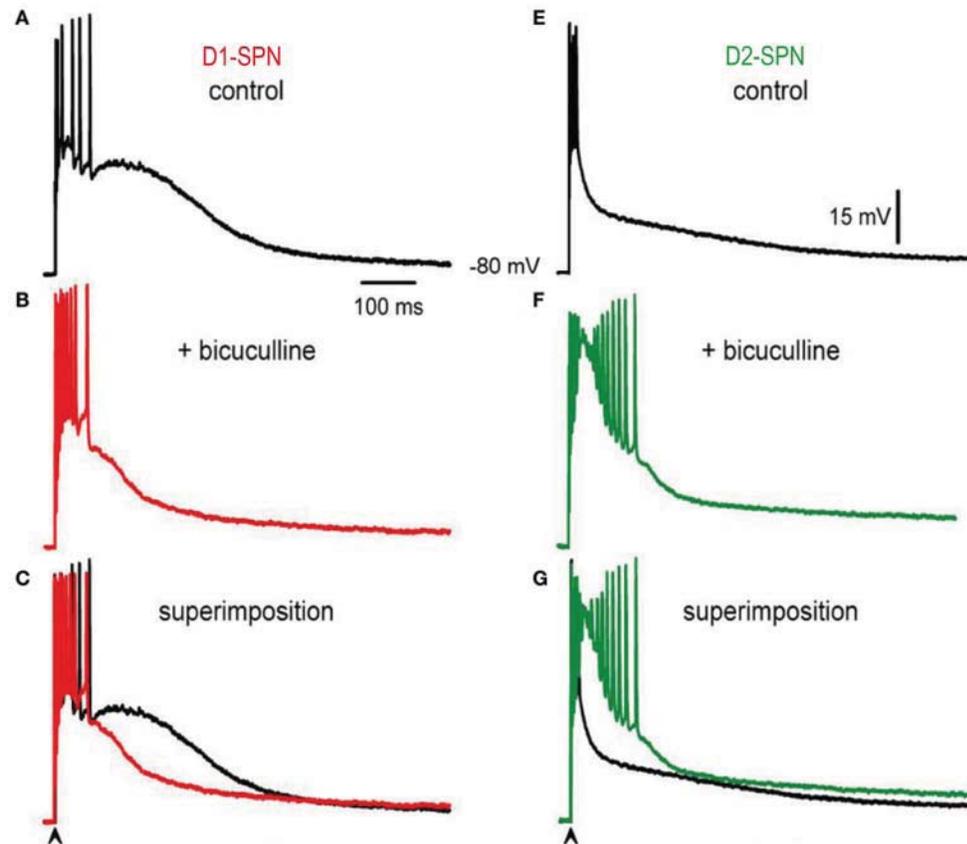


Figura 1.2.4. La contribución de la inhibición sináptica es diferente en las respuestas cortico-estriatales de las SPNs. *A* y *E* muestran los trazos supraumbrales control ante estimulación ortodrómica para cada SPN. En *B* y *F* se encuentran dichos trazos ante la adición de 10 μ M de bicuculina (antagonista de receptores GABA_A). Finalmente, *C* y *G* representan la comparación de los trazos superiores. Se observa como el bloqueo del componente GABAérgico en las D1-SPNs tiene un componente bifásico: primero, aumenta la respuesta y después, la reduce. Mientras que en las D2-SPNs, la respuesta ante bicuculina siempre es mayor. Modificado de Flores-Barrera *et al.* (2010).

es similar en ambas poblaciones de SPNs (Fig. 1.2.2) y que no se han encontrado diferencias entre las conexiones entre interneuronas GABAérgicas y neuronas piramidales glutamatérgicas con ambos tipos de SPNs; la distinción en la contribución GABAérgica sobre la integración sináptica cortico-estriatal debe estar respaldada por propiedades intrínsecas a cada tipo de SPN. Pero, ¿cuáles propiedades intrínsecas podrían respaldar tal efecto? En base a la literatura estudiada, en este trabajo me centraré en dos posibilidades.

Cotransportadores de cloro

El efecto excitatorio a través de la transmisión GABAérgica se ha analizado en distintas especies animales, estructuras del SNC, preparaciones y condiciones (Ben-Ari 2002, Fukuda 2005, Ben-Ari 2014). En estos estudios, dicho efecto se relaciona con la concentración de cloro intracelular (Cl^-_i), donde en células inmaduras o dañadas es muy alta y en células adultas o sanas disminuye. Además, se sabe que la concentración de Cl^- intracelular se relaciona con el balance entre exportadores e importadores de Cl^- ; siendo los principales en las neuronas del SNC los cotransportadores cloro-catiónicos NKCC1 y KCC2 (Payne *et al.* 2003, Bartos *et al.* 2007, Blaesse *et al.* 2009, Mao *et al.* 2012, Ben-Ari 2014, Glykys *et al.* 2014). El NKCC1 (cotransportador de sodio, potasio, cloro 1, por sus siglas en inglés) introduce a la célula aniones Cl^- al intercambiarlos por cationes Na^+ y K^+ (Fig. 1.2.5) (Payne *et al.* 2003, Chamma *et al.* 2012). Mientras que el KCC2 (cotransportador de potasio, cloro 2) deja salir aniones Cl^- siguiendo el gradiente de concentración de K^+ (Fig. 1.2.5) (Payne *et al.* 2003, Chamma *et al.* 2012). Por tanto, si en una célula existe poca expresión de NKCC1, el Cl^- tendrá menor probabilidad de ingresar a la célula y, en consecuencia, la concentración de Cl^- intracelular será baja. Por el contrario, si el transportador KCC2 se encuentra menos expresado, el Cl^- no podrá salir de la célula y su concentración al interior será alta.

El cambio en la concentración intracelular de iones ocasiona un efecto distinto en el flujo de Cl^- a través del receptor GABA_A : en el primer caso (baja expresión de NKCC1) el flujo de Cl^- al momento de abrir el poro del receptor, se dirigirá al interior de la célula, tratando de amortiguar la diferencia de concentración; en cambio el resultado sería opuesto en el segundo caso (baja expresión de KCC2), donde el flujo neto de aniones Cl^- sería hacia el exterior celular siguiendo la diferencia de concentración entre el exterior y el interior celular. De esta manera, la transmisión sináptica GABAérgica resultará hiperpolarizante o despolarizante, respectivamente. De hecho, una expresión tardía del transportador KCC2 es lo que ocasiona que las sinapsis GABAérgicas sean excitatorias en células en desarrollo (Ben-Ari 2002, Ben-Ari *et al.* 2012) y, probablemente este efecto sea una adaptación a la posterior formación de sinapsis glutamatérgicas respecto a las GABAérgicas durante la ontogénesis.

Los estudios sobre acciones despolarizantes del neurotransmisor GABA son pocos si no se toman en cuenta los casos en condiciones transitorias o patológicas. Aún así, existen algunos donde neuronas del SNC adulto poseen transmisión GABAérgica despolarizante durante sus funciones

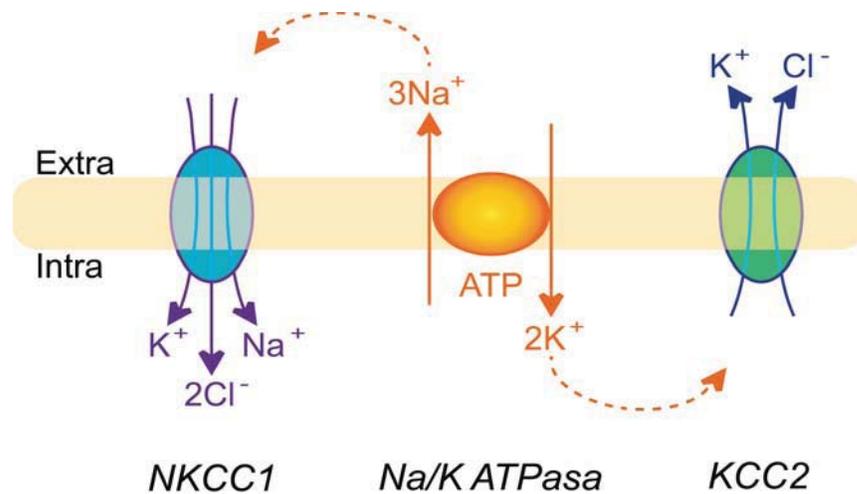


Figura 1.2.5. Esquema de los cotransportadores de cloro. Se muestran los dibujos de los intercambiadores de cloro y cationes, NKCC1 y KCC2. Ambos cotransportadores funcionan siguiendo el gradiente electroquímico del principal catión: Na^+ para el NKCC1 y K^+ para el KCC2. De esta manera, el primero logra introducir dos moléculas de Cl^- por cada Na^+ y K^+ ; mientras que el segundo saca de la célula un Cl^- por cada K^+ . Modificado de Chamma *et al.* (2012).

normales. Uno de ellos se registró en neuronas magnocelulares del hipotálamo, donde se reconoce un efecto opuesto en la inhibición sináptica GABAérgica, ya que las neuronas secretoras de vasopresina tienen sinapsis GABAérgicas excitatorias y las secretoras de oxitocina, inhibitorias (Haam *et al.* 2012). El estudio reveló que la falta de expresión del transportador KCC2 en las primeras neuronas, ocasiona que el potencial de inversión de la conductancia GABAérgica sea positivo respecto al PMR y negativo respecto al umbral de disparo, obteniendo una inhibición de tipo *shunting*. Además, el potencial de inversión se volvía menor al PMR en presencia del bloqueador selectivo al transportador NKCC1, indicando que la alta concentración de Cl^- intracelular es la responsable de la transmisión GABAérgica despolarizante. Por el otro lado, las células secretadoras de oxitocina sí contienen el transportador KCC2 y presentan inhibición clásica. Al bloquear selectivamente éste cotransportador, el potencial de inversión de la sinapsis GABAérgica cambia de negativo a positivo respecto al RPM.

Otro estudio en el núcleo supraquiasmático menciona que los efectos excitadores del GABA son mediados por el transportador NKCC1, ya que al bloquearlo selectivamente, el efecto se revierte (Choi *et al.* 2008). Otro más revela que la falta del transportador KCC2 en las neuronas dopaminérgicas de la SNc merma la inhibición mediada por el receptor GABA_A en comparación con la inhibición reportada en las neuronas GABAérgicas, las cuáles sí presentan dicho

transportador (Gulácsi *et al.* 2003). Finalmente, también se conoce que la transmisión sináptica GABAérgica genera un aumento en los potenciales de acción de neuronas del núcleo reticular talámico debido a la baja expresión del transportador KCC2 (Sun *et al.* 2012). En este estudio, incluso se reportó que la despolarización mediada por el receptor GABA_A se amplifica en la post-sinapsis debido a la activación de VGCCs tipo T, lo cual ocasiona un aumento en la concentración dendrítica de Ca²⁺ y produce disparo en ráfagas en estas neuronas.

Es importante mencionar que, generalmente, la concentración de Cl⁻ al interior de las células no es homogénea a través de toda la membrana axo-somato-dendrítica. En la mayoría de los casos, en las dendritas es menor en comparación al soma y al axón (Báldi *et al.* 2010, Glykys *et al.* 2014). Entonces, se puede extrapolar que la expresión de transportadores tampoco debe de ser igual en toda la membrana celular, ya que las células poseen compartimentación. Por tanto, dado los antecedentes mencionados, una expresión diferencial de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 en las SPNs podría subyacer el efecto de la transmisión GABAérgica hiperpolarizante o despolarizante en la respuesta sináptica cortico-estriatal. Por otro lado, existen reportes sobre la capacidad limitante que los transportadores de Cl⁻ NKCC1 y KCC2 poseen para mover dicho anión (Glykys *et al.* 2014). Esto puede deberse a que también existen otros cotransportadores o a que el flujo neto de aniones Cl⁻ se debe a otras fuentes electroquímicas.

Corrientes dendríticas de calcio

Como se ha mencionado, algunas características que exhiben las dos poblaciones de SPNs refieren las diferencias en las propiedades intrínsecas de dichas neuronas. La excitabilidad dendrítica mediada por VGCCs es una a resaltar, ya que las conductancias a través de estos canales aumentan las mesetas de despolarización en las SPNs y proporcionan una concentración catiónica mayor al interior de las dendritas. De esta manera, este es un factor a considerar al investigar la integración sináptica GABAérgica heterogénea de las SPNs. En el sentido de que pueden existir diferencias entre las conductancias mediadas entre una u otra SPN que ocasionen cambios en el PMR a nivel de la dendrita.

El Ca²⁺ es responsable de regular una gran variedad de procesos neuronales que van desde la liberación de neurotransmisores, modulación de canales iónicos, la inducción de plasticidad sináptica, el control metabólico, la transcripción génica hasta la excitabilidad neuronal (Higley & Sabatini 2012). Específicamente, en las SPNs el Ca²⁺ intracelular participa en la regulación de

la frecuencia de disparo (Galarraga *et al.* 1989, Pérez-Garci *et al.* 2003) y en el mantenimiento de las mesetas despolarizantes ante estímulos ortodróxicos cortico-estriatales (Galarraga *et al.* 1997, Hernández-López *et al.* 1997, Vergara *et al.* 2003).

La entrada de Ca^{2+} en estas células está regulada principalmente por VGCCs y en menor medida, por la permeabilidad de dicho catión a través de receptores AMPA (Higley & Sabatini 2010). Nuevamente, la expresión a nivel membranal de VGCCs en las SPNs es basta (Bargas *et al.* 1994, Song & Surmeier 1996, Salgado *et al.* 2005). El Ca^{2+} que fluye por estos canales tiene distintas funciones, por ejemplo: a través de los N y P/Q permite la activación de corrientes salientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} (SK y BK) determinantes del post-potencial hiperpolarizante y de la duración de las mesetas de despolarización (Vilchis *et al.* 2000, Arias-García *et al.* 2013). Por su parte, el Ca^{2+} cerca de la región dendrítica se debe a la presencia de VGCCs tipo L, R y T (Galarraga *et al.* 1997, McRory *et al.* 2001, Carter & Sabatini 2004, Higley & Sabatini 2008, Plotkin *et al.* 2011). Es importante aclarar que, a pesar de que las conductancias a través de los VGCCs tipo R y T han sido controversiales debido a que se activan a umbrales más bajos que las demás, en las SPNs se han diferenciado con facilidad (Talley *et al.* 1999, McRory *et al.* 2001, McKay *et al.* 2006). Las conductancias mediadas por VGCCs tipo R duran sólo algunos cientos de microsegundos, mientras que aquellas mediadas por VGCCs tipo T son mucho más prolongadas (Foehring *et al.* 2000). Por tanto, en la respuesta sináptica cortico-estriatal que dura cientos de milisegundos, la aportación de los VGCCs tipo R puede descartarse debido a que es muy pequeña.

El antecedente más claro que se tiene de la diferencia en la excitabilidad dendrítica entre las SPNs se basa en el estudio de Day *et al.* (2008), donde usando técnicas basadas en la fluorescencia de Ca^{2+} y microscopía de doble fotón, se examinaron los potenciales de Ca^{2+} evocados por la propagación reversa de potenciales de acción generados en el soma (*bAP-calcium transients*, por sus siglas en inglés). Los resultados muestran que en las dendritas distales de las SPNs, los transitorios de Ca^{2+} evocados bAP se detectan en las D2-SPNs, pero no en las D1-SPNs (Fig. 1.2.6A, B). Además, la atenuación de dichos transitorios a través de las dendritas distales, también resulta menor en las D2-SPNs comparada con las D1-SPNs (Fig. 1.2.6C). Es importante mencionar, que esta diferencia no se debe a la falta de VGCCs en las D1-SPNs, pues al aplicar Cs^+ intracelular (lo cual ocasiona una mejora en el control del voltaje sobre las dendritas distales) la atenuación desaparece, indicando que sí existe disponibilidad de canales, pero éstos no están siendo activados en estas neuronas (Fig. 1.2.6D). El experimento confirma una diferencia en la

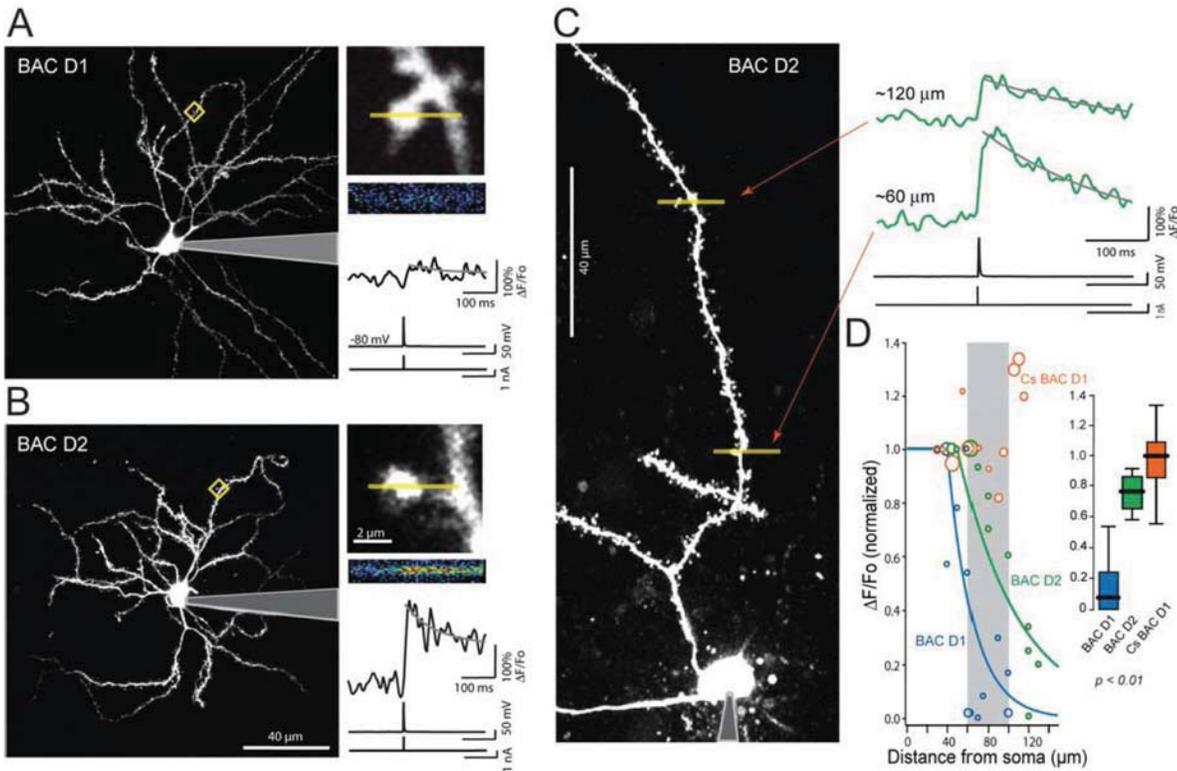


Figura 1.2.6. Distinta excitabilidad dendrítica en las SPNs. Se observa la detección de transitorios de Ca^{2+} debida a bAP en las dendritas distales de las D2-SPNs, pero no de las D1-SPNs (A y B). En C se muestra otro ejemplo de una D2-SPN con registros de transitorios de Ca^{2+} a diferentes distancias del soma (120 y 60 μm). D representa las gráficas de cambio en la amplitud de dichos transitorios de Ca^{2+} en función de la distancia al soma. El decremento en las D1-SPNs es mucho mayor que en las D2-SPNs, y no se observa al cargar a las células con Cs^+ intracelular. Modificado de Day *et al.* (2008).

excitabilidad somato-dendrítica entre las SPNs, siendo mayor en las D2-SPNs.

La información descrita menciona que, a pesar de que las SPNs poseen potenciales de mantenimiento similares, en las dendritas distales de las D2-SPNs hay una despolarización membranar mayor que ocasiona la entrada de una corriente de Ca^{2+} muy notoria en comparación con las D1-SPNs. Es decir, que a nivel dendrítico las D2-SPNs son más excitables o se despolarizan con mayor facilidad que las D1-SPNs. Esta propiedad intrínseca puede tener múltiples causas, pero podría sustentar la diferente transmisión sináptica GABAérgica entre las SPNs debido al cambio en su PMR.

2 Planteamiento del problema

Hace algunos años las SPNs eran consideradas una población neuronal homogénea. Después, con el avance de técnicas anatómicas se lograron diferenciar dos subpoblaciones de SPNs con base en el sitio donde proyectan sus axones: las de la vía directa y las de la vía indirecta. Posteriormente, se reconoció que las SPNs contienen receptores a DA distintos; las de la vía directa el tipo D1 y las de la indirecta el D2. Fuera de dichas diferencias, las SPNs se consideraban similares en anatomía, tamaño y aun en su respuesta electrofisiología ante pulsos de corriente somática.

