



## **Universidad Nacional Autónoma de México**

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Fisiología Celular

Participación de las conductancias  
extrínsecas e intrínsecas en la integración  
sináptica cortico-estriatal y tálamo-estriatal

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

P R E S E N T A:

Mario Alberto Arias García

Tutora :

Dra. Maria Elvira Galarraga Palacio  
Instituto de Fisiología Celular

Comité tutorial:

Dra. Magda Giordano Noyola      y      Dr. José Bargas Díaz  
Instituto de Neurobiología      Instituto de Fisiología Celular

Ciudad Universitaria, Octubre de 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	4
2.	ABSTRACT.....	5
3.	INTRODUCCIÓN.....	6
3.1	Ganglios Basales .....	6
3.2	Vía directa e indirecta de los Ganglios Basales.....	6
3.3	Núcleo estriado.....	9
3.4	Integración Sináptica .....	14
3.5	Aferentes estriatales.....	15
3.6	Vía Cortico-estriatal y Tálamo-estriatal .....	16
3.7	Propiedades electrofisiológicas de la vía tálamo-estriatal .....	16
3.8	Micro circuito estriatal.....	17
3.9	Estudios <i>in vivo</i> .....	20
3.10	Estudios <i>in vitro</i> .....	21
3.11	Distinta respuesta sináptica supraumbral de las dSPNs e iSPNs .....	23
3.12	Canales de potasio dependientes de calcio (Kca <sup>2+</sup> ) .....	26
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	27
5.	HIPÓTESIS .....	28
6.	OBJETIVOS .....	29
6.1	General.....	29
6.2	Particulares.....	29
7	MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
7.1	Animales .....	29
7.2	Mantenimiento de animales.....	31
7.3	Preparación <i>In vitro</i> .....	31
7.4	Registros electrofisiológicos .....	32
7.5	Transfección de Virus Adeno-Asociados .....	32
7.6	Protocolos de estimulación y registro .....	33
7.7	Análisis de los datos .....	34
7.8	Análisis histológicos .....	35
7.9	Fármacos empleados.....	35

<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	36
8.1	Identificación y caracterización electrofisiológica de las neuronas estriatales ..	36
8.2	Integración Sináptica Cortico-estriatal en las SPNs .....	40
8.3	Estimulación de la vía cortico-estriatal en distintas regiones corticales .....	42
8.4	Trazado y activación optogenética de la vía tálamo-estriatal .....	43
8.5	Comparación de la respuesta cortico-estriatal y tálamo-estriatal .....	46
8.6	Distribución de los contactos sinápticos corticales y talámicos en el árbol somatodendrítico de las SPNs .....	47
8.7	Participación de las conductancias intrínsecas en la respuesta cortico-estriatal .....	51
8.8	Manipulación de las conductancias intrínsecas durante la respuesta sináptica cortico-estriatal en las SPNs .....	56
8.9	Comparación de las respuestas postsinápticas de las interneuronas FS a la estimulación cortical y talámica .....	58
8.10	Comparación de las respuestas postsinápticas de las interneuronas ChAT a la estimulación cortical y talámica .....	61
8.11	Comparación de las respuestas postsinápticas de las interneuronas LTS a la estimulación cortical y del tálamo .....	64
8.12	Activación polisináptica del microcircuito estriatal .....	67
8.13	Distinta plasticidad de corto plazo de las aferentes cortico-estriatales y tálamo-estriatales .....	70
8.14	La estimulación repetitiva de las aferentes corticales y talámicas evocan una dinámica distinta de liberación glutamatérgica en el estriado .....	71
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	74
9.1	Propiedades intrínsecas de las neuronas estriatales .....	75
9.2	Comunicación sináptica de las neuronas estriatales estudiadas .....	77
9.3	Distribución de los contactos sinápticos de las aferentes corticales y talámicas en las neuronas estriatales .....	79
9.4	Relevancia funcional .....	80
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	83
<b>11</b>	<b>FIGURAS SUPLEMENTARIAS</b> .....	84
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	86

## 1. RESUMEN

### **Participación de las conductancias extrínsecas e intrínsecas en la integración sináptica cortico-estriatal y tálamo-estriatal**

El estriado recibe aferentes glutamatérgicas corticales y de los núcleos intralaminares talámicos. Se sabe que, los comandos motores son iniciados por la corteza cerebral para comenzar una serie de movimientos, mientras que, la entrada talámica juega un rol importante en los cambios de atención y reorientación de movimientos.

En este trabajo, se realizaron registros electrofisiológicos de célula entera con fijación de corriente, en rebanadas de cerebro de ratón en las que estaban preservadas ambas vías glutamatérgicas. Se compararon las respuestas sinápticas cortico-estriatales y tálamo-estriatales en los dos tipos de neuronas de proyección: (dSPNs e iSPNs). Así como en las interneuronas estriatales: las de disparo rápido (FSI), interneuronas colinérgicas (ChAT), e interneuronas con espigas de bajo umbral (LTS). Además se estudiaron las posibles diferencias funcionales entre las terminales corticales y talámicas que inervan el estriado.

Para identificar las distintas clases de neuronas estriatales, se emplearon las siguientes líneas de animales transgénicos: BAC *Drd1-eGFP*, BAC *Drd2-eGFP*, A2A-Cre, PV-Cre, ChAT-Cre y 5HT3Ra-Cre. En ellos se realizó una cirugía estereotáxica en el estriado dorsal para inyectar el adenovirus Cre-dependiente AAV2 / 1.CAG.-FLEX.tdTomato.WPRE.bGH (tdTomato) para expresar la proteína fluorescente en las neuronas blanco. En algunos experimentos se inyectó en el mismo animal, el adenovirus AAV1.CamKIIa.hChR2-eYFP en los núcleos intralaminares del tálamo (PF/CL) o en la corteza motora (M1) para activar las vías glutamatérgicas optogenéticamente. También se estimularon las vías por medio de un electrodo bipolar concéntrico de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Las respuestas polisinápticas supraumbrales cortico-estriatales son complejas y se conforman tanto de corrientes glutamatérgicas, GABAérgicas, así como de componentes intrínsecos dependientes de voltaje o calcio (por ejemplo, Vizcarra-Chacón et al, 2013; Arias-García et al, 2013). Aquí, mostramos que las respuestas polisinápticas supraumbrales también se pueden evocar al activar los núcleos intralaminares del tálamo tanto con estimulación de campo u optogenética. Las distintas respuestas de las SPNs e interneuronas mantienen sus propiedades al estimular las aferentes corticales o talámicas. De acuerdo a los resultados obtenidos, llegamos a la conclusión de que las propiedades intrínsecas de las neuronas determinan la forma de la respuesta sináptica. Sin embargo las terminales sinápticas corticales y talámicas exhiben una dinámica de depresión y facilitación de corto plazo, respectivamente en las SPNs.

## 2. ABSTRACT

### **Participation of extrinsic and intrinsic conductances in the cortico-striatal and thalamo-striatal synaptic integration**

Recent anatomical and physiological data has shown the evidence of glutamatergic synaptic connections between the intralaminar thalamic nuclei, cerebral cortex and the striatum. In the present work, using whole cell patch clamp recordings in mouse brain slices where cortical and thalamic inputs were preserved, we compared corticostriatal and thalamostriatal synaptic integration and their short term synaptic plasticity among the striatal neurons such as a striatal projection neurons: direct (dSPNs) and indirect (iSPNs), fast spiking interneurons (FSI), cholinergic interneurons (ChAT) and interneurons exhibiting low threshold spikes (LTS). Additionally we studied the possible functional differences among the cortical or thalamic synaptic terminals in the striatum.

In order to achieve the selective identification of the striatal cell type, we used the transgenic mouse lines: BAC *Drd1*-eGFP, BAC *Drd2*-eGFP., A2A-Cre, PV-Cre, ChAT-Cre and 5HT3Ra-Cre combined with stereotaxic surgery to deliver in dorsal striatum the Cre-dependent adenovirus AAV2/1.CAG.-FLEX.tdTomato.WPRE.bGH (tdTomato), to express the fluorescence protein. In some experiments we deliver in the same animal AAV1.CamKIIa.hChR2-eYFP in the intralaminar thalamic nuclei (PF/CL) or in the cerebral cortex (M1) to activate optogenetically the thalamostriatal or the corticostriatal pathway.

Polysynaptic activation of corticostriatal responses are complex and contain both ionotropic glutamatergic and GABAergic components as well as intrinsic voltage or calcium dependent currents (e.g., Vizcarra-Chacón et al, 2013; Arias-García et al., 2013). Here, we show that the same complex suprathreshold responses appear when stimulating the intralaminar thalamic nuclei with field and optogenetics stimulus. Different classes of SPNs and interneurons were similarly activated by both glutamatergic pathways, suggesting a predominance of intrinsic neuron properties. Surprisingly, we found that cortico-striatal synapse have short term synaptic depression, while thalamo-striatal synapse have short term synaptic facilitation.

We conclude that a great part of striatal synaptic integration depends on the postsynaptic intrinsic properties of striatal projection neurons and is largely independent on the class of afferent (cortical or thalamic). On the other hand, we found that cortical and thalamic synaptic terminals in the striatum have functional differences.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Ganglios Basales

Estudios realizados en reptiles, roedores, humanos y otros primates, han sugerido fuertemente que el circuito de los Ganglios Basales (GB) participa en múltiples funciones sensoriales, motoras, aprendizaje motor, cognitivas, de toma de decisiones, motivacionales y emocionales (Kim & Hikosaka 2015; DeLong & Wichmann 2015; Schultz W 2016, Graybiel & Grafton 2015; Reig & Silberberg, 2014).

Cuando el circuito de los GB presenta alguna alteración en su funcionamiento se ven comprometidos las funciones descritas anteriormente, tal es el caso de las enfermedades como el Parkinson, Discinesia, Huntington, o Adicción (Smith et al., 2012; Pérez-Ortega et al., 2016).

El circuito de los GB se conforma de los siguientes núcleos: Caudado-putamen (Estriado), Globo Pálido externo e interno (GPe, GPi), Núcleo Subtalámico (NST), Sustancia Nigra compacta y reticulada (SNc, SNr).

El estriado es el principal núcleo de entrada de los GB, principalmente recibe aferentes excitatorias de la corteza cerebral y de los núcleos intralaminares del tálamo. Estos contactos sinápticos son integrados por el circuito estriatal y proyectados a los núcleos de salida de los GB por medio de dos vías neuronales, la vía directa y la vía indirecta. Funcionalmente la vía directa facilita el movimiento, mientras que la vía indirecta lo inhibe (Shepherd 2013; Haber 2014; Deschenes et al., 1995; Doig et al., 2010). Cabe mencionar que ambas vías reciben aferentes dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars Compacta (SNc).

#### 3.2 Vía directa e indirecta de los Ganglios Basales

Las neuronas de proyección del estriado se han segregado en dos grupos neuronales (Vía directa y Vía indirecta) de acuerdo al sitio de proyección de sus axones fuera del estriado, la expresión de receptores dopaminérgicos y a la liberación de péptidos.

##### 3.2.1 Vía directa

La vía directa comienza con proyecciones corticales que son integradas por las neuronas espinosas medianas (*Spiny Projection Neurons en inglés "SPNs"*) del estriado, las cuales envían sus axones GABAérgicos hacia núcleos de salida de los

GB: el Globo pálido interno (GPi) y la Sustancia Nigra reticulada (SNr). Esta inhibición GABAérgica que las neuronas de proyección tienen sobre los núcleos de salida, permite que éstos dejen de inhibir al núcleo ventral anterior (VA) y al núcleo lateral (VL) del Tálamo, para que finalmente éste último relevo envíe proyecciones excitatorias hacia la corteza motora, promoviendo de esta manera el movimiento (Ver figura 1).

Las neuronas de la vía directa o “estriato-nigrales” (dSPNs) han sido caracterizadas por la expresión de receptores a dopamina de la familia D1 y muscarínicos del tipo M1 y M4 (Kreitzer & Malenka 2008; Hernández-Flores et al., 2015). Estas neuronas también co-liberan sustancia P (SP) y dynorfina.

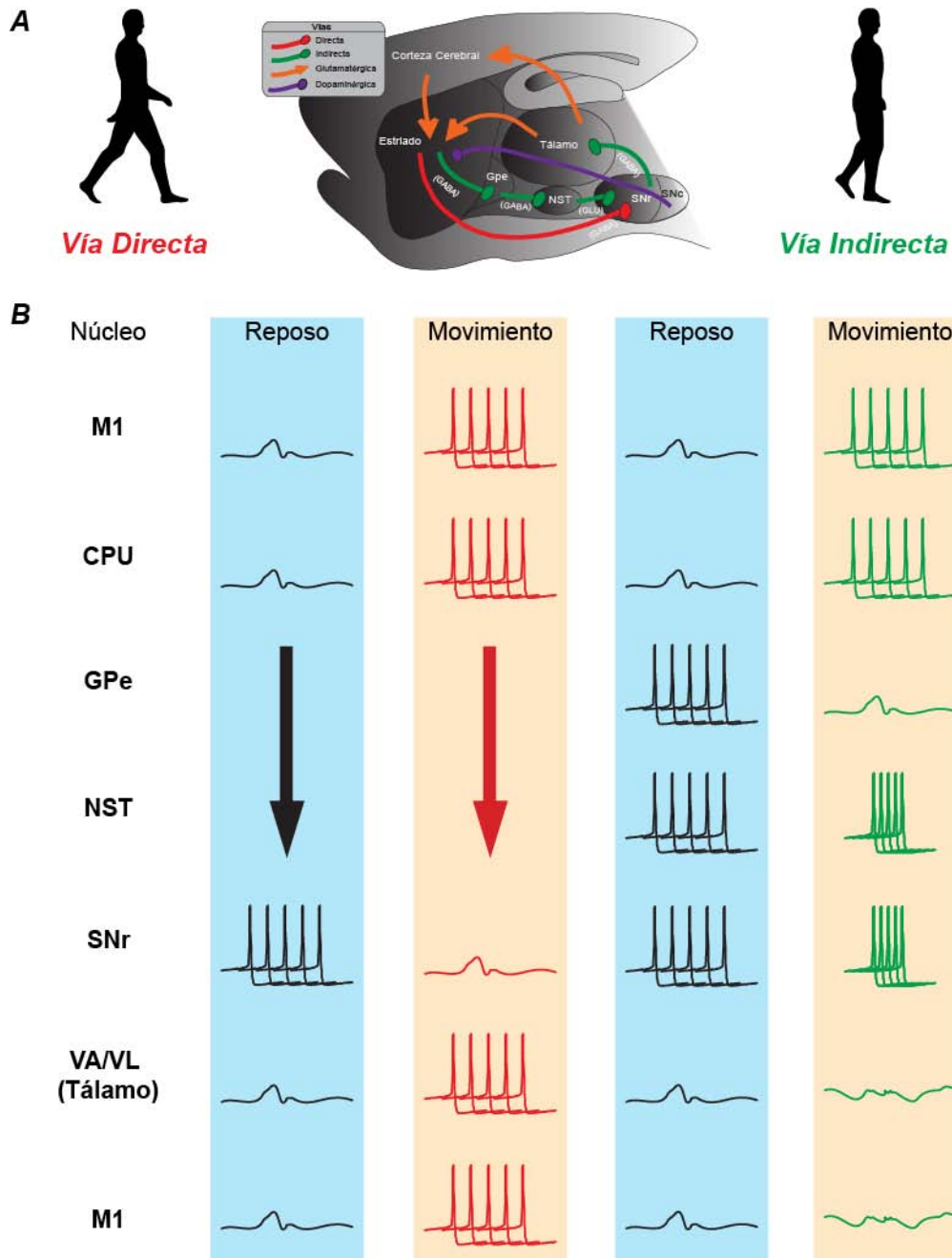
### 3.2.2 Vía indirecta

La vía indirecta inhibe los movimientos. Cuando las células estriatales de esta vía (iSPNs) son activadas por la corteza motora, éstas envían sus aferentes GABAérgicas al GPe. Las células de este núcleo que dejan de inhibir al núcleo subtalámico (NST) permiten a este último enviar proyecciones glutamatérgicas hacia la SNr. Dichas neuronas GABAérgicas incrementan su frecuencia de disparo e inhiben a los núcleos talámicos desfavoreciendo su proyección excitatoria sobre la corteza motora y por lo tanto impidiendo el movimiento (Ver figura 1). (Albin et al., 1989; DeLong 1990; Mink, 1996; Groenewegen 2003; Kravitz et al., 2010).

Las SPNs se han podido distinguir por su trayectoria dentro del circuito de GB y también por su expresión de receptores y péptidos. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha demostrado una localización anatómica preferencial. Por el contrario, se ha descrito que estas neuronas se encuentran ampliamente distribuidas de forma homogénea por todo el estriado (Deng et al., 2006).

Las neuronas de la vía indirecta (iSPNs) o “estriatopalidales” son caracterizadas por su robusta expresión de receptores dopaminérgicos de la familia D2 y de Adenosina tipo A2A (Kreitzer & Malenka 2008). Estas neuronas también co-liberan el neuropéptido encefalina (ENK).





**Figura. 1.** Esquema de los GB. A) Identificación anatomía de los núcleos de los GB. B) Esquema funcional de los núcleos de los GB y la M1 en reposo y en la realización de movimientos voluntarios. Los potenciales de acción denotan la actividad del núcleo correspondiente. Las abreviaciones se describen a continuación: M1: Corteza Motora Primaria, CPU: Caudado-Putamen, GPe: Globo Pálido Externo, NST: Núcleo Subtalámico, SNr: Sustancia Nigra Reticulata, VAVL: Núcleo Ventral Anterior y Ventral Lateral del Tálamo.

### 3.3 Núcleo estriado

El estriado, también llamado Núcleo neoestriado (NE) se ha dividido anatómica y funcionalmente. La región dorsal, se le ha relacionado con funciones sensoriales, motrices y asociativas. Por otra parte, en la región ventral se encuentra el núcleo accumbens, el cual se relaciona con el sistema de la recompensa (Schultz 2016; Gonzales & Smith 2015).

El estriado en el cerebro del roedor se compone de los núcleos caudado y putamen, los cuales en el cerebro humano y de otros primates, se encuentran segregados por la capsula interna.

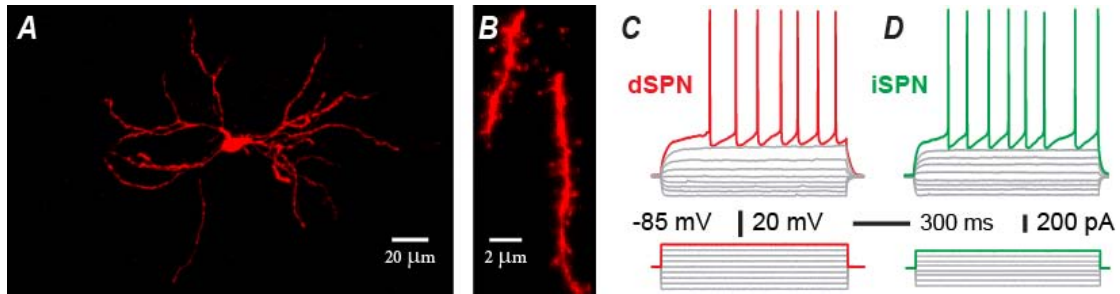
#### Clases de Neuronas en el Núcleo Estriado

##### Neuronas de proyección

Las neuronas espinosas de proyección del núcleo estriado (SPN) son aproximadamente el 95% del total de la población. El 5% restante corresponde a las interneuronas. Las dendritas de las SPN poseen una amplia distribución de espinas, además se arborizan en todas direcciones abarcando un radio de 300 a 500  $\mu\text{m}$ . En promedio presentan de 4 a 6 dendritas principales que a su vez pueden ser divididas 2 o 3 veces más, teniendo en total de 25 a 30 ramas terminales (Wilson 2004). Su cuerpo celular tiene un diámetro de 10 a 15  $\mu\text{m}$ .

A diferencia de las dendritas, sus axones exhiben ángulos más agudos y no tienen espinas dendríticas (Bishop et al., 1982; Kawaguchi 1997; Wilson 2004).

En el inciso A de la figura 2, se muestra una fotografía confocal de la anatomía de las SPNs, así como una amplificación que ilustra sus espinas dendríticas (Inciso B). Cabe señalar que las SPNs, poseen características electrofisiológicas muy similares entre sí, al estimularlas con pasos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes en el soma de la neurona (Inciso C y D de la figura 2).



**Figura 2:** Caracterización anatómica y electrofisiológica de las SPNs. En el inciso A, se muestra la caracterización anatómica de SPNs, en el inciso B se muestra una amplificación donde se aprecian las espinas dendríticas. En los incisos C y D, se ilustran dos registros electrofisiológicos en la modalidad de fijación de corriente, donde se muestra el cambio del voltaje en respuesta a pulsos cuadrados despolarizantes e hiperpolarizantes aplicados en el soma de una dSPN (trazo rojo) y una iSPN (trazo verde). Note que el perfil electrofisiológico es muy similar entre las SPNs.

### Interneuronas del Núcleo Estriado

Tradicionalmente se han reportado tres distintas interneuronas, identificadas a partir de sus propiedades inmunocitoquímicas, electrofisiológicas y anatómicas: las PV o FSI, las ChAT o TAN y las NPY o LTS (Wilson et al., 1990; Kawaguchi 1993,1995, 1997; Tepper et al., 2010). En la actualidad, el desarrollo de reporteros fluorescentes combinado con la ingeniería genética, ha permitido la identificación de tipos específicos de neuronas en diferentes núcleos del cerebro. Con la aplicación de estas herramientas tecnológicas, se han estudiado neuronas poco abundantes y por lo tanto poco estudiadas, por ejemplo interneuronas, ya que solo representan el 5% del total de la población neuronal del estriado. Hasta la fecha, se han logrado identificar tres nuevos tipos de interneuronas estriatales: la interneurona Neurogliforme, las TH (+) y la Fast-Adapting (Ibañez-Sandoval et al., 2010; 2011, Faust et al., 2015, Muñoz-Manchado et al., 2016).

De las 6 distintas clases de interneuronas en el estriado, solo las interneuronas ChAT(+) son de naturaleza Colinérgica, mientras que los 5 tipos restantes son GABAérgicas.

A continuación se describirán algunas de las principales características anatómicas, histocitoquímicas y electrofisiológicas de los distintos grupos de interneuronas.

### **Interneuronas PV (+)**

Las interneuronas Fast Spiking o PV (+) presentan un cuerpo celular de 10 a 25  $\mu\text{m}$  y tienen un potencial de membrana menor a -80 mV (Tepper et al., 2010). Su principal característica es la presencia de trenes de potenciales de acción sumamente rápidos, ya que pueden generar frecuencias de disparo superiores a los 350 Hz, de hecho de ahí deriva su nombre (Tepper & Bolam 2004; Tepper et al., 2010). También poseen una densa arborización axónica que puede llegar a abarcar un área de más de 600  $\mu\text{m}$  de diámetro. Esta clase de neuronas establece conexiones eléctricas entre sí, a través de uniones comunicantes que permiten la sincronización de decenas de neuronas, formando una red de Fast Spiking. Estas neuronas son inmunoreactivas a parvalbumina (Tepper et al., 2010; Kawaguchi et al., 1995; Kawaguchi 1993,1997). En el inciso A de la figura 3, se ilustran sus características anatómicas y electrofisiológicas.

### **Interneuronas NPY/NOS/SOM (+)**

La interneurona de bajo umbral (*LTS*) o interneuronas NPY/NOS/SOM (+) se caracterizan por tener resistencias de entrada superiores a los 600 M $\Omega$ , Además de generar espigas de calcio de bajo umbral de activación (generados por canales de calcio tipo T), que a su vez genera ráfagas de potenciales de acción (Tepper & Bolam 2004; Tepper et al., 2010). Así mismo, estas células pueden generar potenciales prolongados en forma de meseta en respuesta a pulsos despolarizantes en el soma, por lo cual también se les denomina PLTS. Este tipo neuronal puede co-liberar neuropéptido Y, NOS y somatostatina, el diámetro de su cuerpo celular es de 12 a 25  $\mu\text{m}$ . También presenta una arborización dendrítica y axónica menor con respecto a las neuronas de proyección. Su potencial de membrana se encuentra alrededor de -60 mV, sin embargo, también puede presentar disparo espontáneo o en forma de ráfagas. (Beatty et al., 2012, Ibañez-Sandoval et al., 2011, Kawaguchi 1993; Kawaguchi et al., 1995). En el inciso B de la figura 3, se ilustran sus características anatómicas y electrofisiológicas.

### **Interneuronas ChAT (+)**

La neurona gigante colinérgica, también llamada célula de largo postpotencial hiperpolarizante, presenta un cuerpo celular fusiforme de 20 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, de donde emergen de 2 a 5 dendritas principales que no presentan espinas dendríticas o de manera muy difusa. Su potencial de membrana es despolarizado (alrededor de -60 mV) y puede presentar potenciales de acción de manera tónica. Histoquímicamente es positiva a acetilcolinesterasa (Wilson et al., 1990; Kawaguchi 1993,1997). En el inciso C de la figura 3, se ilustran sus características anatómicas y electrofisiológicas.

### **Interneurona NPY-NGF**

Este tipo de interneurona se le ha denominado “Neurogliaforme”, también es de naturaleza GABAérgica y es positiva a NPY. A diferencia de las NPY/NOS/SOM (+), no posee alta resistencia de entrada, ni bajo umbral de disparo. Sin embargo se caracteriza por poseer una vasta arborización axónica. Así como un postpotencial muy amplio, de hecho podría ser la neurona estriatal con postpotencial más amplio. Por otra parte también se ha descrito que esta clase de neuronas poseen un control inhibitorio muy fuerte sobre las SPNs. (Ibañez-Sandoval et al., 2011; English et al., 2012). En el inciso D de la figura 3, se ilustran sus características anatómicas y electrofisiológicas.

### **Interneurona TH (+)**

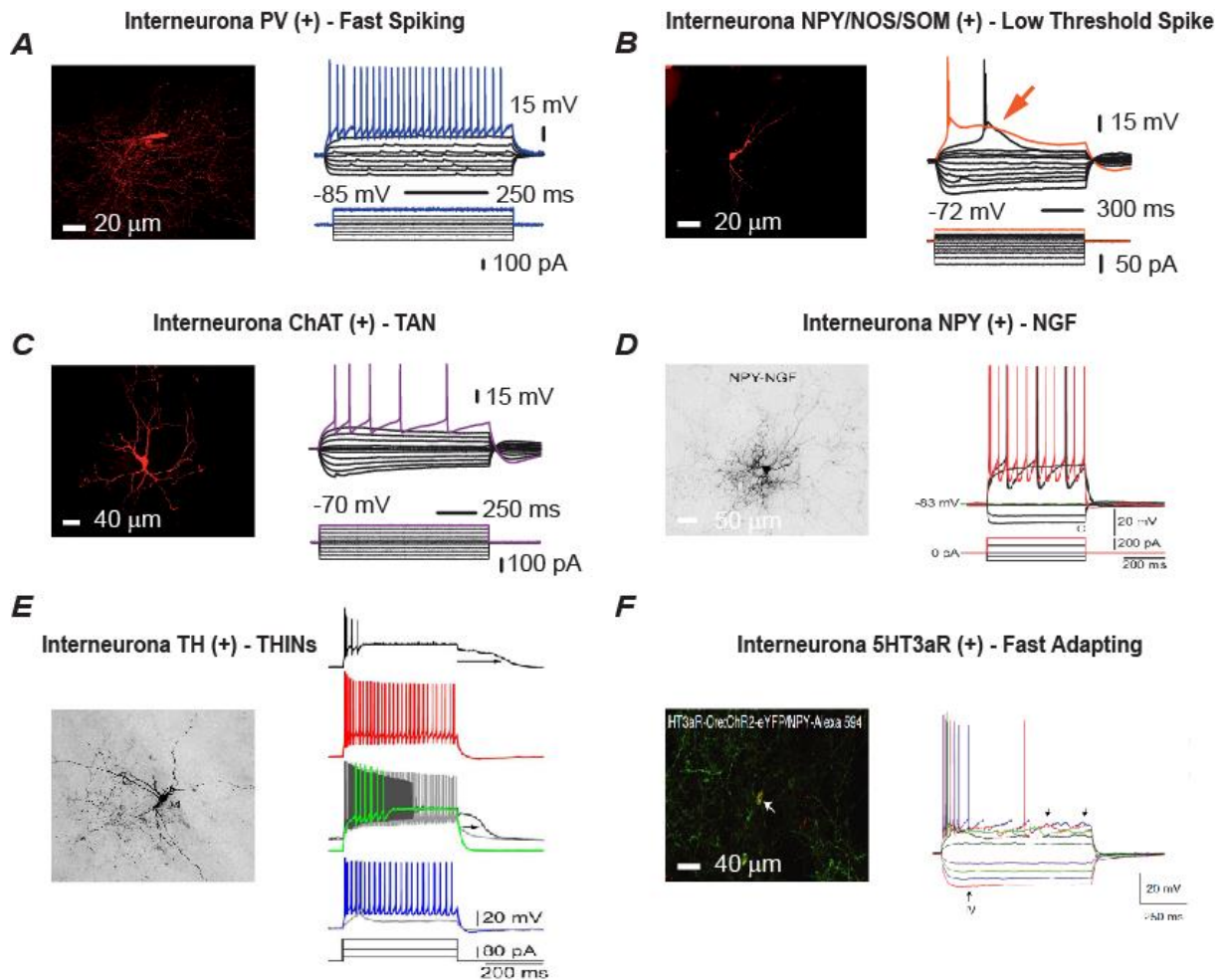
A partir de estudios de histoquímica realizados en monos (Dubach et al., 1987) y en roedores (Ibañez-Sandoval et al., 2010), se han descrito neuronas estriatales positivas a la enzima Tirosina hidroxilasa (TH). En el inciso E de la figura 3, se ilustran sus características anatómicas y electrofisiológicas.

Este tipo de interneuronas es un grupo pequeño que posee un cuerpo celular de 10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro y presentan un amplio repertorio electrofisiológico al ser

estimuladas en el soma con un pulso de corriente. Se han dividido en cuatro subtipos: Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV. (Ibañez-Sandoval et al., 2010).

### **Fast Adapting 5HT3aR (+)**

El desarrollo de animales transgénicos que expresan proteínas fluorescentes bajo el promotor del receptor a serotonina 5HT3Ra (Muñoz-Manchado et al., 2016), develó que varios tipos de interneuronas presentes en el estriado poseen dicho receptor (NPY, Fast Spiking). Los estudios realizados en esta cepa de animal transgénico, también sugirió un nuevo subtipo de interneurona que no se había descrito antes. A este nuevo subtipo se le denominó Fast Adapting Interneuron (FAI) o Fast Adapting 5HT3aR (+). Hay evidencia electrofisiológica que permite la diferenciación de esta interneurona respecto a las PV (+) y las NPY (+), quienes también expresan el receptor 5HT3a. La característica electrofisiológica más evidente es su alta frecuencia de disparo inicial seguida de una fuerte adaptación a la despolarización con un pulso cuadrado de corriente en el soma (Muñoz-Manchado et al., 2016, Faust et al., 2015). En el inciso F de la figura 3, se ilustran sus características anatómicas y electrofisiológicas.



**Figura 3:** Caracterización anatómica y electrofisiológica de las interneuronas estriatales. En el inciso A, se muestra la caracterización anatómica de la interneurona Fast Spiking, así como un registro electrofisiológico en la modalidad de fijación de corriente en donde se muestran los cambios en el voltaje en respuesta a los pulsos cuadrados despolarizantes e hiperpolarizante, hasta generar un tren de potenciales de acción (Trazo azul). En los incisos B al F, se ilustra la misma información para las interneuronas: LTS (Trazo naranja), ChAT (Trazo morado), NGF (Trazo rojo), TH (4 registros en vertical en distintos colores), y la interneurona Fast Adapting (Respuesta del voltaje en varios colores) respectivamente. Los registros en el inciso A, B y C se obtuvieron durante el desarrollo del proyecto doctoral. El esquema y registro del inciso D, se tomo de Ibañez-Sadoval et al., 2011. El registro del inciso E, se tomo de Ibañez-Sadoval et al., 2010, la microfotografía fue una cortesía del Dr. Ibañez-Sadoval. El esquema y registro del inciso F, se tomo de Faust et al., 2015.

### 3.4 Integración Sináptica

Las neuronas reciben miles de entradas sinápticas excitatorias, inhibitorias y moduladoras de otras neuronas durante todo el periodo de vida del sistema nervioso. La integración sináptica es el término utilizado para describir cómo las neuronas “suman, restan, multiplican o dividen” estas entradas sinápticas antes de la generación

del potencial de acción en el cono axónico de la neurona que está procesando dicha información.

La capacidad de las entradas sinápticas para evocar potenciales de acción se determina por múltiples factores, por ejemplo: el tipo de neurotransmisor segregado por la neurona pre-sináptica, el tipo de receptor post-sináptico, la temporización relativa de los potenciales eléctricos generados por entradas sinápticas, la estructura anatómica de la neurona receptora, así como la ubicación física de las entradas sinápticas a lo largo de la distribución anatómica de la neurona receptora. Por lo tanto, el proceso de integración sináptica puede ser influenciada en múltiples niveles, contribuyendo a las diversas y complejas propiedades computacionales del funcionamiento del cerebro.

### **3.5 Aferentes estriatales**

El estriado recibe múltiples entradas sinápticas del circuito de los GB, e integra aferentes glutamatérgicas provenientes de la mayoría de las áreas de la corteza cerebral. Sin embargo, ha demostrado tener mayor contribución de la corteza prefrontal, motora, sensoria y de asociación (Selemon et al., 1985; Haber et al., 2000; Postuma et al., 2006; Wall et al., 2013), la segunda aferente glutamatérgica proviene de los núcleos intralaminares del tálamo (Castle et al., 2005; Künzle 2006; Smeal et al., 2007, 2008; Ding et al., 2008, Pan et al., 2010; Wall et al., 2012). Además de estas aferencias glutamatérgicas, el estriado recibe una importante modulación dopaminérgica de fibras provenientes de la SNc. Cabe mencionar que cuando esta vía degenera, se presenta la enfermedad de Parkinson (Freund et al., 1985, DeLong & Wichmann 2015).

El estriado también recibe una importante modulación colinérgica de las interneuronas colinérgicas (ChAT+), así como del núcleo pedúnculo pontino (PPN) y el núcleo tegmental laterodorsal (LDT) del tallo cerebral (Dautan et al., 2016). Además, recientemente se describieron aferentes GABAérgicas provenientes del GPe, las cuales hacen sinapsis sólo con las interneuronas estriatales PV +, las NPY + y algunas SPNs (Saunders et al., 2016).



### 3.6 Vía Cortico-estriatal y Tálamo-estriatal

Funcionalmente la vía cortico-estriatal está relacionada con la realización de las tareas voluntarias o habituales dirigidas a alcanzar metas (Balleine et al., 2007; 2009; Feingold et al., 2016). La vía tálamo-estriatal se ha propuesto como el “switch” entre las conductas dirigidas por la corteza cerebral y los cambios en la conducta motora provocados por las vías aferentes sensoriales que codifican los estímulos salientes o provenientes del ambiente (Matsumoto et al., 2001; Minamimoto et al., 2005; Kimura et al., 2004, 2005; Galvan et al., 2011). Por lo tanto, esta vía podría estar implicada al momento de realizar cambios abruptos en la conducta motora, cuando inesperadamente encontramos algo inconveniente en el camino al caminar, andar en bicicleta o conducir un auto.

Anatómicamente, estas dos vías aferentes glutamatérgicas poseen distintas propiedades, las terminales axónicas de las neuronas piramidales corticales al entrar al estriado se bifurcan varias veces en forma de abanico dejando sólo algunos contactos sinápticos sobre las espinas dendríticas de las SPNs. (Cowan & Wilson 1994). En contraparte, reconstrucciones axónicas de la vía tálamo-estriatal, demuestran que estas terminales forman pequeños ramilletes axónicos que posiblemente dejen varios botones sinápticos sobre las neuronas estriatales de proyección (Deschenes et al., 1995, 1996). Cabe mencionar que ambas entradas glutamatérgicas al estriado proveen un número similar de sinapsis y la mayoría de éstas se sitúa sobre las espinas dendríticas (Dube et al., 1988; Doig et al., 2010; Huerta-Ocampo et al., 2014). Otra diferencia entre estas aferentes es el transportador vesicular de glutamato. La vía tálamo-estriatal expresa el transportador tipo vGluT2, mientras que las terminales cortico-estriatales expresan el transportador a glutamato del tipo vGluT1.

### 3.7 Propiedades electrofisiológicas de la vía tálamo-estriatal

Uno de los principales obstáculos para comprender la electrofisiología de esta vía *in vitro*, ha sido la obtención de una rebanada de cerebro que preserve tanto la vía tálamo-estriatal como la vía cortico-estriatal para llevar a cabo la comparación directa de ambas vías sobre las neuronas del estriado. En 2007, Smeal y colaboradores reportaron un tipo de corte horizontal con un ángulo que preserva ambas vías,

considerando que las fibras tálamo-estriatales abarcan un espacio de 400 micrómetros de diámetro en sentido ventro-dorsal, con un ángulo aproximado de 20°. Lo anterior hizo posible la comparación directa, en una misma neurona de las dos aferencias excitatorias.

Sin embargo, en los pocos estudios realizados *in vitro* (Ding et al, 2008, Smeal et al, 2007), sólo se han reportado respuestas sub-umbrales, dejando de lado la activación supra-umbral, siendo esta última el correlato fisiológico de la actividad motora en vivo. De ahí la importancia de estudiar este tipo de proceso fisiológico evocado desde las aferentes talámicas.

### **3.8 Micro circuito estriatal**

Las neuronas SPNs representan el 95% del total de la población estriatal, mientras que las interneuronas: Fast Spiking, LTS, ChAT, NGF, TH y Fast Adapting constituyen el 5% restante. Todas las neuronas estriatales son de naturaleza GABAérgica excepto la interneurona Colinérgica ChAT (+).

Se conoce que las SPNs se encuentran altamente interconectadas entre sí (Tunstall et al., 2002; Koos et al., 2004; Tecuapetla et al., 2007; Taverna et al., 2007). Sin embargo, algunos estudios enfocados en el registro de pares de neuronas entre interneuronas y SPNs han revelado que las interneuronas Fast spiking son las que se pueden encontrar con mayor probabilidad conectadas con las SPNs, seguidas de las LTS. Por el contrario, a la fecha no se ha podido registrar un par entre neurona gigante colinérgica y SPN (Tecuapetla et al., 2007; Gittis et al., 2010; Szydlowski et al., 2013). Si bien, es cierto que la interneurona ChAT (+) no se conecta sinápticamente por medio de receptores ionotrópicos como el receptor nicotínico con las SPNs, éstas sí tienen modulación colinérgica por medio de los receptores metabotrópicos muscarínicos M1 y M4 (Hernández-Flores et al., 2015). Además la interneurona ChAT (+) tiene una gran influencia por medio del “loop” que establecen a través de la interneurona (NGF), la cual ejerce un control inhibitorio con las SPNs (English et al., 2011). Por otra parte, se ha sugerido que la interneurona Fast Spiking (FSI) posee receptores nicotínicos y muscarínicos a través de los cuales puede tener una influencia directa de la interneurona colinérgica (Tepper et al., 2010; Plata et al., 2013) y también influir sobre las SPNs.

Algunos estudios han propuesto que los distintos elementos del microcircuito estriatal poseen una distinta latencia de activación en respuesta a comandos provenientes de la corteza cerebral.

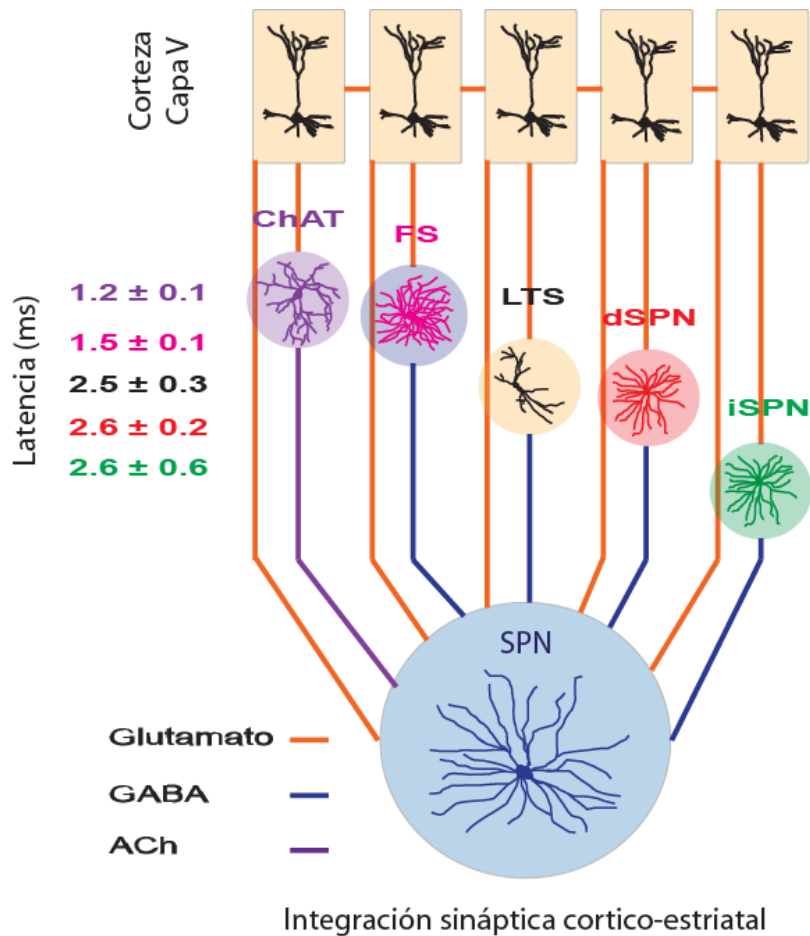
Planert et al., 2010, Vizcarra-Chacón et al., 2013 y Bakhurin et al., 2016, muestran que la latencia de activación de las interneuronas FSI y ChAT(+) precede a la activación de las SPNs y demás interneuronas al momento en que se activa la vía cortico-estriatal. De esta manera, la estimulación cortico-estriatal genera respuestas poli sinápticas de cientos de milisegundos de duración en las SPNs, capaces de disparar trenes de potenciales de acción (Flores-Barrera et al., 2010, 2011; Vizcarra-Chacón et al., 2013;). Con lo anterior se podría pensar que cuando se da la comunicación sináptica entre las neuronas piramidales de la corteza cerebral y las SPNs, no solo se obtiene la conexión monosináptica, sino también la conjunción de la excitación glutamatérgica polisináptica con la modulación colinérgica y la contribución GABAérgica de las interneuronas y de otras SPNs, de tal forma que se obtiene una integración sináptica del conjunto del microcircuito estriatal.

El proceso de integración sináptica de las SPNs es bastante complejo, ya que se lleva a cabo la integral de diversas entradas sinápticas con la participación de distintos neurotransmisores.

En la figura 4 se muestra que las interneuronas ChAT (Color morado) son las que exhiben menor latencia ante la estimulación cortico-estriatal, seguido de las FSI (Color rosa), las LTS (Color negro) y al final las SPNs (Color rojo y verde).

Cabe señalar que las interneuronas estriatales también ejercen un rol muy importante en la regulación de la dinámica de selección de grupos de SPNs para habilitar salidas específicas de información, además se ha propuesto que las interneuronas estriatales ejercen una función de filtrado de las aferentes glutamatérgicas en las SPNs (Carrillo-Reid et al., 2008, López-Huerta et al., 2013, Vizcarra-Chacón et al., 2013). En resumen, las distintas entradas sinápticas al estriado, en conjunto con la información proveniente de 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), lo cual permite la función adecuada del estriado dentro del macro circuito de los GB.

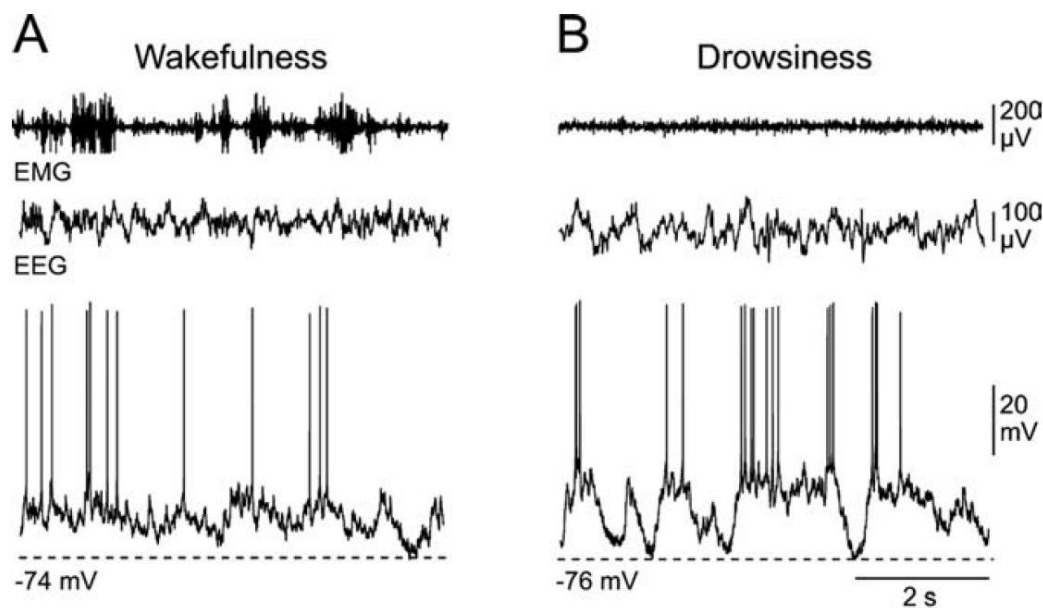


**Figura 4:** Compleja integración polisináptica cortico-estriatal. En la parte superior del esquema se ilustran 5 neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza cerebral que envían sus axones para establecer contactos sinápticos sobre las distintas clases de neuronas estriadales. Cada una de ellas se denota con distinto color. A la izquierda del esquema se puede ver que los elementos del circuito estriatal tienen distinta latencia de la respuesta sináptica cortico-estriatal. En la parte inferior del esquema se representa la compleja integración polisináptica que una SPN (neurona Azul) lleva a cabo, ya que integra múltiples contactos sinápticos diferidos en el tiempo y mediados por distintos receptores y neurotransmisores. Esquema basado en los datos experimentales reportados en Vizcarra-Chacón et al., 2013.

### 3.9 Estudios *in vivo*

Registros intracelulares en vivo en animales no anestesiados (Mahon et al., 2006) y anestesiados (Wilson & Groves, 1981; Wilson & Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997; Schulz et al., 2011), han mostrado que las neuronas estriatales tienen cambios periódicos entre un estado hiperpolarizado y otro despolarizado en la membrana. El estado hiperpolarizado “*Down state*” se caracteriza por tener un potencial de membrana muy similar al de reposo (de -84 a -61 mV), con pequeños cambios de voltaje como resultado de las diversas entradas sinápticas excitatorias. Por otra parte, el estado despolarizado tiene un potencial de membrana alrededor de -45 mV, que puede o no tener potenciales de acción en forma de ráfagas, esta propiedad es también conocida como el “*Up state*”.

Estas oscilaciones de membrana se han registrado intracelularmente, de forma simultánea con la actividad muscular y electroencefalográfica en animales despiertos. En los cuales se ha observado una correlación entre los estados *UP and Down* de las SPNs y distintos patrones de la señal de EMG y EEG (Fig.5), lo que sugiere fuertemente que la actividad bi-estable de las neuronas estriatales podría estar relacionada con los movimientos voluntarios (Mahom et al., 2006; Kravitz et al., 2010).



**Figura 5:** *UP and Down state* in vivo en animal no anestesiado. En el inciso A se muestra un registro simultáneo de EMG, EEG e intracelular de una SPN, en vigilia y en estado de somnolencia (inciso B). Tomado de Mahom et al., 2006

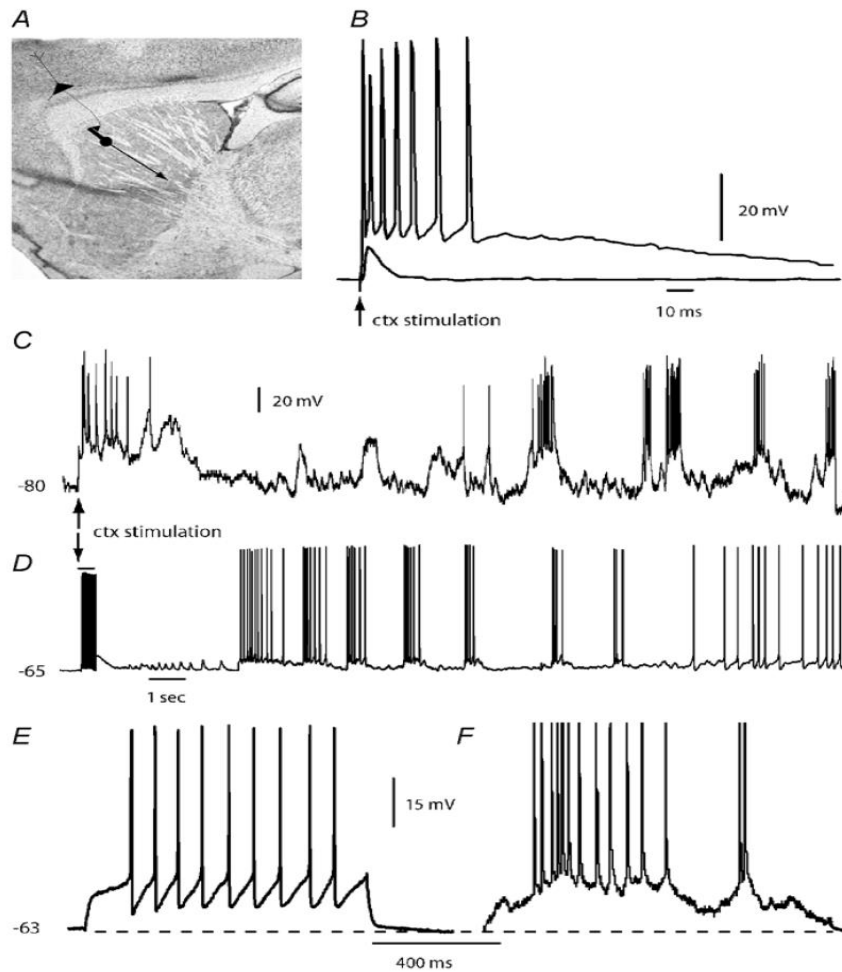
### 3.10 Estudios *in vitro*

A partir de estudios realizados *in vitro* con registros intracelulares en rebanas de cerebro que preservan la vía cortico-estriatal, se han podido reproducir los estados “Up and Down” al estimular la vía cortico-estriatal y registrar las neuronas SPNs. (Kita et al., 1985; Kita et al., 1996; Bargas et al., 1991; Vergara et al., 2003). Gracias a dichos experimentos, también se ha logrado estudiar la participación de los distintos receptores glutamatergicos en las oscilaciones de los estados “Up and Down”. Actualmente se conoce que los receptores-canal AMPA y Kainato proveen de cierta despolarización a la membrana para que el receptor NMDA pueda ser activado. La sinergia de estas dos conductancias desencadenan mecanismos intrínsecos que hacen posible los estados “*Up and Down*” de las SPNs.

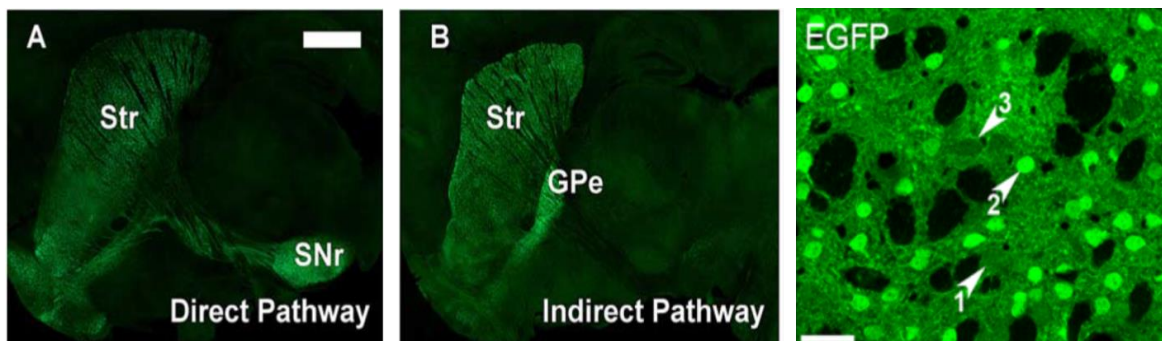
Estas transiciones de membrana también se han logrado reproducir en ausencia de la estimulación de las aferentes glutamatergicas, por la aplicación de agonistas glutamatergicos como el NMDA (Vergara et al., 2003; Flores-Barrera et al., 2009).

De acuerdo con estudios *in vivo* en animales anestesiados y experimentos *in vitro*, la actividad bi-estable de estas neuronas se obtiene por la activación sincronica de las vías aferentes glutamatergicas provenientes de la corteza y el tálamo (Wilson & Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997; Smeal et al., 2007; Pérez-Ortega et al., 2016), Sin embargo las propiedades intrínsecas de las SPNs, sostienen, aumentan y repolarizan la membrana para efectuar la transición entre el estado “Up and Down” y las interacciones del circuito microestriatal (Flores-Barrera et al., 2010; 2011; Vizcarra Chacón et al., 2013; Arias-García et al., 2013; Pérez-Ramírez et al., 2015; Pérez-Ortega et al., 2016).

En la figura 6 se ilustra un registro de un *UP and Down state*, evocado en condiciones *in vitro*, En esta figura se puede notar que estos registros son muy similares a los obtenidos en estudios en vivo (Vergara et al., 2003).



**Figura 6:** *UP and Down state* in vitro. En el inciso A, se muestra una rebanada sagital de cerebro de roedor que preserva las fibras cortico-estriatales. En C y D, Se puede apreciar las características de la transición bifásica in vitro al estimular la corteza cerebral. En E y F, se compara a la izquierda un tren de potenciales de acción obtenido al estimular el soma con un pulso cuadrado de corriente despolarizante y a la derecha una oscilación sináptica obtenida espontáneamente. Tomado de Vergara et al., 2003.



**Figura 7.** Trazado de las vía directa en indirecta con marcadores fluorescentes. En el inciso A, se muestra una fotografía de un corte sagital de un ratón BAC-D1-eGFP donde se aprecia la trayectoria de los axones de las neuronas de la vía directa, en el inciso B se muestra la trayectoria de los axones de las neuronas de la vía indirecta en el ratón BAC-D2-eGFP. En la imagen ampliada de la extrema derecha se pueden ver neuronas eGFP positivas y negativas señaladas con las cabezas de flecha blancas. Tomado de (Shuen et al., 2008; Matamales et al., 2009).

### 3.11 Distinta respuesta sináptica supraumbral de las dSPNs e iSPNs

El avance de la ingeniería genética ha permitido el desarrollo de ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor de la expresión de los receptores dopaminérgicos del tipo D1 o D2: “*bacterial artificial chromosome*” (BAC) eGFP D1 y BAC eGFP D2 (Shuen et al., 2008; Matamales et al., 2009). En la figura 7 se muestran tres fotografías de microscopia confocal, en el inciso A, se encuentra un ejemplo de una rebanada sagital de una ratón BAC-D1, donde se aprecia la vía directa de los ganglios basales marcada por la expresión de la proteína eGFP. En el inciso B se muestra la vía indirecta de los GB, por la expresión de la proteína eGFP en el ratón BAC-D2. A la extrema derecha se muestra un acercamiento en donde se aprecian las neuronas eGFP positivas y negativas.