Con el estudio de Flores-Barrera *et al.* (2010) no sólo se demostró que las SPNs son distinguibles mediante la respuesta sináptica ante estimulación ortodrómica cortical, sino que también se estipula que la transmisión GABAérgica tiene distintos efectos en cada subpoblación. De esta manera, el presente trabajo se enfocará en estudiar las posibilidades por las cuales existe una diferencia en la contribución GABAérgica sobre las respuestas sinápticas de ambos tipos de SPNs. Este hecho es muy importante debido a que permite discernir las diferencias en la inhibición dentro de la dinámica del microcircuito del NE y como se ha mencionado, al estudiar dicha dinámica estamos reconociendo los correlatos neurales del movimiento.

Recapitulando, en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las D2-SPNs existe un componente GABAérgico hiperpolarizante que va en desacuerdo con la inhibición de tipo *shunting* característica del soma de las SPNs. Entonces:

1. ¿Cuál es el mecanismo que subyace la diferencia en la contribución GABAérgica sobre las respuestas sinápticas en las SPNs?

Las diferencias en la contribución GABAérgica de la integración sináptica cortico-estriatal entre las SPNs se deben explicar por medio de ciertas propiedades intrínsecas en cada tipo de neuronas, debido a que la misma estimulación provoca respuestas sinápticas diferentes en la población neuronal del NE. Por lo cual surge otra pregunta:

-
2. ¿Qué propiedades intrínsecas a las SPNs pueden ocasionar dicho mecanismo y por ende, respaldar las diferencias en la transmisión sináptica GABAérgica?

Se sabe que el receptor $GABA_A$ es ionotrópico y permeable al anión Cl^- y que las SPNs poseen un PMR más hiperpolarizado (-85 mV) que el potencial de inversión del Cl^- (alrededor de -70 mV). La concentración de Cl^- en estas neuronas puede ser distinta en base a la expresión de ciertos cotransportadores de cloro. Por tanto es importante saber:

3. ¿Cómo están distribuidos los cotransportadores de cloro NKCC1 y KCC2 a lo largo de la membrana somatodendrítica de las SPNs?

También se sabe que las D2-SPNs poseen una mayor excitabilidad dendrítica que las D1-SPNs y ésta es mediada por VGCCs. Pero, la información sobre la participación de los VGCCs en la respuesta sináptica supraumbral cortico-estriatal en estas neuronas aún es escasa. Por lo que, nos podemos preguntar:

4. ¿Cuál es la aportación de los canales de calcio sensibles a voltaje en la respuesta sináptica cortico-estriatal en cada tipo de SPN?

En este trabajo se propone que las diferencias en la contribución GABAérgica deben estar respaldadas por propiedades intrínsecas a cada tipo de SPN. Además, que dichas propiedades se basan en la distribución electroquímica intracelular de los iones Cl^- y Ca^{2+} .

2.1. Hipótesis

General

- Las diferencias en la transmisión GABAérgica en la respuesta sináptica de las SPNs se explican en base a si el potencial de reposo de la célula (PMR) es menor o mayor al potencial de inversión de la conductancia a través del receptor GABA_A (E_{Cl^-}).

Particulares

- Si existe una diferencia en la expresión de los cotransportadores de cloro NKCC1 y KCC2 a lo largo de la membrana somato-dendrítica entre los dos tipos de SPNs, entonces la concentración de cloro al interior de las células sería diferente, ocasionando un cambio en el PMR en las SPNs.
 - Una mayor expresión de KCC2 en la membrana de las D2-SPNs y en especial en sus dendritas, implicaría que hay menor concentración de cloro intracelular y por tanto, al activar el receptor GABA_A, el anión entrará y su acción será hiperpolarizante.
 - Una mayor expresión de NKCC1 en la membrana de las D1-SPNs, implicaría que hay mayor concentración intracelular de cloro y por tanto, al activar el receptor GABA_A, el anión saldrá y su acción será despolarizante.
- La mayor excitabilidad dendrítica en las D2-SPNs, mediada por una mayor entrada sináptica de calcio a través de los VGCCs, podría provocar un aumento en el potencial de reposo dendrítico de estas células.
 - Ocasionando una respuesta GABAérgica hiperpolarizante, si el aumento del PMR de las dendritas se encuentra más despolarizado que el potencial de inversión de la conductancia a través del receptor GABA_A.
 - Por lo tanto, al eliminar la fuente de Ca²⁺ dendrítica en las SPNs, se debe afectar en mayor medida la transmisión GABAérgica sobre la respuesta sináptica cortico-estriatal en las D2-SPNs respecto a las D1-SPNs.

2.2. Objetivos

General

- Reconocer las características intrínsecas subyacentes al efecto GABAérgico diferente en la integración sináptica cortico-estriatal de las SPNs y determinar que factor puede explicar mejor dichas diferencias:
 1. Una concentración intracelular de Cl^- distinta entre las SPNs como resultado de la presencia de diferentes cotransportadores a lo largo de su membrana somatodendrítica.
 2. Una mayor participación de VGCCs en las dendritas; los cuales, al ser activados por la entrada glutamatérgica cortical, causan una despolarización importante predominante en un tipo de SPNs.

Particulares

- Mediante técnicas inmunohistoquímicas conocer la localización de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 en la membrana somatodendrítica de las SPNs de ambas vías. Con la finalidad de determinar si existe una relación entre su expresión y la integración sináptica GABAérgica en las SPNs ante estímulos corticales.
- Estudiar si existe una relación entre la activación de corrientes de Ca^{2+} dendríticas y la respuesta GABAérgica despolarizante o hiperpolarizante en las SPNs. Específicamente, determinar la aportación de las conductancias de los canales de calcio tipo T y L (pues actúan preferentemente en el compartimento dendrítico de estas neuronas) en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs.

2.3. Métodos

2.3.1. Animales

Se utilizaron ejemplares machos de ratas Wistar de 40-60 días de edad, ratones CD1 o transgénicos BAC-eGFP expresados bajo los promotores DRD1 o DRD2 de 30-90 días de edad; todos provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los animales se mantuvieron en un ciclo normal de luz:oscuridad (12:12 horas) a temperatura ambiente (22-24°C) con acceso libre a agua y alimento. Los procedimientos, en su totalidad, se realizaron en conformidad con lo establecido por la Comisión de Cuidado Animal del Instituto de Fisiología Celular (norma CICUAL-EGP41-14) y por ende, por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) con respecto al uso de animales de laboratorio.

2.3.2. Preparación de tejido cerebral

Los animales, previamente anestesiados con ketamina/xylazina (80:20) vía intraperitoneal, fueron perfundidos intracardialmente con una solución salina helada (4° C) saturada con O₂:CO₂ (95:5) que contiene (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 11 glucosa; pH = 7.4; 300 mOsm/l. El cerebro se removió inmediatamente, se retiraron las porciones de cerebelo y bulbo olfatorio, la porción restante se dividió por la línea media y cada hemisferio se colocó sobre la cámara de un vibratomo (PELCO 101, Ted Pella Inc.), sumergido en la misma solución, para efectuar los cortes del tejido requeridos. Se obtuvieron rebanadas parasagitales (300 µm de grosor) capaces de preservar las innervaciones corticales hacia el neocórtex dorsal (Flores-Barrera *et al.* 2009) (Fig. 2.3.1A). Dichas rebanadas se estabilizaron durante una hora, previa a los registros, en una solución artificial semejante al líquido cefalorraquídeo (LCA) saturada permanentemente con O₂/CO₂ (95:5) que contiene (en mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 26 NaHCO₃, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 glucosa; pH= 7.4; 300 mOsm/L.

2.3.3. Registros electrofisiológicos

Se estudió el disparo integrado de SPNs pertenecientes a ambas vías, mediante registros intracelulares en la modalidad de fijación de corriente. Retomando, las rebanadas se fijaron en una cámara de registro (3 ml de capacidad) suspendida en una mesa antivibratoria y aislada mediante una jaula de Faraday. El tejido se perfundió constantemente con 1 ml/min de LCA en oxigenación continua a una temperatura alrededor de 34° C. Se colocó un microelectrodo bipolar concéntrico

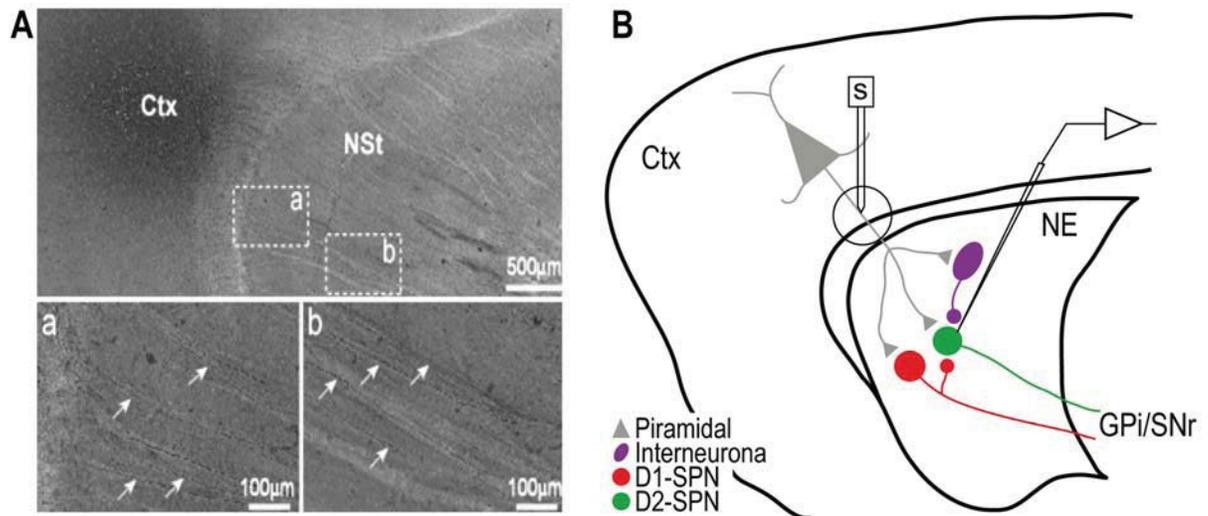


Figura 2.3.1. Esquema de la zona de registro. En A se encuentra una micrografía del área de interés; donde se puede apreciar la corteza, el NE y las fibras de las piramidales corticales (llamadas estriás, de aquí el nombre *estriado*). Los insertos inferiores representan los recuadros blancos magnificados. B muestra un dibujo de la zona de registro en una rebanada sagital. Se puede observar el electrodo de estimulación (S) sobre la capa V-VI de la corteza, así como el de registro (Δ) en el NE. También se hace énfasis en las sinapsis que las neuronas piramidales hacen con las D1-SPNs, D2-SPNs y las interneuronas estriatales. Imágenes modificadas de Flores-Barrera *et al.* (2009).

(50 μ m, FHC) sobre la superficie de la rebanada correspondiente a la capa V-VI de la corteza, con la finalidad de estimular las aferentes estriatales. El funcionamiento es el siguiente: al aplicar un pulso único de voltaje de intensidad variable (8-30 V) y 0.1 ms de duración a través del electrodo de estimulación, las neuronas piramidales adyacentes son despolarizadas al grado tal de liberar moléculas de glutamato en sus terminales, las cuales realizan contactos sinápticos con las neuronas estriatales. Al registrar una SPN cercana a la zona de estimulación, debido a que el glutamato al adherirse a receptores en su membrana desencadena la entrada de corrientes catiónicas, se obtiene la integración a la respuesta ortodrómica cortico-estriatal (Bargas *et al.* 1991) (Fig. 2.3.1B).

Las micropipetas para el registro de las neuronas se fabricaron con tubos de vidrio de borosilicato (80-120 M Ω ; 1 mm diámetro exterior, FHC) en un estirador de pipetas horizontal (P-87, Sutter Instruments Co.). La solución interna contiene 3 M de acetado de K⁺ con biocitina (Sigma-Aldrich Co.) y es conductora de corriente, previene el lavado del medio intracelular y a la vez permite el marcaje de las células registradas (Flores-Barrera *et al.* 2009). La micropipeta conecta a las neuronas con el sistema de registro al empalarlas mecánicamente. Al tratarse de una con-

ción física y debido a que el diámetro de las células registradas es de 20 a 40 μm , la punta de las micropipetas debe tener menos de 0.5 μm de diámetro para evitar daño alguno.

Las señales obtenidas se acondicionan mediante un sistema de amplificación de alta impedancia (Neuron Data, Cygus Technology Inc.) y se despliegan en un osciloscopio de dos canales (Nicolet 310, Nicolet Instrument Co.), el cual muestra el potencial de membrana y las corrientes iónicas involucradas durante el experimento. Así se puede visualizar la respuesta de una célula ante diversos estímulos; ya sea a través de la micropipeta mediante pulsos escalonados de corriente o voltaje, o mediante la estimulación de las terminales glutamatérgicas de la corteza a través del electrodo de estimulación. Ambos estímulos se controlan en amplitud y duración del pulso con ayuda de un estimulador de voltaje aislado (DS2A, Digitimer Ltd.). Finalmente, la actividad electrofisiológica registrada se digitaliza con la ayuda de un software (fSIENN) escrito en LabView para su análisis posterior.

2.3.4. Fármacos

Con la intención de observar la participación de las conductancias de los canales de calcio tipo L y T en la inhibición GABAérgica de las SPNs, los registros obtenidos se realizaron en dos fases distintas. Para esto, primero se obtuvo la respuesta ortodrómica cortico-estriatal de las SPNs en presencia del antagonista a receptores GABA_A (bicuculina, 10 μM , Sigma-Aldrich Co.). En la segunda fase, se aplicaron los antagonistas selectivos a VGCCs tipo L (nicardipina, 2.5 μM , Sigma-Aldrich Co.) y T (NNC 55-0396, 10 μM , Tocris Bioscience, R&D Systems Co.), y después se agregó bicuculina. Las respuestas se compararon entre los resultados de ambas fases y entre registros secuenciales dentro de cada fase.

Los reactivos se administraron a las neuronas mediante el sistema de perfusión, esperando mínimo que 10 ml se perfundieran a la rebanada antes de realizar los registros. Este tiempo es suficiente para que se produzca el efecto farmacológico deseado en las células registradas. Todos los fármacos fueron preparados al momento del experimento a partir de soluciones madre preservadas de forma adecuada.

2.3.5. Inmunohistoquímica

Se realizaron marcajes intracelulares de las células registradas mediante la inyección de la vitamina biocitina, capaz de difundir a través del interior de la membrana plasmática de las neuronas, a través del electrodo de registro. Las rebanadas con células registradas exitosamente se fijaron con paraformaldehído al 4% en un amortiguador de fosfatos (PBS 0.1 M, pH 7.4) por un mínimo de 24 horas, para su posterior procesamiento mediante técnicas inmunocitoquímicas.

El proceso es el siguiente: el tejido se enjuagó y permeabilizó en una solución salina amortiguadora (PBS más Triton 0.1%) para quitar el exceso de fijador. Las rebanadas se cortaron con ayuda de un vibratomo en grosores de 40 μ m. Después se incubaron en estreptavidina conjugada con Cy3 (1:2000 disuelta en PBS, Invitrogen TM), la cual es una proteína altamente afín a la biocitina y, debido al Cy3, es fluorescente. Por lo que, este paso permite la visualización de la célula registrada (una por cada rebanada). El tejido se incubó durante 30 minutos en albúmina bovina al 1% para bloquear sitios de unión no específicos y durante 36 horas en los anticuerpos policlonales de conejo, ya sea contra el cotransportador NKCC1 (1:1000, Abcam) o contra el KCC2 (1:200, Millipore TM). Las rebanadas se enjuagaron tres veces en PBS y se incubaron durante una hora más con un anticuerpo secundario de cabra contra conejo. Este último anticuerpo estaba conjugado con un fluoróforo específico diferente del Cy3 o de la GFP. Por último, las muestras se montaron en un porta objetos con Vectashield (Vector Laboratories) y se observaron bajo un microscopio confocal FV-1000 (Olympus Co.). De esta manera, se obtiene la expresión de dichos cotransportadores en el tejido estriatal y específicamente, mediante la proteína verde fluorescente o la biocitina en las SPNs. El tipo celular de las neuronas registradas se comprueba con la colocalización de la biocitina y la eGFP en los ratones BAC-D1/2 o mediante un segundo marcaje con anticuerpo contra sustancia P o encefalina en las ratas Wistar o ratones CD1. Si no existe colocalización de los fluoróforos, la célula se toma como putativa del tipo celular opuesto a los fluoróforos.

2.3.6. Análisis de datos

En su totalidad, los datos se obtuvieron y analizaron con ayuda del software: OriginPro 8.0 (OriginLab Co.), GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) y secuencias de comandos personalizadas escritos en MATLAB (The MathWorks, Inc.).

Las respuestas sinápticas registradas se caracterizaron en base a la duración a la amplitud media debido a que es una medida capaz de aportar información sobre las características de la meseta de despolarización. Se utiliza la sustracción digital con la finalidad de extraer el curso temporal del componente sensible a los distintos fármacos aplicados en cada respuesta. En los histogramas los datos se reportan como la media aritmética \pm SEM, mientras que los diagramas de cajas muestran la mediana y el rango intercuartil de la distribución. Algunas medidas se normalizaron respecto a la respuesta control y se reportan como porcentajes de cambio en duración. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se obtuvieron mediante distintas pruebas de estadística no paramétrica en base a los grupos examinados. Al comparar dos grupos se utilizaron la prueba de Wilcoxon para valores pareados y Mann-Whitney para los no pareados; y al comparar tres grupos, la prueba Friedman para datos pareados y Kruskal-Wallis para los no pareados, seguidas de un test *post-hoc* indicado en las leyendas de las figuras.

3 Resultados

3.1. Caracterización electrofisiológica de las SPNs

Para identificar que el total de las células registradas en este trabajo ($n = 90$) fuesen SPNs, se realizaron un par de protocolos electrofisiológicos que permiten distinguirlas de interneuronas estriatales y diferenciarlas entre sí, respectivamente.

Primero, se obtuvo la relación corriente-voltaje (I-V) al inyectar pulsos cuadrados de corriente despolarizante e hiperpolarizante en el soma de las células con intensidades crecientes hasta alcanzar el umbral de disparo, mientras se registra el cambio en el potencial de membrana. Este protocolo constituye una manera de medir el comportamiento eléctrico global de los canales en una célula, por lo que el resultado exhibe la huella electrofisiológica del tipo neuronal registrado. Como se ha mencionado, las SPNs poseen características peculiares tales como: PMR hiperpolarizado (alrededor de -80 mV), resistencia de entrada baja (cerca de 100 M Ω), latencia al primer potencial de acción y disparo regular. Además, estas neuronas muestran una ligera oposición a hiperpolarizar el voltaje de su membrana ante corrientes negativas. Todas estas propiedades se observaron en las SPNs registradas, en la Fig. 3.1.1 se muestran los trazos representativos.

En las curvas I-V se puede observar como la relación no es lineal y no se encuentran diferencias claras entre ambos tipos de SPNs (Fig. 3.1.1B, D). Aunque cabe destacar que la pendiente de la curva I-V en la D2-SPN es más pronunciada que en la D1-SPN, lo cual significa que las D2-SPNs presentan una mayor despolarización membranal ante los mismos pulsos de corriente. Sin embargo, aún cuando esta característica es un indicio de la mayor excitabilidad en las D2-SPNs, no es consistente entre la población estriatal total de SPNs debido a la alta variabilidad en las condiciones del sello electrofisiológico con la neurona y el tamaño de la punta del microelectrodo de registro, entre otras. Por tanto, el simple registro de la relación I-V no es suficiente para diferenciar ambas poblaciones de SPNs.

El segundo protocolo consiste en obtener la respuesta de las SPNs ante un estímulo ortodrómico cortico-estriatal. De esta manera se puede predecir si la célula registrada pertenece a la población de D1-SPNs o D2-SPNs en un 90% de los casos (Flores-Barrera *et al.* 2010), puesto que la integración sináptica cortico-estriatal en dichas neuronas es contrastante. Las D1-SPNs poseen un sináptico con una meseta de mayor duración y exhiben menor frecuencia de potenciales de acción en comparación con las D2-SPN, las cuales presentan respuestas breves y capaces de alcanzar mayores frecuencias de disparo (Fig.3.1.2A, B, C).