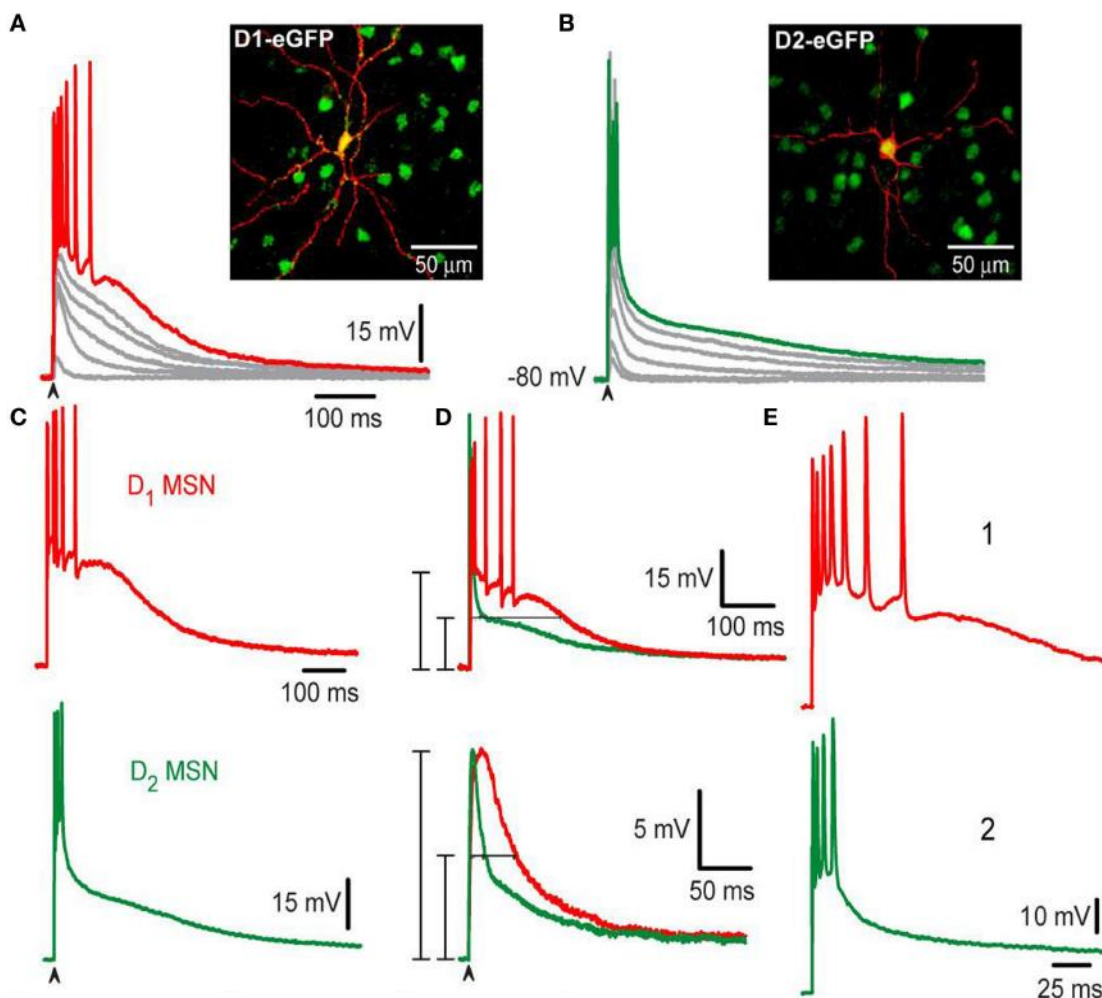
Con dicha tecnología de ingeniería genética se ha podido diferenciar claramente que la integración sináptica cortico-estriatal de las neuronas de la vía directa (dSPN) difieren de las que conforman la vía indirecta (iSPN). Una de las principales diferencias es la duración de las respuestas sinápticas cortico-estriatales que estos dos tipos neuronales exhiben. Las dSPN presentan mayor duración a la amplitud media respecto de las iSPN. De manera cualitativa, las dSPNs poseen una meseta despolarizante de varios cientos de milisegundos con disparo repetitivo de menor frecuencia con respecto a las iSPNs.

Por otra parte las iSPN es aproximadamente la mitad de aquella de las dSPN. Esta marcada diferencia se hace presente incluso en las respuestas sinápticas subumbrales. En el inciso A, B y C de la figura 8, se ilustran registros de la distinta respuesta supraumbral en las dSPNs e iSPNs al estimular la corteza. En el inciso D, se muestra la sobre posición de los registros, tanto supraumbrales como subumbrales. En el inciso E se presenta un barrido más amplio de los registros de las respuestas



supraumbrales en donde se aprecia con claridad que las iSPNs exhiben mayor frecuencia de disparo durante la respuesta sináptica.

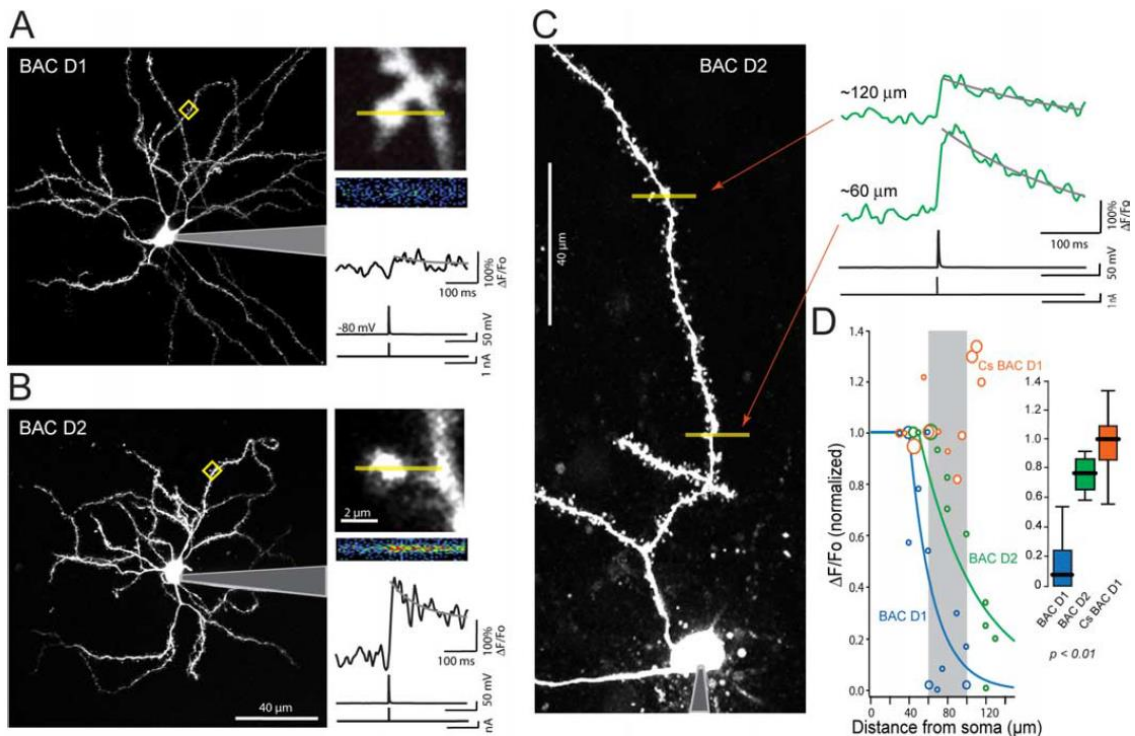
El  $\text{Ca}^{2+}$  está involucrado en múltiples procesos fisiológicos tales como la liberación de neurotransmisores, modulación de canales iónicos, la inducción de plasticidad sináptica, el control metabólico, la transcripción génica, etc. (Higley & Sabatini 2010). Específicamente, en las SPNs el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular participa en algunos procesos fisiológicos tales como: la regulación de la frecuencia de disparo (Galarraga et al., 1989; Pérez-García et al., 2003), el mantenimiento de las mesetas despolarizantes ante estímulos ortodróxicos cortico-estriatales (Hernández-López et al., 1997; Vergara et al., 2003; Flores-Barrera et al., 2011), en la liberación GABAérgica (Pérez-Rosello et al., 2005), etc.



**Figura 8.** Diferencias en la integración sináptica cortico-estriatal de las SPNs. En los inciso A,B y C, se muestra las respuesta sinápticas supraumbrales de una dSPN (trazo rojo) y una iSPN (trazo verde) identificadas en ratones BAC-D1 y BAC-D2 respetivamente. En el inciso D, se muestra la sobreposicion de los registros electrofisiológicos supraumbrales y subumbrales, note que en ambos casos las dSPN exhiben una mayor duración a la amplitud media. En el inciso E se graficaron los trazos a diferente barrido a fin de observar la diferente frecuencia de disparo, durante la respuesta sináptica de las dSPN e iSPN. Tomado de Flores-Barrera et. al., 2010.

En este sentido, se han reportado diferencias en la forma en que el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en la integración sináptica entre las SPNs. De acuerdo con la literatura, las iSPN poseen mayor contribución de  $\text{Ca}^{2+}$  en sus dendritas respecto a las dSPN. Sólo en las iSPN, esta molécula participa en la excitabilidad dendrítica, desde las dendritas proximales hasta las dendritas distales. En los inciso A, B y C de la figura 9, se ilustran los experimentos que muestran este fenómeno (Day et al., 2008; Plotkin et al., 2011; 2013).

También se ha descrito que sólo las iSPNs pueden generar potenciales auto regenerativos de  $\text{Ca}^{2+}$  que forman en las dendritas y se propagan hasta el soma de estas neuronas (Flores-Barrera et al., 2010; Arias-García et al., 2013). Con base en estas evidencias se puede considerar que otra de las diferencias entre las SPNs es la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la integración sináptica. El  $\text{Ca}^{2+}$ , también resulta relevante porque permite la activación de los canales de potasio dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o ( $\text{Kca}^{2+}$ ).



**Figura 9.** Distinta dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  en las dendritas de las SPNs. En el inciso A y B se muestra la dinámica del calcio dendrítico en neuronas dSPNs e iSPNs identificadas en los ratones BAC D1 y BAC-D2 respectivamente, llenadas con Alexa Fluor 568. En estas condiciones se aprecia que en las iSPN el calcio permea hasta las dendritas distales después de evocar un potencial de acción en el soma, mientras que en las dSPN no se observa ese fenómeno. En los incisos C y D, se muestra la cuantificación estadística. Tomado de Day et al., 2008.

### 3.12 Canales de potasio dependientes de calcio ( $\text{Kca}^{2+}$ )

La despolarización de la membrana celular permite la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que aumentan la probabilidad de que los  $\text{Kca}^{2+}$  se abran y repolaricen el voltaje de las células. Estos canales se encuentran ampliamente distribuidos en diversas estructuras cerebrales (Stocker & Pedarzani 2000), participando en procesos fisiológicos tales como: neurosecreción, la forma y duración de los potenciales de acción, el post potencial hiperpolarizante, la frecuencia de disparo y en la repolarización de potenciales sinápticos. (Sah, 1996; Bennett et al., 2000; Stocker, 2004). Los  $\text{Kca}^{2+}$ , se han clasificado en 3 familias llamadas: BK, SK e IK, tomando en cuenta sus propiedades biofísicas y farmacológicas.

En las SPNs, se ha descrito la presencia de los canales BK y SK, los cuales participan en la repolarización del potencial de acción (canal tipo BK) y en el postpotencial

hiperpolarizante (canal tipo SK). Ambas clases regulan la frecuencia de disparo de las SPNs (Pineda et al., 1992; Vilchis et al., 2000, 2002).

Recientemente se ha descrito en la literatura que los  $Kca^{2+}$  también pueden regular la excitabilidad de la actividad sináptica en las dendritas de las neuronas (Ngo-Anh et al., 2005; Benhassine et al., 2005, 2009), sin embargo, este fenómeno no se había estudiado en las SPNs, por lo que se desconocía si los  $Kca^{2+}$  participan en la repolarización de potenciales sinápticos en las dendritas de las SPNs (Arias-García et al., 2013).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estriado recibe aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral y el tálamo, que poseen diferentes características anatómicas relacionadas con distintas funciones cognitivas y motoras. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito con claridad la naturaleza de la integración sináptica Cortico-estriatal VS Tálamo-estriatal, las conexiones sinápticas de estas aferentes con las interneuronas estriatales, ni la dinámica del microcircuito que estas dos aferentes evocan.

Actualmente, los reportes sobre la naturaleza de la integración sináptica de la aferencia talámica al estriado en términos electrofisiológicos, son escasos. Uno de los principales obstáculos para comprender la fisiología de esta vía *in vitro*, ha sido la obtención de una rebanada de cerebro que preserve tanto la vía tálamo-estriatal como la vía cortico-estriatal y que permita comparar ambas vías en las neuronas del estriado. A partir de los estudios realizados por Smeal RM y colaboradores (2007), quienes reportan un tipo de corte horizontal con el ángulo que preserva ambas vías, es posible la comparación directa en una misma neurona de las dos aferencias excitatorias. En el presente trabajo se planteó conocer la diferencia funcional de estas aferencias dejando intactos los distintos componentes que participan en la actividad sináptica (intrínsecos y extrínsecos), ya que en la mayoría de los estudios sobre integración sináptica, el circuito neuronal se aísla del resto de los elementos que participan (glutamatérgico, GABAérgico etc.).

De acuerdo a lo anterior, se plantean las siguientes preguntas:

- 1.- ¿Las propiedades intrínsecas de las neuronas estriatales de proyección (canales iónicos distribuidos en la membrana somatodendrítica) determinan la integración de la respuesta sináptica? (particularmente los canales de potasio dependientes de calcio  $K_{Ca}^{2+}$ ).
- 2.- ¿La respuesta cortico-estriatal depende de la corteza cerebral estimulada? (e.g. corteza temporal, parietal, frontal, etc).
- 3.- ¿La respuesta tálamo-estriatal produce una respuesta sináptica distinta a la respuesta cortico-estriatal?
- 4.- ¿Las entradas glutamatérgicas al estriado poseen una innervación preferencial sobre las distintas neuronas estriatales? (e.g. La corteza activa preferentemente a las interneuronas FS, mientras que el tálamo inerva preferentemente a las interneuronas ChAT).
- 5.- ¿Existen diferencias en la plasticidad sináptica de corto plazo en las terminales corticales y las talámicas?
- 6.- ¿La estimulación repetitiva de corteza o tálamo producen respuestas similares en las neuronas estriatales?
- 7.- ¿Existen diferencias sinápticas al estimular las vías cortical y tálamica optogenéticamente respecto a la estimulación eléctrica de campo?

## 5. HIPÓTESIS

- A) Las propiedades intrínsecas de las distintas clases de neuronas del estriado determinan las características electrofisiológicas de las respuestas sinápticas, no el tipo de aferente estimuladas.
- B) Las terminales glutamatérgicas de la corteza y el tálamo poseen distinta plasticidad de corto plazo.

C) La estimulación optogenética producirá respuestas post-sinápticas similares a la estimulación eléctrica.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 General**

Investigar si las diferencias en las respuestas supraumbrales cortico-estriatales de las neuronas de proyección de la vía directa e indirecta, se explican por corrientes intrínsecas a cada neurona (canales iónicos, receptores, anatomía, etc), o por diferencias extrínsecas (distintas aferentes que cada neurona recibe).

### **6.2 Particulares**

- 1) Explorar si las diferencias en la integración sináptica entre las neuronas estriatales de proyección (SPNs) dependen del área cortical estimulada.
- 2) Investigar si es posible evocar una respuesta supraumbral en las neuronas estriatales activando la vía tálamo-estriatal.
- 3) Evaluar si las diferencias en la integración sináptica córtico-estriatal entre las neuronas estriatales de proyección (SPNs) se mantienen al estimular la vía tálamo-estriatal.
- 4) Determinar si ambas aferencias glutamatérgicas del estriado establecen comunicación sináptica con las interneuronas estriatales.
- 5) Examinar si existe alguna diferencia funcional entre las aferentes corticales y talámicas que inervan el estriado.

## **7 MATERIALES Y MÉTODOS**

Todos los procedimientos de este proyecto se llevaron a cabo de acuerdo con la ley de uso y cuidado de animales de laboratorio, aprobados por la universidad nacional autónoma de México (NOM-062-ZOO-1999) y el Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL-IFC) EGP41-14.

### **7.1 Animales**

Con el objetivo de identificar a los distintos tipos neuronales del estriado se utilizaron varias líneas de ratones transgénicos, que a continuación se describirán brevemente:

Para la identificación de las neuronas de proyección de la vía directa (dSPNs) se utilizó el ratón:

**1)** Tg(Drd1-EGFP)X60Gsat/Mmmh (BAC-D1; Nathaniel Heintz, Ph.D., The Rockefeller University, GENSAT #: 000297-MU), que en lo subsecuente se le denominará BAC Drd1-eGFP.

Para la identificación de las neuronas de proyección de la vía indirecta (iSPNs) se utilizaron los ratones:

**2)** Tg(Drd2-EGFP)S118Gsat/Mmnc (BAC-D2; Nathaniel Heintz, Ph.D., The Rockefeller University, 000230-UNC), que en lo subsecuente se le denominará BAC Drd2-eGFP.

**3)** B6.FVB8(Cg)-Tg(Adora2a-cre) KG139Gsat/Mmucd (A2A-Cre; Nathaniel Heintz, Ph.D., The Rockefeller University and Charles Gerfen, Ph.D., National Institutes of Health, National Institute of Mental Health; 036158-UCD), que en lo subsecuente se le denominará A2A-Cre.

Para la identificación de las interneuronas Fast spiking (FSI) se utilizó el ratón:

**4)** B6;12P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J(PV-Cre; Silvia Arber, Friederich Miescher Institute; Jackson Labs, stock # 008069), que en lo subsecuente se le denominará PV-Cre.

Para la identificación de las interneuronas colinérgicas (ChAT+) se utilizó el ratón:

**5)** B6;129S6-Chattm2(cre)Lowl/J(ChAT-Cre; Bradford B. Lowell, Beth Israel Deaconess Med Cntr (Harvard); Jackson Labs, stock # 018957), que en lo subsecuente se le denominará ChAT-Cre.

Para la identificación de las interneuronas LTS se utilizó el ratón:

**6)** Tg(5HTr3a-cre)NO152Gsat/Mmucd (5HTr3a-Cre; Nathaniel Heintz, Ph.D., The Rockefeller University, and Charles Gerfen, Ph.D., National Institutes of Health, National Institute of Mental Health; 036680-UCD), que en lo subsecuente se le denominará 5HT3Ra-Cre.

Para activar la vía tálamo-estriatal selectivamente con optogenética se utilizó el ratón:

**7)** KSlc17a6tm2(Cre)Lowl/J. (Vglut2-Cre; Bradford B. Lowell, Beth Israel Deaconess Med Cntr (Harvard); Jackson Labs, Stock # 016963), que en lo subsecuente se le denominará Vglut2-Cre.

## 7.2 Mantenimiento de animales

Todas las líneas de animales transgénicos fueron mantenidas con cruces de animales con un fondo genético afín, tal es el caso de los ratones C57BL/6 o los ratones CR CD-1 CRL.

Algunos experimentos se realizaron en ratones silvestres (Sin modificaciones genéticas) (C57BL/6 ó CR CD-1 CRL) o bien negativos a la enzima Cre, recombinasa o a la proteína eGFP. En todos los casos se obtuvieron resultados similares.

Todos los animales se mantuvieron un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 a temperatura controlada (22-24°C) y con libre acceso a alimento y agua. En todos los grupos experimentales se utilizó el mínimo número de animales para obtener significancia estadística. Los animales fueron profundamente anestesiados con ketamina (30 mg / kg, ip; Anesket) y xilazina (3 mg / kg, ip; Rompun; Bayer), y perfundidos por la vía intracardiaca con la siguiente solución salina: (en mM): 225 sacarosa, 2.5 KCl, 7 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 28 NaHCO<sub>3</sub>, 7 glucosa, 1 ácido ascórbico, y 3 piruvato con un pH de 7.4 ajustado con NaOH y saturado con 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente los animales fueron decapitados y se extrajo el cerebro inmediatamente.

## 7.3 Preparación *In vitro*

Se obtuvieron rebanadas de cerebro de 300 µm de espesor a 4°C, por medio de un vibratomo. Con el fin de preservar la vía tálamo-estriatal y la vía cortico-estriatal en la misma rebanada se obtuvieron cortes horizontales o sagitales con un ángulo de 20°. Así mismo se utilizaron rebanadas sagitales sin ángulo para estudiar la vía cortico-estriatal. (Smeal et al., 2007; Ding et al., 2008; Flores-Barrera et al., 2010)

Las rebanadas adquiridas se transfirieron a una solución salina que contiene (en mM) 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 glucosa, 0.2 ácido ascórbico, y .02 de tiourea con un pH de 7.4 y saturado con 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. Después de 1 hora de restablecimiento del tejido a temperatura ambiente, las rebanadas se transfirieron a la cámara de registro en donde tuvieron una perfusión continua de la misma solución salina oxigenada a una tasa de 2 a 3 ml/min.



#### 7.4 Registros electrofisiológicos

Los registros se realizaron con la técnica de Patch Clamp en la modalidad de célula entera, en su mayoría en la modalidad de fijación de corriente y en algunos casos en la modalidad de fijación de voltaje.

La visualización del tejido se realizó con un objetivo de inmersión de 40X y un contraste de interferencia diferencial de iluminación infrarroja (IR-DIC) montado en un microscopio (Nikon Instruments, Melville, NY) conectado a una cámara digital y un monitor. Los registros se realizaron con un amplificador *Axoclamp-2B* (Axon instruments, Foster city, CA). La adquisición y visualización de los datos se llevó a cabo en un software diseñado en el laboratorio del Dr. José Bargas IFC-UNAM en el entorno de LabVIEW (National Instruments, Austin TX).

Los electrodos de registro fueron elaborados con tubos de borosilicato (WorldPrecision Instruments, Inc. Fl. USA) que fueron estirados finamente por medio de un “*Puller*” para obtener electrodos con resistencias de 3 – 6 MΩ. (P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter instrument, Novato CA.). Los electrodos fueron llenados con la siguiente solución interna: (en mM): 120 KMeSO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0,2 Na<sub>2</sub>ATP, 0,2 Na<sub>3</sub>GTP y 1% biocitina.

#### 7.5 Transfección de Virus Adeno-Asociados

La transfección viral se realizó en la línea de ratones Cre. Los cuales expresan la encima Cre-recombinasa bajo el control de algún promotor específico, tales como la proteína parvalbumina (PV) o la encima colina-acetil-transferasa (ChAT), etc. De esta manera solo las neuronas que tienen ese promotor, expresan la encima Cre-recombinasa, lo que da pie a la recombinación específica de secuencias de ADN para la expresión de proteínas fluorescentes o canales iónicos.

Para este procedimiento se utilizaron virus Adeno-Asociados del serotipo 2 (AAV2) como vectores de las secuencias de ADN deseadas para la expresión de las proteínas fluorescentes (eYFP, tdTomato, etc) o de opsinas (ChR2) en las neuronas Cre (+). Con esta manipulación experimental fue posible activar neuronas específicas con pulsos de luz (Activación optogenética), (Deisseroth K. (2015).

En el presente proyecto se utilizaron las distintas líneas de ratones transgénicos antes mencionadas, entre los 21 y 60 días postnatales, en los cuales se realizó una cirugía estereotáxica para transfectar el estriado dorsal con los adenovirus Cre-dependiente AAV2 / 1.CAG.-FLEX. tdTomato. WPRE.bGH (tdTomato), (Honguki Zeng) o AVV1.EF1a.DIO.eYFP (eYFP), para la identificación específica de la población neuronal deseada (interneuronas FS, TAN, PLTS). En los mismos animales se llevó a cabo una segunda transfección con el adenovirus: AAV1.CamKIIa.hChR2 (H134R) eYFP.WPRE.hGII (Karl Deisseroth, Addgene plásmido # 26969) en los núcleos intralaminares del tálamo (Pf y CL) para activar vía tálamo-estriatal optogenéticamente. Con el mismo objetivo se transfectó el ratón transgénico VGLUT2-Cre con el adenovirus: AAV1 .EF1a.DIO.hChR2 (H134R) -eYFP.WPRE.hGH (ChR2), (Karl Deisseroth, Addgene plásmido # 20298).

La cirugía estereotáxica se llevó a cabo en una campana de extracción de flujo laminar dentro de un cuarto de bioseguridad aislado. Los ratones fueron profundamente anestesiados con ketamina (30 mg / kg, ip; Anesket) y xilazina (3 mg / kg, ip; Rompun; Bayer), así como con anestesia local (lidocaína). Posteriormente, el cráneo fue expuesto en condiciones antisépticas.

Tomando Bregma como referencia, se utilizaron las siguientes coordenadas: para los núcleos intralaminares del tálamo (PF): anteroposterior -2,5 mm, medial-lateral 0,05-0,07 mm y 3,5 mm de profundidad desde la superficie del cerebro. Por medio de una jeringa Hamilton se inyectó de 0,5 a 1  $\mu$ l del stock del virus.

Para la transfección del estriado dorsal se utilizó la coordenada: anteroposterior 1 mm, medial-lateral 1,5 mm y 3,0 mm de profundidad desde la superficie del cerebro (1 a 1.5  $\mu$ l del stock del virus). Después de la cirugía, los animales fueron alojados en el cuarto de bioseguridad durante al menos 7 días, posterior a ese tiempo de recuperación, se realizaron los experimentos hasta 30 días después de las transfecciones.

## **7.6 Protocolos de estimulación y registro**

Las aferentes se estimularon eléctrica y optogenéticamente. La estimulación eléctrica se realizó mediante electrodos bipolares concéntricos (50 micras, de diámetro en la

punta; FHC, Bowdoinham, ME) colocados sobre la capa V de la corteza sensorial o motora, así como en el borde interno del núcleo reticular del tálamo.

Las respuestas sinápticas fueron evocadas por una serie de pulsos de voltaje de intensidad creciente hasta obtener respuestas supraumbrales, con o sin disparo de potenciales de acción (Flores-Barrera et al., 2010) La sincronización y la frecuencia del estímulo se controló digitalmente desde el software de adquisición, sin embargo la duración e intensidad del estímulo fueron controlados por una unidad de aislamiento (Digitimer Ltd, Inglaterra).

La estimulación optogenética de las aferentes tálamo-estriatales se llevó a cabo con pulsos de luz azul (473 nm) emitida a través de un láser de 50 mW de potencia (CrystaLaser CL 473-50-O) situada cerca de la pipeta de registro o bien situada sobre el sitio de transfección. La duración del estímulo fue controlado por medio del software de adquisición de datos y la intensidad fue modulada por la salida de la potencia del láser.

En algunos experimentos, la estimulación optogenética se realizó con iluminación de epifluorescencia por medio de una lámpara de xenón con un filtro de luz azul de  $470 \pm 20$  nm de longitud de onda. La duración de la estimulación de epifluorescencia se controló con un obturador (Lambda LS, Sutter Instruments) conectado al microscopio a través de una fibra óptica.

## **7.7 Análisis de los datos**

Los datos digitalizados fueron importados para el análisis y su representación gráfica en el software comercial (Origin v. 8.; Microcal, Northampton, MA) y (Graphpad Prism 5, San José CA, EE.UU).

Se utilizaron pruebas de estadística paramétricas (Student's t tests) y no paramétricas (Wilcoxon, Mann-Whitney, Friedman, Kruskal-Wallis, etc.), de acuerdo a las características de los grupos medidos o comparados así como algunas pruebas post hoc (Tukey, Dunnett's, Dunn, etc.), con los siguientes niveles de significancia: (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). En algunos casos los datos se presentan como medias o medianas  $\pm$  SEM.

## 7.8 Análisis histológicos

Las rebanadas de las neuronas que se marcaron intracelularmente con biocitina, se fijaron en paraformaldehído (4%) y ácido pícrico (1%) en buffer salino de fosfatos, (PBS) con un pH de 7.4 a 4°C durante 24 horas para fijar el tejido. Posteriormente se hicieron tres lavados de diez minutos cada uno y se incluyó el tejido en sacarosa al 10% y 6%. Después se incluyó el tejido en un bloque de agar al 5% para obtener secciones de menor espesor (50  $\mu$ m) e incubarlas con 1: 200 de estreptavidina conjugada con Cy3 o Cy5 (Invitrogen) disuelto en PBS que contiene 0,3% de Triton X-100 (PBS-Tx), durante 12 horas en agitación continua.

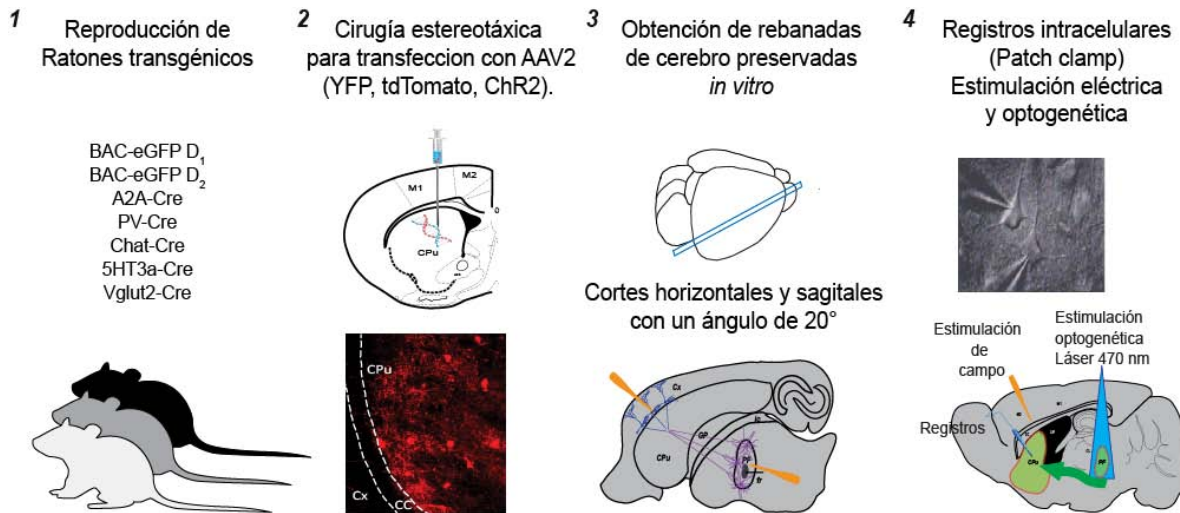
Finalmente, todos los cortes se montaron en porta-objetos con medio de montaje para muestras con fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories).