Las diferencias en la duración a la amplitud media (referida adelante como duración media) de las respuestas sinápticas registradas son significativamente distintas tanto a estimulaciones supraumbrales ($*p < 0.001$), como desde las subumbrales ($**p < 0.01$) (Fig. 3.1.2F). Los datos son los siguientes: las respuestas supraumbrales de D1-SPNs tiene una media de 187 ± 16 ms ($n = 24$), mientras que en las D2-SPNs el valor es de 72 ± 15 ms ($n = 18$). A nivel subumbral el valor promedio de la duración media corresponde a 36 ± 3 ms en las D1-SPNs ($n = 31$) contra 24 ± 1 ms en las D2-SPNs ($n = 20$).

Los registros se realizaron tanto en ratones BAC-eGFP-D1/D2, como en ratones CD1 o ratas Wistar. Como se ha mencionado, en las rebanadas provenientes de los primeros, la identificación celular se comprobó al superponer la marca de la neurona registrada con la fluorescencia de la eGFP (Fig.3.1.2E). Para comprobar el tipo celular en ratones CD1 y ratas Wistar, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos contra los péptidos característicos para cada subpoblación: sustancia P en las D1-SPNs y encefalina en las D2-SPNs, y se examinó la superposición de la marca de la neurona registrada con la de los péptidos.

Por último, es importante mencionar que las D2-SPNs presentan mesetas con potenciales autorregenerativos durante estimulaciones supraumbrales en algunos ensayos (Fig. 3.1.2D). Esta propiedad intrínseca se suma a la breve meseta que caracteriza a dichas neuronas durante la integración sináptica cortico-estriatal y es sensible a dihidropiridinas (Bargas *et al.* 1991, Flores-Barrera *et al.* 2011), por tanto se basa en la generación de potenciales de Ca^{2+} en las dendritas. Las D1-SPNs no presentan dicha respuesta durante estimulaciones supraumbrales, lo cual comprueba hipótesis de estudios previos que señalan una mayor excitabilidad dendrítica en las D2-SPNs (Day *et al.* 2008). De esta manera, se indica que las diferencias intrínsecas entre una y otra SPNs sí subyacen a las diferencias en la integración sináptica cortico-estriatal.

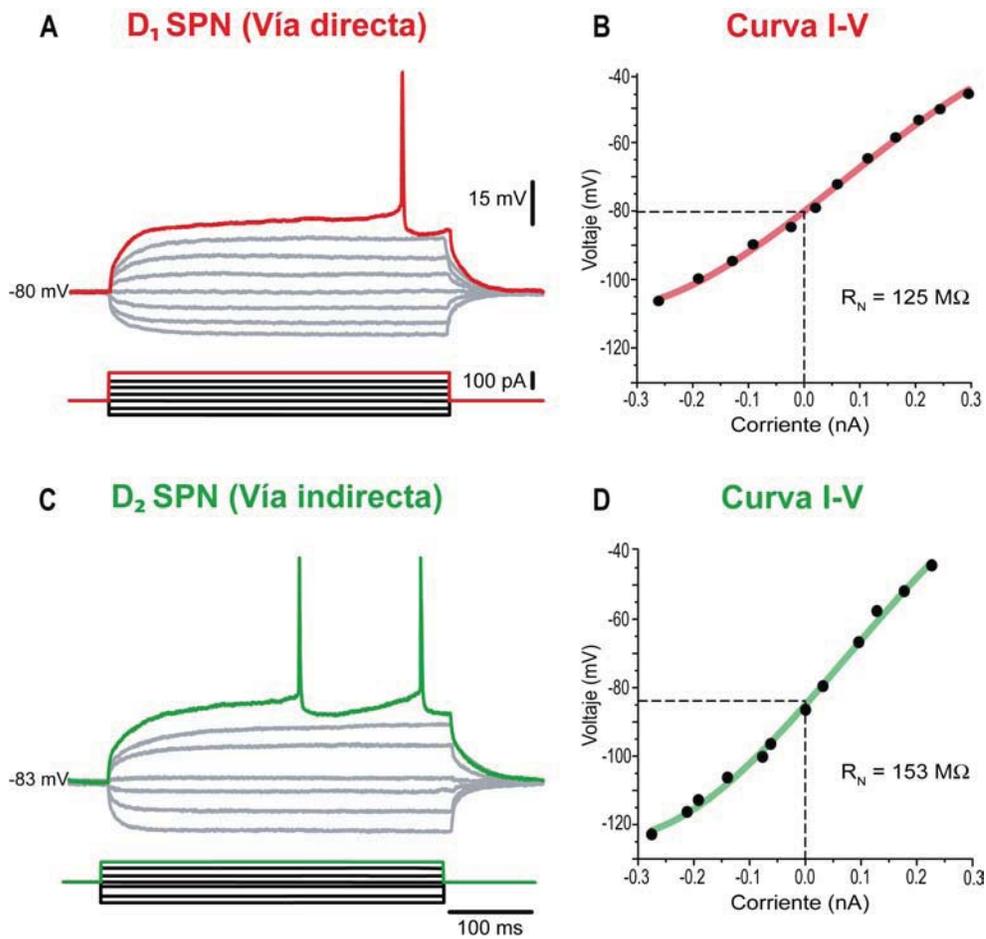


Figura 3.1.1. Respuesta electrofisiológica de las SPNs ante pulsos escalonados de corriente. Los registros intracelulares se obtuvieron al inyectar pasos de corriente directa en el soma de las células. Se muestra la caracterización de una D1-SPN (A) y una D2-SPN (C), así como las curvas intensidad-voltaje para cada caso (B y D). Observe como la relación no es lineal, pues los datos se ajustan a una función polinomial de segundo orden. La resistencia de entrada (R_N) se obtiene al derivar dicha función en el valor cero de corriente, siguiendo la ley de Ohm.

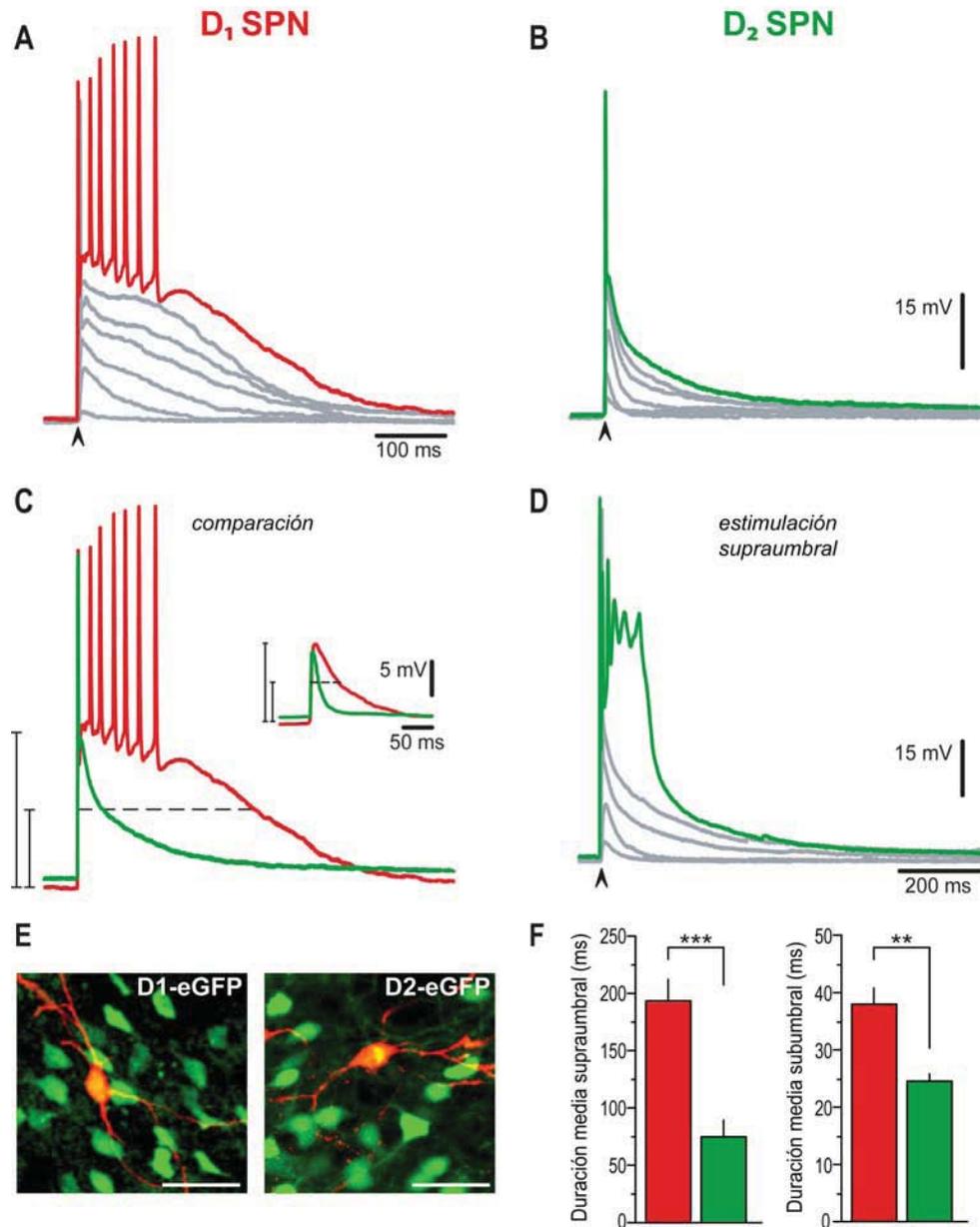


Figura 3.1.2. Diferencias en la integración sináptica cortico-estriatal entre los dos tipos de SPNs. En *A* y *B* se muestran las familias de registros a distintas intensidades de estimulación cortical de una D1-SPN y de una D2-SPN, respectivamente. En *C* se encuentra el sobrepuesto de las respuestas a la máxima intensidad y a nivel subumbral (inserto) para facilitar su comparación. *D* es la respuesta de una neurona D2-SPN que exhibe un potencial autorregenerativo de calcio. En *E* se muestran las fotografías de un par de neuronas registradas y llenadas con biocitina, se observa que colocalizan con la marca de la proteína verde fluorescente (rojo con amarillo) de los ratones BAC-D1/D2-eGFP, respectivamente. La calibración equivale a 20 μm . *F* contiene los histogramas que resumen las diferencias entre los dos tipos celulares en base a la duración a la amplitud media; las muestras son significativas desde estimulación subumbral (** $p < 0.01$), hasta supraumbral (***) a partir de una prueba Mann-Whitney. Las barras representan la media \pm ESM. En estimulación supraumbral, $n = 24$ para las D1-SPNs y $n = 18$ para las D2-SPNs; en subumbral, D1-SPNs $n = 31$ y D2-SPNs $n = 20$.

3.2. La contribución GABAérgica en la integración sináptica cortico-estriatal en ambos tipos de SPNs es diferente

La transmisión sináptica GABAérgica es de suma importancia en el NE pues es un núcleo principalmente GABAérgico. Posee muchas sinapsis inhibitorias entre SPNs (inhibición lateral o *feedback inhibition*) y aquellas entre las interneuronas GABAérgicas y las SPNs (*feedforward inhibition*). Como se ha mencionado, la respuesta sináptica cortico-estriatal no sólo es mediada por el neurotransmisor glutamato, ya que una vez que las aferencias corticales llegan al NE, echan a andar todo el microcircuito estriatal, en el cual la inhibición GABAérgica juega un papel crucial. Si se recuerda, el objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto GABAérgico en la integración sináptica cortico-estriatal y las características intrínsecas a las SPNs que lo subyacen. Por lo cual, el siguiente paso consistió en obtener las respuestas de las SPNs ante los mismos estímulos ortodrómicos cortico-estriatales en presencia del antagonista de receptores GABA_A, bicuculina (10 μ M). De esta manera se obtienen los experimentos control para este trabajo y se comprueba la aportación del neurotransmisor GABA en la integración sináptica cortico-estriatal de las SPNs en base al trabajo de Flores-Barrera *et al.* (2010).

La Figura 3.2.1 muestra un resumen de dicho experimento, donde después de obtener los trazos en condiciones control para cada tipo de SPN (A, B), se registran las respuestas ante la aplicación de bicuculina (10 μ M) (C, D). El resultado indica cómo la aportación GABAérgica de la respuesta sináptica cortico-estriatal es contrastante entre una y otra subpoblación de SPNs. En las D1-SPNs, el bloqueo de los receptores GABA_A en la respuesta supraumbral tuvo un efecto bifásico: al inicio de la respuesta aumentó la despolarización y la frecuencia de disparo, mientras que en la parte media-tardía redujó la meseta despolarizante (Fig. 3.2.1E, K). Por el lado de la estimulación subumbral, en presencia de bicuculina se redujo la despolarización membranal durante toda la respuesta en comparación al trazo control (Fig. 3.2.1E, inserto). El promedio de duración media en las respuestas supraumbrales con bicuculina es de 115 ± 16 ms, o lo que equivale a una disminución del $43 \pm 4\%$ con respecto a la población control ($n = 15$; $***p < 0.001$; Fig. 3.2.1I, J). Durante la estimulación subumbral, el promedio de la duración media es de 19 ± 2 ms o el $47 \pm 2\%$ de reducción respecto al control ($n = 11$; $**p < 0.01$). Los datos concuerdan con los reportados previamente por Flores-Barrera *et al.* (2010).

En cambio, en las D2-SPNs el bloqueo de los receptores GABA_A resultó en un aumento de la despolarización membranal durante toda la respuesta, un aumento en la frecuencia de disparo e incluso, en algunos casos, la aparición de potenciales autorregenerativos de Ca²⁺ (Fig. 3.2.1F, K). De hecho, en la estimulación subumbral, el aumento en la despolarización también permanece durante el trazo completo (Fig. 3.2.1F, inserto). Los valores promedio de la duración a la amplitud media para la estimulación supraumbral y subumbral, respectivamente son: 123 ± 20 ms ($n = 12$; *** $p < 0.001$; Fig. 3.2.1I) y 33 ± 3 ms ($n = 9$). En porcentajes se contabilizó el 93 ± 28% de aumento respecto a la condición control en estimulación supraumbral (Fig. 3.2.1J) y el 38% en estimulación subumbral (* $p < 0.05$). De nuevo, estos registros corresponden a los reportados por Flores-Barrera *et al.* (2010).

Además, con la finalidad de obtener el componente sensible al fármaco en la respuesta sináptica cortico-estriatal de cada SPN se realizó la sustracción digital del trazo en presencia de bicuculina respecto al trazo control (Fig. 3.2.1G, H). En base a este dato podemos interpretar la acción del neurotransmisor GABA sobre la integración sináptica cortico-estriatal llevada a cabo por las SPNs. Se observa como en las D1-SPNs (G) la entrada GABAérgica restringe el disparo de la neurona al inicio de la respuesta, pero en la parte tardía ayuda a mantener la meseta de despolarización. Este efecto sigue un claro ejemplo de inhibición tipo *shunting*, revisada durante la introducción. En cambio, en las D2-SPNs (H) se observa una restricción del disparo y la despolarización durante toda la respuesta, siguiendo el esquema de la inhibición clásica.

Este hecho, como se ha mencionado, resulta en una contradicción de la transmisión GABAérgica en las SPNs, ya que existe una distinción de la acción del receptor GABA_A entre las SPNs bajo las mismas condiciones de experimentación. La inhibición clásica, es decir, hiperpolarizante que presentan las D2-SPNs no concuerda con el efecto GABAérgico despolarizante en el compartimento somático registrado en ambas SPNs. Además, resulta difícil de explicar dado que las D1-SPNs no presentan este tipo de inhibición, sino que se rigen por la inhibición de tipo *shunting*. Por tanto, es importante recordar que este resultado diferencial se debe a propiedades intrínsecas de las SPNs. Pero, ¿cuáles son los elementos encargados del cambio en el flujo neto de la corriente GABAérgica a través del receptor ionotrópico GABA_A, capaces de ocasionar un aumento o disminución de la despolarización membranal durante la respuesta sináptica cortico-estriatal en estas neuronas?

Como se ha explicado previamente, existen dos posibles respuestas ante dicha pregunta: la pri-

mera involucra la expresión diferencial de los cotransportadores de Cl^- NKCC1 y KCC2 entre las subpoblaciones de SPNs. La segunda tiene que ver con la diferencia en la excitabilidad dendrítica entre estas neuronas, la cual es mediada por VGCCs. A continuación se exploran ambas posibilidades.

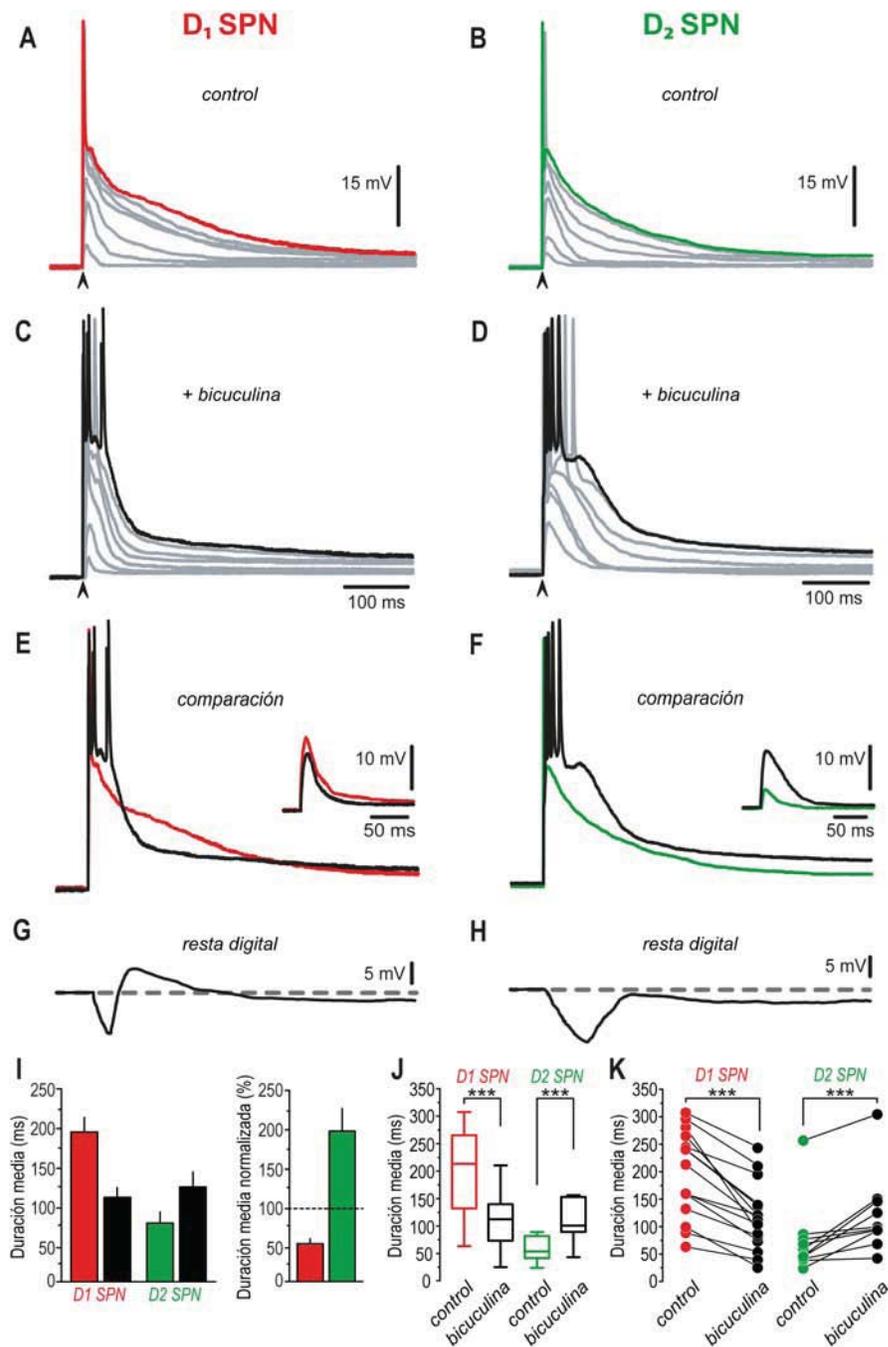


Figura 3.2.1. Efecto GABAérgico de las SPNs durante la estimulación cortico-estriatal. A y B contienen las respuestas sináptica en condiciones control de ambas vías, respectivamente. En C y D se muestran las respuestas en presencia de bicuculina (10 μM, antagonista de receptores GABA_A). En E y F se encuentra el sobrepuesto de los trazos supraumbrales y subumbrales (insertos). G y H tienen la resta digital de cada respuesta control menos la experimental (bicuculina). De esta manera se obtiene el componente sensible a bicuculina para cada tipo de SPN: se observa que las D1-SPNs tiene un efecto GABAérgico bifásico (primero inhibitorio y después despolarizante), en cambio las D2-SPNs siempre presentan un efecto inhibitorio. Los histogramas (I), las cajas de Tukey (J) y las distribuciones de efecto fármacológico (K) muestran el resumen de los datos analizados respecto a la duración a la amplitud media; D1-SPNs $n = 15$; D2-SPNs $n = 12$. Las muestras son significativamente diferentes de acuerdo a una prueba Wilcoxon de rangos pareados (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.3. La expresión de los cotransportadores de Cl⁻ en las SPNs es homogénea

En la mayoría de las neuronas del SNC los cotransportadores de Cl⁻ NKCC1 y KCC2 son las moléculas encargadas de mantener la concentración intracelular de Cl⁻ (Gulácsi *et al.* 2003, Choi *et al.* 2008, Chamma *et al.* 2012). Los cambios en su expresión influyen directamente en el flujo de las corrientes de Cl⁻ a través del receptor GABA_A. Específicamente, una mayor expresión de NKCC1 en la membrana permitiría un aumento de la acumulación de Cl⁻ intracelular, ocasionando un efecto excitador al activar el receptor GABA_A, pues los aniones Cl⁻ saldrían de la célula. Lo opuesto sucedería con una mayor expresión del transportador KCC2, donde la concentración de Cl⁻ intracelular se mantendría baja y las conductancias a través de los receptores GABA_A serían inhibitorias, ya que los iones Cl⁻ fluirían al interior celular.

Para probar si existe una diferencia en la expresión de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 en las SPNs se realizaron ensayos inmunocitoquímicos en el estriado a partir de rebanadas sagitales de cerebros de ratones BAC-D1/D2-eGFP, según el caso. Una vez realizado el marcaje, se observaron las muestras en un microscopio confocal y se tomaron fotografías de los campos clave. Los resultados muestran que el transportador NKCC1 se expresa principalmente en el soma de las SPNs (Fig. 3.3.1A, C, E, G) y en los procesos dendríticos es muy escaso. Su expresión colocaliza tanto en somas de las D1-SPNs (Fig. 3.3.1B, D) como en los de las D2-SPNs (Fig. 3.3.1F, H). Se puede notar en las imágenes del núcleo estriado tomadas a partir de rebanadas de ratones transgénicos BAC-D1 contienen la marca de NKCC1 en neuronas que no poseen la proteína verde fluorescente (cabezas de flecha), lo mismo sucede con las imágenes tomadas a partir de ratones transgénicos BAC-D2 (flechas). Esto indica que el cotransportador NKCC1 tiene una expresión similar en ambas SPNs, ya que ambos tipos neuronales lo expresan y su expresión se localiza preferentemente en el soma.

El transportador KCC2 se encuentra mayoritariamente en los procesos dendríticos estriatales. Al realizar el ensayo inmunocitoquímico sobre una rebanada de un ratón transgénico BAC-eGFP-D1, se muestra que la marca de KCC2 no colocaliza con los somas de las células que expresan la proteína verde fluorescente (Fig. 3.3.2D, H). Incluso en las fotografías tomadas con microscopía confocal se nota claramente como el espacio correspondiente a los somas no se sobrepone con la marca de KCC2 (Fig. 3.3.2A, C, E, G).

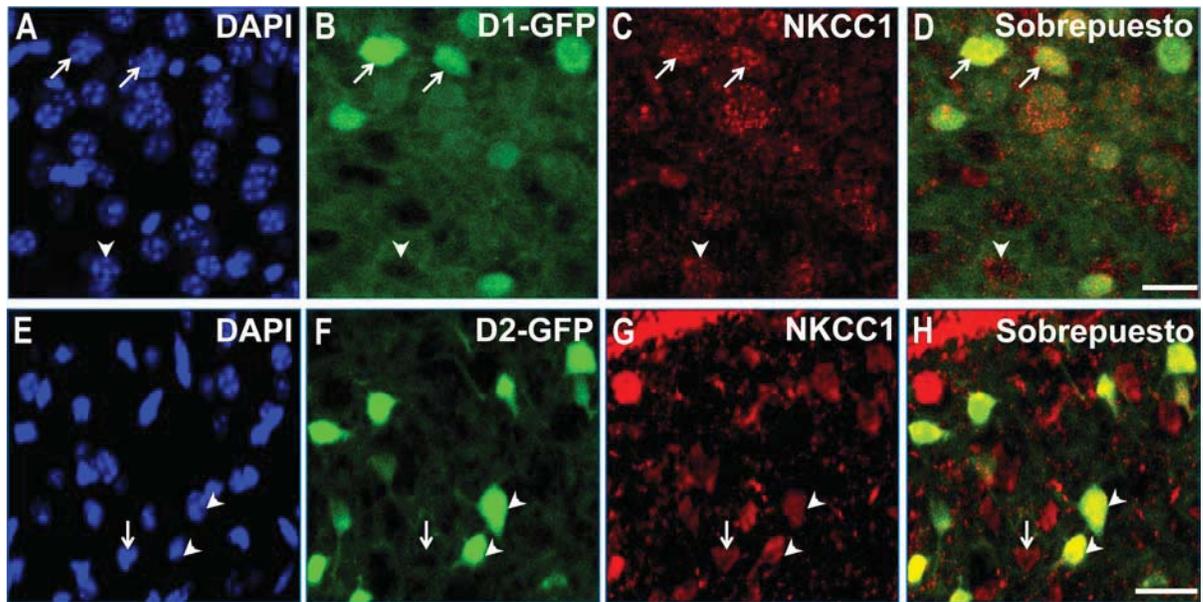


Figura 3.3.1. Expresión del cotransportador NKCC1 en las SPNs a partir de ratones BAC-D1/D2-eGFP. Las imágenes se obtienen después de teñir la preparación con DAPI (A y E), estimular la eGFP (B y F) y obtener la inmunohistoquímica del NKCC1 (C y G). En la primera fila se muestra una rebanada de ratón D1-GFP y en la segunda un D2-GFP. D y H ilustran el sobrepuesto de las imágenes anteriores, respectivamente. Es importante notar que el marcaje contra NKCC1 se encuentra contenido principalmente en los somas de las neuronas estriatales y colocaliza con ambos tipos de SPNs (flechas para D1-SPN y cabezas de flechas para D2-SPN). La escala indica 20 μ m.

Al no lograr una resolución a nivel de los procesos dendríticos con estos ensayos inmunohistoquímicos y como la expresión de KCC2 en el NE se centra principalmente en la neuropila, se realizó un ensayo inmunocitoquímico con una neurona D1-SPN previamente registrada y llenada con biocitina (una proteína capaz de difundir al interior de la membrana celular). Esta técnica sirvió para obtener resolución a nivel de dendritas siguiendo la marca del fluoróforo acoplado a la biocitina (Fig. 3.3.2I). Las imágenes J, H de la Fig. 3.3.2 muestran que la marca de la biocitina en las dendritas de una D1-SPN (flechas) tampoco colocaliza con la expresión del transportador KCC2 (cabezas de flechas).

En rebanadas de ratones BAC-eGFP-D2 se realizaron los mismos marcajes con el transportador KCC2 (Fig. 3.3.3A, B, C, E, F, G). Se muestra nuevamente, que la expresión del transportador KCC2 se encuentra concentrada en la neuropila estriatal (cabezas de flecha) (Fig. 3.3.3D, H). En estas imágenes se distingue con facilidad como la marca de KCC2 no ocupa el espacio de los somas de neuronas estriatales. Por último, al realizar el ensayo inmunocitoquímico sobre una

neurona D2-SPN llenada con biocitina, tampoco se encontró colocalización entre los procesos dendríticos de la D2-SPN y la expresión del KCC2 (Fig. 3.3.3H, I, J).

Estos resultados indican que las SPNs de ambas subpoblaciones no expresan el cotransportador KCC2 en su membrana somatodendrítica. Sin embargo, en las fotografías del NE sí se observa expresión de dicho transportador. Entonces, se puede inferir que las interneuronas estriatales y las terminales de neuronas piramidales corticales o talámicas podrían expresar el cotransportador KCC2.

En resumen, los ensayos inmunocitoquímicos realizados para este trabajo establecen que no existe heterogeneidad en la expresión de los cotransportadores de Cl⁻ NKCC1 y KCC2 en ambos tipos de SPNs. Además, en cada subpoblación tampoco se encontraron diferencias entre la parte somática y la parte dendrítica. Por tanto, las diferencias en la integraciones sináptica GABAérgica de ambos tipos de SPNs no se explican de acuerdo a un cambio en la concentración de Cl⁻ intracelular ocasionada por un balance de expresión diferencial de dichos transportadores.

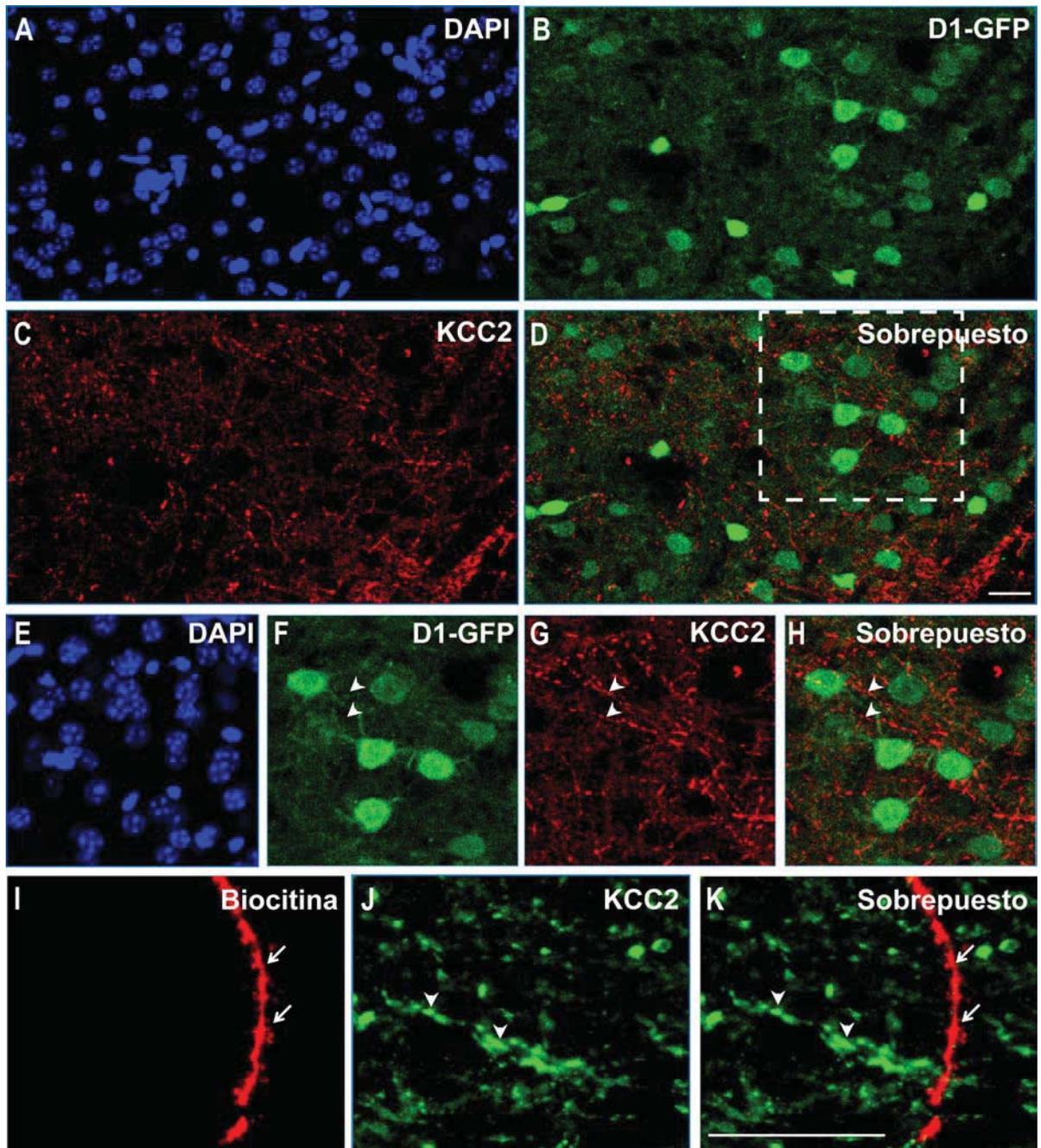


Figura 3.3.2. Ausencia del cotransportador KCC2 en las D1-SPNs. En *A* y *E* se observan neuronas estriatales marcadas con DAPI. *B* y *F*, muestran la inmunofluorescencia de la eGFP acoplada al receptor D1 en las SPNs. En *C* y *G* se muestra la marca inmunocitoquímica del transportador KCC2. *E*, *F*, *G* y *H* son acercamientos al recuadro delimitado en *D*, donde se aclara que la marca del KCC2 se concentra en los procesos dendríticos (cabezas de flecha). En *I*, se muestra la marca de biocitina en una dendrita de una neurona D1-SPN. *J* muestra la expresión del KCC2 en ese mismo campo que *I*. En *K* se observa el sobrepuesto de las dos imágenes anteriores. En la última secuencia es importante notar que el marcaje contra KCC2 se encuentra principalmente en los procesos dendríticos (cabezas de flechas) dentro del NE, pero éste no corresponden a las dendritas de la D1-SPN (flechas). La escala indica 20 μ m.

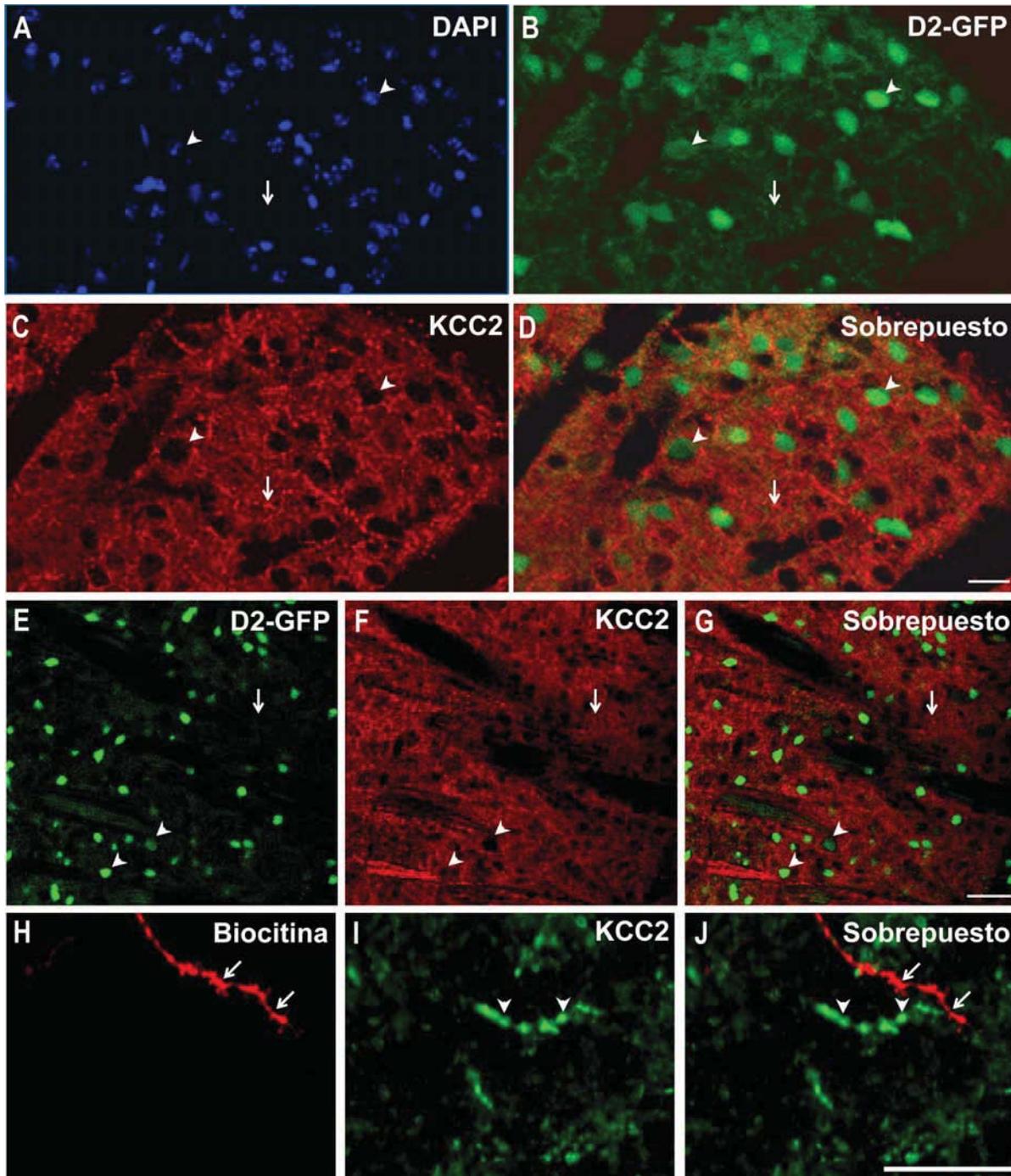


Figura 3.3.3. Ausencia del cotransportador KCC2 en D2-SPNs. En *A* se muestran neuronas estriatales marcadas con DAPI. *B* y *E*, inmunofluorescencia de la eGFP acoplada al receptor D2 de las SPNs en campos distintos. En *C* y *F* se muestra la inmunohistoquímica del KCC2 para cada campo, respectivamente. *D* y *G* muestran el sobrepuesto de las imágenes inmediatas anteriores en cada campo, respectivamente. En estas imágenes, se debe notar que el marcaje contra KCC2 se encuentra principalmente en los procesos dendríticos estriatales (flechas), pues la silueta de los somas queda vacía (cabezas de flecha). También se muestra la marca de biocitina en una dendrita de una neurona D2-SPN (*H*), la expresión del KCC2 en ese mismo campo (*I*) y el sobrepuesto (*J*). La última serie de imágenes comprueba que en las dendritas de una D2-SPN (rojo) tampoco existe colocalización con la marca del KCC2. La escala indica 20 μ m.

3.4. La participación de los VGCCs tipo T y L en la respuesta sináptica cortico-estriatal es diferente entre ambos tipos de SPNs

Para evaluar la diferente excitabilidad dendrítica de las SPNs como otra posible causa para explicar las diferencias en la integración sináptica GABAérgica de las respuestas ante un estímulo ortodrómico cortico-estriatal, se realizaron experimentos capaces de suprimir la aportación de las conductancias a través de los canales de calcio sensibles a voltaje tipo T y L en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs.

El experimento consiste en evocar respuestas sinápticas mediante estimulación ortodrómica cortical utilizando el mismo protocolo, pero esta vez en presencia de bloqueadores de los VGCCs tipo T y L. Estos registros sí muestran diferencias entre las dos subpoblaciones de SPNs. Primero se estudió la aportación del canal tipo T mediante la aplicación de su antagonista selectivo (NNC 55-0396, 10 μ M), una vez registrados los trazos en condiciones control para cada tipo de SPN (Fig. 3.4.1A, B). La conductancia de Ca^{2+} a través de dicho canal está presente en las respuestas de las dos subpoblaciones de SPNs, pues las respuestas sinápticas se reducen en presencia del fármaco NNC 55-0396 (Fig. 3.4.1C, D). Este dato comprueba que existen corrientes de Ca^{2+} entrantes durante la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs (Flores-Barrera *et al.* 2011), pero es pionero en reconocer la participación del VGCC tipo T en estas neuronas.

Sin embargo, existen algunas diferencias entre la participación de la conductancia mediada por el VGCC tipo T durante los registros de las D1- y D2-SPNs. Su aportación en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las D1-SPNs es pequeña, pero perceptible (Fig. 3.4.1E). Al analizar la resta digital se aprecia que la reducción del trazo en presencia del bloqueador NNC 55-0396 posee una latencia de un par de decenas de milisegundos con respecto al inicio de la respuesta en condiciones control y que su participación es mayor durante la porción media (Fig. 3.4.1G). Este resultado indica que las corrientes de Ca^{2+} entrantes a través del VGCC tipo T ayudan al mantenimiento de la meseta de despolarización que las D1-SPNs exhiben ante estimulación cortical. El promedio de la duración a la amplitud media en las respuestas supraumbrales control es de 147 ± 20 ms, mientras que después de bloquear los VGCCs tipo T se reduce a 136 ± 34 ms ($n = 4$; Fig. 3.4.1I). Estos datos muestran que la aportación a la respuesta supraumbral promedio en base a la duración media equivale al 11 ± 11 % (Fig. 3.4.1I). Pero la prueba estadística arroja que

la disminución de los registros en presencia de NNC 55-0396 no es significativamente distinta del control. En este caso, es recomendable ampliar la muestra analizada para corroborar si no existen diferencias mínimas.