Todas las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Confocal Zeiss LSM700 (Zeiss, Göttingen, Alemania), en el cual se obtuvieron imágenes de 1024 X 1024 pixeles que fueron exportadas en formato de archivo TIFF.

## 7.9 Fármacos empleados

Nombre	Acción	Compañía
Apamina	Bloqueador de los canales SK	Alomone Labs (Israel)
Caribdotoxina	Bloqueador de los canales BK	
NS 1619	Activador del canal BK	Tocris Biosciences (Bristol, Reino Unido)
CyPPA	Activador del canal SK	
NS 309	Activador del canal SK	
CNQX	Bloqueador de los receptores AMPA y KAINATO	Sigma-Aldrich-RBI (St Louis, MO, USA)
APV	Bloqueador de los receptores NMDA	
Bicuculina	Bloqueador de los receptores GABA <sub>A</sub>	

Todas las soluciones stock de los fármacos se prepararon al momento de realizar la serie de experimentos correspondientes y posteriormente se añadieron al medio de perfusión para alcanzar la concentración final deseada.



**Figura 10.** Esquema resumen de la metodología empleada. Número 1: Tipos de animales transgénicos que se utilizaron en el presente proyecto. 2: Ejemplo del sitio de transfección en el estriado dorsal y fotografía de una rebanada horizontal de un ratón PV-Cre, en el que se expresó la proteína tdTomato en las interneuronas FS. 3: Esquema del tipo de corte y rebanadas obtenidas que preservan las vías cortico-estriatal y tálamo-estriatal. 4: Fotografía que ilustra dos neuronas que se están registrando con la técnica de patch clamp, así como un esquema de la preparación experimental que se utilizó para activar la vía tálamo-estriatal optogenéticamente y la cortico-estriatal con estimulación de campo.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Identificación y caracterización electrofisiológica de las neuronas estriatales

#### Neuronas de proyección

Para la caracterización electrofisiológica de las neuronas estriatales de proyección (dSPNs e iSPNs), se tomaron muestras de varios ratones de diferentes cepas.

Se registraron 14 neuronas de la vía directa o dSPNs de la siguiente manera: 7 en ratones BAC-D1, 4 en ratones A2A-Cre y 3 en ratones C57BL /6J. Por otra parte se registraron 17 neuronas de la vía indirecta o iSPNs de la siguiente manera: 4 en ratones BAC-D2, 4 en ratones A2A-Cre y 5 en ratones C57BL / 6J. Las dSPNs e iSPNs se identificaron por sus marcadores moleculares o respuesta electrofisiológica ante la estimulación cortico-estriatal (Flores-Barrera et al., 2010).

Las SPNs se caracterizan por presentar un retardo en la generación del primer potencial de acción, al ser estimuladas en el soma con un pulso despolarizante (Bargas et al., 1989). Este retardo tiene la forma de una rampa despolarizante de

varios cientos de milisegundos (Trazo negro de los incisos A1 Y B1 de la Figura 11). Las SPNs también presentan un patrón de disparo tónico regular y con poca adaptación (Trazo rojo y verde de los incisos A1 Y B1 de la Figura 11). Por otra parte, se observa cierta oposición del voltaje a la hiperpolarización debido al rectificador entrante (incisos A2 Y B2 de la Figura 11).

Las neuronas dSPNs tuvieron en promedio un potencia de membrana (mV) de  $-85.2 \pm 0.9$ , mientras que las iSPNs presentaron un promedio de  $-86.1 \pm 1.05$ . De manera consistente con la literatura, las SPNs mostraron una resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) en promedio de  $174 \pm 23$  y  $148 \pm 18$  para las dSPNs e iSPNs respectivamente (Figura 11, inciso A2 y B2).

La constante de decaimiento membranal ( $\tau_m$ ) fue ligeramente más rápida en las iSPNs ( $12 \pm 2.2$ ), con respecto a las dSPNs ( $15 \pm 2.1$ ), (Figura 11, inciso A3 y B3). Sin embargo la diferencia no fue significativa (Student's t test.  $P = 0.284$ ). Por otra parte las iSPNs tuvieron una capacitancia neuronal (pF) de  $77 \pm 8.0$ , mientras que las dSPNs tuvieron una capacitancia de  $77 \pm 6.0$ , lo cual sugiere que el área somatodendrítica de las SPNs es muy similar (Reyes et al., 1998; Saunders et al., 2016).

### **Interneuronas estriatales**

En el presente proyecto se registraron las siguientes clases de interneuronas: FS, ChAT y LTS. Las FSI se obtuvieron principalmente de los ratones transgénicos PV-Cre ( $n = 7$ ), y 5HTr3a-Cre ( $n = 5$ ), las interneuronas ChAT se obtuvieron de los ratones ChAT-Cre ( $n = 11$ ), mientras que las interneuronas LTS se obtuvieron de los ratones 5HTr3a-Cre ( $n = 8$ ) y de ratones transgénicos Vglut2-Cre, BAC-D1 y BAC-D2 ( $n=7$ ). En todos los casos se realizó una clasificación con base en las propiedades electrofisiológicas de las distintas clases de interneuronas de acuerdo con lo reportado en la literatura (Tepper et al., 2010; Ibañez-Sandoval et al., 2010, 2011; Saunders et al., 2016). Cabe mencionar que las interneuronas: Neurogliaforme y Fast-adapting fueron excluidas del presente estudio.

Las propiedades electrofisiológicas de las interneuronas registradas en este proyecto se describen a continuación:

### Interneuronas FS

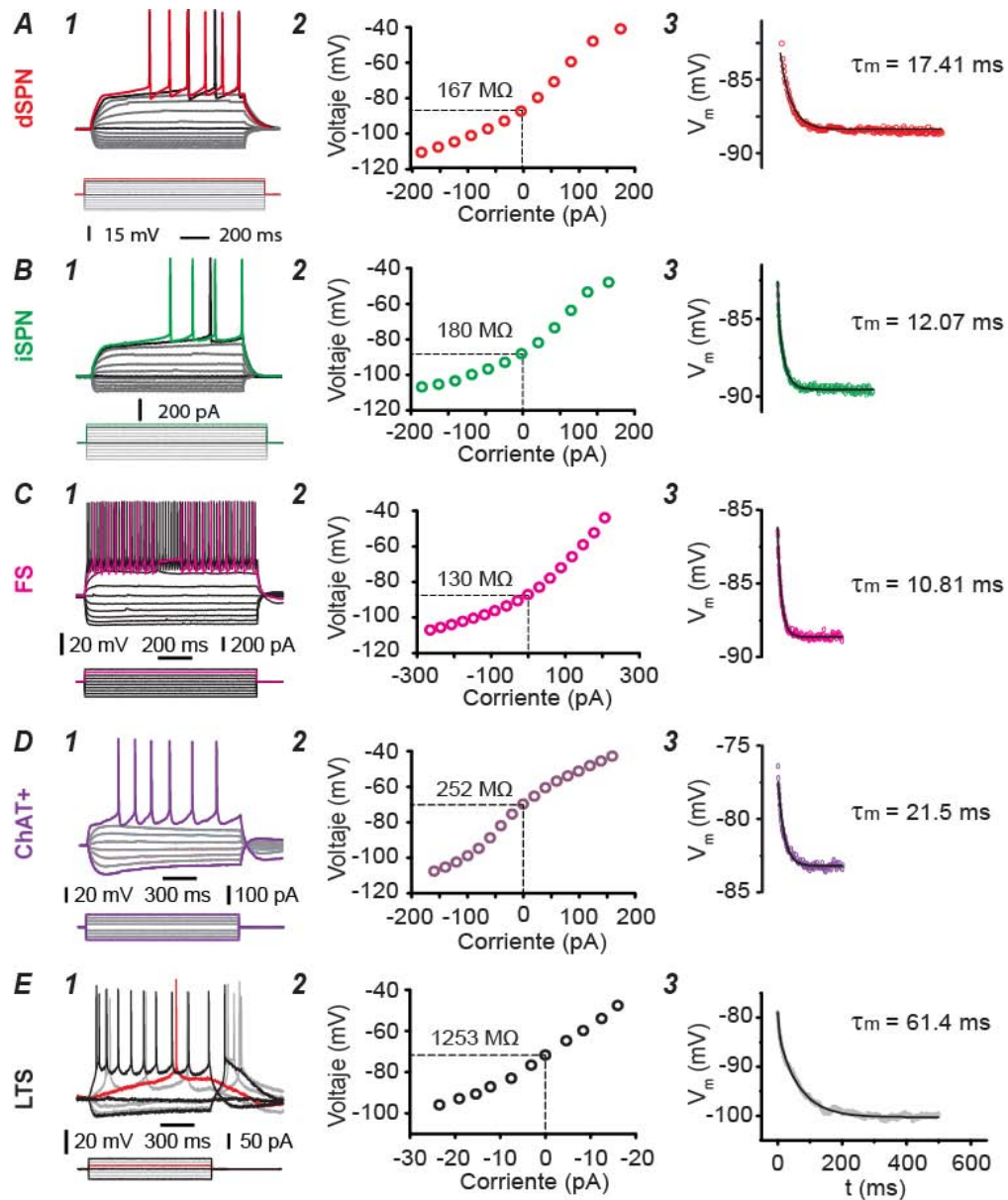
La principal característica electrofisiológica de las FSI es la capacidad de generar ráfagas de potenciales de acción de hasta 300 Hz. En algunas ocasiones estas neuronas exhiben disparo con pausas o “Stuttering” (Ver trazo color rosa del inciso C1 de la figura 11). Las FSI, tuvieron un potencial de membrana en promedio de  $-81 \pm 3.1$  (mV), una resistencia de entrada de  $159 \pm 14$  ( $M\Omega$ ), constante de decaimiento membranar de  $10.1 \pm 1.0$  (tau  $\tau_m$ ) y una capacitancia neuronal de  $64 \pm 4.1$  (pF). Para estas mediciones se consideraron 14 neuronas registradas (incisos C2 Y C3 de la Figura 11).

### Interneuronas ChAT

La principal característica electrofisiológica de las ChAT es su baja frecuencia de disparo, debido a las conductancias de potasio que subyacen al largo post-potencial hiperpolarizante. Por otra parte, estas interneuronas presentan una deflexión en el voltaje no uniforme o “Sag” en respuesta a un pulso cuadrado hiperpolarizante en el soma (Ver trazos color rosa del inciso D1 de la figura 11).

Considerando las ChAT que presentaron actividad espontánea y aquellas que no la tuvieron, presentaron un potencial de membrana en promedio de  $-72 \pm 1.7$  (mV), una resistencia de entrada de  $242 \pm 43$  ( $M\Omega$ ), constante de decaimiento membranar de  $24 \pm 6.1$  ms (tau  $\tau_m$ ) y una capacitancia neuronal de  $90.5 \pm 11.6$  (pF). Para estas mediciones se consideraron 11 neuronas registradas (incisos D2 Y D3 de la Figura 11).





**Figura 11.** Caracterización electrofisiológica de las neuronas estriatales. La columna de la izquierda del extremo superior al inferior, muestra la respuesta del voltaje ante la aplicación de pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes en el soma de una dSPN (inciso A1), iSPN (inciso B1), FSI (inciso C1), ChAT (inciso D1), y una LTS (inciso E1). La columna central ilustra la relación corriente-voltaje o “Curva I-V” y el valor de la resistencia de entrada para cada uno de los tipos neuronales antes mencionados. La columna derecha ilustra el ajuste de una exponencial a la constante de tiempo membranar de cada uno de los tipos neuronales estudiados. En las tres columnas se conserva el siguiente código de color para cada clase neuronal: dSPN (Color rojo), iSPN (Color verde), FSI (Color rosa), ChAT (Color morado), y una LTS (Color negro).



## Interneuronas LTS

La principal característica electrofisiológica de las LTS es la presencia del bajo umbral de disparo, así como el disparo en ráfaga al inicio de la estimulación del pulso cuadrado despolarizante en el soma. Estas neuronas también pueden exhibir disparo al final de un pulso hiperpolarizante en el soma. Cabe mencionar que estas neuronas también presentan rectificación ante pulsos hiperpolarizantes. Las características electrofisiológicas se ilustran en los trazos rojos y negros del inciso 1E de la figura 11. Las interneuronas LTS, tuvieron un potencial de membrana en promedio  $73.1 \pm 1.42$  (mV), una resistencia de entrada de  $1,019 \pm 204$  ( $M\Omega$ ), constante de decaimiento membranal de  $61.4 \pm 10.8$  ms (tau  $\tau_m$ ) y una capacitancia neuronal de  $73.3 \pm 5.7$  (pF). Para estas mediciones se consideraron 15 neuronas registradas (incisos E2 Y E3 de la Figura 11).

### 8.2 Integración Sináptica Cortico-estriatal en las SPNs

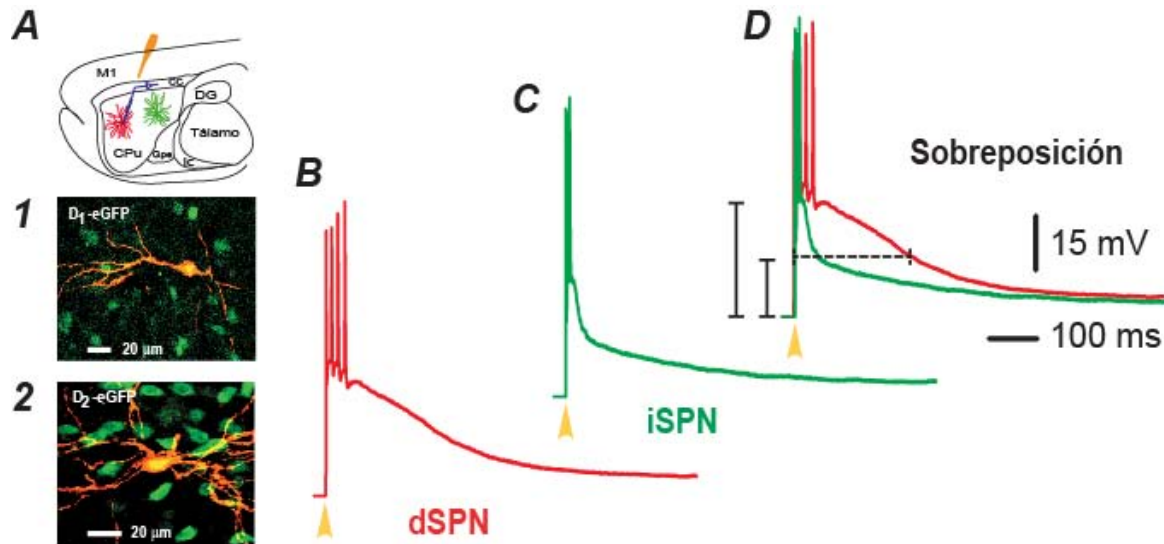
Las dSPNs exhiben una distinta respuesta sináptica con respecto a las iSPNs. Dicha diferencia se ha observado recientemente al estimular la vía cortico-estriatal con un electrodo bipolar concéntrico en la capa 5 de la corteza sensorio-motriz (esquema experimental ilustrado en el Inciso A de la figura 12) (Flores-Barrera et al., 2010). En el presente proyecto se corroboró esta información registrando neuronas de la vía directa (dSPNs) en ratones BAC D1-eGFP (Inciso A1 de la figura 12) y neuronas de la vía indirecta (iSPNs) en ratones BAC D2-eGFP (Inciso A2 de la figura 12), así como en ratones A2A-Cre.

La principal diferencia entre neuronas dSPNs y neuronas iSPNs, consiste en la distinta duración a la amplitud media de la respuesta sináptica cortico-estriatal.

Las dSPNs exhiben una meseta despolarizante de varios cientos de milisegundos con disparo repetitivo (Inciso B de la figura 12). La duración a la amplitud media de esta respuesta sináptica tuvo un valor promedio de  $296 \pm 26$  ms ( $n = 24$ ).

Por otra parte las iSPNs responden a la activación cortical con una respuesta despolarizante que exhibe una rápida repolarización (Inciso C de la figura 12). Como resultado, la duración a la amplitud media de la respuesta sináptica es en promedio

de  $115 \pm 13$  ms ( $n = 19$ ). La diferencia en la duración a la amplitud media de la respuesta sináptica cortico-estriatal entre iSPNs dSPNs se puede observar con toda claridad al sobreponer los trazos en el mismo barrido temporal (Inciso D de la figura 12).



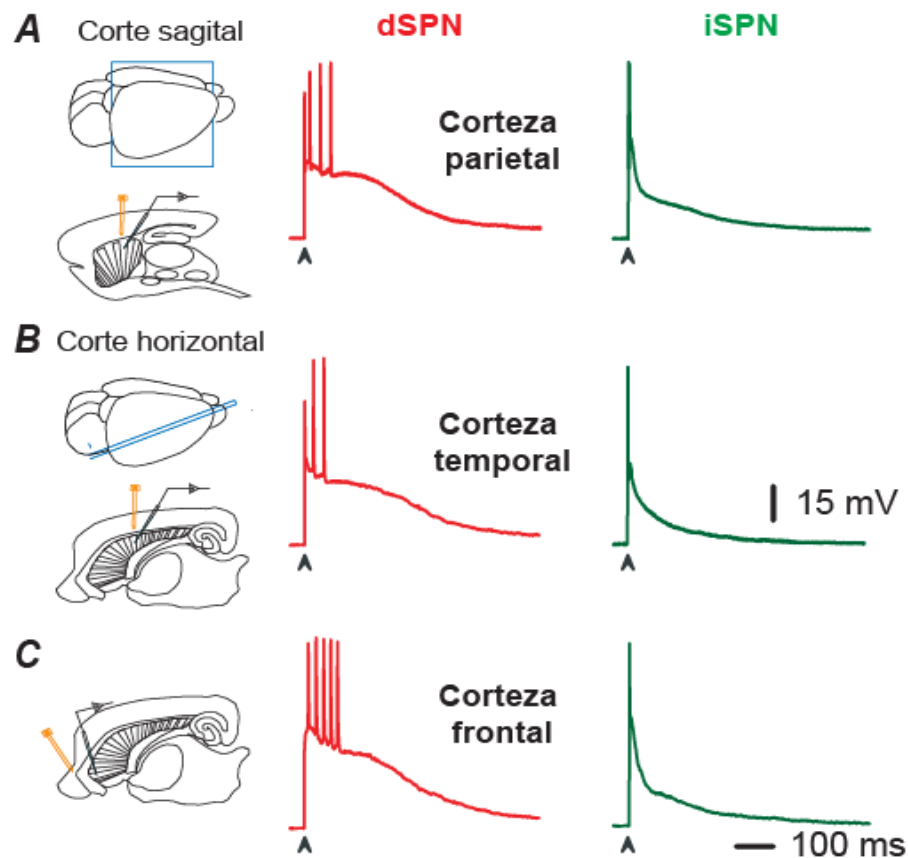
**Figura 12.** Distinta respuesta sináptica cortico-estriatal entre las SPNs. iSPNs: A) ensamble experimental: el electrodo de campo señalado en color amarillo se colocó sobre la capa 5 de la corteza cerebral para estimular la vía cortico-estriatal. A1y A2). Al mismo tiempo de estimular la vía cortico-estriatal, se registró la respuesta sináptica en las SPNs identificadas en ratones transgénicos BAC-D1-eGFP y BAC-D2-eGFP. B) Respuesta sináptica supraumbra de una dSPN. C) Respuesta sináptica supraumbra de una iSPN. D) Sobreposición de los trazos de respuesta sináptica. La cabeza de flecha al pie de los registro indica el momento en que se dio el estímulo en la corteza cerebral.

Con base en los resultados obtenidos, nos preguntamos sí la distinta respuesta cortico-estriatal entre las SPNs, depende de factores extrínsecos o intrínsecos. Los componentes extrínsecos considerados fueron: el área cortical estimulada, o bien una fuente distinta de glutamato, como las aferentes provenientes de los núcleos intralaminares del tálamo. Los componentes intrínsecos considerados fueron: la distinta contribución de canales iónicos que tienen una importante participación en la repolarización de la respuesta sináptica, tales como los canales de potasio, o bien una distinta contribución de canales de calcio.

### 8.3 Estimulación de la vía cortico-estriatal en distintas regiones corticales

Dado que las distintas áreas corticales están relacionadas con diversas funciones sensoriales, motoras y cognitivas, se estimularon 3 diferentes regiones corticales para estudiar si las distintas respuestas cortico-estriatales en las SPNs dependen de la corteza motora o bien se generalizan a las aferentes cortico-estriatales asociadas a distintas funciones. Para ello, se obtuvieron cortes sagitales que preservaran la corteza parietal en la cual se estimuló la corteza sensorial primaria (Inciso A de la figura 13). También se obtuvieron cortes horizontales para activar la corteza sensorial secundaria del lóbulo temporal (Inciso B de la figura 13), así mismo se activó la corteza insular del lóbulo frontal (Inciso C de la figura 13). En ambas neuronas (dSPN y iSPNs), las respuestas sinápticas fueron consistentes entre su mismo tipo (figura 13). Los resultados obtenidos, sugieren que las distintas respuestas sinápticas entre las SPNs son independientes de las distintas vías aferentes cortico-estriatales que inervan al estriado.

Para corroborar que las distintas respuestas sinápticas entre las SPNs, no dependen de los elementos extrínsecos, se estudió la respuesta sináptica de las SPNs activando otra fuente distinta de glutamato; la vía tálamo-estriatal.



**Figura 13.** Distinta respuesta sináptica cortico-estriatal entre las SPNs. A) Ilustración de corte sagital que preserva la corteza parietal, a la derecha se muestran las respuestas sinápticas supraumbrales de dSPN (rojo) e iSPN (verde), obtenidas al estimular la corteza sensorial primaria. B) Ilustración de corte horizontal con un ángulo de 20° que preserva la corteza temporal, a la derecha se muestran las respuestas sinápticas supraumbrales de dSPN (rojo) e iSPN (verde) que se obtuvieron al estimular la corteza sensorial secundaria. C) Respuestas sinápticas supraumbrales de dSPN (rojo) e iSPN (verde) que se obtuvieron al estimular la corteza insular en una rebanada horizontal.

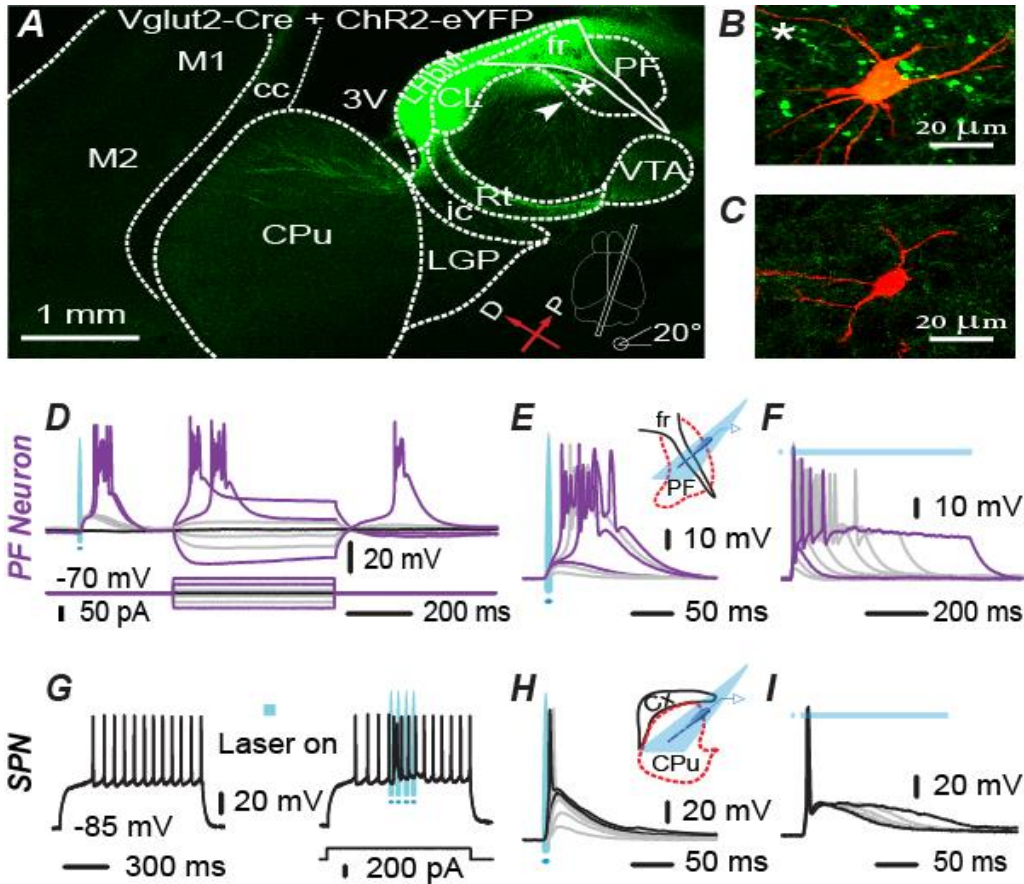
#### 8.4 Trazado y activación optogenética de la vía tálamo-estriatal

Con el objetivo de activar selectivamente la vía tálamo-estriatal, se utilizó la técnica de optogenética. Para ello se utilizaron ratones transgénicos Vglut2-Cre, en los cuales se introdujo en los núcleos intralaminares parafascicular (Pf) y centrolateral (CL) un adenovirus dependiente de la enzima Cre-recombinasa, que contiene secuencias de ADN para expresar las proteínas eYFP-ChR2. Después de la expresión de las proteínas, se realizó una rebanada sagital con un ángulo de 20° que preserva la vía tálamo-estriatal en condiciones óptimas para los experimentos posteriores de electrofisiología *in vitro* (Inciso A de la figura 14). Para corroborar que la proteína eYFP se expresa en las neuronas de los núcleos intralaminares, se realizaron registros en

los que se realizó un marcado intracelular con biocitina que permitió identificar las características anatómicas reportadas en la literatura (Deschênes et al., 1995, 1996; Lacey et al., 2007). Se identificó una neurona del núcleo parafascicular positiva a eYFP, rodeada de axones y somas de otras neuronas transfectadas (inciso B de la figura 14). Las neuronas registradas pueden exhibir una respuesta tipo burst de bajo umbral de activación, al estimularlas con pulsos hiperpolarizantes en el soma (inciso D de la figura 14). En las respuestas subumbrales y supraumbrales evocadas optogenéticamente por estímulos de intensidades o duraciones crecientes se puede observar que estas neuronas también pueden exhibir respuestas de bajo umbral de disparo, seguidas de ráfagas de potenciales de acción de alta frecuencia (incisos E y F de la figura 14).

Una vez que se corroboró la correcta expresión de la eYFP y el ChR2 en las neuronas de los núcleos intralaminares, se verificó la activación de los axones tálamicos en el estriado. Para ello, se realizaron registros intracelulares en las SPNs que se marcaron con biocitina para su corroboración anatómica (Inciso C de la figura 14). La frecuencia de disparo se incrementó al momento en que se activaron los axones tálamicos eYFP-ChR2 + dentro del estriado con un tren de 4 pulsos a 20 Hz, lo que indica que la activación de la vía tálamo-estriatal fue exitosa (inciso G, figura 14).

En las neuronas estriatales se emplearon los mismos protocolos de activación optogenética utilizados para las neuronas tálamicas (Incisos E, F, H e I de la figura 14).



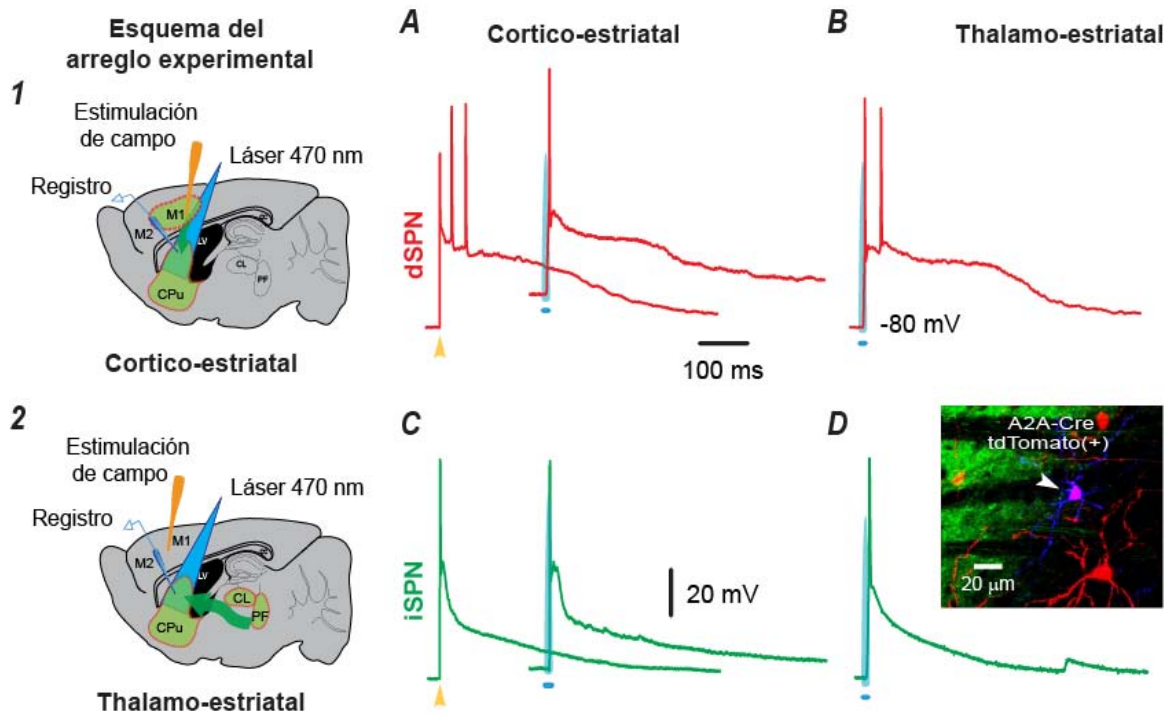
**Figura 14.** Activación optogenética de la vía tálamo-estriatal. A) Reconstrucción serial de una rebanada sagital donde se muestra el sitio de la inyección del virus adeno-asociado EF1a.DIO-ChR2-eYFP en la región de los núcleos intralaminares del tálamo (PF y CL) en un ratón Vglut2-Cre, el corte fue sagital con un ángulo de 20 grados desde el eje antero-posterior del cerebro. B) Fotografía confocal de una neurona del núcleo parafascicular marcada intracelularmente con biocitina y positiva a eYFP. Alrededor también se observan colaterales axónicas locales eYFP-positivas. El sitio de registro está marcado por un asterisco en A. C) Neurona de proyección estriatal con marcado intracelular con biocitina (rojo) y rodeada de axones aferentes eYFP-positivos provenientes del tálamo. D) Respuesta del voltaje de una neurona del núcleo parafascicular ChR2-eYFP (+) ante la estimulación de luz al inicio del trazo, seguida de pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes en el soma de la neurona. E y F) Registros electrofisiológicos de la respuesta evocada al aplicar pulsos crecientes de intensidad (izquierda) y duración (derecha) de la estimulación laser sobre el núcleo parafascicular. G) Tren de potenciales de acción de una SPN evocados con un pulso de corriente en el soma (trazo izquierdo) y después de estimular simultáneamente la vía tálamo-estriatal optogenéticamente con un tren de cuatro pulsos de luz azul a 20 Hz (trazo derecho). Note el aumento de la frecuencia de disparo por la activación optogenética. H e I) Registros electrofisiológicos de una SPN, de la respuesta evocada al aplicar pulsos crecientes de intensidad (izquierda) y duración (derecha) de la estimulación laser sobre los axones tálamo-estriatales que expresan ChR2-eYFP. Las abreviaciones de la imagen del inciso A, son citados de acuerdo al atlas de Paxinos: M1: Corteza motora primaria; M2: Corteza motora secundaria; CPU: Caudado-putamen o estriado; CC: Cuerpo Calloso; 3V: 3er Ventrículo; LHbM: Habénula lateral parte media; CL: Núcleo talámico centrolateral; Pf: Núcleo talámico parafascicular; IC: Cápsula interna; LGP: Globo pálido lateral o externo (GPE); Rt: Núcleo reticular talámico; VTA: Área tegmental ventral; fr: Fascículo retroflexus

## 8.5 Comparación de la respuesta cortico-estriatal y tálamo-estriatal

Después de estandarizar los protocolos de estimulación optogenética, se realizaron los experimentos para comparar la respuesta sináptica de las SPNs de dos fuentes distintas de aferentes glutamatérgicas (Corteza y tálamo). En esta serie de experimentos se realizaron transfecciones con el constructo genético CamKII-ChR2-eYFP en la corteza motora (Ver figura suplementaria 1) o bien en los núcleos intralaminares del tálamo, para activar optogenéticamente las aferentes glutamatérgicas. Así mismo se realizaron experimentos estimulando las aferentes con electrodos de campo (Los esquemas de los arreglos experimentales se ilustran en los números 1 y 2 de la figura 15). Se observó que ambas respuestas sinápticas presentan una despolarización con meseta prolongada (característica de estas neuronas), después de estimular tanto las aferentes corticales como talámicas (Incisos A y B de la figura 15). Cabe señalar que se obtuvo el mismo resultado tanto con la estimulación optogenética como con la eléctrica (Ver registro del inciso A, señalado con la cabeza de flecha en color amarillo).

En los experimentos realizados para estudiar las respuestas sinápticas de las iSPNs, también se observaron respuestas de repolarización rápida al estimular las aferentes corticales y talámicas (Incisos C y D de la figura 15), tal como se ha reportado previamente (Flores-Barrera et al., 2010). La fotografía del inciso D ilustra una neurona iSPN A2A-tdTomato (+) marcada intracelularmente con biocitina y acoplada al fluoróforo CY5 (Azul). Las fibras eYFP positivas que se aprecian de fondo corresponden a los axones cortico-estriatales positivos a eYFP-ChR2.





**Figura 15.** Comparación de las respuestas sinápticas supraumbrales de las neuronas de proyección durante la activación cortical y talámica. 1) Esquema del diseño experimental, ilustra el sitio de transfección del adeno virus asociados con CamKII-ChR2-eYFP en el área de la corteza motora y la localización del electrodo de campo. 2) Esquema del diseño experimental para activar la vía talámico-estriatal optogenéticamente, se ilustra el sitio de transfección del adeno virus asociados con CamKII-ChR2-eYFP en los núcleos intralaminares del tálamo y la localización del electrodo de campo. A) Se muestra de izquierda a derecha la respuesta sináptica supraumbrales de una dSPN obtenida al estimular la corteza con un electrodo de estimulación de campo, así como la respuesta obtenida con estimulación optogenética. B) Se muestra una respuesta sináptica supraumbrales de una dSPN al estimular la vía talámico-estriatal optogenéticamente. C) Se muestra de izquierda a derecha la respuesta sináptica supraumbrales de una iSPN obtenida al estimular la corteza con un electrodo de estimulación de campo, así como la respuesta obtenida con estimulación optogenética. D) Respuesta sináptica supraumbrales de una iSPN al estimular la vía talámico-estriatal optogenéticamente. La imagen confocal del inciso D, corresponde a una iSPN A2A-tdTomato (+) marcada intracelularmente con biocitina y acoplada al fluoróforo CY5 (Azul) con axones positivos a eYFP-ChR2 de fondo, que descienden de la corteza cerebral. Note la similitud de las respuestas sinápticas supraumbrales evocadas desde la corteza o el tálamo, ya sea con estimulación optogenética o de campo.

### 8.6 Distribución de los contactos sinápticos corticales y talámicos en el árbol somatodendrítico de las SPNs

De acuerdo con algunos reportes en la literatura, las respuestas sinápticas que hacen contacto sobre las dendritas proximales al soma tienen un tiempo de subida al pico (*rise time*) y una duración a la amplitud media (Half width) más cortos, con respecto a los contactos sinápticos sobre las dendritas distales al soma (Rall, 1967; Munson y



Sypert 1979; Plotkin et al., 2011). Por lo tanto, estos dos parámetros tienden a incrementarse conforme la distancia al soma aumenta. Con este marco teórico, se realizaron experimentos para determinar si los contactos sinápticos sobre las SPNs, provenientes de la corteza o el tálamo, hacen contactos sinápticos de manera preferencial, o se encontraban distribuidos homogéneamente a lo largo del árbol dendrítico.

Para comparar en la misma neurona la respuesta sináptica evocada al estimular la vía cortico-estriatal y tálamo-estriatal, con estimulación de campo, se obtuvieron rebanadas horizontales que preservan las aferencias cortico-estriatales y tálamo-estriatales, así como la localización de los electrodos de estimulación de campo y el sitio de registro (inciso A de la figura 16). Solo 4 de 10 neuronas registradas se encontraron conectadas por ambas aferentes glutamatérgicas al estimular con electrodos de campo.

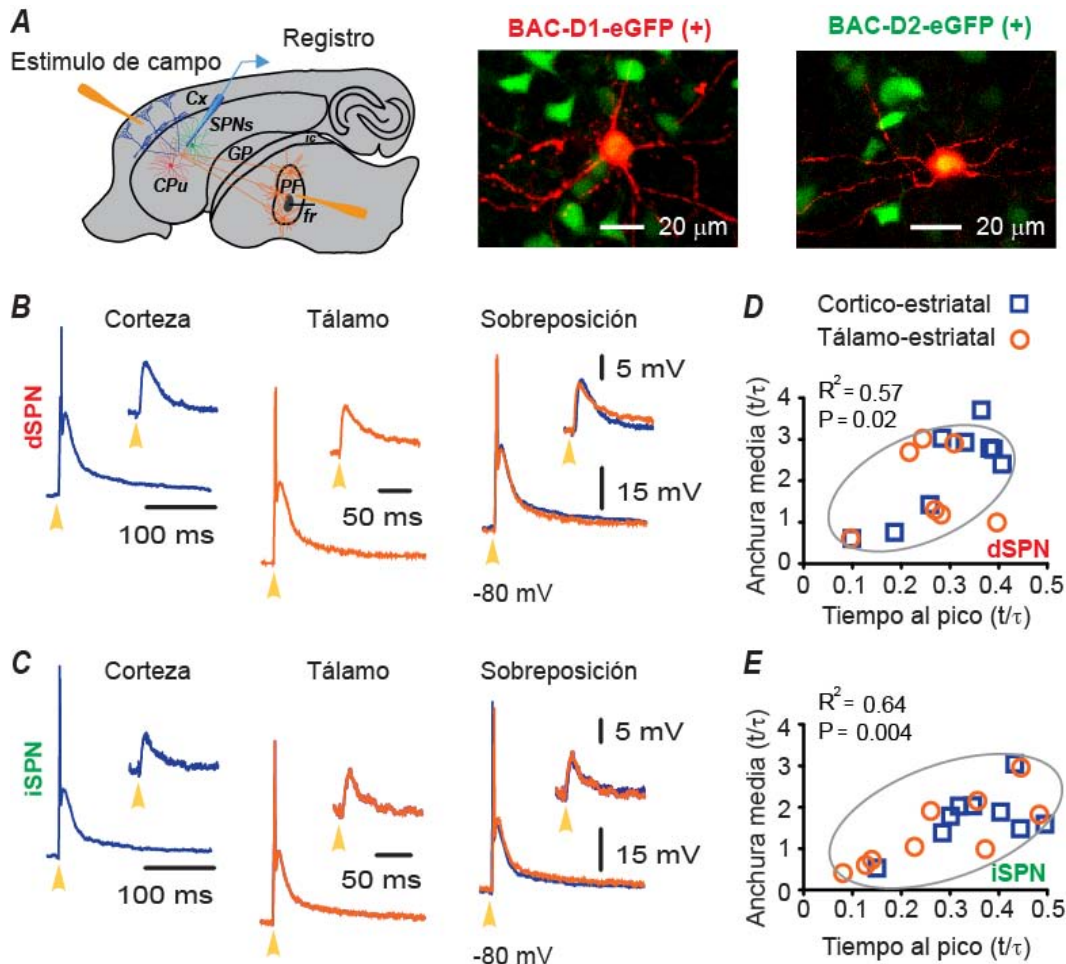
En esta serie de experimentos se emplearon los ratones transgénicos BAC-D1-eGFP y BAC-D2-eGFP. Para corroborar la identidad de las neuronas registradas, se marcaron con biocitina durante el registro y posteriormente se realizó el análisis histológico. A la derecha del esquema de inciso A, se muestra la imagen confocal de una dSPN e iSPN positivas a eGFP. En el inciso B, se muestra la comparación de las respuestas sinápticas evocadas desde la corteza (Trazos azules) y desde el tálamo (Trazos naranjas) en la misma dSPN a nivel de despolarización subumbral (registro superior) y umbral (registro inferior), en estos experimentos se observaron respuestas sinápticas muy similares al estimular las distintas aferentes glutamatérgicas. Los resultados fueron equivalentes en las iSPN al comparar las respuestas sinápticas de las dos vías aferentes glutamatérgicas (inciso C, figura 16).

Al comparar el tiempo de subida al pico (*rise time*) y la duración a la amplitud media (Half width) de las respuestas sinápticas subumbrales evocadas desde la corteza y el tálamo en las dSPNs, no fueron significativamente diferentes, lo que sugiere que los contactos sinápticos de ambas fuentes glutamatérgicas establecen sinapsis en regiones similares de la membrana somatodendrítica postsináptica (Ver tabla 1). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas al comparar el tiempo de subida al

pico (*rise time*) y la duración a la amplitud media (Half width) de las respuestas sinápticas subumbrales evocadas desde la corteza y el tálamo en las iSPNs.

Sin embargo, al comparar la duración a la amplitud media entre las distintas SPNs (dSPNs:  $59 \pm 7.8$  ms; iSPNs:  $33 \pm 4.3$  ms), se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.011$ ).

Posteriormente se realizó una normalización del tiempo de subida al pico y la duración a la amplitud media con la constante de decaimiento de la membrana (tau  $\tau_m$ ), (Munson y Sypert 1979). Con este análisis se develó que los contactos sinápticos en las SPNs, provenientes de la corteza cerebral y el tálamo se superponen y se distribuyen de manera similar a diferentes distancias electrotonicas al soma. Lo anterior podría indicar que las aferentes glutamatérgicas poseen un patrón similar de inervación. Este resultado se observó tanto en las dSPN (Inciso D de la figura 16;  $R^2 = 0,57$ ;  $p = 0,02$ ), como en las iSPNs (Inciso E de la figura 16;  $R^2 = 0,64$ ;  $p = 0,0042$ ). Los resultados descritos anteriormente son congruentes con reportes anatómicos, publicados por Doig et al, 2010, Deng et al., 2014 y Huerta-Ocampo et al, 2014.



**Figura 16.** Respuestas sinápticas subumbriles en las SPNs evocadas con estimulación de campo en la corteza o el tálamo. A) Esquema experimental utilizado para estimular con el estímulo de campo en la corteza cerebral capa 5. En este caso las neuronas registradas se marcaron con biocitina intracelularmente (marca fluorescente roja), para su identificación anatómica en los ratones BAC-eGFP-D1 y BAC-eGFP-D2. B) De izquierda a derecha las respuestas evocadas en una dSPN después de un estímulo cortical (izquierda) y después de estimular el tálamo (columnas centrales), seguido por la superposición de las respuestas. C) De izquierda a derecha las respuestas sinápticas evocadas en una iSPN después de un estímulo cortical (izquierda) y después de estimular el tálamo (columnas centrales), seguidas por la superposición de las respuestas. D y E) Tiempo de subida al pico de la respuesta sináptica respecto a la duración a la amplitud media de la respuesta sináptica, ambas mediciones normalizadas con la constante de tiempo membranar. Las respuestas cortico-estriatales están representadas por cuadros azules, mientras que las respuestas tálamo-estriatales se esquematizan con círculos de color naranja. Note, que las entradas sinápticas de la corteza y el tálamo se distribuyen a distancias similares respecto al soma de las SPNs. Tanto las dSPNs como las iSPN tuvieron correlaciones estadísticamente significativas (dSPNs:  $R^2 = 0,57$ ;  $p = 0,02$ ) y (iSPNs:  $R^2 = 0,64$ ;  $p = 0,0042$ )

De acuerdo con los resultados anteriores (figuras 13, 15 y 16), se sugiere que las distintas respuestas sinápticas entre las dSPN e iSPNs, ante la estimulación de

aferentes glutamatérgicas, no dependen de los factores extrínsecos. Con base en lo anterior decidimos estudiar la participación de algunas conductancias intrínsecas posiblemente involucradas en la distinta repolarización de la respuesta sináptica.

**Tabla 1.** Comparación de las medidas del tiempo de subida al pico y la duración a la amplitud media de las respuestas sinápticas cortico-estriatal y tálamo-estriatal de las neuronas estriatales.

<i>Estimulación</i>	<i>Mediciones</i>	<b>dSPN</b>	<b>iSPN</b>	<b>FSI</b>	<b>ChAT+</b>	<b>LTS</b>
	(n)	(n = 10)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 8)	(n = 9)
<b>Cortical</b>	Tiempo de subida al pico de la amplitud máxima (rise time, ms)	6.9 ± 0.98	7.2 ± 0.8	4.2 ± 0.77	5.5 ± 0.78	7.3 ± 0.93
	Duración a la amplitud media (Half width, ms)	59 ± 7.8	33 ± 4.3	21.8 ± 3.3	46.4 ± 13.4	74.1 ± 9.4
	(n)	(n = 7)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 6)	(n = 7)
<b>Talámica</b>	Tiempo de subida al pico de la amplitud máxima (rise time, ms)	6.8 ± 0.92	6.3 ± 0.9	4.2 ± 0.38	5.1 ± 0.6	6.1 ± 0.89
	Duración a la amplitud media (Half width, ms)	48 ± 10.1	27 ± 5.5	23.4 ± 1.82	57.7 ± 18.4	50.9 ± 13.6

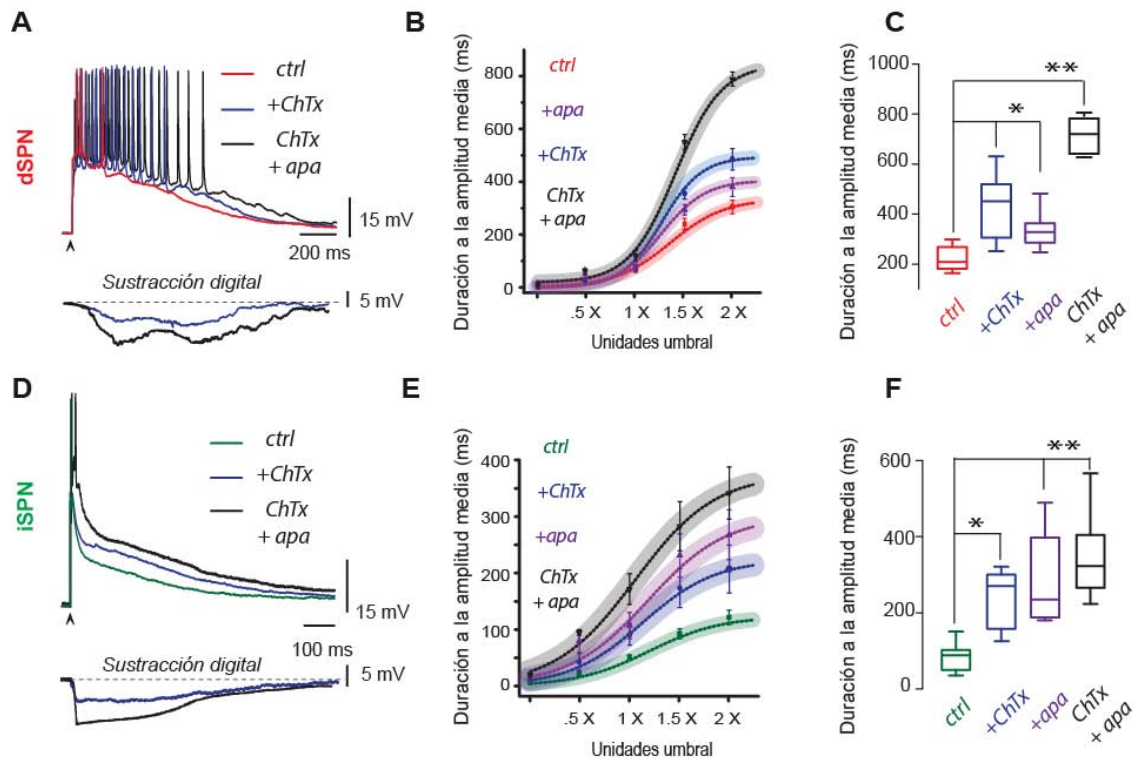
Ni los tiempos de subida al pico ni la duración a la amplitud media de los eventos sinápticos subumbriles fueron estadísticamente diferentes al comparar los valores de la estimulación de la corteza o el tálamo en las dSPNs ( $P = 0,98$  y  $P = 0,18$ ) e iSPNs ( $P = 0,39$  y  $P = 0,14$ ), FSI ( $P = 0,993$  y  $P = 0,667$ ), ChAT ( $P = 0,734$  y  $P = 0,618$ ) y LTS ( $P = 0,382$  y  $P = 0,171$ ) respectivamente.

### 8.7 Participación de las conductancias intrínsecas en la respuesta cortico-estriatal

Dado que al estimular el tálamo o la corteza, la mayor diferencia entre las distintas respuestas sinápticas en las SPNs es la duración a la amplitud media y considerando que las dSPNs y las iSPNs poseen una dinámica distinta del calcio en las dendritas (Day et al., 2008; Flores Barrera et al., 2010), se estudió la contribución de los canales de potasio activados por calcio ( $Kca^{2+}$ ) en la integración sináptica.

En la serie de experimentos que se realizaron para estudiar la participación de estos canales en la integración sináptica de las SPNs, se encontró que tanto los canales BK, como los SK, están participando en la repolarización de las respuestas sinápticas. Al bloquear los canales BK con toxinas selectivas Caribdotoxina (“ChTx” 20 nM) o los canales SK con Apamina (“apa” 100 nM), se puede notar que la duración de la respuesta se incrementa significativamente respecto al control (Trazo azul y negro, incisos A y D de la figura 17).

Cabe resaltar que la participación de los canales BK (trazo azul) y SK (trazo morado) en las dSPN, es más representativa a partir de las respuestas a nivel de despolarización umbral (1X) (inciso B, figura 17). En el inciso C (figura 17) se ilustra una gráfica de los cambios en la duración a la amplitud media de la respuesta sináptica con respecto a la aplicación de los bloqueadores de los  $Kca^{2+}$  en las dSPN. En la gráfica se observa que la duración a la amplitud media en condiciones control es en promedio de  $296 \pm 26$  ms ( $n = 24$ , caja roja  $*P < 0.05$ ). Al adicionar al sistema de perfusión ChTx, este valor incrementó a  $474 \pm 40$  ms, lo cual representa un incremento del 60% ( $n = 10$ , caja azul  $*P < 0.05$ ). Cuando se empleo Apamina, la duración a la amplitud media aumento a  $370 \pm 53$  ms lo cual representa un incremento del 25% ( $n = 10$ , caja morada,  $*P < 0.05$ ). En los experimentos en que se bloquearon los dos canales (BK y SK), la duración a la amplitud media se incrementó a  $773 \pm 26$  ms, lo que es equivalente a un incremento del 161% ( $n = 6$ , caja negra del inciso C,  $**P < 0.02$ ).



**Figura 17.** Participación de los canales BK y SK en la respuesta sináptica supraumbral de las dSPNs e iSPNs. A y D) Tres registros superpuestos de la respuesta sináptica supraumbral de una dSPN e iSPN respectivamente, ante la misma intensidad de estimulación en la corteza cerebral. El registro control se ilustra en rojo y verde, en presencia de los bloqueadores de los canales BK, 20 nM caribdotoxina (ChTX, trazo azul), y la misma respuesta en la presencia tanto de ChTX y de bloqueador de canales de SK, 100 nM apamina (ChTX + apa, trazos negros). Al pie de cada registro se muestra la sustracción digital de los trazos control y los experimentales. Note la distinta activación temporal y dinámica de los  $Kca^{2+}$  entre las dSPNs e iSPNs. B y E) Incremento de la duración a la amplitud media en función de la intensidad del estímulo normalizado a la intensidad umbral (1X) de las dSPNs e iSPNs. Los códigos de color para las distintas condiciones experimentales e identificación de las neuronas se mantienen respecto a los incisos A y D. Las curvas sobrepuestas a los valores promedio, corresponde a un ajuste de una función sigmoide. C y F) Resumen de las distribuciones de las mediciones de la duración a la amplitud media de las respuestas supraumbrales (2X) de las dSPNs e iSPNs en el control, con cada bloqueador, y con los dos bloqueadores administrados juntos. Las diferencias son significativas: \*  $P < 0,5$  y \*\*  $P < 0,01$  con respecto a los controles.

Al bloquear los canales BK o los canales SK en las iSPNs, se observó que la duración de la respuesta se incrementó significativamente respecto al control (Trazo azul y negro, inciso D de la figura 17). Los resultados muestran que la participación de los canales  $Kca^{2+}$  en las dSPNs se da de forma gradual y sostenida, mientras que en las iSPNs se da de forma cuasi-instantánea y transitoria (Ver sustracción digital, inciso A y D, figura 17).

A partir de los resultados en la curva de activación con respecto al nivel de despolarización, se puede observar que la participación de los canales BK (trazo azul) y SK (trazo morado) en las iSPN, se encuentra repolarizando las respuestas sinápticas desde las amplitudes subumbrales (.5 X), (inciso E, figura 17).

La duración a la amplitud media de la respuesta sináptica con respecto a la aplicación de los bloqueadores de los  $Kca^{2+}$  en las iSPN (inciso F, figura 17) mostraron que los valores en condiciones control fueron de  $115 \pm 13$  ms ( $n = 19$ , caja verde \* $P < 0.05$ ). Al adicionar al sistema de perfusión ChTx, este valor incrementó a  $204 \pm 44$  ms, lo cual representa un incremento del 77% ( $n = 7$ , caja azul \* $P < 0.05$ ). Cuando se aplicó Apamina la duración a la amplitud media aumentó a  $267 \pm 46$  ms, lo cual representa un incremento del 132% ( $n = 8$ , caja morada \* $P < 0.02$ ). En los experimentos en que se bloquearon los dos canales (BK y SK), la duración a la amplitud media se incrementó a  $344 \pm 48$  ms, que corresponde a un incremento del 199% ( $n = 6$ , caja negra \*\* $P < 0.02$ ).

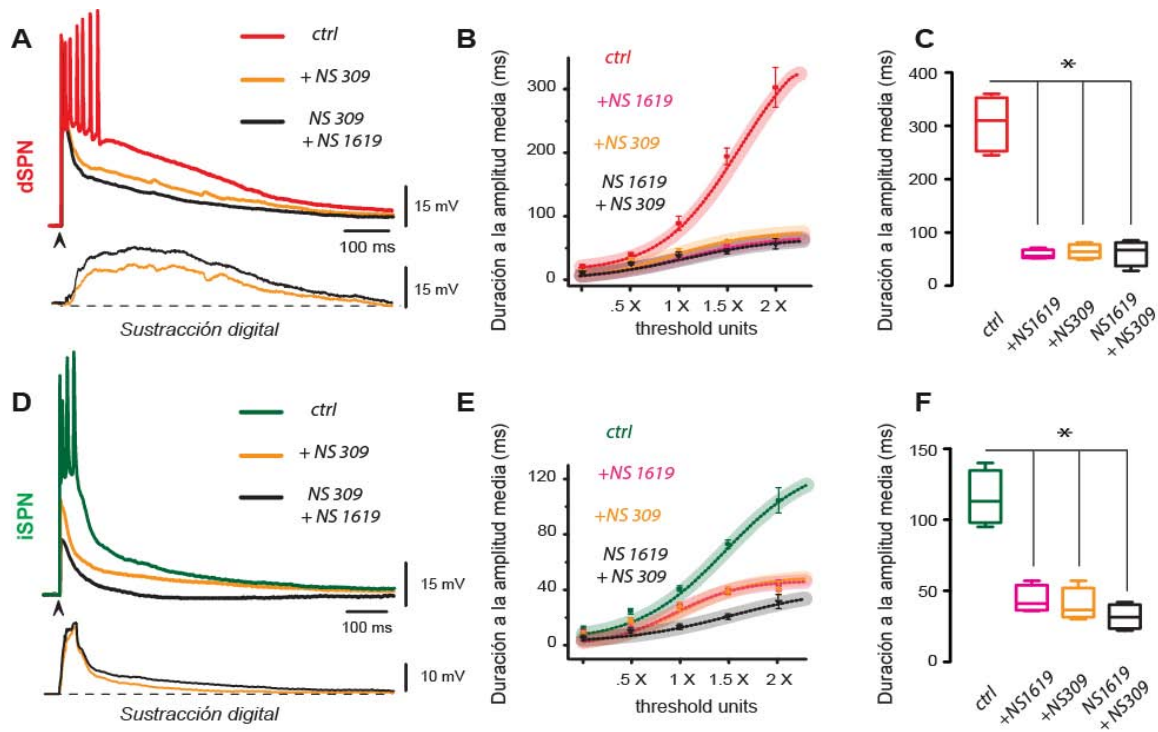
Para corroborar los resultados anteriores, se realizaron experimentos de activación farmacológica de los canales BK (NS1619,  $2 \mu M$ ) y SK (NS 309,  $2.5 \mu M$ ) en las SPNs. En el inciso A de la figura 18, se muestra una respuesta sináptica supraumbral característica de una dSPN al activar la corteza (trazo rojo). Sin embargo, al activar los canales BK farmacológicamente (NS1619,  $2 \mu M$ ) o los canales SK con (NS 309,  $2.5 \mu M$ ), se puede notar que la duración de la respuesta se reduce drásticamente respecto al control (Trazo amarillo y negro). También se puede observar que la participación de los canales BK (trazo rosa) y SK (trazo naranja) en las dSPN, se hace más notoria a partir de las respuestas umbrales (1X) (inciso B, figura 18).