Por su parte, al analizar la contribución de la conductancia mediada por el VGCC tipo T en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las D2-SPNs, se nota que el efecto del NNC 55-0396 es mayor en comparación con lo observado en las D1-SPNs (Fig. 3.4.1D, F). Además, en la resta digital se observa que la conductancia a través de este canal es mayor al inicio de la respuesta sináptica y permanece durante todo el trazo con un decaimiento gradual (Fig. 3.4.1H). Por tanto, las corrientes de Ca^{2+} entrantes a través de este canal están presentes durante toda la respuesta, teniendo una participación mayor durante la despolarización inicial. Esto significa que incluso ayudan a delimitar la amplitud máxima de la meseta de despolarización durante la estimulación supraumbral. Los valores promedio de la duración media corresponden a 90 ± 52 ms en condiciones control y después de aplicar NNC 55-0396 se reduce a 55 ± 24 ms ($n = 6$; $*p < 0.05$; Fig. 3.4.1I). Estos datos muestran que la reducción promedio en la duración media de la respuesta durante estimulación supraumbral corresponde al $25 \pm 6\%$ respecto a los trazos control (Fig. 3.4.1I). En este caso se obtuvo una tendencia significativa a diferencia de lo reportado en las D1-SPNs, revelando que, en efecto, la aportación del VGCC tipo T sí es mayor en este tipo de neuronas.

Al final de la Fig. 3.4.1 se muestra un registro de una D2-SPN con potenciales de Ca^{2+} y el efecto que la aplicación de NNC 55 -0396 tiene sobre la respuesta sináptica cortico-estriatal supraumbral (J). La comparación resulta espectacular pues al bloquear los VGCCs tipo T, el potencial autorregenerativo se reduce considerablemente, aunque se mantiene una despolarización de magnitud supraumbral. Las respuestas ante estimulación subumbral se analizan en una figura más adelante.

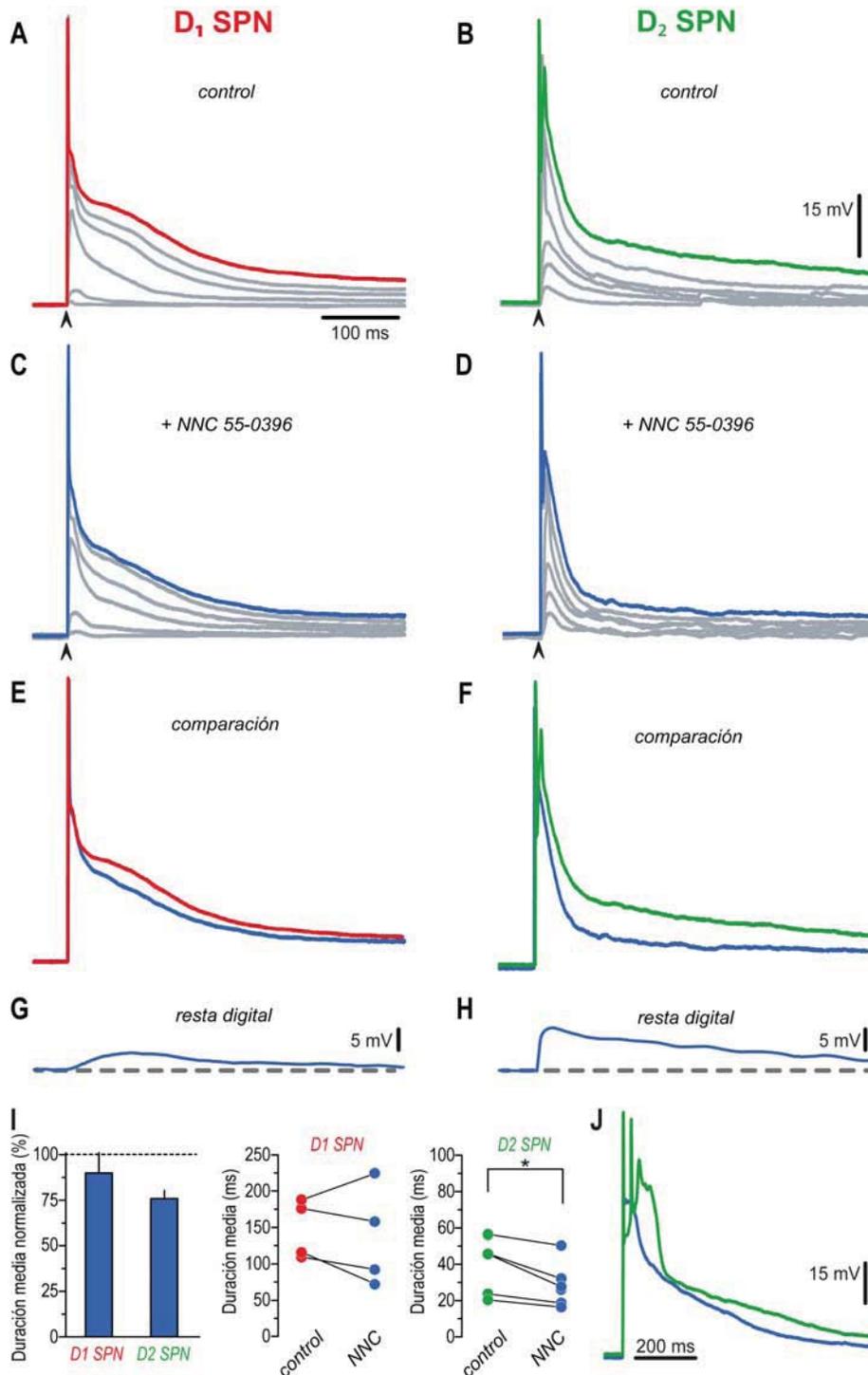


Figura 3.4.1. Aportación de los VGCCs tipo T en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs. Se observan las respuestas en condiciones control de ambas vías (*A* y *B*) y en presencia de 10 μ M de NNC 55-0396 (*C* y *D*). *E* y *F* comparan los trazos supraumbrales de cada respuesta. En *G* y *H* se muestra la resta digital de la respuesta experimental ante el control, que indica el componente sensible a NNC. En *I* encontramos los histogramas y las distribuciones de la muestra analizada. En la distribución de las D2-SPNs se omite un caso que se sale del rango. Las barras representan la media \pm ESM. D1-SPNs $n = 4$; D2-SPNs $n = 6$; $*p < 0.05$ a partir de una prueba Wilcoxon de rangos pareados. En *J* se muestra un trazo de un potencial autorregenerativo en una D2-SPN y el efecto del NNC sobre éste.

Por otro lado, se realizó el mismo experimento en presencia de la combinación de los bloqueadores de VGCCs tipo T y L (NNC 55-0396, 10 μ M y nicardipina, 5 μ M, respectivamente) para cada tipo de SPN (Fig. 3.4.2A, B, C, D). Los resultados obtenidos muestran nuevamente un decremento en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs de ambas vías. En las D1-SPNs la aportación de las conductancias de Ca^{2+} a través de estos canales aumenta respecto a la reportada para el canal T solo (Fig. 3.4.2E), pero aún sigue siendo pequeña comparada con las D2-SPNs. Este resultado significa que la acción del VGCC tipo L es mayor que aquella mediada por el VGCC tipo T en estas neuronas. En la resta digital (Fig. 3.4.2G) se puede apreciar que la acción conjunta de ambos canales se lleva a cabo durante toda la respuesta, nuevamente ayudan a mantener la meseta de despolarización que estas neuronas presentan ante estímulos corticales. También se observa que la conductancia posee una activación lenta y un decaimiento ligero a lo largo del trazo. Además, aún se observa una latencia corta al inicio de la respuesta en presencia de los antagonistas de estos canales en comparación con el control, pero ésta es menor que en el trazo del componente sensible a NNC 55-0396 solo. El promedio de la duración a la amplitud media en las respuestas supraumbrales control es de 214 ± 92 ms, mientras que después de bloquear ambos VGCCs tipo T y L se reduce a 101 ± 17 ms ($n = 3$; Fig. 3.4.2I). Estos datos muestran que la aportación a la respuesta supraumbral promedio en base a la duración media equivale al $40 \pm 15\%$ (Fig. 3.4.2I). Es importante observar que existe una menor disminución en comparación con lo reportado para el bloqueo de los VGCCs tipo T, aunque la prueba estadística arroja que no es significativamente distinta del control, la tendencia es clara. Lo más probable es que al momento de aumentar el número de casos estudiados se logre obtener significancia estadística.

En cambio, en las D2-SPNs el bloqueo de los VGCCs tipo T y L también tiene un efecto que abarca toda la respuesta y sigue siendo mayor que el reportado para las D1-SPNs (Fig. 3.4.2F). Pero además, es mayor que lo reportado sólo para la conductancia a través del VGCC tipo T. Esto significa que aunado al efecto del VGCC tipo T, se suma la entrada de Ca^{2+} a través de los VGCC tipo L. Al analizar la resta digital (Fig. 3.4.2H) es evidente que la participación de ambas conductancias es mucho más pronunciado al inicio de la respuesta y, debido a la corta duración de las mesetas en este tipo de neuronas, su decaimiento es más abrupto que en las D1-SPNs. En este caso cabe resaltar que la participación del VGCC tipo T se lleva a cabo al inicio de la respuesta, mientras que aquella del VGCC tipo L continua hasta el final de la meseta de despolarización. Los valores promedio de la duración media corresponden a 47 ± 8 ms en condiciones control y después de aplicar la combinación de antagonistas se reduce a 24 ± 3 ms

($n = 6$; $*p < 0.05$; Fig. 3.4.1I). Estos datos muestran que la reducción promedio en la duración media de la respuesta durante estimulación supraumbral corresponde al $46 \pm 7\%$ respecto a los trazos control (Fig. 3.4.1I). Nuevamente, se obtuvo una tendencia significativa en las D2-SPNs a diferencia de lo reportado en las D1-SPNs. Lo cual sustenta que la aportación de los VGCCs tipo T y L sobre la respuesta sináptica cortico-estriatal es mayor en este tipo de neuronas.

Por último, también se muestra un registro de una D2-SPN con potenciales dendríticos autorregenerativos y su efecto al aplicar NNC 55-0396 más nicardipina sobre la respuesta cortico-estriatal (Fig. 3.4.2J). Se observa como la respuesta del potencial de Ca^{2+} se ocluye de forma impresionante, dejando simplemente una respuesta similar a la estimulación umbral control. Por tanto, las espigas autorregenerativas presentes en las D2-SPNs se logran gracias a la entrada de Ca^{2+} a través de los VGCCs tipo L y en menor medida en los tipo T. Este dato sustenta lo reportado por Flores-Barrera *et al.* (2011), pero aumenta la aportación de los VGCCs tipo T en los potenciales autorregenerativos de Ca^{2+} , la cual se desconocía anteriormente.

Ahora bien, la contribución de los canales mencionados también se estudió en estimulaciones subumbrales (Fig. 3.4.3). Los resultados obtenidos son similares a aquellos reportados durante estimulaciones supraumbrales. En A y B se muestra como la aportación del VGCC tipo T es mayor en las D2-SPNs respecto a las D1-SPNs, donde su participación es prácticamente nula. En cambio la combinación de NNC más nicardipina representa una disminución de la respuesta en ambos tipos de SPNs, aunque sigue siendo mayor en las D2-SPNs (C y D).

El valor promedio de la duración a la amplitud media subumbral control en las D1-SPNs es de 31 ± 3 ms y después de aplicar NNC 55-0396 no sufre cambios significativos: 32 ± 1 ms ($n = 3$; Fig. 3.4.3F) y en términos de porcentajes un cambio del $104 \pm 13\%$ (Fig. 3.4.3E). Lo cual corrobora que la participación de los VGCCs tipo T es nula en la respuesta subumbral de estas neuronas. En el caso de la combinación de los bloqueadores de estos canales, el promedio de la duración media paso de 34 ± 7 ms en condiciones control a 27 ± 2 ms ($n = 4$; Fig. 3.4.3F), lo cual equivale a una disminución del $11 \pm 12\%$ (Fig. 3.4.3E). Nuevamente, la participación de la combinación de estos canales no es significativa, aunque sí existe una tendencia a la disminución. Para corroborarla es importante aumentar la muestra analizada.

En las D2-SPNs se obtiene un promedio de la duración media de 31 ± 7 ms en condiciones control y después de agregar NNC se disminuye a 14 ± 6 ms ($n = 5$; Fig. 3.4.3F). Esto equivale a

una reducción del $24 \pm 5\%$ (Fig. 3.4.3E) que es claramente mayor que lo reportado para las D1-SPNs. Al analizar los registros con NNC más nicardipina se obtiene un cambio en el promedio de la duración media de 31 ± 5 ms a 20 ± 3 ms ($n = 5$; Fig. 3.4.3F). En términos de porcentajes, se alcanza la máxima disminución para las respuestas subumbrales: $32 \pm 9\%$ (Fig. 3.4.3E). La participación de ambos canales en las respuestas sinápticas subumbrales de estas neuronas no resulta significativa ante las pruebas estadísticas, muy probablemente debido al bajo número de casos reportados. Aún, con tan pocas células es notoria una tendencia a disminuir la despolarización en dichas respuestas en comparación con lo reportado para las D1-SPNs. Lo cual indica que a nivel subumbral la entrada de Ca^{2+} a través de los VGCCs tipo T y L es mayor en las respuestas sinápticas de las D2-SPNs que en las D1-SPNs, donde los componentes no son tan claros.

En general, los resultados mostrados en esta sección establecen que la aportación de la conductancia a través del VGCC tipo T es mayor en las D2-SPNs en comparación con las D1-SPNs tanto en estimulaciones sub y supraumbrales. También establecen que ambas SPNs son sensibles al bloqueo de la conductancia a través del VGCC tipo L de forma similar y que los potenciales autorregenerativos de las D2-SPNs se deben a corrientes entrantes a través de ambos canales; situación que respalda estudios previos sobre la mayor excitabilidad mediada por Ca^{2+} en las D2-SPNs (Day *et al.* 2008). Además, se reconoce por primera vez que los VGCCs tipo T están involucrados en las respuestas sinápticas de las D2-SPNs desde el comienzo de la respuesta, en cambio en las D1-SPNs actúan en la porción media. Por su parte, los VGCCs tipo L participan a partir a lo largo de toda la respuesta sináptica en ambas SPNs.

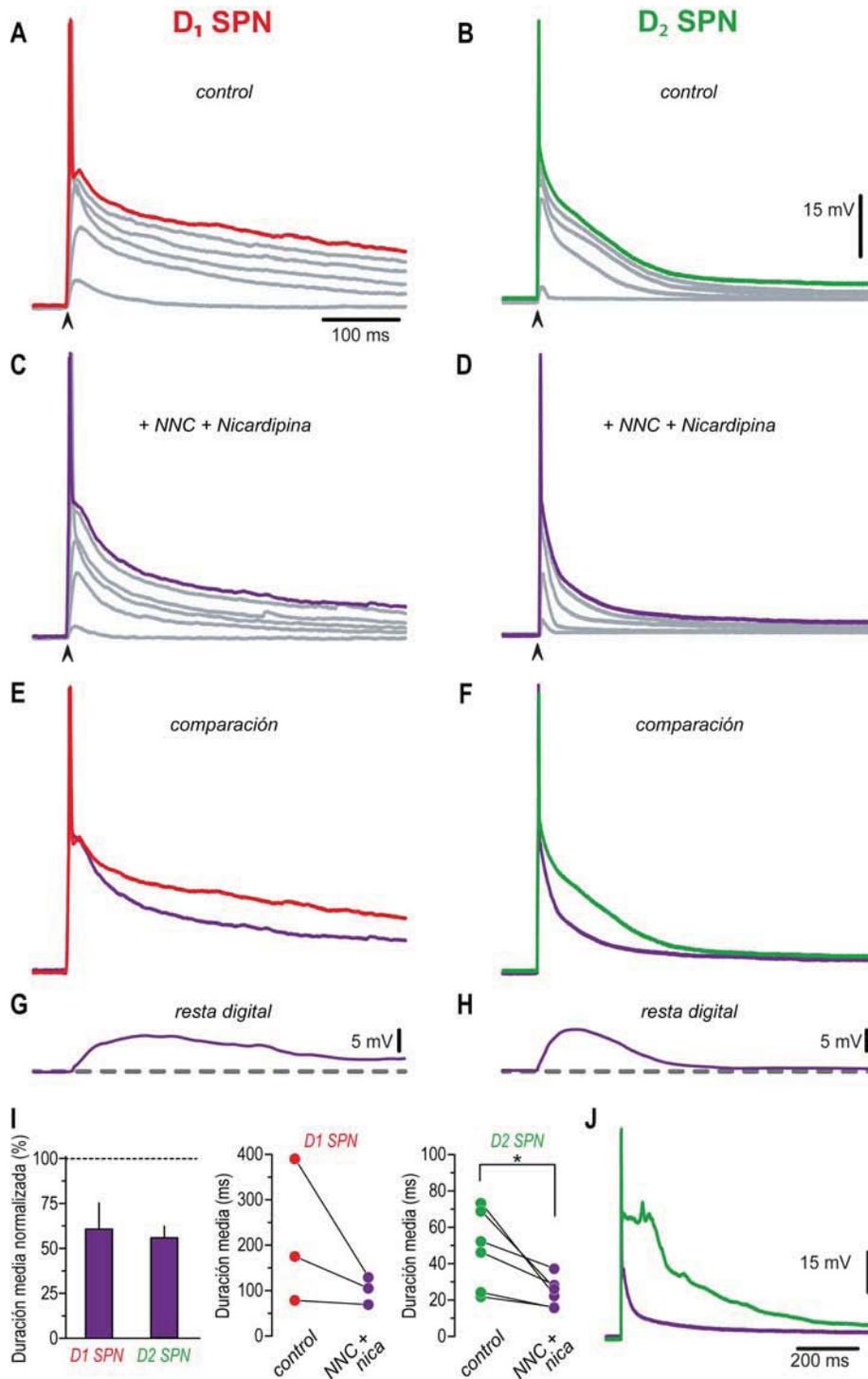


Figura 3.4.2. Aportación de los VGCCs tipo T y L en la integración sináptica cortico-estriatal de las SPNs. Se observan las respuestas control de ambas vías (A y B) y en presencia de 10 μ M de NNC 55-0396 combinado con 5 μ M de nicardipina (C y D; bloqueadores selectivos de los VGCCs T y L, respectivamente). E y F comparan los trazos supraumbrales de cada respuesta. G y H muestran la resta digital de la respuesta experimental ante el control, que nos indica el componente sensible a NNC y nicardipina. En I encontramos los histogramas y las distribuciones de la muestra analizada. Las barras representan la media \pm ESM. D1-SPNs $n = 3$; D2-SPNs $n = 6$; $*p < 0.05$. J muestra un trazo de un potencial autorregenerativo de Ca^{2+} en una D2-SPN y cómo el NNC más la nicardipina merman dicha respuesta. 59

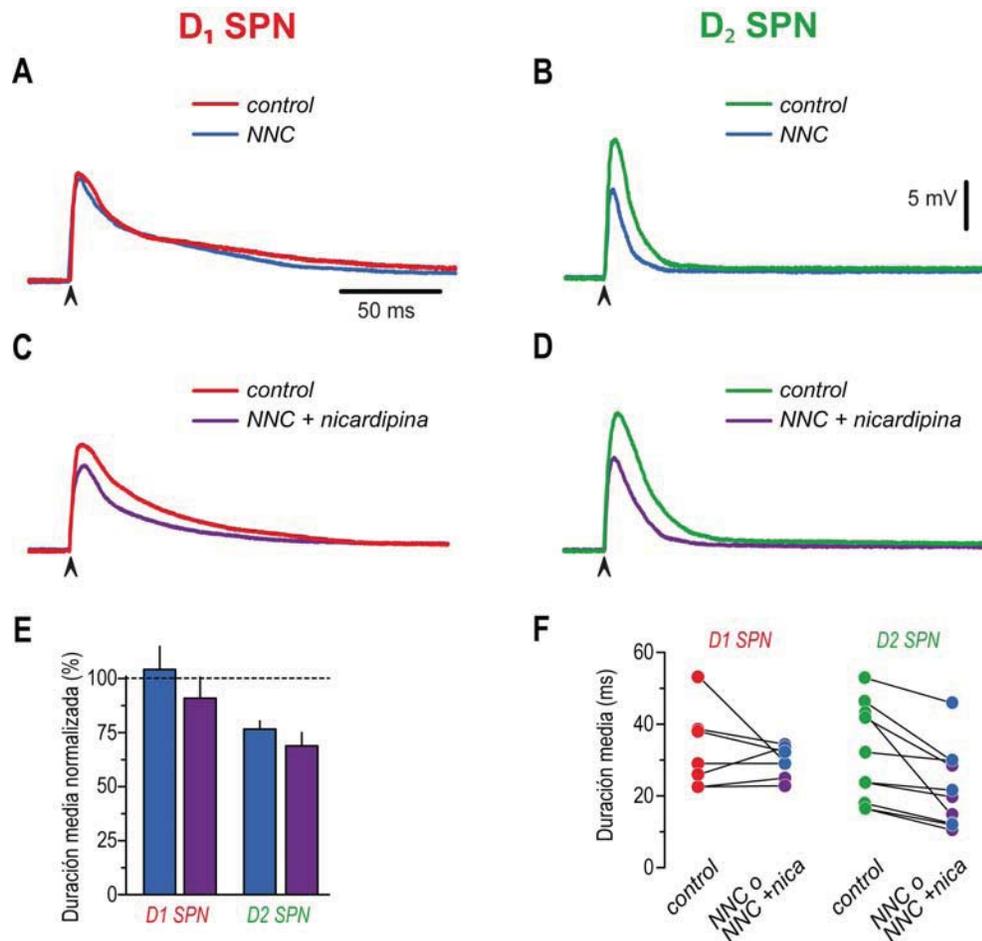


Figura 3.4.3. Aportación de los VGCCs tipo T y L en la respuesta sináptica cortico-estriatal subumbral. Se observa la comparación de un registro subumbral control contra la respuesta al agregar 10 μ M de NNC 55-0396 (A y B) y contra la respuesta ante la adición de 10 μ M NNC-55-0396 más 5 μ M nicardipina (C y D). E y F representan los histogramas y distribuciones de los datos analizados, las barras representan la media \pm ESM. D1-SPNs vs NNC 55-0366 $n = 3$; D1-SPNs vs NNC + nicardipina $n = 4$; D2-SPNs vs NNC $n = 5$; D2-SPNs vs NNC + nicardipina $n = 5$.