La duración a la amplitud media en condiciones control fue de  $302 \pm 31$  ms ( $n = 18$ , caja roja del inciso C \* $P < 0.05$ ). Al adicionar al sistema de perfusión NS1619, la duración disminuyó a  $57 \pm 2$  ms, lo cual representa una reducción del 81% respecto al control ( $n = 6$ , caja rosa del inciso C \* $P < 0.05$ ). Cuando se aplicó NS 309, la duración a la amplitud media se redujo a  $65 \pm 6$  ms, lo cual representa un decremento del 78% respecto al control ( $n = 6$ , caja amarilla del inciso C, \* $P < 0.05$ ). A partir de los experimentos de activación de los canales BK y SK, se observó que la duración a la

amplitud media se redujo a  $54 \pm 16$  ms, lo que es equivalente a una disminución del 82% respecto al control (n = 5, caja negra del inciso C, \*P < 0.05)

Al activar los canales BK farmacológicamente (NS1619, 2  $\mu$ M) o los canales SK con (NS 309, 2.5  $\mu$ M), se observa que la duración de la respuesta sináptica se reduce drásticamente respecto al control (Trazo amarillo y negro, inciso D, figura 18). También se observa que la participación de los canales  $Kca^{2+}$  en las dSPNs se da de forma gradual y sostenida, mientras que en las iSPNs se da de forma cuasi-instantánea y transitoria (A y D, figura 18). La gráfica del inciso E, se puede observar que la participación de los canales BK (trazo rosa) y SK (trazo naranja) en las iSPN, se encuentra repolarizando los eventos sinápticos desde las amplitudes subumbrales. La duración a la amplitud media de las iSPNs en condiciones control fue de  $110 \pm 9$  ms (n = 6, caja verde del inciso F \*P < 0.05). Al adicionar al sistema de perfusión NS1619, la duración disminuyó a  $44 \pm 4$  ms, lo cual representa una reducción del 60% respecto al control (n = 6, caja rosa del inciso F \*P < 0.05). Cuando se aplicó NS 309, la duración a la amplitud media se redujo a  $40 \pm 5$  ms, lo cual representa un incremento del 62% respecto al control (n = 6, caja amarilla del inciso F, \*P < 0.05). En los experimentos en que se activaron los dos canales (BK y SK), la duración a la amplitud media se redujo a  $38 \pm 16$  ms, lo que es equivalente a una reducción del 64% respecto al control (n = 4, caja negra del inciso F, \*P < 0.05).





**Figura 18.** Activación de los canales BK y SK en la respuesta sináptica supraumbral de las dSPNs e iSPNs. A y D) Tres registros superpuestos de la respuesta sináptica supraumbral de una dSPN e iSPN respectivamente, ante la misma intensidad de estimulación en la corteza cerebral. El registro control se ilustra en rojo y verde, en presencia de los activadores de los canales SK, (NS 309, 2.5  $\mu$ M) en trazos color amarillo, y la misma respuesta en la presencia tanto de NS 309 y el activador de canales de BK (NS1619, 2  $\mu$ M) en trazos negros. Al pie de cada registro se muestra la sustracción digital de los trazos control y los experimentales. Note la distinta activación temporal y dinámica de los  $Kca^{2+}$  entre las dSPNs e iSPNs. B y E) Reducción de la duración a la amplitud media en función de la intensidad del estímulo normalizado a la intensidad umbral (1X) de las dSPNs e iSPNs. Los códigos de color para las distintas condiciones experimentales e identificación de las neuronas se mantienen de acuerdo a los incisos A y D. Las curvas sobrepuestas a los valores promedio, corresponden a un ajuste de una función sigmoide. C y F) Resumen de las distribuciones de las mediciones de la amplitud media de las respuestas supraumbrales (2X) de las dSPNs e iSPNs en el control, con cada activador, y con los dos activadores administrados juntos. Las diferencias son significativas: \*  $P < 0,5$  con respecto a los controles.

## 8.8 Manipulación de las conductancias intrínsecas durante la respuesta sináptica cortico-estriatal en las SPNs

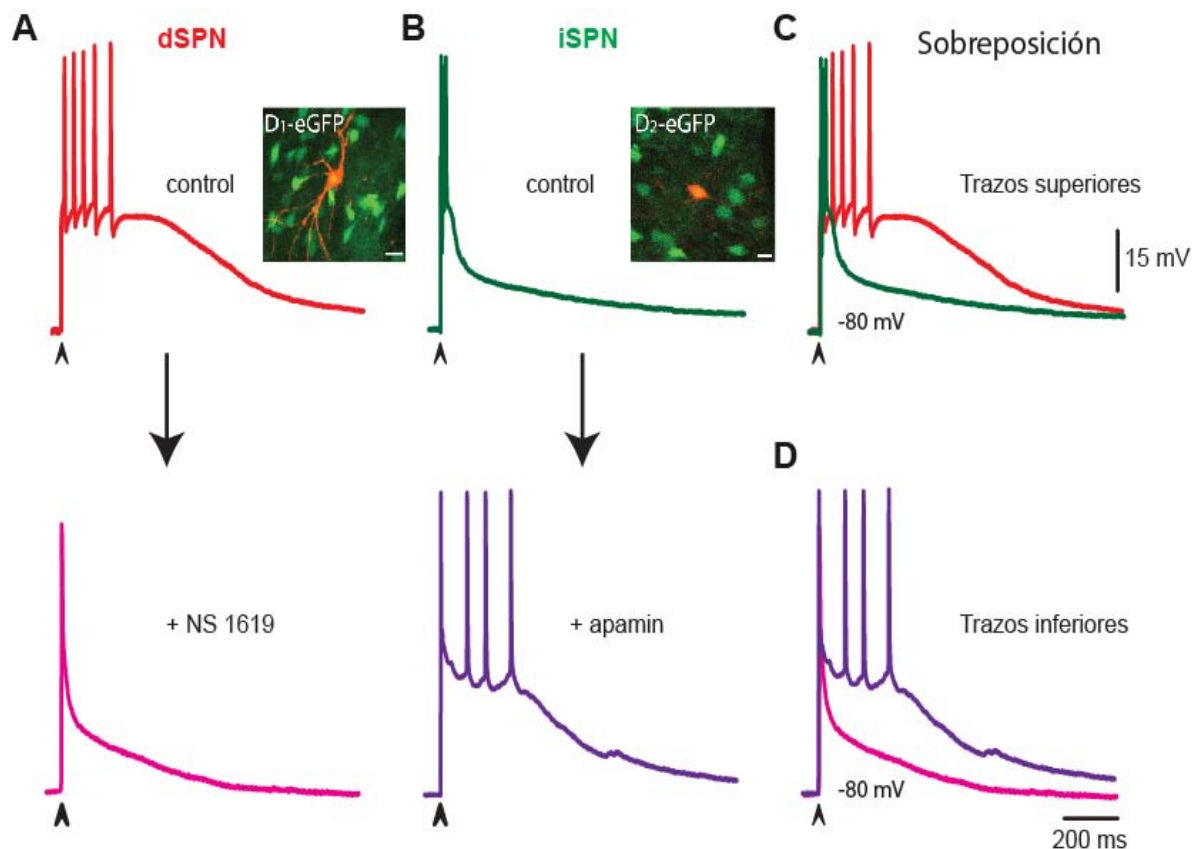
La pregunta que subyace a esta serie de experimentos es: ¿cuáles son los principales determinantes de las diferentes trayectorias de la repolarización de la respuesta sináptica Cortico-estriatal entre las SPNs?. Cuando a la respuesta cortico-estriatal de una dSPN se le aplica un activador de los canales BK (NS1619) (inciso A, figura 19) la respuesta adquiere una repolarización más rápida, lo que provoca que la respuesta sináptica sea muy similar a la de una iSPN. Por el contrario, cuando se bloquean los

$Kca^{2+}$  en una respuesta cortico-estriatal de una iSPN, la duración se prolonga y el tren de potenciales de acción en forma de ráfaga, se espacian y forman un tipo de disparo en meseta (inciso B, figura 19).

Estos resultados apuntan a que las dSPNs e iSPNs tengan una distinta activación temporal y dinámica de la participación de los  $Kca^{2+}$ , que promueve que la repolarización de las respuestas sinápticas de las iSPNs, sean más rápidas que las de dSPNs.

De acuerdo con los resultados anteriormente descritos, se plantea la hipótesis de que la naturaleza de la integración sináptica depende mayormente de la participación de las conductancias intrínsecas, que de las extrínsecas.

Con el objetivo de hacer robusta la hipótesis de trabajo, se realizaron experimentos en las interneuronas estriatales, para estudiar si estas exhibían una distinta forma de integración sináptica con respecto a las neuronas de proyección, así como una respuesta sináptica similar entre la forma de integración sináptica al estimular las aferentes corticales y talámicas.



**Figura 19.** Conversión de las respuestas sinápticas cortico-estriatal de las dSPNs e iSPNs una en la otra. A) Registro control de la respuesta sináptica cortico-estriatal de una dSPN (Trazo superior) La flecha indica la adición de 2,5  $\mu$ M del activador del canal BK (NS 1619). Note, que la repolarización de la duración a la amplitud media se disminuyó de forma tal que adopto la forma de iSPN en condiciones control (Trazo inferior). La imagen confocal ilustra la identificación de la dSPN en un ratón BAC-D1 eGFP. B) Registro control de la respuesta sináptica cortico-estriatal de una iSPN (Trazo superior) La flecha indica la adición de 100 nM de la apamina bloqueador del canal SK. Note que la repolarización rápida y el disparo en forma de ráfaga de potenciales de acción al inicio de la respuesta sináptica, se convirtió en una respuesta con una repolarización lenta y un tren más prolongado de los potenciales de acción que duran más de 200 ms, comparable a los observados en las dSPNs en condiciones control. La imagen confocal ilustra la identificación de la iSPN en un ratón BAC-D2 eGFP. C y D) Sobreposición de los trazos en condiciones control (Trazos superiores) y en condiciones experimentales (Trazos inferiores).

### 8.9 Comparación de las respuestas postsinápticas de las interneuronas FS a la estimulación cortical y talámica

En esta serie de experimentos se tuvo como objetivo la comparación de la respuesta sináptica ante la estimulación de las aferentes corticales y talámicas.

Dado que las FSI representan alrededor del 2% del total de la población del estriado (Sciamanna et al., 2015), se utilizó el ratón transgénico PV-Cre para expresar la proteína tdTomato con el fin de identificar a las FSI en el estriado. Adicionalmente se introdujo por medio de una cirugía estereotáxica, el constructo genético CamKII-ChR2-eYFP en los núcleos intralaminares del tálamo para poder activar la vía tálamo-estriatal optogenéticamente. En la misma preparación experimental se estimuló la vía cortico-estriatal por medio de un electrodo de campo. Con la combinación de estos dos protocolos se logró estudiar la respuesta sináptica de las FSI ante la estimulación de ambas aferentes glutamatérgicas.

En el inciso A de la figura 20 se ilustra el ensamble experimental, en el que se puede observar el sitio de las dos transfecciones, así como el sitio de la estimulación de campo en la corteza cerebral y el sitio de registro en el estriado.

A la derecha del esquema se muestran cuatro imágenes obtenidas con un microscopio confocal, en donde se ilustra (de izquierda a derecha) los axones tálamo-estriatales eYFP (+) en el estriado dorsal, dos neuronas PV que expresan la proteína tdTomato en el estriado, la interneurona FSI registrada y marcada con biocitina y conjugada con Cy5 (Azul) y la sobre posición de las tres imágenes anteriormente señaladas.

Las interneuronas Fast Spiking, pueden ser fácilmente reconocidas por sus propiedades electrofisiológicas, sobre todo su disparo de alta frecuencia. En el inciso

B de la figura 20 se puede ver un ejemplo del disparo (Trazo negro) de estas células al aplicar pulsos de corriente de intensidad creciente despolarizantes e hiperpolarizantes en el soma de la FSI (Trazos grises).

En el inciso C se muestra un tren de potenciales de acción de una FSI al estimular el soma con un pulso cuadrado despolarizante, simultáneamente se le aplico un tren de 4 pulsos de luz azul a 20 Hz sobre los axones talámicos que expresan eYFP-ChR2, note que la frecuencia de disparo se incrementa al activar optogenéticamente la vía tálamo-estriatal.

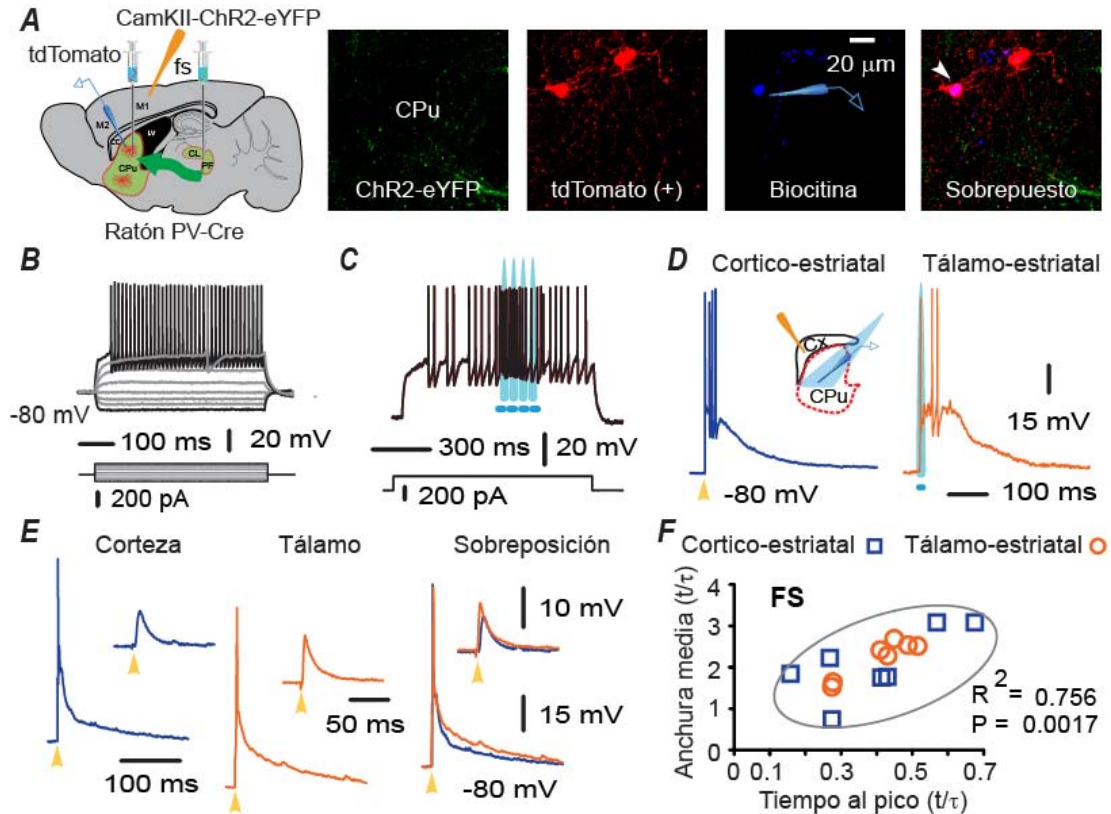
Para comparar la respuesta sináptica de las aferentes corticales y talámicas se estimuló con un electrodo de campo en la corteza cerebral y se activó la vía tálamo-estriatal con optogenética. Al comparar las respuestas supraumbrales se encontró que ambas respuestas exhiben mesetas despolarizantes con ráfagas de potenciales de acción que muestran un amplio postpotencial hiperpolarizante (Inciso D de la figura 20). Cabe mencionar que la mayoría de las interneuronas FSI respondieron tanto a la corteza y el tálamo.

Con el objetivo de comparar las respuesta sinápticas al estimular el tálamo o la corteza en la misma FSI, obtuvimos rebanadas horizontales con un ángulo de 20° de ratones PV-Cre transfectados con tdTomato en el estriado dorsal. En estas condiciones experimentales, observamos que a tanto a niveles de despolarización subumbral y umbral las respuestas se sobreponen (Inciso E de la Figura 20).

Con las respuestas subumbrales obtenidas al estimular la corteza y el tálamo, se midió y grafico la duración a la amplitud media contra el tiempo al pico de la subida de la respuesta sináptica, con el objetivo de estudiar cualquier posible segregación funcional de los contactos sinápticos a lo largo de la membrana somatodendrítica (inciso F de la figura 20).

La comparación de los tiempos de subida y la duración a la amplitud media de las respuestas sinápticas evocados desde la corteza y el tálamo, no mostraron diferencias significativas (Tabla 1), lo que sugiere que las respuestas sinápticas de ambas fuentes glutamatérgicas inciden en los mismos lugares a lo largo de la membrana somatodendrítica. Incluso se obtuvo una correlación significativa entre estos parámetros, lo que sugiere que ambos tipos de entrada se extienden de forma

homogénea y que la distancia electrotonica es equivalente al soma ( $R^2 = 0,756$ ;  $P = 0,0017$ ).



**Figura 20.** Comparación de las respuestas sinápticas cortico-estriatal y tálamo-estriatal sobre las interneuronas Fast Spiking. A) Esquema del protocolo experimental que se utilizó: Se inyectó tdTomato en el estriado dorsal, así como CamKII-ChR2-eYFP en los núcleos intralaminares del tálamo. También se ilustra el sitio de estimulación de campo de la vía cortico-estriatal y el de registro en el estriado dorsal. La secuencia de imágenes muestra las terminales del tálamo ChR2-EYFP, las interneuronas tdTomato FS-PV-Cre (rojo), la FSI registrada y marcada intracelularmente con biocitina reaccionada con estreptavidina-Cy5 (azul), la cuarta imagen refiere a la sobre posición de las 3 imágenes anteriores. B) Respuesta del voltaje de una interneurona FS-PV + después de aplicar inyecciones intracelulares de corriente. En el trazo negro se ve reflejada la alta frecuencia de disparo que estas neuronas pueden alcanzar. C) Tren de potenciales de acción evocados con un pulso cuadrado de corriente despolarizante en el soma, a la mitad del pulso se activó optogenéticamente la vía tálamo-estriatal con un tren de 4 pulsos de luz a 20 Hz, sobre los axones tálamo-estriatales. Note que la frecuencia de disparo se incrementa en respuesta a la estimulación con luz. D) Respuestas sinápticas supraumbrales de las FS-PV + ante la estimulación de campo en la corteza cerebral (trazo azul) y la estimulación optogenética (trazo naranja) de las fibras del tálamo. En ambos casos, se obtuvieron respuestas prolongas de cientos de milisegundos, así como disparo repetitivo que muestra el amplio postpotencial hiperpolarizante característico de esta clase de neuronas. E) De izquierda a derecha: Respuestas sinápticas subumbrales y de amplitud umbral evocadas desde la corteza (trazo azul) y el tálamo (trazo naranja), en la última columna se ilustra la sobre posición de los registros. Note la similitud de la trayectoria del voltaje F) Distribución de los valores obtenidos al medir el tiempo al pico de la respuesta, así como la duración a la amplitud media. Esta distribución tuvo una correlación significativa ( $R^2 = 0.756$ ). Las respuestas cortico-estriatales están representadas por cuadros azules, mientras que las respuestas tálamo-estriatales se esquematizan con círculos de color naranja. Este análisis revela que ambas entradas glutamatérgicas se distribuyen de forma homogénea en la membrana somatodendrítica de las FSI.

### 8.10 Comparación de las respuestas postsinápticas de las interneuronas ChAT a la estimulación cortical y talámica

En esta serie de experimentos se realizaron transfecciones en el estriado dorsal de ratones transgénicos ChAT-Cre, para identificar a las interneuronas ChAT (+) con tdTomato, así como también en los núcleos intralaminares del tálamo con el constructo genético CamKII-ChR2-eYFP, para activar la vía tálamo-estriatal optogenéticamente. En el inciso A de la figura 21, se muestran cuatro imágenes obtenidas con un microscopio confocal, en donde se ilustra (de izquierda a derecha) los axones tálamo-estriatales eYFP (+) en el estriado dorsal (Verde), interneuronas ChAT que expresan la proteína tdTomato en el estriado dorsal (Rojo), la interneurona ChAT registrada y marcada con biocitina y conjugada con Cy5 (Azul) y la sobre posición de las tres imágenes anteriormente señaladas.

La respuesta del voltaje al aplicar pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes de corriente en el soma de la neurona ChAT (+) demostraron que éstas neuronas exhiben baja frecuencia de disparo, así como una deflexión en el voltaje en respuesta a pulsos hiperpolarizantes (Trazos Negros, inciso B, figura 21).

En el inciso C se pueden observar varias repeticiones de un tren de potenciales de acción de una ChAT al estimular en el soma con un pulso cuadrado despolarizante, 500 milisegundos después, se le aplico un tren de 4 pulsos de luz azul a 20 Hz sobre los axones talámicos que expresan eYFP-ChR2 en el estriado dorsal, note que la frecuencia de disparo se incrementa al activar optogenéticamente la vía tálamo-estriatal.

En el inciso D de la figura 21, se muestra la respuesta sináptica supraumbral de una ChAT + al estimular la corteza cerebral con un electrodo de campo (Trazo Azul), mientras que a la derecha se muestra la respuesta sináptica supraumbral al estimular la vía tálamo-estriatal optogenéticamente (Trazo Naranja).

En ambos casos, se obtuvieron respuestas prolongas de cientos de milisegundos, o incluso segundos así como disparo repetitivo que muestra el lento postpotencial hiperpolarizante característico de esta clase de neuronas (Goldberg et al., 2011; Bonsi et al., 2011; Vizcarra-Chacón et al. 2013; Sciamanna et al., 2012; Doig et al., 2014).

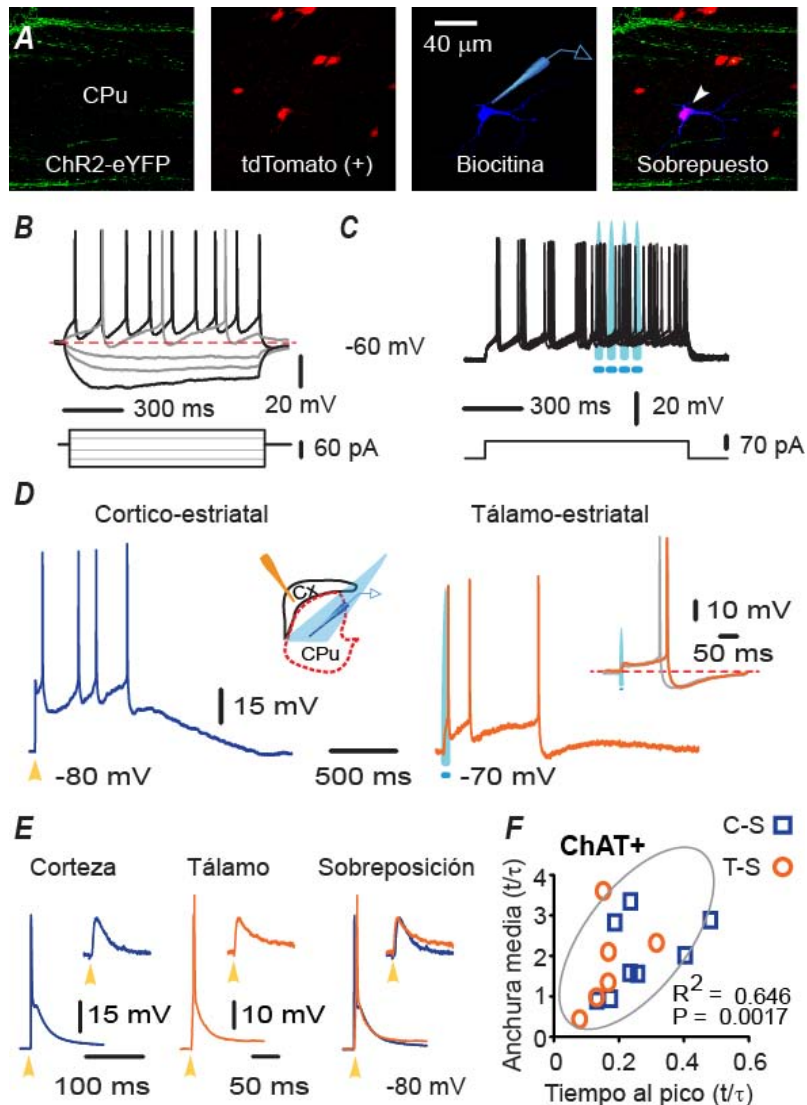
En el inserto de la esquina superior derecha se muestra el disparo de un potencial de acción, seguido de su largo postpotencial hiperpolarizante a un potencial de

membrana de -60 mV evocado optogenéticamente al activar el tálamo. Una vez más, no se encontraron diferencias evidentes entre las respuestas sinápticas talámicas y corticales (Doig et al., 2014).

Con el objetivo de comparar las respuesta sinápticas al estimular el tálamo o la corteza en la misma interneurona ChAT, se obtuvieron rebanadas horizontales de ratones ChAT-Cre transfectados con tdTomato en el estriado dorsal. En estas condiciones experimentales, observamos que a tanto a niveles de despolarización subumbral y umbral las respuestas se sobreponen (Inciso E de la Figura 21).

Con las respuestas subumbrales obtenidas al estimular la corteza y el tálamo, se graficó la duración a la amplitud media contra el tiempo al pico de la subida de la respuesta sináptica, con el fin de detectar cualquier posible segregación funcional de entradas sinápticas (inciso F de la figura 21). La comparación de los tiempos de subida y la duración a la amplitud media de las respuestas sinápticas evocados desde la corteza y el tálamo, no mostraron diferencias significativas (Tabla 1), lo que sugiere que las respuestas sinápticas de ambas fuentes glutamatérgicas inciden en los mismos lugares a lo largo de la membrana somatodendrítica. Incluso se obtuvo una correlación significativa entre estos parámetros, lo que sugiere que ambos tipos de entrada se extienden de forma homogénea y que la distancia electrotónica es equivalente al soma ( $R^2 = 0,646$ ,  $P = 0,0017$ ).





**Figura 21.** Comparación de las respuestas sinápticas cortico-estriatal y tálamo-estriatal sobre las interneuronas ChAT +. A) De izquierda a derecha: imágenes de microscopía confocal de las terminales del tálamo-estriatales ChR2-EYFP +, las interneuronas tdTomato ChAT-Cre + (rojo), la neurona ChAT registrada y marcada intracelularmente con biocitina reaccionada con estreptavidina-Cy5 (azul), la cuarta imagen refiere a la sobreposición de las 3 imágenes anteriores. B) Respuesta del voltaje de una interneurona ChAT + después de aplicar pulsos cuadrados despolarizantes e hiperpolarizantes de corriente en el soma. En el trazo negro se ve reflejada la baja frecuencia de disparo que estas neuronas exhiben) Tren de potenciales de acción evocados con un pulso cuadrado de corriente despolarizante en el soma, a la mitad del pulso se activó optogenéticamente la vía tálamo-estriatal con un tren de 4 pulsos de luz a 20 Hz, sobre los axones tálamo-estriatales. Note que la frecuencia de disparo se incrementa en respuesta a la estimulación con luz. D) Respuestas sinápticas supraumbrales de las ChAT+ ante la estimulación de campo en la corteza cerebral (trazo azul) y la estimulación optogenética (trazo naranja) de las fibras del tálamo. E) De izquierda a derecha: respuestas sinápticas subumbrales y de amplitud umbral evocadas desde la corteza (trazo azul) y el tálamo (trazo naranja), en la última columna se ilustra la sobreposición de los registros. Note la similitud de la trayectoria del voltaje. F) Distribución de los valores obtenidos al medir el tiempo al pico de la respuesta, así como la duración a la amplitud media. Las respuestas cortico-estriatales están representadas por cuadros azules, mientras que las respuestas tálamo-estriatales se esquematizan con círculos de color naranja. Esta distribución tuvo una correlación significativa ( $R^2 = 0,646$ )



### 8.11 Comparación de las respuestas postsinápticas de las interneuronas LTS a la estimulación cortical y del tálamo

En esta serie de experimentos se realizaron transfecciones en el estriado dorsal de ratones transgénicos 5HT3a-Cre, para identificar a las interneuronas LTS con tdTomato, así mismo se realizaron transfecciones en los núcleos intralaminares del tálamo con el constructo genético CamKII-ChR2-eYFP, para poder activar la vía tálamo-estriatal optogenéticamente.