3.5. Las diferencias en el efecto GABAérgico de la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs se pueden explicar por conductancias de Ca^{2+} dendríticas a través de VGCCs

Una vez que se encontraron diferencias en la aportación de los VGCCs entre ambas poblaciones de SPNs, se estudió la participación de dichos canales en la inhibición sináptica GABAérgica ante estimulación ortodrómica cortico-estriatal en estas mismas neuronas. Para ello se realizó el mismo protocolo de estimulación en tres condiciones distintas: 1) el control sólo en presencia de bicuculina (10 μM), 2) una vez bloqueados los VGCCs tipo T se agregó bicuculina y 3) el bloqueo en conjunto de los VGCCs tipo T y L más bicuculina. Los resultados se explican a continuación.

En la Fig. 3.5.1A, B se encuentran las comparaciones de una respuesta sináptica cortico-estriatal control (trazo rojo o verde) con el efecto del antagonista a receptores GABA_A bicuculina (negro) en las D1 y D2-SPNs, respectivamente. La aportación GABAérgica en dichas respuesta se ha estudiado previamente (Fig. 3.2.1); hay que recordar que en las D1-SPNs se observa un efecto bifásico ante el bloqueo de los receptores GABA_A y en las D2-SPNs el efecto siempre es despolarizante. Lo cual indica que la transmisión GABAérgica en las D2-SPNs es hiperpolarizante durante toda la respuesta, mientras que en las D1-SPNs primero es hiperpolarizante y después mantiene la meseta de despolarización. Las restas digitales se muestran en la parte inferior y clarifican lo mencionado.

Ahora bien, en el segundo protocolo se agregó la bicuculina en presencia del bloqueador de VGCCs tipo T NNC 55-0396 y se evocó la respuesta sináptica cortico-estriatal en cada tipo de SPN. En las D1-SPNs (Fig. 3.5.1C) se observa que la transmisión sináptica GABAérgica continúa siendo bifásica, pero al comparar la respuesta con la bicuculina control (A) se aprecia una característica distinta. Al eliminar las conductancias de Ca^{2+} a través de los VGCCs tipo T, el efecto de la bicuculina se atenúa en la parte inicial y se mantiene en la tardía. Al analizar las restas digitales es posible conocer el componente sensible a la bicuculina en combinación con el NNC (*inserto abajo*). De tal manera se reporta que la respuesta sináptica GABAérgica inhibitoria en la parte inicial de la respuesta se reduce en ausencia de la corriente de Ca^{2+} y así

mismo en la porción tardía aún mantiene la meseta de despolarización. Este ejemplo aún muestra una inhibición de tipo *shunting*, entonces se estipula que la conductancia a través del VGCC tipo T no interfiere con la dinámica de la inhibición GABAérgica. El valor promedio de la duración media en dichas respuestas equivale a 74 ± 14 ms ($n = 3$; Fig. 3.5.1G, H, I), mientras que la población de células que presentan la bicuculina sola tienen un promedio de 115 ± 16 ms ($n = 15$).

Este efecto se magnifica en el tercer protocolo, al bloquear tanto los VGCCs tipo T como los L y después agregar el bloqueador de los receptores GABA_A. En la Fig. 3.5.1E se compara el trazo control (rojo) contra el efecto de la bicuculina en ausencia de las conductancias de los VGCCs tipo T y L (negro). Se observa como la transmisión sináptica continúa siendo bifásica, aunque esta vez la porción inicial está mucho más reducida que en el caso anterior (comparar C y E). Pero, debido a la falta de corrientes entrantes de Ca²⁺, la meseta de despolarización se merma mucho más que el control sólo con bicuculina (A). En la resta digital se aprecia muy bien las características mencionadas (*inserto abajo*), donde el componente sensible inicial es muy pequeño y el tardío aumenta. Al analizar la duración a la amplitud media de esta respuesta se obtiene un promedio de 58 ± 21 ms ($n = 3$; Fig. 3.5.1G, H, I), lo cual sí muestra una disminución respecto a lo reportado para la bicuculina sola, 115 ± 16 ms ($n = 15$).

En las D2-SPNs, la aportación GABAérgica sobre la respuesta sináptica cortico-estriatal supra-umbral es sumamente sensible a las conductancias de los VGCCs tipo T y L. En la Fig. 3.5.1D se observa como simplemente al agregar NNC la respuesta en presencia de bicuculina (trazo negro) se revierte; es decir, pasa de ser una respuesta hiperpolarizante a una despolarizante. Al observar la resta digital (*inserto abajo*) esto se traduce a que el componente sensible en este caso ayuda a mantener la despolarización del trazo, en lugar de restringirlo como se mostraba en la aportación de la bicuculina sola (Fig. 3.5.1B). El cambio en el valor promedio de la duración media es de 123 ± 20 ms en la condición de sólo bicuculina ($n = 12$) a 36.2 ± 1 ms en presencia de bicuculina más NNC ($n = 2$; Fig. 3.5.1G, H, I). La tendencia es notoria, aunque para alcanzar una significancia estadística se necesita ampliar la muestra estudiada.

En la Fig. 3.5.1F, cuando se registra la respuesta sináptica cortico-estriatal en presencia de bicuculina, NNC y nicardipina, se obtiene un trazo mucho más pequeño que lo reportado para el caso anterior (comparar D y F). Esto quiere decir que la mayor entrada de Ca²⁺ a través de los VGCCs tipo T y L que estas neuronas presentan delimita el efecto GABAérgico sobre las

respuestas sinápticas cortico-estriatales. En otras palabras, al tener muchas corrientes catiónicas entrantes, la transmisión sináptica GABAérgica actúa inhibiendo la alta excitabilidad dendrítica. En contraste, cuando las corrientes de catiónicas desaparecen, el GABA actúa de forma despolarizante, en acuerdo a la transmisión GABAérgica somática que las SPNs presentan. El valor promedio de la duración media en dicha respuesta equivale a 30 ± 4 ms ($n = 6$; Fig. 3.5.1G, H, I) y corresponde una diferencia significativa respecto al promedio en la población de células que presentan la bicuculina sola, 123 ± 20 ms ($n = 12$; $**p < 0.01$).

Al estudiar estas respuestas durante estimulación subumbral se reconoció una diferencia de efectos que la transmisión GABAérgica ejerce sobre las SPNs. En la Fig. 3.5.2 se compara el efecto de la bicuculina respecto a su control (A, B), la combinación de bicuculina más NNC 55-0396 (C, D) y la combinación de bicuculina, NNC y nicardipina (E, F) para ambas poblaciones de SPNs, respectivamente.

En las D1-SPNs los trazos entre uno y otro protocolo son muy similares (comparar A, C y E), el efecto de la bicuculina permanece despolarizante. Las diferencias que se encuentran no son significativamente distintas (Fig. 3.5.2G, H); los valores promedio reportados son: 22 ± 2 ms en presencia de bicuculina ($n = 11$), 27 ± 1 ms al aplicar bicuculina más NNC ($n = 5$) y 24 ± 1 con la combinación bicuculina, NNC más nicardipina ($n = 7$). Estos resultados indican que la participación de los VGCCs no está presente durante estimulaciones subumbrales, apoyando lo reportado en la Fig. 3.4.3.

Por su parte, en las D2-SPNs se muestra como desde estimulaciones que no llegan al umbral de disparo, la transmisión sináptica GABAérgica se revierte, al igual como sucede en estimulaciones supraumbrales. En el registro de la bicuculina sola se reconoce un efecto de la transmisión GABAérgica hiperpolarizante, pues el bloqueador de dicha transmisión ocasiona una respuesta mayor (Fig. 3.5.2B). Tan sólo al aplicar NNC (3.5.2D), el efecto cambia de hiperpolarizante a despolarizante (comparar C y D). Y, nuevamente, la respuesta en presencia de la combinación bicuculina, NNC y nicardipina sigue siendo menor que el trazo control (Fig. 3.5.2F). Esto sugiere que la participación de las conductancias de Ca^{2+} en las D2-SPNs sí está presente desde estimulaciones subumbrales y son muy importantes al momento de delimitar el efecto de la transmisión sináptica GABAérgica.

Los valores promedio de duración media analizados sustentan lo mencionado (Fig. 3.5.2G,

H), se tiene: 33 ± 3 ms en presencia de bicuculina sola ($n = 9$), 38 ± 1 ms al aplicar bicuculina más NNC ($n = 2$) y 19 ± 3 con la combinación bicuculina, NNC más nicardipina ($n = 8$). Las diferencias son significativamente distintas entre el primero y tercer protocolo (** $p < 0.01$), pero no para el primero y segundo. Aunque, en este último caso la tendencia de cambio también es evidente, sólo que la muestra estudiada necesita ampliarse.

En resumen, al interpretar los resultados de esta sección se reconoce que las conductancias mediadas por los VGCCs tipo T y L están relacionados con el efecto de la transmisión sináptica GABAérgica en las SPNs. Especialmente, su aportación es mucho más notoria en las D2-SPNs ante estimulaciones de distintas intensidades. En cambio, en las D1-SPNs sólo actúan en estimulaciones supraumbrales. Además, se enfatiza que la transmisión GABAérgica está compartimentalizada en el componente somático y el dendrítico, y que la dinámica de ésta es distinta entre uno u otro comparimento.

Figura 3.5.1. (En la página siguiente). *A* y *B* muestran los efectos del bloqueador bicuculina solo ante una respuesta control de una D1-SPN y una D2-SPN, con su resta digital respectiva. Después se comparan las respuestas en presencia de bicuculina una vez que se han bloqueado los canales de calcio tipo T (*C* y *D*) y ya que se han bloqueando los canales de calcio T y L (*E* y *F*). Es importante observar como el efecto despolarizante de la bicuculina en las D2-SPNs se revierte en presencia de los bloqueadores de VGCCs; en cambio, en las D1-SPNs la respuesta de bicuculina permanece bifásica, con una ligera atenuación en la porción despolarizante. *G*, *H* e *I* representan los histogramas y distribuciones que resumen los cambios en el efecto GABAérgico en presencia o ausencia de NNC 55-0396 ($10 \mu\text{M}$) y nicardipina ($5 \mu\text{M}$). Las barras representan la media \pm ESM. D1-SPN vs bicuculina + NNC 55-0366 $n = 3$; D1-SPN vs NNC + nicardipina $n = 3$; D2-SPN vs NNC $n = 2$; D2-SPNs vs NNC + nicardipina $n = 6$; ** $p < 0.01$ en base a una prueba Kruskal-Wallis, seguida de un Test de Dunn como *post-hoc*.

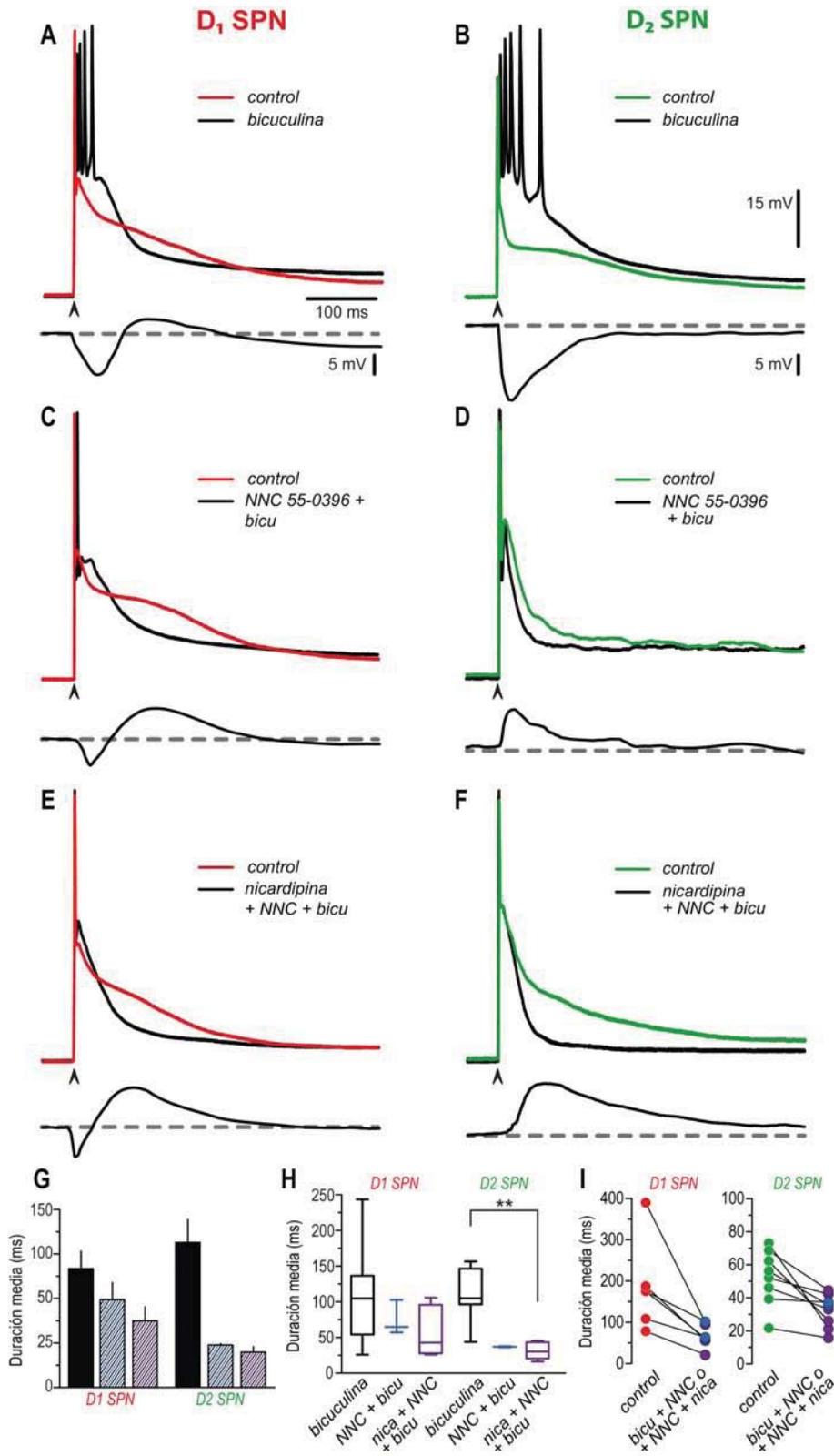


Figura 3.5.1. Comparación del efecto GABAérgico en la integración sináptica cortico-estriatal en presencia y ausencia de los bloqueadores de VGCCs tipo T y L. (Explicación en la página anterior).

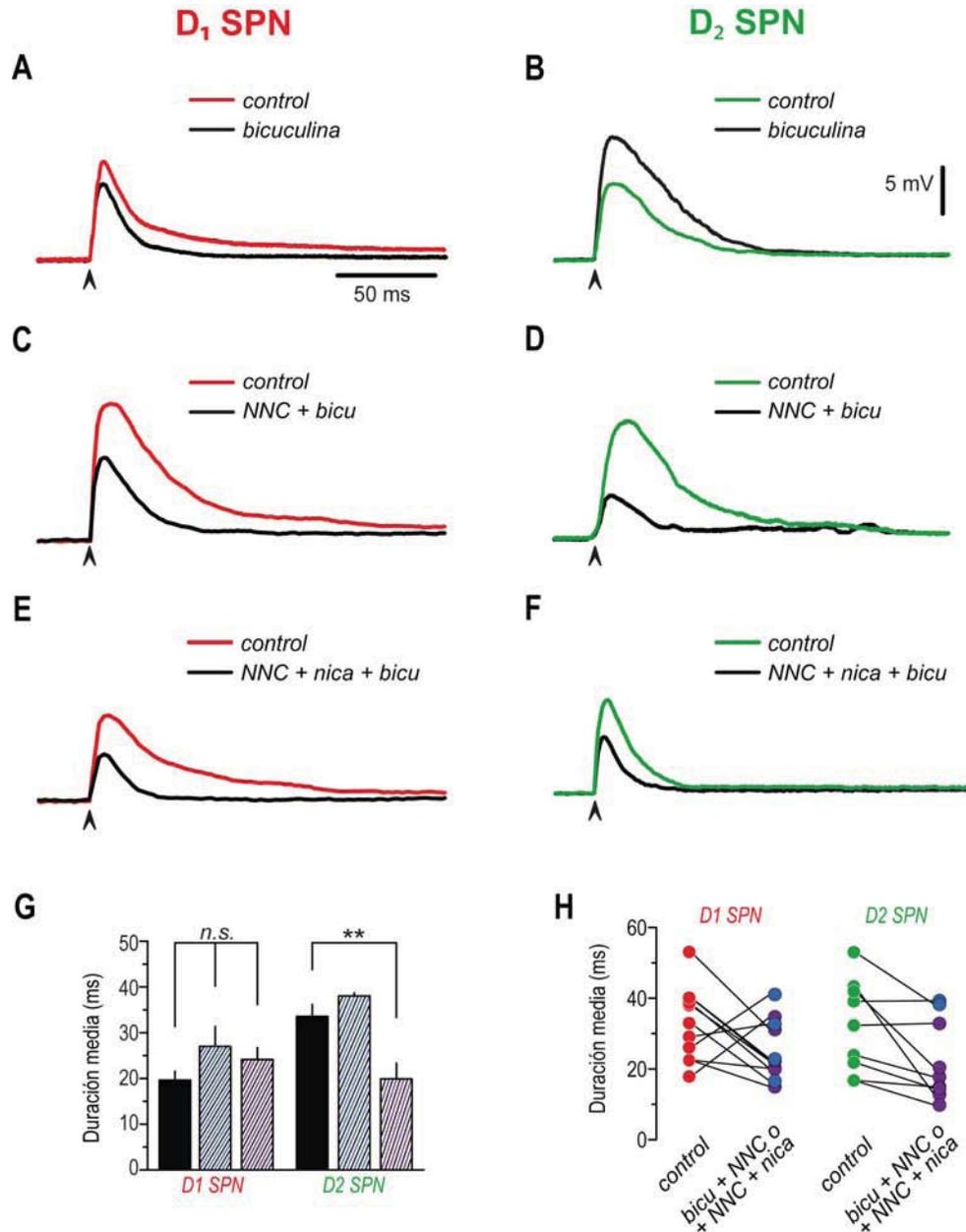


Figura 3.5.2. Comparación del efecto GABAérgico en la respuesta sináptica subumbral ante estimulación ortodrómica en presencia y ausencia de los bloqueadores de VGCCs tipo T y L. A y B muestran los efectos del bloqueador bicuculina solo ante una respuesta control de una D1-SPN y una D2-SPN. También se comparan las respuestas en presencia de bicuculina una vez que se han bloqueado los canales de calcio tipo T (C y D) y cuando se han bloqueado los canales de calcio T y L (E y F). El efecto despolarizante de la bicuculina en las D2-SPNs se revierte desde estimulaciones subumbrales una vez que se aplica NNC 55-0396 (10 μ M) y con la combinación NNC + nicardipina (5 μ M). En cambio, el efecto de la bicuculina en estimulación subumbral de las D1-SPNs con el bloqueo de los VGCCs tipo T y L no genera cambio significativo (G). Las barras representan la media \pm ESM. D1-SPN vs bicuculina + NNC 55-0366 $n = 5$; D1-SPN vs NNC + nicardipina $n = 7$; D2-SPN vs NNC $n = 2$; D2-SPNs vs NNC + nicardipina $n = 8$; $**p < 0.01$ en base a una prueba Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn.