En el inciso A de la figura 22, se ilustra en los paneles superiores de izquierda a derecha, cuatro imágenes obtenidas con un microscopio confocal, en donde se observan los axones tálamo-estriatales eYFP (+) en el estriado dorsal (Verde), una interneurona LTS que expresan la proteína tdTomato en el estriado dorsal (Rojo), la interneurona LTS registrada y marcada con biocitina y conjugada con Cy5 (Azul) y la sobre posición de las tres imágenes anteriormente señaladas.

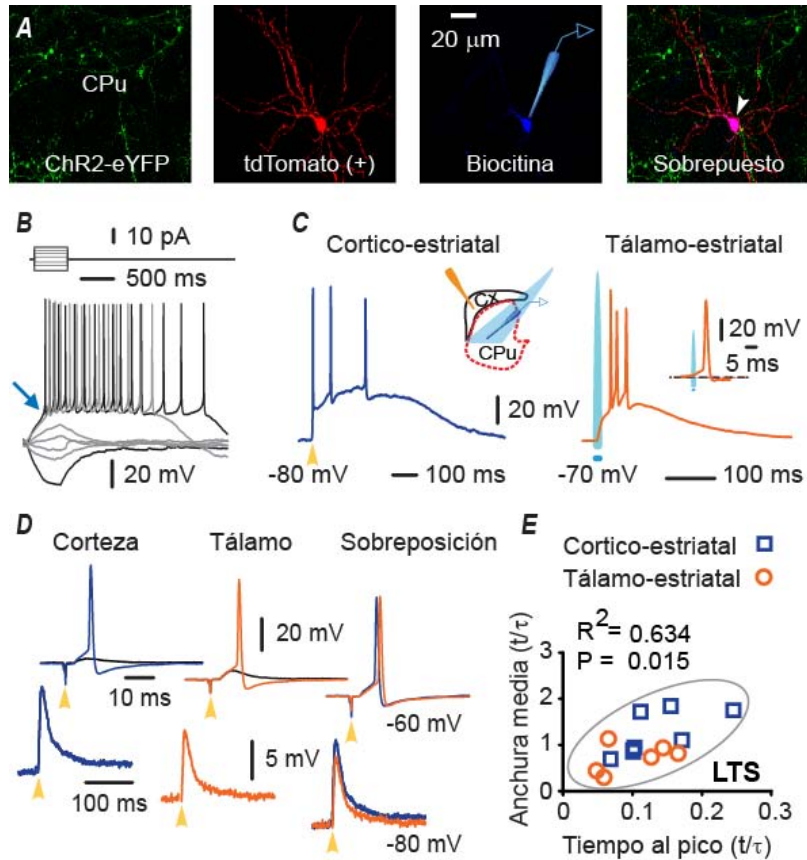
En el inciso B, se muestra la respuesta del voltaje de una interneuronas LTS al aplicar pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes en el soma, estas neuronas exhibieron una meseta despolarizante con disparo repetitivo que persiste varios cientos de milisegundos, incluso después de que el pulso de corriente finaliza (Trazos Negros, inciso B, figura 22).

Después de estimular la corteza cerebral con un electrodo de campo (Trazo Azul) y de estimular la vía tálamo-estriatal optogenéticamente (Trazo Naranja), la respuesta sináptica supraumbral fue prolongada y con disparo repetitivo sobre la meseta despolarizante (inciso C, figura 22). También se observó el disparo de bajo umbral característico de estas neuronas activado sinápticamente (alrededor de -60 mV). En el inserto de la esquina superior derecha se muestra el disparo de un potencial de acción evocado al estimular optogenéticamente la vía tálamo-estriatal.

Con el objetivo de comparar las respuestas sinápticas al estimular el tálamo o la corteza en la misma interneurona LTS, se obtuvieron rebanadas horizontales de ratones 5HT3a-Cre transfectados con tdTomato en el estriado dorsal. En estas condiciones experimentales, observamos que tanto a niveles de despolarización subumbral y umbral, las respuestas sinápticas se sobreponen (Inciso D, Figura 22). Estos experimentos se realizaron a un potencial de mantenimiento de -60 mV y a -80 mV (Trazos superiores e inferiores). Con este protocolo se logró comparar las

respuestas sinápticas al activar el componente de activación de bajo umbral (-60 mV) y sin activar el componente de activación de bajo umbral (-80 mV). Note que las respuestas sinápticas en ambos casos son muy similares (Inciso D, Figura 22)

Con las respuestas subumbrales obtenidas al estimular la corteza y el tálamo, se graficó la duración a la amplitud media contra el tiempo al pico de la subida de la respuesta sináptica para detectar cualquier posible segregación funcional de entradas sinápticas (inciso E, figura 22). La comparación de los tiempos de subida y la duración a la amplitud media de las respuestas sinápticas evocados desde la corteza y el tálamo, no mostraron diferencias significativas (Tabla 1), sin embargo se observó con mayor frecuencia respuestas sinápticas de menor duración a la amplitud media y de tiempo de subida al pico rápido, al estimular la vía tálamo-estriatal. Lo que sugiere que los contactos sinápticos provenientes del tálamo en las LTS, podrían estar más cercanos al soma, respecto a los inputs corticales. Aun así se obtuvo una correlación significativa entre estos parámetros, por lo que no se descarta que ambos tipos de entradas sinápticas también poseen contactos sinápticos que se distribuyen de manera extensa a lo largo de la membrana somatodendrítica ( $R^2 = 0,634$ ,  $P = 0,015$ ). De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento, se demuestra que tanto las SPNs, como las interneuronas estriatales poseen una particular forma de integración sináptica al compararlas entre las distintas clases de neuronas estriatales, pero una respuesta sináptica muy similar al comparar la respuesta sináptica evocada desde el tálamo o corteza en la misma clase de neurona. Por lo tanto, se puede considerar que la contribución de las conductancias intrínsecas juega un papel determinante en los procesos de integración sináptica.



**Figura 22.** Comparación de las respuestas sinápticas cortico-estriatal y tálamo-estriatal sobre las interneuronas LTS. A) De izquierda a derecha: imágenes de microscopía confocal de las terminales tálamo-estriatales ChR2-EYFP +, las interneuronas tdTomato 5HT3a-Cre + (rojo), la neurona LTS registrada y marcada intracelularmente con biocitina reaccionada con estreptavidina-Cy5 (azul), la cuarta imagen refiere a la sobreposición de las 3 imágenes anteriores. B) Respuesta del voltaje de una interneurona LTS, después de aplicar pulsos cuadrados despolarizantes e hiperpolarizantes de corriente en el soma. En el trazo negro se ve reflejada la meseta sostenida despolarizante que estas neuronas exhiben. C) Respuestas sinápticas supraumbrales de las LTS ante la estimulación de campo en la corteza cerebral (trazo azul) y la estimulación optogénica de la vía tálamo-estriatal (trazo naranja). En ambos casos, se obtuvieron respuestas prolongas de cientos de milisegundos, así como disparo repetitivo que muestra el componente de bajo umbral característico de esta clase de neuronas. D) Respuestas sinápticas subumbrales y de amplitud umbral evocadas desde la corteza (trazo azul) y el tálamo (trazo naranja), en la última columna se ilustra la sobreposición de los registros. Note la similitud de la trayectoria del voltaje. E) Distribución de los valores obtenidos al medir el tiempo al pico de la respuesta sináptica, así como la duración a la amplitud media. Esta distribución tuvo una correlación significativa ( $R^2 = 0.634$ ). Este análisis revela que ambas entradas glutamatérgicas se distribuyen de forma cuasi-homogénea en la membrana somatodendrítica de las LTS, ya que se puede apreciar una cierta tendencia de proximidad al soma, respecto a los contactos sinápticos provenientes del tálamo.

Por otra parte, hasta el momento se ha descrito que tanto las neuronas de proyección (Vizcarra-Chacón et al., 2013), como las interneuronas (FS, ChAT y LTS) responden ante la estimulación de las aferentes corticales y talámicas, y dado que en todos los casos las respuestas sinápticas duran cientos de milisegundos, es probable que la actividad del microcircuito estriatal se refleje en el registro de actividad sináptica en distintos tiempos del registro electrofisiológico después del estímulo evocado tanto en la corteza como en el tálamo.

Para corroborar esta hipótesis, se registró la actividad sináptica después de la estimulación glutamatérgica, con el fin de estudiar la posible acción polisináptica del microcircuito estriatal evocada por ambas aferentes.

### **8.12 Activación polisináptica del microcircuito estriatal**

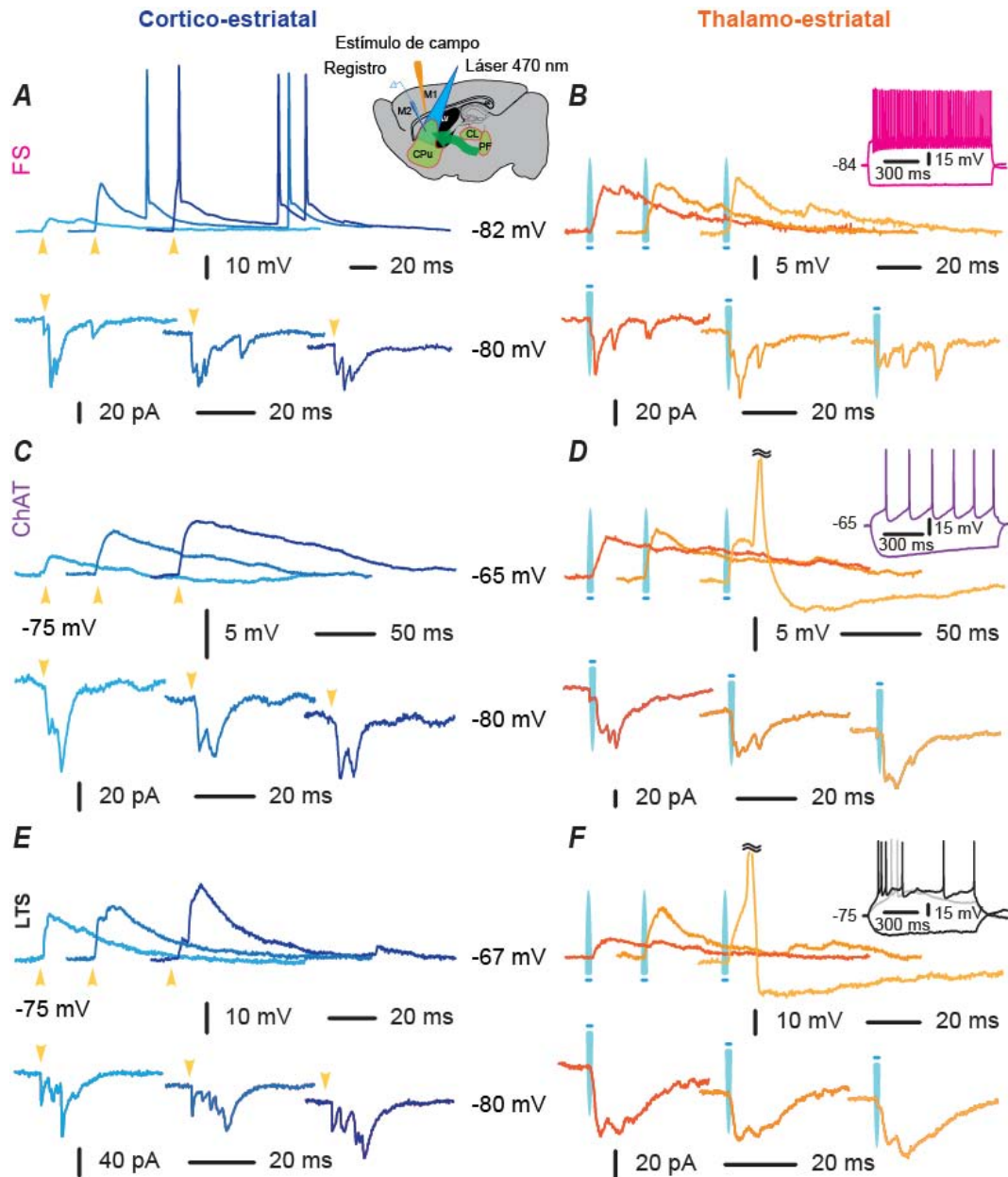
En esta serie de experimentos, se identificaron y caracterizaron electrofisiológicamente las interneuronas PV, ChAT y LTS, a través de registros en los ratones transgénicos con marcadores moleculares para cada interneurona (PV-Cre, ChAT-Cre y 5HTr3a-Cre).

En el inciso A de la figura 23 se ilustran las respuestas sinápticas de una FSI después de un único estímulo en la corteza cerebral por medio de un electrodo de campo. En esta figura se muestran tres diferentes trazos electrofisiológicos en respuesta a estímulos de intensidad creciente (Distintos tonos de azul) el momento en el que se dio el estímulo, se representa con una cabeza de flecha amarilla. La parte superior del panel A corresponde a los registros realizados en la modalidad de fijación de corriente, mientras que los registros inferiores fueron realizados en fijación de voltaje. Note que ambos casos es posible observar la actividad polisináptica evidenciada con la presencia de varios picos o eventos sinápticos que acompañan al trazo electrofisiológico que se evoca al estimular las aferentes corticales y también al estimular las aferentes talámicas con optogenética (Inciso B de la figura 23). Los distintos tonos de naranja representan tres ejemplos diferentes de respuestas sinápticas a estímulos de intensidades crecientes, la barra azul sobre el registro, indica el momento en que se activó la aferente talámica. El registro en color rosa de la

esquina superior derecha del panel B, muestra la caracterización electrofisiológica de una FSI

Los mismos experimentos se realizaron en la interneurona ChAT (+) representados en los incisos C y D, así como en las interneuronas LTS, representados en los incisos E y F de la figura 23.

Noten que en los tres tipos de interneuronas es posible observar la presencia de actividad polisináptica en respuesta a la activación de las aferentes corticales y talámicas (Lorente de No et al., 1938).



**Figura 23.** Participación del circuito estriatal durante la activación cortico-estriatal y tálamo-estriatal. A y B) Registros sinápticos de fijación de corriente (trazos superiores) y fijación de voltaje (trazos inferiores) en respuesta a estímulos crecientes de la vía cortico-estriatal (registros azules) y tálamo-estriatal (registros naranjas) en interneuronas FS. C y D) Actividad polisináptica del microcircuito estriatal en las interneuronas ChAT. E y F) Actividad polisináptica del microcircuito estriatal en las interneuronas LTS. Tanto la estimulación cortical y talámica evocan respuestas sinápticas que se acompañan de varios picos o eventos sinápticos que llegan a distintos tiempos de la respuesta sináptica. Lo que evidencia la actividad polisináptica del microcircuito estriatal en las interneuronas FS, ChAT (Incisos C y D) y LTS (Incisos E y F). La identidad de las interneuronas registradas, se corroboró con la caracterización electrofisiológica de cada clase neuronal, aplicando pulsos cuadrados despolarizantes e hiperpolarizante en el soma de las neuronas en la modalidad de fijación de corriente. Los registros de cada clase de interneurona se muestran en la esquina superior derecha de los incisos B, D y F.

### 8.13 Distinta plasticidad de corto plazo de las aferentes cortico-estriatales y tálamo-estriatales

La pregunta que subyace a esta serie de experimentos es: ¿Existe alguna diferencia funcional entre las aferentes corticales y talámicas que inervan el estriado?. Con el objetivo de estudiar las posibles diferencias funcionales de las aferentes talámicas se realizó una serie de experimentos en los que se aplicaron trenes de 10 pulsos a 20 Hz cada 10 segundos (0.1 Hz) con al menos 10 repeticiones en cada experimento, tanto en las aferentes corticales como en las talámicas, al mismo tiempo que se realizaron registros en la modalidad de fijación de voltaje en las neuronas de proyección del estriado para estudiar la dinámica de las corrientes sinápticas obtenidas.

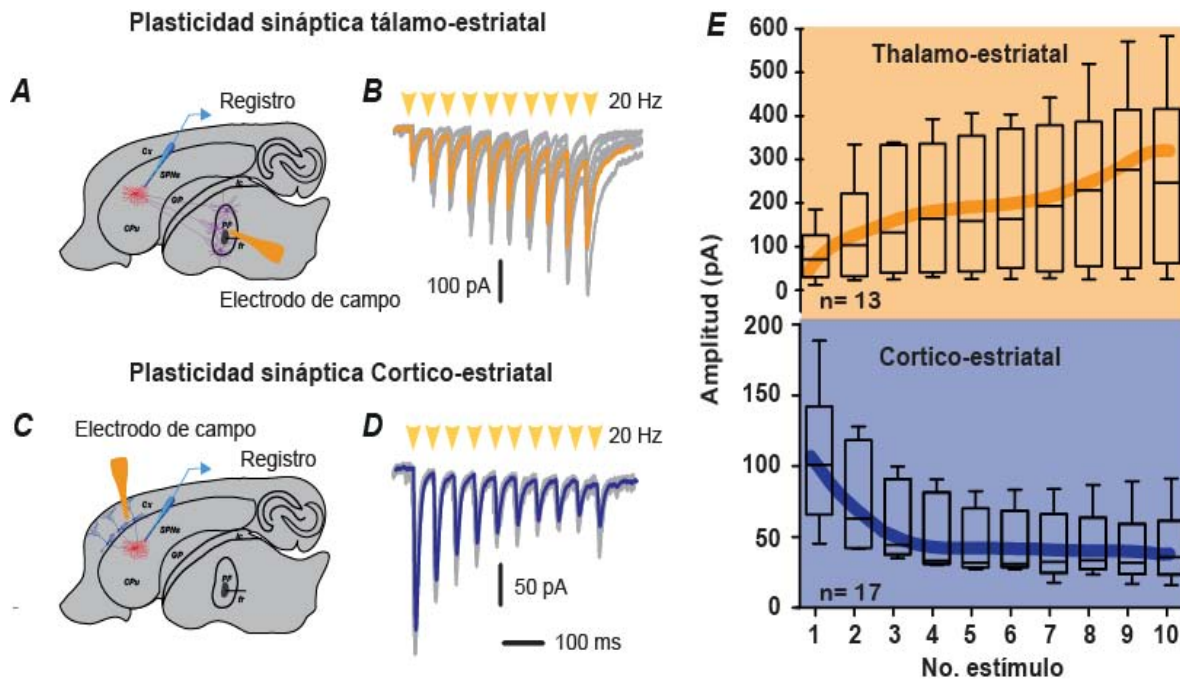
Las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) que se evocaron en las SPN, revelaron que la estimulación tálamica (esquema experimental en el inciso A, figura 24) provoca una dinámica de facilitación de corto plazo ( $n= 13/20$ ). En el inciso B (figura 24), se ilustra el trazo en color naranja que representa el promedio del total de las repeticiones del protocolo experimental, mientras que los trazos grises representan las respuestas individuales e ilustran la variabilidad cuántica intrínseca de las EPSCs evocadas durante los trenes de estimulación. Al realizar este mismo protocolo en las aferentes corticales (Inciso C, figura 24), se encontró una dinámica de depresión de corto plazo ( $n= 17/22$ ). En el inciso D (figura 24) se ilustra el trazo en color azul que representa el promedio del total de las repeticiones del protocolo experimental, mientras que los trazos grises representan las respuestas individuales e ilustra la variabilidad cuántica intrínseca de las EPSCs evocada durante los trenes de estimulación.

A partir del análisis de la distribución de la amplitud de las respuestas postsinápticas con respecto al número de pulsos del tren de 10 estímulos (inciso E, figura 24), se observó que las aferentes corticales y talámicas poseen una dinámica distinta de plasticidad de corto plazo. Los EPSCs evocados desde el tálamo tienden a aumentar conforme van transcurriendo los pulsos del tren de 10 estímulos, mientras que los corticales tienden a disminuir ante el mismo protocolo de estimulación.

Cabe mencionar que al estimular la vía tálamo-estriatal, principalmente se evoca una dinámica de facilitación de corto plazo, sin embargo, también se registraron algunas SPNs que exhibieron depresión de corto plazo ( $n=4/20$ ). Así mismo, se registraron



algunas SPNs que presentaban una combinación de facilitación y depresión, denominadas sinapsis bifásicas (n=3/20). Por otra parte, al estimular las aferentes corticales también se encontraron sinapsis facilitadoras (n=3/22), así como bifásicas (n=2/22).



**Figura 24.** Distinta plasticidad de corto plazo de las aferentes cortico-estriatal y tálamo-estriatal. A y C) Esquemas experimentales del sitio de estimulación y de registro. B) Trazos representativos del tipo de plasticidad de corto plazo de la vía tálamo-estriatal, el trazo naranja es el trazo promedio de todas la repeticiones del estímulo, mientras que los trazos grises son los registros de cada repetición. D) Trazos representativos del tipo de plasticidad de corto plazo de la vía cortico-estriatal, el trazo azul es el trazo promedio de todas la repeticiones del estímulo, mientras que los trazos grises son los registros de cada repetición. E) Distribución de las respuestas obtenidas en toda la muestra de experimentos.

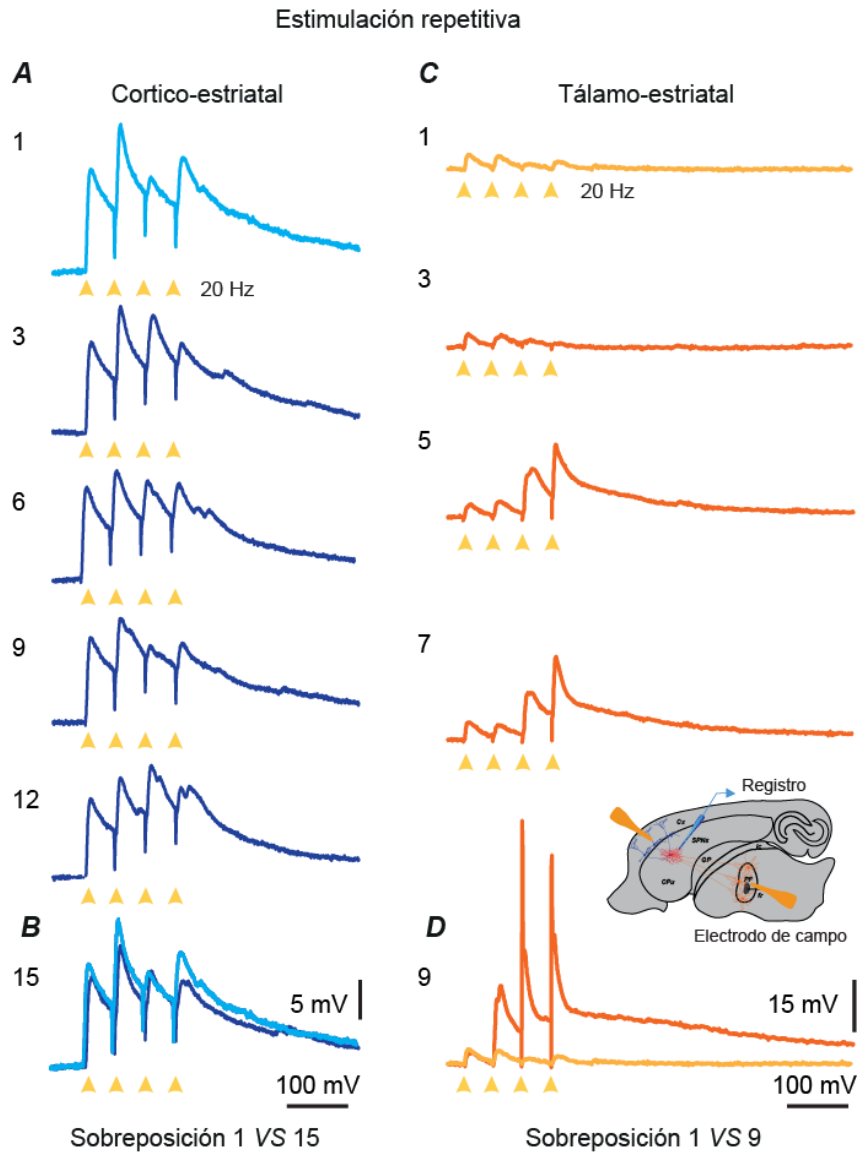
#### 8.14 La estimulación repetitiva de las aferentes corticales y talámicas evocan una dinámica distinta de liberación glutamatergica en el estriado

De acuerdo con los antecedentes, las dos distintas aferentes glutamatergicas del estriado, se han relacionado con las diferentes funciones cognitivas y motoras (Balleine et al., 2007; 2008; Ding et al., 2010; Thorn et al., 2010; Galvan et al., 2011). Para estudiar si se puede evidenciar alguna diferencia funcional entre las dos aferentes glutamatergicas del estriado, comparamos las respuestas sinápticas



evocadas desde la corteza y el tálamo ante un protocolo de estimulación repetitiva de 4 pulsos a 20 Hz cada 10 segundos (0.1 Hz). Al emplear estos protocolos experimentales, se encontró que la estimulación repetitiva de las aferentes corticales mostró un decremento en la amplitud de la respuesta sináptica que evoco el ultimo pulso respecto al primero del tren de 4 estímulos (Inciso A, figura 25), así como una respuesta sináptica que no disminuyó ni aumentó su amplitud promedio conforme se repitió el protocolo de estimulación (al menos 10 repeticiones) Ver la sobreposición de los trazos obtenidos (Inciso B, Fig. 25), en la primera repetición (Trazo Azul claro), respecto a la última repetición (Trazo Azul marino),

Por otra parte, se encontró que la estimulación repetitiva de las aferentes talámicas mostró un incremento del último pulso con respecto al primero del tren de 4 pulsos (Inciso C, figura 25), así como una respuesta que aumentó su amplitud promedio de la primera repetición (Trazo amarillo) del tren de estímulos con respecto al último que se ilustra en tono naranja (Inciso B, figura 25). Este incremento fue tan grande, que logro evocar una respuesta supraumbral con disparo repetitivo en las SPNs. Cabe mencionar que en estos protocolos de estimulación no varió la intensidad del estímulo. El fenómeno observado, se confirmó en neuronas identificadas como dSPNs, iSPNs, así como en las interneuronas estriatales (FS, ChAT, LTS). La diferencia funcional entre las aferentes corticales y talámicas, puede deberse a distintas propiedades de la dinámica de liberación de neurotransmisor de las aferentes talámicas con respecto a las corticales, ya que el incremento de la respuesta sináptica nunca se observó al estimular las aferentes corticales. Es probable que el incremento de la respuesta sináptica, sea un fenómeno exclusivo de las aferentes talámicas que inervan el estriado. Cabe mencionar que el fenómeno sigue ocurriendo, en rebanadas a las que se les seccionó la corteza cerebral (rebanadas decorticadas). Ver figura suplementaria 2.



**Figura 25.** Distinta respuesta sináptica de las aferentes cortico-estriatal y tálamo-estriatal ante la estimulación repetitiva. A) Respuesta sináptica a la estimulación de un tren de 4 pulsos en la corteza cerebral. Los números a la izquierda de los registros indican el número de repeticiones del mismo estímulo. B) Comparación de la respuesta de la primera repetición con respecto a la última (del inciso A); no se observan grandes diferencias. C) Respuesta sináptica a la estimulación de un tren de 4 pulsos en el tálamo. Los números a la izquierda de los registros indican el número de repeticiones del mismo estímulo. D) Comparación de la respuesta de la primera repetición respecto a la última (del inciso C); se observa un incremento significativo de la amplitud de la respuesta.

## 9 DISCUSIÓN

En el presente proyecto doctoral, se estudiaron las respuestas sinápticas subumbrales y supraumbrales de las neuronas de proyección e interneuronas estriatales al estimular las aferentes corticales y talámicas. Así como las propiedades pasivas e intrínsecas de las neuronas estriatales bajo las mismas condiciones experimentales. Las neuronas se registraron en diferentes cepas de ratones dentro de un amplio rango de edad. En estas condiciones, encontramos que las respuestas sinápticas al estimular la corteza y el tálamo fueron indistinguibles entre las diversas cepas estudiadas, sin embargo, cada tipo neuronal presentó una forma particular de integración sináptica al estimular las aferentes glutamatérgicas.

Estos resultados sugieren que no hay invasión preferente del tálamo o la corteza sobre las clases de neuronas estriatales estudiadas. Incluso los análisis que se realizaron para estudiar la distancia electrotónica de las sinapsis corticales y talámicas a lo largo de la distribución somatodendrítica resultaron muy similares en todas las clases de neuronas, estos resultados son congruentes con reportes anatómicos publicados previamente (Dube et al., 1988; Sidibé et al., 1999; Doig et al., 2010; Huerta-Ocampo et al., 2014)

Cabe mencionar que ésta es la primera investigación que muestra la respuesta sináptica supraumbral al estimular el tálamo en condiciones in vitro, tanto en las neuronas de proyección, como en las interneuronas estriatales. Este trabajo, también representa la primera evidencia de que la interneurona LTS es parte de la activación del circuito tálamo-estriatal y cortico-estriatal (Ibañez-Sandoval et al., 2011). Por otra parte, se demostró que al activar las aferentes corticales o talámicas, se ve reflejada la actividad del microcircuito estriatal en la actividad polisináptica (Lorente de No, et al., 1938) que precede al estímulo, tanto en las neuronas de proyección (Vizcarra-Chacón et al., 2013) como en las interneuronas (FS, ChAT y LTS).