4 Discusión de resultados

Antes de iniciar se deben recordar unos cuantos datos relevantes para esta discusión. Primero, la estimulación cortical permite la activación del microcircuito estriatal total, pues no sólo se dirige a la SPNs, sino que también y con mayor facilidad activa a las interneuronas estriatales. Esto significa que la respuesta evocada tras la estimulación ortodrómica cortico-estriatal involucra tanto excitación glutamatérgica, modulación colinérgica e inhibición GABAérgica (Tepper *et al.* 2008, Vizcarra-Chacón *et al.* 2013). Entonces, al analizar las respuestas generadas en una SPN ante estimulación ortodrómica cortico-estriatal, se obtiene la interacción tanto del comando de las neuronas piramidales, como también el de las interneuronas estriatales y las otras SPNs. Además, la información se integra desde las dendritas, pasa por el soma y llega hasta la membrana axónica, permitiendo así la excitación o inhibición del disparo en las SPNs ante la estimulación de sus aferencias. Este punto es importante ya que refleja la compartimentación que existe dentro de una respuesta sináptica.

Segundo, debido a que las respuestas duran cientos de milisegundos, su composición se basa principalmente en la acción de receptores ionotrópicos y en menor medida en algunos receptores metabotrópicos, como los receptores de ACh tipo muscarínicos (Pérez-Ramírez *et al.* En prensa). Los principales receptores ionotrópicos en el NE son a glutamato (NMDA, AMPA y kainato) y a GABA (GABA_A).

Tercero, la respuesta sináptica GABAérgica que las SPNs presentan a nivel somático siempre resulta despolarizante. Esto se debe a una inhibición tipo *shunting*, en la cual en base a que el PMR es menor al potencial de inversión de la corriente GABAérgica, los iones Cl⁻ generan un flujo neto saliente.

Las respuestas sinápticas ante estímulos corticales de las SPNs son diferentes entre las dos subpoblaciones: en las D1-SPNs la respuesta es más prolongada y evoca mayor número de potenciales de acción; mientras que en las D2-SPNs la respuesta es corta y capaz de exhibir poten-

ciales autorregenerativos de Ca^{2+} (Flores-Barrera *et al.* 2010). Además, al estudiar el papel de la transmisión GABAérgica en la respuesta sináptica cortico-estriatal, se encontró un efecto despolarizante en las D1-SPNs, donde se aumenta la meseta de despolarización de dichas respuestas. Mientras que en las D2-SPNs el efecto es hiperpolarizante en el compartimento dendrítico, lo cual ocasiona una restricción de la despolarización en la respuesta sináptica total (Flores-Barrera *et al.* 2010). Debido a que las aferencias de ambas SPNs son similares entre sí, este efecto disímil de la integración sináptica GABAérgica se debe explicar mediante la variación de algunas propiedades intrínsecas a las SPNs.

En este trabajo se analizaron dos propiedades intrínsecas capaces de respaldar la distinta integración GABAérgica en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs.

4.1. Cotransportadores de cloro

Al estudiar la expresión de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 no se encontraron diferencias entre las dos subpoblaciones de SPNs. Ambos tipos neuronales presentan el importador NKCC1 en el soma, preferentemente (Fig. 3.3.1); a la vez que la expresión del transportador KCC2 está ausente en ambas SPNs, tanto en sus somas como en sus procesos dendríticos (Fig. 3.3.2 y 3.3.3). Sin embargo, sí se reconoció una marca del exportador KCC2 dentro el NE, la cual se ubicaba principalmente en los procesos dendríticos o axónicos. Por tanto, se puede inferir que algunas interneuronas estriatales o incluso las terminales de neuronas piramidales, talámicas o de otras aferentes contienen este exportador de Cl^- (Fig. 3.3.2,3.3.3).

El hecho de que el importador de Cl^- sí este presente en las SPNs, pero el exportador no, permite explicar el efecto despolarizante de la transmisión GABAérgica a nivel somático de las SPNs y coincide con lo reportado para neuronas en desarrollo presentes en el SNC (Ben-Ari *et al.* 2012). Incluso, al pensar que existe una entrada continua de Cl^- a través del transportador NKCC1, se puede agregar esta fuente junto a las corrientes persistentes de K^+ (Bargas *et al.* 1989, Nisenbaum & Berger 1992), como las encargadas de mantener un PMR somático mucho más hiperpolarizado en las SPNs (-85 mV) que en la mayoría de las neuronas en el SNC (-65 mV).

Otro hecho que cabe destacar es cómo las SPNs son similares a neuronas en desarrollo o que

presentan ciertas patologías debido al efecto despolarizante que el GABA ejerce sobre ellas, aunque sea dentro del compartimento somático. Esto se explica, en parte, debido a la ausencia en la expresión del transportador de Cl^- KCC2 que presentan. Si se recuerda, esta característica se manifiesta en neuronas en desarrollo debido a que las sinapsis excitatorias glutamatérgicas aparecen después que las GABAérgicas (Ben-Ari 2014). Indicando que las células encuentran una manera de balancear la falta de excitación. Tal vez en el NE ocurra algo similar en los circuitos de animales adultos, puesto que las sinapsis inhibitorias predominan respecto a las excitatorias, se puede pensar que las SPNs intentan balancear dicha dominancia al permitir una respuesta GABAérgica despolarizante. Aún así, cualquiera que sea la explicación, lo importante es reconocer el efecto GABAérgico despolarizante en las SPNs como uno más en los escasos, pero existentes ejemplos de neuronas adultas y sanas.

Para propósitos de este trabajo, los resultados de la expresión de transportadores de Cl^- no explican porqué a nivel dendrítico se observan efectos GABAérgicos distintos entre una y otra SPNs, ya que ningún cotransportador se expresa en las dendritas y además, su expresión es igual en ambas subpoblaciones de SPNs. A pesar de que la concentración de Cl^- intracelular difiere a lo largo de la membrana axo-somato-dendrítica en algunas neuronas del SNC (Báldi *et al.* 2010, Glykys *et al.* 2014), es poco probable que exista una variación muy contrastante al interior de la membrana de las SPNs debido a que el principal exportador de Cl^- no se encuentra ni en el soma, ni en las dendritas. Aún, esta inferencia necesita un análisis más detallado pues existen otros transportadores de Cl^- menos comunes que no fueron analizados en este trabajo (Payne *et al.* 2003, Blaesse *et al.* 2009, Mao *et al.* 2012). Pero, a pesar de esto, sí se reportan diferencias en la transmisión GABAérgica en base a otra propiedad intrínseca característica de las SPNs.

4.2. Corrientes dendríticas de calcio

Mediante registros intracelulares que no alteran la concentración de iones al interior de la membrana somatodendrítica, se comprobó que las conductancias mediadas por los VGCCs tipo T y L participan durante la meseta despolarizante evocada por estímulos corticales en las SPNs. En las D1-SPNs la participación de los VGCCs tipo T es muy pequeña ante estimulaciones supraumbrales (Fig. 3.4.1A, C, E) y nula en estímulos subumbrales (Fig. 3.4.3A). Por su parte, el VGCC tipo L sí participa durante las estimulaciones supraumbrales (Fig. 3.4.2A, C, E), pero no en las subumbrales (Fig. 3.4.3C). En las D2-SPNs, las conductancias a través de los VGCCs tipo

T y L sí están presentes ante distintas intensidades de estimulación y la aportación de los VGCCs tipo T es mayor que en las D1-SPNs. Específicamente, forman las respuestas autorregenerativas de Ca^{2+} en la estimulación supraumbral (Figs. 3.4.1B, D, F y 3.4.2B, D, F) y aumentan la despolarización en estimulaciones subumbrales ((Fig. 3.4.3B, D).

Los datos anteriores, obtenidos mediante registros electrofisiológicos, comprueban la participación del VGCC tipo L en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs reportada por Flores-Barrera *et al.* (2011). Además, reconocen que en esta respuesta ambas SPNs presentan un componente mediado por el VGCC tipo T, pero la aportación de dicho canal es mayor en las D2-SPNs en comparación con las D1-SPNs. Este hecho coincide con estudios realizados mediante técnicas de imagenología de Ca^{2+} en las dendritas de SPNs, donde se identifica la distinta aportación de Ca^{2+} que presentan dado los diversos tipos de VGCCs (Carter & Sabatini 2004, Higley & Sabatini 2010). En este trabajo, además se añade una clara distinción entre las subpoblaciones de SPNs; por tal, se propone que el VGCC tipo T tiene una mayor participación en las dendritas de las D2-SPNs y que, aunque este mismo canal se encuentra también en las D1-SPNs, su participación está disminuida.

Es relevante resaltar que los VGCCs tipo T son activados a umbrales bajos (-65 mV), mientras que los VGCCs tipo L son de alto umbral (-45 mV). De esta manera, durante los estados hiperpolarizados (estados *down*) de las SPNs resulta de suma importancia la aportación del VGCC tipo T y en los estados despolarizados, el tipo L es predominante dada la activación de una gran corriente entrante (de ahí el acrónimo L, por *large*, grande en inglés) (Carter & Sabatini 2004). Al recordar que en las D2-SPNs se ha registrado una mayor excitabilidad dendrítica que en las D1-SPNs y que no es debida a la falta de VGCCs en las dendritas de las D1-SPNs (Day *et al.* 2008); se puede argumentar que el VGCC tipo T permite una entrada de Ca^{2+} significativa en las D2-SPNs y esto eleva su excitabilidad dendrítica. En cambio, en las D1-SPNs la entrada de Ca^{2+} a través de la menor participación de los VGCCs tipo T no resulta suficiente para permitir la generación de espigas de Ca^{2+} y por consiguiente, su excitabilidad dendrítica está reducida.

La mayor aportación de los VGCCs tipo T en las D2-SPNs respecto a las D1-SPNs también coincide con reportes sobre la contribución de conductancias de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (BK y SK) en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs (Arias-García *et al.* 2013). El estudio menciona que las corrientes a través de los canales BK y SK actúan más temprano en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las D2-SPNs en comparación con las D1-

SPNs. Dado este hecho, se sugiere que la mayor disponibilidad de Ca^{2+} en las dendritas de las D2-SPNs es capaz de activar corrientes BK y SK, resultando en una medida mediante la cual estas neuronas restringen su despolarización al acortar la duración de la respuesta sináptica. En contraste, debido a la baja aportación de los VGCCs tipo T, en las D1-SPNs se requieren de otras fuentes de Ca^{2+} (entrada a través de receptores NMDA, AMPA y kainato) para lograr la activación de las corrientes BK y SK. De esta forma, se lleva a cabo una participación más tardía de dichas corrientes en la respuesta sináptica cortico-estriatal, permitiendo la prolongación de la meseta de despolarización.

También se debe mencionar que el aumento de la excitabilidad dendrítica en las D2-SPNs, junto con otras características fisiológicas y anatómicas, permite que estas neuronas sean activadas más fácilmente que las D1-SPNs (Gertler *et al.* 2008). Por tanto, al momento de la invasión cortical sobre el NE, las D2-SPNs serían capaces de reclutarse con mayor rapidez y desde estimulaciones menores en comparación con las D1-SPNs. De hecho, la menor latencia de activación que presentan ante estimulación cortical es una prueba de esta suposición (Vizcarra-Chacón *et al.* 2013). Esto es de enorme relevancia al intentar esclarecer la dinámica del microcircuito estriatal.

Retomando, la inhibición GABAérgica en la integración sináptica cortico-estriatal está sujeta a la despolarización dendrítica producida por la entrada de Ca^{2+} en las SPNs (Fig. 3.5.1 y 3.5.2). Como existe mayor entrada de Ca^{2+} en las D2-SPNs, la transmisión sináptica GABAérgica tiene un efecto inhibitorio en el compartimento dendrítico durante toda la respuesta cortico-estriatal, sugiriendo que compone un freno ante su alta excitabilidad. Al eliminar las corrientes de los VGCCs tipo T y L se merma la entrada de Ca^{2+} y por tanto, la excitabilidad dendrítica en estas neuronas. Es entonces cuando la transmisión sináptica GABAérgica se vuelve despolarizante. Una interpretación podría ser que como ya no hay un aumento de la excitabilidad dendrítica a compensar en estas neuronas, la transmisión GABAérgica ya no necesita ser hiperpolarizante; y entonces pasa a ser despolarizante, tal y como sucede en el compartimento somático y en las D1-SPNs. También se puede decir que debido a la gran entrada de corrientes catiónicas a través de los VGCCs estudiados, el PMR de la dendrita se eleva por encima del potencial de inversión de la conductancia GABAérgica, ocasionando que el flujo de iones Cl^- sea hacia el interior celular.

Ahora bien, en las D1-SPNs la inhibición sináptica durante estimulación supraumbral posee un componente bifásico, donde predomina la porción tardía que participa en el aumento de la meseta despolarizante ante estimulación cortico-estriatal. Este efecto coincide con lo reportado

en el compartimento somático de las SPNs (Flores-Barrera *et al.* 2009), donde la transmisión GABAérgica es despolarizante. La porción inicial de la respuesta sináptica presenta una gran despolarización membranal (EPSP) debido a la rápida activación de los receptores a glutamato, lo cual permite suponer que estas neuronas ya no necesitan más despolarización y por consiguiente el neurotransmisor GABA tiene un efecto hiperpolarizante. Si se agrega que las corrientes de los VGCCs tipo T y L también están involucradas en el aumento de la meseta despolarizante, la eliminación de dichas corrientes disminuye la meseta al igual que si se elimina la contribución GABAérgica (Fig. 3.5.1A, C, E). Sin embargo, dicha entrada de corrientes catiónicas no es suficiente para elevar el PMR dendrítico por encima del potencial inversor de la conductancia GABAérgica, resultando en un flujo neto de iones Cl^- saliente. En estimulaciones subumbrales la transmisión GABAérgica también es despolarizante, pero la aportación de corrientes catiónicas entrantes a través de los VGCCs estudiados es muy pequeña (Fig. 3.5.2A, C). Esto también sugiere que el PMR permanece por debajo del potencial de inversión de la conductancia GABAérgica, ocasionando una salida de iones Cl^- .

El esquema propuesto queda representado en la Figura 4.2.1, donde se observa que el efecto despolarizante o hiperpolarizante de la transmisión sináptica GABAérgica ejerce durante la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs depende del PMR dendrítico de cada célula. En las dendritas de las SPNs, el PMR es altamente sensible a la cantidad de Ca^{2+} intracelular y este último varía en función de la expresión de los VGCCs tipo T y L. Por tanto, se obtiene que la contribución GABAérgica diferente en la respuesta sináptica cortico-estriatal de ambas SPNs está dada por la diferencia en la excitabilidad dendrítica dependiente de Ca^{2+} .

Un hecho controversial ante estos resultados podría argumentar que el efecto diferente de la inhibición GABAérgica sobre las SPNs en realidad estaría gobernado por un cambio en la pre-sinapsis glutamatérgica al bloquear las conductancias de VGCCs, más que por los efectos intrínsecos a la post-sinapsis. Dado los resultados revelados resulta difícil explicar esta situación ya que al bloquear los VGCCs en las células piramidales, la liberación de glutamato debería mermarse y dejaría de producir tanto excitación glutamatérgica como inhibición GABAérgica despolarizante mediada por la activación de las interneuronas ante estímulos corticales en las dendritas de las SPNs, fenómeno que no ocurre. Aún así, es importante esclarecer todas las dudas, por lo que se propone un simple ensayo capaz de comprobar la propiedad intrínseca a las SPNs como responsable de las diferencias en la inhibición sináptica cortico-estriatal. El expe-

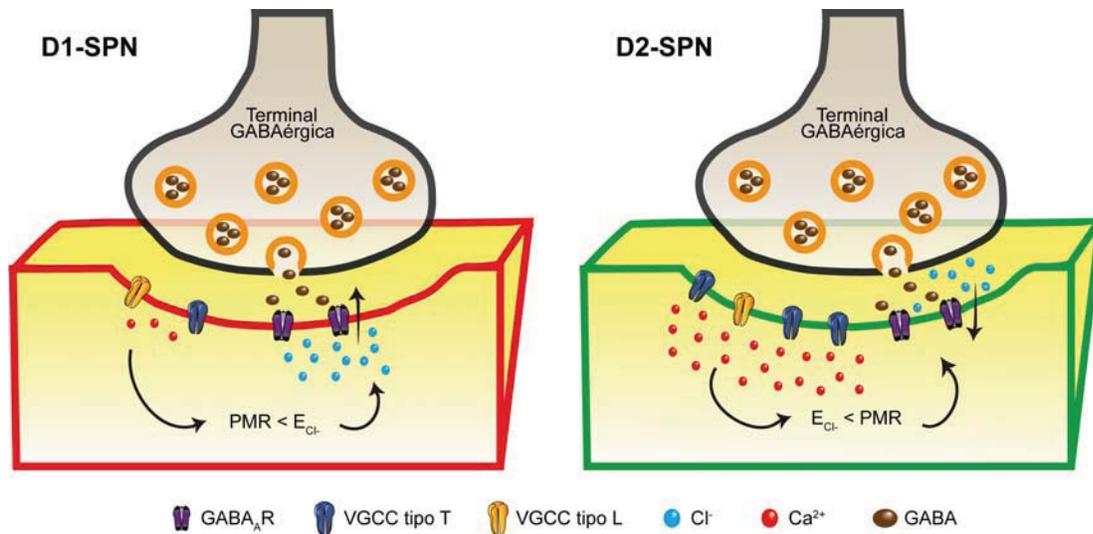


Figura 4.2.1. La integración sináptica GABAérgica es diferente en las dendritas de las SPNs. Se observa un esquema de la sinapsis en una D1-SPN y de una D2-SPN. El dibujo resalta las diferencias en la expresión de VGCCs entre ambos tipos de neuronas, provocando una mayor concentración intracelular de Ca^{2+} en las D2-SPNs respecto a las D1-SPNs. También se ejemplifica que el efecto GABAérgico de la integración sináptica cortico-estriatal es excitador o inhibitorio, en función de si el PMR es menor o mayor al potencial inversor del Cl^- . De esta manera, resulta claro reconocer la sinapsis derivativa en las D2-SPNs. PMR, potencial de membrana en reposo; E_{Cl^-} , potencial de inversión del ión Cl^- .

rimento consiste en estudiar la aportación GABAérgica al aplicar bicuculina durante la misma respuesta cortico-estriatal, pero ahora agregar un quelante de Ca^{2+} intracelular en el microelectrodo de registro. Si las diferencias se deben a propiedades intrínsecas, el efecto GABAérgico se vería afectado de igual manera que en los resultados presentados en este trabajo.

4.3. Relevancia fisiológica en el microcircuito estriatal

Al estudiar la inhibición GABAérgica en la respuesta sináptica cortico-estriatal podemos entender la dinámica del microcircuito estriatal. Si se recuerda, la importancia de las mesetas de voltaje despolarizante radica en que funcionan como ventanas para la sincronización de la actividad de ensamblajes neuronales (Carter & Sabatini 2004). Esto sugiere que existe mayor posibilidad de sincronización entre las D1-SPNs, ya que poseen mesetas de despolarización más prolongadas. Sin embargo, aquí también entra en juego la mayor excitabilidad dendrítica en las D2-SPNs mediada, principalmente por los VGCCs tipo T. Existen estudios que relacionan las conductancias a través del VGCC tipo T con la sincronización entre neuronas, ya que éstos permiten un disparo en rebote al mismo tiempo en algunas neuronas del SNC (Alviña *et al.* 2009). Por lo que,

al parecer, las propiedades intrínsecas de estas neuronas modulan su capacidad de participación en los ensambles corticales y, a pesar de ser diferentes, permiten tener un resultado balanceado al momento de sincronizar los distintos estados de la red estriatal (Carrillo-Reid *et al.* 2008).

Si a esto se suma que la inhibición sináptica permite que un grupo determinado de neuronas oscile de forma coherente (Surmeier *et al.* 2009), la transmisión sináptica GABAérgica también debe balancear la proporción de participación de diferentes SPNs para lograr una correcta sincronización. En efecto, en este caso, este componente aumenta las mesetas de despolarización en las D1-SPNs y contrarresta la alta excitabilidad en las D2-SPNs. De esta manera, cumple la función de reiniciar el microcircuito para garantizar la disponibilidad de este tipo de neuronas ante un comando de activación.

Pero, ¿acaso existen otros componentes del microcircuito estriatal capaces de mediar el desbalance en la excitabilidad dendrítica entre las SPNs? La respuesta es sí, existen más neurotransmisores que intentan restringir la excitabilidad en las D2-SPNs, mientras que aumentan la excitación de las D1-SPNs. Si se recuerda, el efecto de la DA en estas neuronas aumenta la frecuencia de disparo en las D1-SPNs y la disminuye en las D2-SPNs (Hernández-López *et al.* 1997; 2000). También se ha estudiado el efecto de la DA en la respuesta sináptica cortico-estriatal y se encontró el mismo efecto: la DA mantiene la meseta despolarizante en las D1-SPNs, pero la disminuye en las D2-SPNs (Flores-Barrera *et al.* 2011). Otro caso es el de la ACh, la cual tiene un efecto similar a través de los receptores M1 y M4. Se ha observado que la activación del receptor M4 incrementa una corriente entrante de Ca^{2+} a través de los VGCCs tipo L y son las D1-SPNs que poseen ambos receptores, ya que las D2-SPNs sólo contienen el M1. Estos resultados, aunados a la transmisión GABAérgica establecen que dentro del circuito estriatal existen muchos componentes que aumentan la despolarización y excitabilidad en las D1-SPNs, mientras que las disminuyen en las D2-SPNs.

Por lo tanto, la inhibición en el microcircuito cortico-estriatal, aunada a la modulación dopaminérgica y colinérgica diferencial en las SPNs, forman un componente importante durante la reverberación y alternancia entre ensambles estriatales, los cuales resultan en la dinámica del microcircuito del NE capaz de formar el correlato neuronal del movimiento.

5 Conclusiones

Con el presente trabajo se obtuvieron los siguientes resultados:

1. La comprobación de que la respuesta sináptica cortico-estriatal es diferente entre las SPNs. Las D1-SPNs tienen respuestas más prolongadas, mientras que en las D2-SPNs son más cortas.
2. La contribución GABAérgica sobre dicha respuesta también es diferente entre las SPNs.
3. La localización del cotransportador de Cl^- NKCC1 se encuentra preferentemente en el compartimento somático de ambos tipos de SPNs. En cambio, el cotransportador KCC2 a pesar de encontrarse en el NE, no está presente ni en el soma ni en las dendritas de las SPNs.
4. La participación de conductancias de Ca^{2+} a través de los VGCCs tipo T durante las respuestas sinápticas es mayor en las D2-SPNs que en las D1-SPNs. Además, su contribución es evidente aun en respuestas sinápticas subumbrales. Esto influye en el aumento de la excitabilidad dendrítica que las D2-SPNs presentan.
5. La participación de conductancias de Ca^{2+} a través de los VGCCs tipo L es similar en ambas neuronas.
6. La integración sináptica GABAérgica mencionada depende de la despolarización dendrítica alcanzada en cada SPN a partir de la entrada de corrientes de Ca^{2+} a través de VGCCs tipo T y L.
7. Por tanto, la inhibición sináptica GABAérgica a partir de una estimulación cortico-estriatal es diferente en las SPNs debido a los cambios en el potencial de membrana ocasionados por la activación de VGCCs localizados en las dendritas.

Dicho de una forma más detallada, se comprobó una vez más, la diferencia en la respuesta sináptica cortico-estriatal que existe entre las D1-SPNs y las D2-SPNs; la cual aporta una característica electrofisiológica específica para cada subpoblación de SPNs, permitiendo su identificación al momento de realizar los registros. También se comprobó la contribución GABAérgica disímil que existe en la integración sináptica cortico-estriatal de ambas tipos de SPNs.

Por otro lado, se identificó la expresión del cotransportador NKCC1 y la ausencia del cotransportador KCC2 en ambas SPNs, sumando información relevante al momento de explicar el PMR tan hiperpolarizado presente en estas células.

Además, se reconoció el aporte de las conductancias a través de los VGCCs tipo T y L en la respuesta sináptica estudiada; indicando una diferencia en el efecto mediado por el VGCC tipo T, ya que su aportación es mayor sobre la respuesta de las D2-SPNs en comparación con la de las D1-SPNs. Este resultado marca uno de los pocos precedentes acerca de la aportación del VGCC tipo T en las dendritas de las SPNs, la cual antes era descartada. Por si fuera poco, este hecho resulta explicar de manera conjunta la diferencia en la excitabilidad dendrítica entre las dos subpoblaciones de SPNs.

Sin duda alguna, la piedra angular de este trabajo consistió en reconocer el origen intrínseco que subyace al diferente efecto GABAérgico durante la integración sináptica ante estímulos ortodróxicos corticales entre una y otra SPN. Se determinó que este hecho se debe a la mayor aportación de los VGCCs tipo T en las dendritas de las D2-SPNs en comparación con las D1-SPNs; situación que modifica la excitabilidad en estas neuronas y las vuelve propensas a un efecto GABAérgico hiperpolarizante o despolarizante, respectivamente. A la par, se descartó la explicación aceptada para otros tipos neurales del SNC, donde el desbalance en la expresión de los cotransportadores de cloro NKCC1 y KCC2 a lo largo de la membrana somato-dendrítica subyace el efecto disímil en la inhibición mediada por el receptor GABA_A.

Es importante resumir que la mayor excitabilidad dendrítica que las D2-SPNs presentan en comparación con las D1-SPNs desencadena dos efectos: primero, que ante estímulos corticales de menor intensidad respondan con despolarizaciones mayores que las D1-SPNs y que generen potenciales dendríticos de Ca²⁺ autorregenerativos. Esto, a su vez ocasiona que en las D2-SPNs el efecto sináptico GABAérgico sea completamente hiperpolarizante y que se activen de forma más pronta y con mayor participación corrientes de K⁺ dependientes de Ca²⁺. Lo cual determina

la respuesta sináptica cortico-estriatal en las D2-SPNs y resulta en dos mecanismos mediante los cuales la mayor excitabilidad se logra balancear.

Por último, quisiera resaltar la importancia de estos resultados en el sentido de que forman un estudio pionero sobre la relación electroquímica que se tiene entre los iones Cl^- y Ca^{2+} , la cual es capaz de delimitar el efecto que el neurotransmisor GABA tiene sobre las SPNs.

Bibliografía

- Albin, RL, Young, AB & Penney, JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12(10):366–375.
- Alviña, K, Ellis-Davies, G & Khodakhah, K (2009) T-type calcium channels mediate rebound firing in intact deep cerebellar neurons. *Neurosci*, 158(2):635–641.
- Arias-García, MA, Tapia, D, Flores-Barrera, E, Pérez-Ortega, JE, Bargas, J & Galarraga, E (2013) Duration differences of corticostriatal responses in striatal projection neurons depend on calcium activated potassium currents. *Front Syst Neurosci*, 7:63.
- Báldi, R, Varga, C & Tamás, G (2010) Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells. *European Journal of Neuroscience*, 32(8):1319–1325.
- Bargas, J, Ayala, GX, Hernández, E & Galarraga, E (1998) Ca²⁺-channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res Bull*, 45(5):521–524.
- Bargas, J, Galarraga, E & Aceves, J (1989) An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res*, 75(1):146–156.
- Bargas, J, Galarraga, E & Aceves, J (1991) Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res*, 539(1):159–163.
- Bargas, J, Howe, A, Eberwine, J, Cao, Y & Surmeier, D (1994) Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci*, 14(11):6667–6686.
- Barnes, TD, Kubota, Y, Hu, D, Jin, DZ & Graybiel, AM (2005) Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature*, 437(7062):1158–1161.
- Barroso-Flores, J, Herrera-Valdez, MA, López-Huerta, VG, Galarraga, E & Bargas, J (En prensa) Diverse short-term dynamics of Inhibitory synapses converging on striatal projection neurons: differential changes in a rodent model of Parkinson's disease. *Neural Plast*.

- Bartos, M, Vida, I & Jonas, P (2007) Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci*, 8(1):45–56.
- Ben-Ari, Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, 3(9):728–739.
- Ben-Ari, Y (2014) The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: A personal journey. *Neurosci*, 279(0):187 – 219.
- Ben-Ari, Y, Woodin, MA, Sernagor, E, Cancedda, L, Vinay, L, Rivera, C, Legendre, P, Luhmann, HJ, Bordey, A, Wenner, P *et al.* (2012) Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever! *Front Cell Neurosci*, 6.
- Bennett, BD & Wilson, CJ (2003) *Synaptology and physiology of neostriatal neurons. In: Brain dynamics and the striatal complex.* CRC Press.
- Blaesse, P, Airaksinen, MS, Rivera, C & Kaila, K (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*, 61(6):820–838.
- Carrillo-Reid, L, Tecuapetla, F, Tapia, D, Hernández-Cruz, A, Galarraga, E, Drucker-Colin, R & Vargas, J (2008) Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol*, 99(3):1435–1450.
- Carter, AG & Sabatini, BL (2004) State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron*, 44(3):483–493.
- Carter, AG, Soler-Llavina, GJ & Sabatini, BL (2007) Timing and location of synaptic inputs determine modes of subthreshold integration in striatal medium spiny neurons. *J Neurosci*, 27(33):8967–8977.
- Cepeda, C, Andréé, VM, Yamazaki, I, Wu, N, Kleiman-Weiner, M & Levine, MS (2008) Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *Eur J Neurosci*, 27(3):617–682.
- Chamma, I, Chevy, Q, Poncer, JC & Lévi, S (2012) Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front Cell Neurosci*, 6.
- Choi, HJ, Lee, CJ, Schroeder, A, Kim, YS, Jung, SH, Kim, JS, Son, EJ, Han, HC, Hong, SK, Colwell, CS *et al.* (2008) Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 28(21):5450–5459.
- Day, M, Wokosin, D, Plotkin, JL, Tian, X & Surmeier, DJ (2008) Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J Neurosci*, 28(45):11603–11614.
- Flores-Barrera, E, Laville, A, Plata, V, Tapia, D, Vargas, J & Galarraga, E (2009) Inhibitory

- contribution to suprathreshold corticostriatal responses: an experimental and modeling study. *Cell Mol Neurobiol*, 29(5):719–731.
- Flores-Barrera, E, Vizcarra-Chacón, BJ, Bargas, J, Tapia, D & Galarraga, E (2011) Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front Syst Neurosci*, 5:15.
- Flores-Barrera, E, Vizcarra-Chacón, BJ, Tapia, D, Bargas, J & Galarraga, E (2010) Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front Syst Neurosci*, 4:15.
- Foehring, RC, Mermelstein, PG, Song, WJ, Ulrich, S & Surmeier, DJ (2000) Unique properties of R-type calcium currents in neocortical and neostriatal neurons. *J Neurophysiol*, 84(5):2225–2236.
- Fujiyama, F, Sohn, J, Nakano, T, Furuta, T, Nakamura, KC, Matsuda, W & Kaneko, T (2011) Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *Eur J Neurosci*, 33(4):668–677.
- Fukuda, A (2005) Diuretic soothes seizures in newborns. *Nat Med*, 11(11):1153–1154.
- Galarraga, E, Bargas, J, Sierra, A & Aceves, J (1989) The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res*, 75(1):157–168.
- Galarraga, E, Herná-López, S, Reyes, A, Barral, J & Bargas, J (1997) Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca²⁺ conductance. *Neuroreport*, 8(9):2183–2186.
- Galarraga, E, Pacheco-Cano, M, Flores-Hernandez, J & Bargas, J (1994) Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res*, 100(2):239–249.
- Gertler, TS, Chan, CS & Surmeier, DJ (2008) Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J Neurosci*, 28(43):10814–10824.
- Gittis, AH, Nelson, AB, Thwin, MT, Palop, JJ & Kreitzer, AC (2010) Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *J Neurosci*, 30(6):2223–2234.
- Glykys, J, Dzhalala, V, Egawa, K, Balena, T, Saponjian, Y, Kuchibhotla, K, Bacskai, B, Kahle, K, Zeuthen, T & Staley, K (2014) Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration. *Science*, 343(6171):670–675.
- Graybiel, AM (1997) The basal ganglia and cognitive pattern generators. *Schizophr Bull*, 23(3):459–469.
- Graybiel, AM (2000) The basal ganglia. *Curr Biol*, 10:R509–R511.
- Graybiel, AM (2005) The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol*, 15(6):638–644.

- Gulácsi, A, Lee, CR, Sík, A, Viitanen, T, Kaila, K, Tepper, JM & Freund, TF (2003) Cell type-specific differences in chloride-regulatory mechanisms and GABAA receptor-mediated inhibition in rat substantia nigra. *J Neurosci*, 23(23):8237–8246.
- Haam, J, Popescu, IR, Morton, LA, Halmos, KC, Teruyama, R, Ueta, Y & Tasker, JG (2012) GABA is excitatory in adult vasopressinergic neuroendocrine cells. *J Neurosci*, 32(2):572–582.
- Herculano-Houzel, S (2012) The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Nat Acad Sci*, 109:10661–10668.
- Hernández-Flores, T, Hernández-González, O, Pérez-Ramírez, MB, Lara-González, E, Arias-García, MA, Duhne, M, Pérez-Burgos, A, Prieto, GA, Figueroa, A, Galarraga, E & Bargas, J (2015) Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M4-type receptors. *Neuropharmacol*:232–244.
- Hernández-López, S, Bargas, J, Surmeier, DJ, Reyes, A & Galarraga, E (1997) D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca^{+2} conductance. *J Neurosci*, 17(9):3334–3342.
- Hernández-López, S, Tkatch, T, Pérez-Garci, E, Galarraga, E, Bargas, J, Hamm, H & Surmeier, DJ (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-Type Ca^{+2} currents and excitability via a novel $PLC\beta 1$ –IP3–calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci*, 20(24):8987–8995.
- Higley, MJ & Sabatini, BL (2008) Calcium signaling in dendrites and spines: practical and functional considerations. *Neuron*, 59(6):902–913.
- Higley, MJ & Sabatini, BL (2010) Competitive regulation of synaptic Ca^{2+} influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat Neurosci*, 13(8):958–966.
- Higley, MJ & Sabatini, BL (2012) Calcium signaling in dendritic spines. *Cold Spring Harb Perspec Biol*, 4(4):a005686.
- Huerta-Ocampo, I, Mena-Segovia, J & Bolam, JP (2014) Convergence of cortical and thalamic input to direct and indirect pathway medium spiny neurons in the striatum. *Brain Struct Funct*, 219(5):1787–1800.
- Ibáñez-Sandoval, O, Tecuapetla, F, Unal, B, Shah, F, Koós, T & Tepper, JM (2010) Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. *J Neurosci*, 30(20):6999–7016.
- Jiang, Z & North, R (1991) Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *J Physiol*, 443(1):533–553.

- Kawaguchi, Y, Wilson, CJ, Augood, SJ & Emson, PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*, 18(12):527–535.
- Kita, H (1996) Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neuroscience*, 70(4):925–940.
- Kita, T, Kita, H & Kitai, S (1985) Local stimulation induced GABAergic response in rat striatal slice preparations: intracellular recordings on QX-314 injected neurons. *Brain Res*, 360(1):304–310.
- Kravitz, AV, Freeze, BS, Parker, PR, Kay, K, Thwin, MT, Deisseroth, K & Kreitzer, AC (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306):622–626.
- Kreitzer, AC & Malenka, RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4):543–554.
- Kress, GJ, Yamawaki, N, Wokosin, DL, Wickersham, IR, Shepherd, GM & Surmeier, DJ (2013) Convergent cortical innervation of striatal projection neurons. *Nat Neurosci*, 16(6):665–667.
- López-Huerta, VG, Carrillo-Reid, L, Galarraga, E, Tapia, D, Fiordeliso, T, Drucker-Colin, R & Bargas, J (2013) The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of parkinsonism. *J Neurosci*, 33(11):4964–4975.
- López-Huerta, VG, Tecuapetla, F, Guzman, JN, Bargas, J & Galarraga, E (2008) Presynaptic modulation by somatostatin in the neostriatum. *Neurochem Res*, 33(8):1452–1458.
- Mao, S, Garzon-Muvdi, T, Di Fulvio, M, Chen, Y, Delpire, E, Alvarez, FJ & Alvarez-Leefmans, FJ (2012) Molecular and functional expression of cation-chloride cotransporters in dorsal root ganglion neurons during postnatal maturation. *J Neurophysiol*, 108(3):834–852.
- McKay, BE, McRory, JE, Molineux, ML, Hamid, J, Snutch, TP, Zamponi, GW & Turner, RW (2006) CaV3 T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *Eur J Neurosci*, 24(9):2581–2594.
- McRory, JE, Santi, CM, Hamming, KS, Mezeyova, J, Sutton, KG, Baillie, DL, Stea, A & Snutch, TP (2001) Molecular and functional characterization of a family of rat brain T-type calcium channels. *J Biol Chem*, 276(6):3999–4011.
- Nisenbaum, ES & Berger, TW (1992) Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by GABAergic and dopaminergic inputs. *Neurosci*, 48(3):561–578.
- Payne, JA, Rivera, C, Voipio, J & Kaila, K (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci*, 26(4):199–206.

- Pérez-Garci, E, Bargas, J & Galarraga, E (2003) The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport*, 14(9):1253–1256.
- Pérez-Ramírez, MB, Laville, A, Tapia, D, Duhne, M, Lara-González, E, Bargas, J & Galarraga, E (En prensa) Kv7 channels regulate firing during synaptic integration in GABAergic striatal neurons. *Neural Plast.*
- Pineda, J, Galarraga, E, Bargas, J, Cristancho, M & Aceves, J (1992) Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol*, 68(1):287–294.
- Plotkin, JL, Day, M & Surmeier, DJ (2011) Synaptic driven state transitions in distal dendrites of striatal spiny neurons. *Nat Neurosci*, 14(7):881–888.
- Salgado, H, Tecuapetla, F, Perez-Rosello, T, Perez-Burgos, A, Perez-Garci, E, Galarraga, E & Bargas, J (2005) A reconfiguration of CaV2 Ca²⁺ channel current and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol*, 94(6):3771–3787.
- Song, WJ & Surmeier, DJ (1996) Voltage-dependent facilitation of calcium channels in rat neostriatal neurons. *J Neurophysiol*, 76(4):2290–2306.
- Sun, YG, Wu, CS, Renger, JJ, Uebele, VN, Lu, HC & Beierlein, M (2012) GABAergic synaptic transmission triggers action potentials in thalamic reticular nucleus neurons. *J Neurosci*, 32(23):7782–7790.
- Surmeier, DJ, Plotkin, J & Shen, W (2009) Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr Opin Neurobiol*, 19(6):621–628.
- Talley, EM, Cribbs, LL, Lee, JH, Daud, A, Perez-Reyes, E & Bayliss, DA (1999) Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci*, 19(6):1895–1911.
- Tecuapetla, F, Carrillo-Reid, L, Bargas, J & Galarraga, E (2007) Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Nat Acad Sci*, 104(24):10258–10263.
- Tepper, JM, Abercrombie, D, Elizabeth & Bolam, JP (Eds.) (2007) *GABA and the Basal Ganglia: from molecules to systems*, vol. 160. Elsevier.
- Tepper, JM & Bolam, JP (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol*, 14(6):685–692.
- Tepper, JM, Koós, T & Wilson, CJ (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci*, 27(11):662–669.

- Tepper, JM, Tecuapetla, F, Koós, T & Ibáñez-Sandoval, O (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat*, 4.
- Tepper, JM, Wilson, CJ & Koós, T (2008) Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. *Brain Res Rev*, 58(2):272–281.
- Vergara, R, Rick, C, Hernández-López, S, Laville, JA, Guzman, JN, Galarraga, E, Surmeier, DJ & Bargas, J (2003) Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol*, 553(Pt 1):169–182.
- Vilchis, C, Bargas, J, Ayala, GX, Galván, E & Galarraga, E (2000) Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. *Neurosci*, 95(3):745–752.
- Vizcarra-Chacón, BJ, Arias-García, MA, Pérez-Ramírez, MB, Flores-Barrera, E, Tapia, D, Drucker-Colin, R, Bargas, J & Galarraga, E (2013) Contribution of different classes of glutamate receptors in the corticostriatal polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neurosci*, 14:60.
- Wilson, CJ (2004) *Basal Ganglia. In: The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press New York.