## 9.1 Propiedades intrínsecas de las neuronas estriatales

Una manera de estimar si estamos estudiando clases de neuronas estriatales similares, es comparar los parámetros de las propiedades pasivas y activas obtenidos en nuestras condiciones experimentales, con los resultados reportados por otros grupos de investigación. Por lo tanto, en el presente trabajo, se realizó la comparación de las mediciones electrofisiológicas de las neuronas estriatales en diferentes cepas de animales silvestres, así como de animales con modificaciones genéticas.

En cualquier caso, independientemente de los valores obtenidos que pudieran variar en función de la edad o las condiciones experimentales, se espera que los parámetros estimados entre las distintas clases de neuronas basadas en sus propiedades intrínsecas, se mantengan. Por ejemplo el potencial de membrana o la frecuencia de disparo.

En nuestras condiciones experimentales (Ver métodos) y en el rango de edad en el que se desarrolló este proyecto (PN: 21-60 días), se encontró que las dSPNs, iSPNs y las FSI tuvieron el potencial de membrana en reposo más polarizado ( $\leq -80$  mV) con respecto a las ChAT + y a las LTS (Kawaguchi et al., 1995; Koos & Tepper 1999; Tepper et al., 2010; Beatty et al., 2015; Saunders et al., 2016). Por otra parte las ChAT+ y las LTS, exhibieron disparo espontáneo, mientras que las FSI alcanzaron la frecuencia de disparo más alta en respuesta a la estimulación somática con pulsos de corriente (Kawaguchi et al., 1995; Beatty et al., 2015). Sin embargo, las LTS fueron las que tuvieron los valores de resistencia de entrada más altos ( $\geq 650$  M $\Omega$ ) y el valor promedio de constante de decaimiento membranaral  $\tau_m$  (ms) más lento (61.4 ms).

En el presente proyecto se planteó la hipótesis de que las propiedades intrínsecas de las neuronas estriatales podrían estar ejerciendo una influencia importante en la naturaleza de la integración sináptica, tanto en la estimulación de las aferentes glutamatérgicas de la corteza cerebral, como del tálamo. Por ejemplo la constante de decaimiento membranaral  $\tau_m$  (ms), medido al dar un pulso cuadrado en el soma de las iSPNs, fue más rápida que las de las dSPNs ( $12 \pm 2.2$  ms VS  $15 \pm 2.1$  ms, respectivamente). Esta distinta repolarización de la membrana se vio reflejada en la repolarización de las respuestas sinápticas al estimular diversas áreas corticales o el tálamo, siendo que la duración a la amplitud media de las iSPNs también fue más

rápida con respecto a las dSPNs ( $33 \pm 4.3$  ms VS  $59 \pm 7.8$  ms, respectivamente). Esta relación entre las mediciones somáticas y sinápticas también fue consistente entre las interneuronas del estriado. (Ver Tabla 1).

A pesar de que se estimuló la corteza temporal, parietal y frontal, la respuesta sináptica supraumbral resultó con las mismas características descritas en las dSPN e iSPNs (Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013); incluso, al estimular una distinta fuente de glutamato (aférentes talámicas), se preservó íntegra la forma particular de la respuesta sináptica en las SPNs. Esta hipótesis, se hizo más robusta al constatar que la respuesta sináptica de las tres clases de interneuronas estudiadas fue diferente, pero estrechamente similar al comparar las respuestas sinápticas en la misma clase de interneurona al estimular las aférentes corticales y talámicas.

En el presente proyecto se evidenció que la participación de las conductancias de potasio dependientes de calcio tipo BK y SK, son fundamentales para entender la diferente integración sináptica que las dSPNs y las iSPNs exhiben al recibir comunicación sináptica de la corteza o el tálamo. En el caso particular de las dSPN, las  $Kca^{2+}$  tuvieron una activación paulatina y sostenida durante la respuesta sináptica supraumbral, mientras que en las iSPN y las  $Kca^{2+}$  tuvieron una activación cuasi-instantánea y transitoria durante la respuesta sináptica supraumbral (Arias-García et al., 2013).

Esta activación distinta de las conductancias intrínsecas podría ser el reflejo de los distintos mecanismos que cada tipo celular posee para incorporar la participación de estas conductancias en la integración sináptica, tales como, distintas fuentes de calcio para la activación de los canales, o subtipos de  $Kca^{2+}$  con distinta sensibilidad al calcio, o bien una distinta participación de calcio en las dendritas entre las SPNs durante los procesos sinápticos que faciliten o no la activación de los  $Kca^{2+}$  (Pineda et al., 1992; Vilchis et al., 2000, 2002; Carter & Sabatini, 2004; Day et al 2008; Fakler & Adelman 2008; Flores-Barrera et al., 2010). Por otra parte la participación GABAérgica en la integración sináptica supraumbral de las SPNs posee una contribución distinta entre las SPNs (Flores-Barrera et al., 2010), sin embargo éste fenómeno también se debe a diferencias en la excitabilidad dendrítica que existe entre las dSPN e iSPN (Suárez-Rodríguez et al., 2016, en preparación).

Los resultados descritos previamente robustecen la hipótesis de que las propiedades intrínsecas de las distintas clases de neuronas estriatales determinan la forma en que éstas integran las respuestas sinápticas. Cabe mencionar, que otros grupos de investigación han descrito resultados similares en diversos núcleos del cerebro (Cai et al., 2004; Bond et al., 2005; Faber et al., 2007; Benhassine et al., 2009; Kohashi, et al., 2014).

## **9.2 Comunicación sináptica de las neuronas estriatales estudiadas**

El estriado recibe aferentes de diversas áreas de la corteza cerebral. Sin embargo, se ha demostrado una mayor contribución de la corteza pre-frontal, motora, sensorial y de asociación (Selemon et al., 1985; Haber et al., 2000. Postuma et al., 2006, Pan et al., 2010; Wall et al., 2012). Por otra parte, estudios anatómicos y algunos electrofisiológicos han descrito las aferentes talámicas que inervan el estriado (Dube et al., 1988; Deschenes et al., 1996; Thomas et al., 2000; Ding et al., 2008; Doig et al., 2010; Wall et al., 2013),

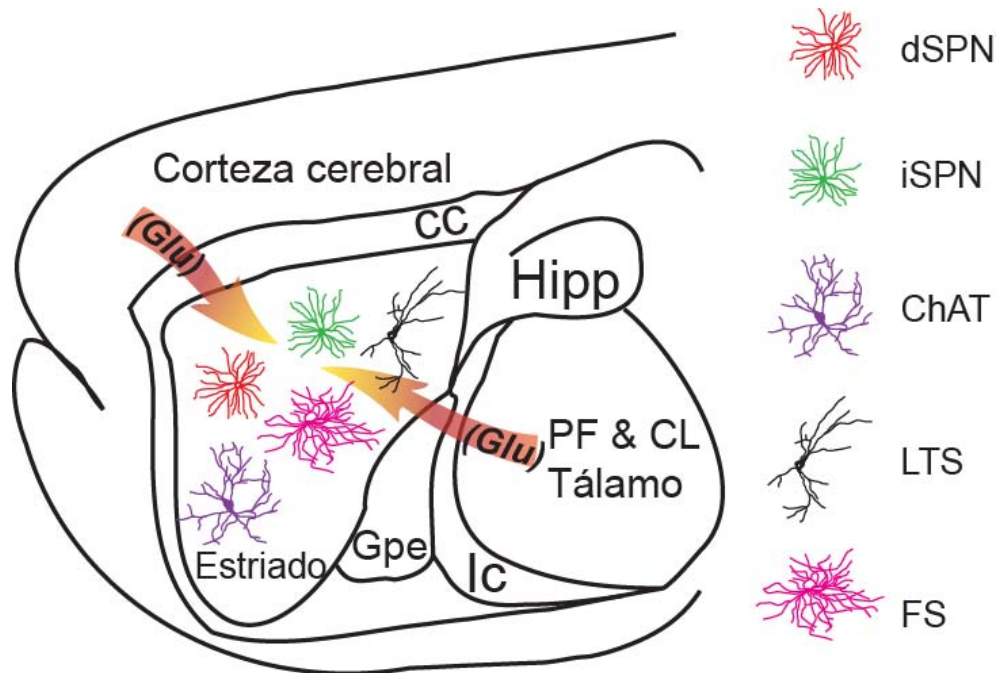
Anteriormente, se había demostrado que un solo estímulo en la corteza cerebral tiene la fuerza suficiente para evocar respuestas polisinápticas prolongadas de varios cientos de milisegundos con disparo repetitivo en las dSPNs, iSPN y las interneuronas FS, ChAT y LTS (Bargas et al., 1991; Kita 1996; Vergara et al., 2003; Tseng et al., 2007; Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013; Arias-García et al., 2013; Pérez-Ramírez et al., 2015). Estas respuestas poseen la contribución de diversos receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA y KA), GABAérgicos, así como la participación de distintos receptores moduladores como los dopaminérgicos o colinérgicos, al igual que conductancias intrínsecas activadas por voltaje u otros iones como los  $Kca^{2+}$  (Flores-Barrera et al., 2010; 2011; Vizcarra-Chacón et al., 2013; Arias-García et al., 2013; Pérez-Ramírez et al., 2015).

El presente trabajo extiende este punto de vista y muestra que las respuestas polisinápticas supraumbrales prolongadas con disparo repetitivo, también se pueden evocar al estimular la vía tálamo-estriatal. De hecho, estas respuestas sinápticas fueron indistinguibles con las obtenidas al estimular la corteza cerebral o bien al estimular el tálamo en rebanadas decorticadas. Incluso, la diferencia entre las respuestas sinápticas al comparar las dPSN e iSPN al activar la corteza, se mantienen

intactas después de la estimulación del tálamo, lo que sugiere, que la activación del tálamo evoca una activación convergente y polisináptica de los axones talámicos sobre las neuronas de proyección e interneuronas, e indica una actividad sincrónica del microcircuito estriatal. Esta última hipótesis es susceptible de futuras investigaciones en materia de circuitos neuronales (Vergara et al., 2003; Carrillo-Reid et al., 2008, 2009; 2011; Pérez-Ortega et al., 2016).

Por otra parte, también se describió en este proyecto que la activación optogenética de las aferentes talámicas evocó una respuesta supraumbral en las interneuronas FS, ChAT y LTS. Una vez más, la respuesta característica de cada clase de neuronas fue independiente de su origen de activación. Sin embargo, algunos reportes en la literatura han postulado que las aferentes corticales y talámicas tienen una innervación preferente respecto a las interneuronas del estriado. En este sentido se ha propuesto que las FSI están preferentemente innervadas por las aferentes corticales (Tepper et al., 2004; Plotkin et al., 2005), mientras que las las interneuronas ChAT +, están preferentemente innervadas por las aferentes talámicas (Ding et al., 2010; Smith et al., 2004; 2009; 2011; 2014). Sin embargo, también hay reportes anatómicos y electrofisiológicos que refieren a que las interneuronas FS y ChAT+ reciben contactos sinápticos de ambas aferencias (Sidibe & Smith 1999; Rudkin et al., 1999; Sciamanna et al., 2015). Es importante mencionar que en relación a las interneuronas LTS, se han publicado pocos estudios sobre su innervación glutamatérgica cortico-estriatal y ninguno de su innervación tálamo-estriatal (Ibañez-Sandoval et al., 2011; Vizcarra-Chacón et al., 2013). En este trabajo, se evidenció que tanto las aferentes corticales y talámicas establecen contactos sinápticos funcionales sobre las interneuronas FS, ChAT y LTS. Estas conexiones sinápticas se ven reflejadas en la actividad polisináptica que subyace a la activación del circuito estriatal. Lo anterior resulta de suma importancia debido a las distintas funciones cognitivas y motoras a las que estas vías glutamatérgicas están relacionadas. Por lo tanto, resulta interesante estudiar la dinámica del microcircuito estriatal al activar una aferente glutamatérgica en particular. Con base en los resultados experimentales obtenidos en este proyecto, se propone un modelo de conexión sináptica de las aferentes corticales y talámicas que innervan al estriado que incluye la conexión glutamatérgica de ambas aferentes con las

neuronas de proyección de la vía directa (dSPNs), neuronas de proyección de la vía indirecta (iSPNs), interneurona colinérgica (ChAT), interneurona de bajo umbral de disparo (LTS), así como la interneurona Fast Spiking (FSI), (Lapper et al., 1992; Ding et al., 2010; Sciamanna et al., 2015) ver figura 26.



**Figura 26.** Inervación cortical y talámica de las neuronas estriatales. En el esquema se ilustra que tanto las aferentes corticales, como las talámicas establecen sinapsis con las neuronas estriatales neuronas de proyección de la vía directa (dSPNs), neuronas de proyección de la vía indirecta (iSPNs), Interneurona colinérgica (ChAT), interneurona de bajo umbral de disparo (LTS), así como la interneurona fast spiking (FSI).

### 9.3 Distribución de los contactos sinápticos de las aferentes corticales y talámicas en las neuronas estriatales

Algunos estudios anatómicos han sugerido que los contactos sinápticos corticales y talámicos sobre las SPNs poseen alguna inervación preferente sobre regiones específicas del árbol, espinas o troncos dendríticos (Raju et al., 2006; Smith et al., 2009; 2011; 2014), Por otra parte, también se ha reportado que los contactos sinápticos corticales y talámicos poseen características similares en las SPNs (Doig et al 2010; Huerta-Ocampo et al., 2014). Sin embargo, solo algunos estudios han



comparado las propiedades electrofisiológicas de las respuestas sinápticas cortico-estriatales y tálamoestriatal (Smeal et al., 2007; Ding et al., 2008) y hasta la fecha ninguno ha comparado la distribución de las entradas sinápticas a diferentes distancias electrotonicas con respecto al soma de las SPNs y mucho menos de las interneuronas estriatales. Cabe mencionar, que el tiempo de subida al pico de la respuesta sináptica y la duración a la amplitud media son funciones que varían en relación a la distancia electrotonica (Rall 1967, 1992). Los resultados del presente proyecto, no reflejaron diferencias significativas entre estos parámetros cuando se evocan respuestas sinápticas al activar la corteza o el tálamo en la mayoría de las distintas clases de neuronas que se estudiaron. Además, se obtuvieron correlaciones significativas entre estos parámetros, lo que sugiere que las entradas sinápticas de ambas fuentes glutamatergicas, se distribuyen y superponen a distancias similares con respecto al soma de las neuronas registradas (Munson y Sybert, 1979), por lo tanto, no hay una prevalencia de las entradas sinápticas de cualquier origen glutamatergico, con una posible excepción de las neuronas LTS, quienes presentaron una cierta tendencia de proximidad de las aferentes talámicas con respecto a las corticales.

#### **9.4 Relevancia funcional**

Dado que los resultados obtenidos en las propiedades intrínsecas de las neuronas estudiadas, fueron consistentes a pesar de utilizar distintos animales transgénicos con diversos marcadores moleculares, se infiere que los microcircuitos neuronales nativos se conservan y por lo tanto, las conexiones sinápticas descritas en este proyecto se podrían generalizar a otras clases de animales transgénicos que en esta investigación no se contemplaron. Lo anterior resulta relevante toda vez que los estudios en neurociencias que persiguen conocer la naturaleza del funcionamiento del cerebro en condiciones normales y patológicas, se realizan en distintas cepas de animales sin haber considerado el estudio comparativo entre cepas de animales utilizados, tal como se realizó en este proyecto doctoral (López-Huerta et al., 2013; Perk et al., 2015; Pérez-Ortega et al., 2016).

Otra hipótesis relacionada, sujeta a experimentación es el tipo de modulación sináptica que estas vías glutamatergicas pudieran tener en el estriado, dado que este

núcleo es partícipe de diversos moduladores tales como la Dopamina, Acetilcolina, Somatostatina, etc.

Funcionalmente la vía cortico-estriatal está relacionada con la realización de las tareas voluntarias o habituales dirigidas a alcanzar metas (Balleine et al., 2007, 2008; Feingold et al., 2016), mientras que la vía tálamo-estriatal se ha propuesto como el “*switch*” entre las conductas dirigidas por la corteza cerebral y los cambios en la conducta motora provocados por las vías sensoriales provenientes de estímulos del medio ambiente (Matsumoto et al., 2001; Minamimoto et al., 2005; Kimura et al., 2004, 2005; Galvan et al., 2011). Sin embargo, en la literatura no se había reportado una respuesta sináptica supraumbral evocada al activar la vía tálamo-estriatal, lo cual es de suma importancia, dado que, si el comando sináptico tálamo-estriatal no evoca potenciales de acción, los núcleos de salida de los Ganglios Basales no se verían influenciados y por tanto la conducta motora podría no verse modificada.

Por otra parte, al estudiar la plasticidad de corto plazo de las aferentes corticales y talámicas se observó que las terminales tálamo-estriatales mostraron facilitación, mientras que las cortico-estriatales se deprimieron conforme transcurrió el tren de estímulos. Lo que implica que la activación sostenida de las aferentes talámicas poseen mayor probabilidad de evocar potenciales de acción en las neuronas estriatales que las aferentes corticales. Cabe mencionar que las terminales sinápticas talámo-estriatales carecen del receptor CB1, lo cual podría ayudar a que la dinámica de corto plazo presente facilitación en vez de depresión (Wu et al., 2015). Lo anterior, podría ser el correlato neurofisiológico del “*switch*” entre las conductas dirigidas por la corteza cerebral y los cambios en la conducta motora provocados por los estímulos salientes del ambiente que el tálamo codifica (Matsumoto et al., 2001; Minamimoto et al., 2005; Kimura et al., 2004,2005; Ding et al., 2010; Thorn et al., 2010; Galvan et al., 2011), ver figura 27. Otra evidencia experimental que apoya esta hipótesis de trabajo, es que al estimular repetitivamente la vía tálamo-estriatal, se observó un incremento en la amplitud de la respuesta postsináptica de las SPNs, que incluso fue capaz de evocar potenciales de acción. Cabe mencionar que al aplicar el mismo estímulo en las aferentes corticales, no logramos evocar un efecto similar, sugiriendo que es un mecanismo exclusivo de las aferentes talámicas.

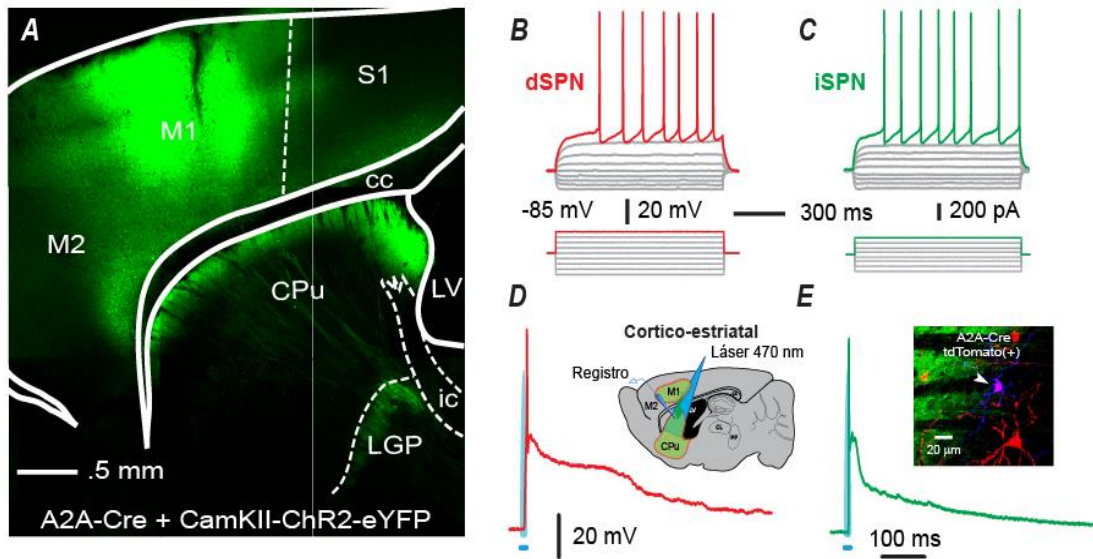


**Figura 27.** Conductas relacionadas a la vía cortico-estriatal y tálamo-estriatal. La vía cortico-estriatal lleva a cabo conductas dirigidas a metas, mientras que la vía tálamo-estriatal realiza el cambio de conductas motoras que la corteza comandaba en función de los estímulos salientes ambientales.

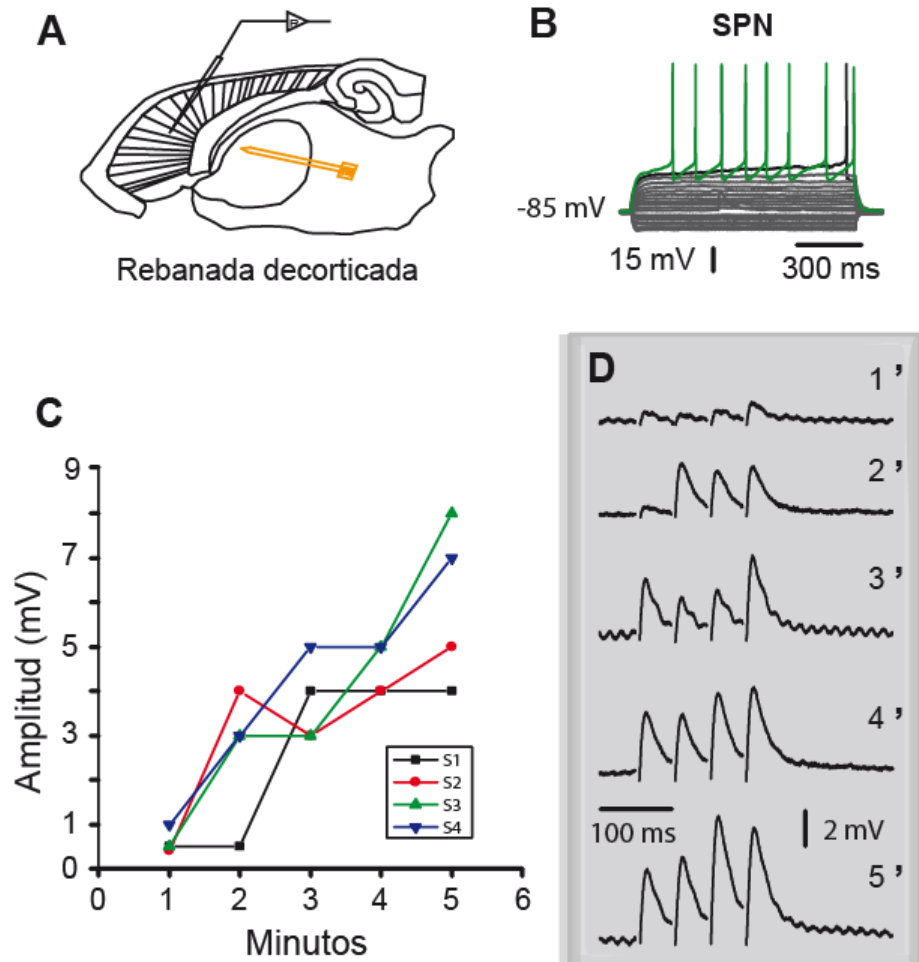
## 10 CONCLUSIONES

- 1) Las SPNs e interneuronas del estriado establecen comunicación sináptica con las aferentes glutamatergicas corticales y talámicas.
- 2) Los contactos sinápticos cortico-estriatales y tálamo-estriatales, se distribuyen de forma homogénea en el árbol dendrítico de las SPNs y las interneuronas FS, ChAT y LTS.
- 3) Las SPNs y las interneuronas FS, ChAT y LTS, exhibieron una respuesta polisináptica supraumbral de varios cientos de milisegundos al activar la vía cortico-estriatal y tálamo-estriatal.
- 4) La forma de la respuesta sináptica está determinada por las propiedades intrínsecas de las SPNs y las interneuronas FS, ChAT y LTS.
- 5) Los  $Kca^{2+}$  determinan la duración y la forma de la respuesta sináptica cortico-estriatal de las SPNs.
- 6) Las terminales sinápticas tálamo-estriatales poseen una dinámica de facilitación de corto plazo
- 7) Las terminales sinápticas cortico-estriatales poseen una dinámica de depresión de corto plazo -
- 8) La estimulación repetitiva de las aferentes glutamatérgicas del estriado, revelo un incremento de la respuesta sináptica tálamo-estriatal.

## 11 FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura suplementaria 1.** Trazado y activación optogenética de la vía Cortico-estriatal. A) reconstrucción serial de una rebanada sagital donde se aprecia la inyección del virus adeno-asociado CamKII-ChR2-eYFP en la corteza motora primaria (M1) de un ratón A2A-Cre. B y C) respuesta del voltaje (trazos superiores) ante la aplicación de pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes en el soma (trazos inferiores) de una dSPN e iSPN respectivamente. D y E) respuesta sináptica supraumbrales de una dSPN e iSPN obtenida al activar la corteza motora con estimulación optogenética. La imagen confocal del inciso E, corresponde a una iSPN A2A-tdTomato(+) marcada intracelularmente con biocitina y acoplada al fluoróforo CY5 (Azul) con axones positivos a eYFP-ChR2 de fondo, que descienden de la corteza cerebral.



**Figura suplementaria 2.** Incremento de la respuesta sináptica tálamo-estriatal en rebanada decorticada. A) Esquema experimental de la rebanada decorticada, así como la estimulación de las aferentes talámicas y el registro en el estriado dorsal. B) Caracterización electrofisiológica de la SPN registrada. C) Amplitud creciente de la respuesta sináptica de una SPN ante la estimulación repetitiva de la vía tálamo-estriatal, en una rebanada decorticada. Note que el incremento en la respuesta sináptica está en función del tiempo que transcurre la estimulación repetitiva. D) trazos representativos del incremento de la respuesta sináptica a distintos minutos en presencia de la estimulación repetitiva de la vía tálamo-estriatal.

## 12 REFERENCIAS

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989 12:366-375.
- 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. doi:10.3389/fnsys.2013.00063.
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989) An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Expe Brain Res.* 1: 146-156.
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1991) Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res* 539:159–163.
- Bakhurin KI, Mac V, Golshani P, Masmanidis SC (2016). Temporal correlations among functionally specialized striatal neural ensembles in reward-conditioned mice. *Journal of neurophysiology*, 115(3), 1521-1532. doi: 10.1152/jn.01037.2015
- Beatty JA, Sullivan MA, Morikawa H, Wilson CJ (2012) Complex autonomous firing patterns of striatal low-threshold spike interneurons. *Journal of neurophysiology* 108:771-781. doi:10.1152/jn.00283.2012
- Balleine, BW, Delgado, MR, & Hikosaka, O. (2007). The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *The Journal of Neuroscience*, 27(31), 8161-8165. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1554-07.2007
- Balleine BW, Liljeholm M, Ostlund SB (2009) The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav Brain Res.* 199(1): 43–52. doi: 10.1016/j.bbr.2008.10.034
- Beatty JA, Song SC, Wilson CJ (2015) Cell-type-specific resonances shape the responses of striatal neurons to synaptic input. *Journal of neurophysiology* 113:688-700. doi:10.1152/jn.00827.2014
- Bennett BD, Callaway JC, Wilson CJ (2000) Intrinsic Membrane Properties Underlying Spontaneous Tonic Firing in Neostriatal Cholinergic Interneurons *The Journal of Neuroscience.* 22:8493-8503.
- Benhassine N, Berger T (2005) Homogeneous distribution of large-conductance calcium-dependent potassium channels on soma and apical dendrite of rat neocortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci.* 4:914-26.
- Benhassine N & Berger T (2009) Large-conductance calcium-dependent potassium channels prevent dendritic excitability in neocortical pyramidal neurons *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 457:1133-1145.
- Bishop GA, Chang HT, Kitai ST (1982) Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience.* 7: 179-191.
- Bond CT, Maylie J, Adelman JP (2005). SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Current Opinion in Neurobiology.* 15:305-311.
- Bonsi P, Cuomo D, Martella G, Madeo G, Schirinzi T, Puglisi F, Ponterio G, Pisani A. (2011) Centrality of striatal cholinergic transmission in Basal Ganglia function. *Front Neuroanat* 5:6. doi:10.3389/fnana.2011.00006
- Cai X, Liang CW, Muralidharan S, Kao JP, Tang CM, Thompson SM (2004) Unique Roles of SK and Kv4.2 Potassium Channels in Dendritic Integration. *Neuron* 44: 351–364.
- Carter AG, Sabatini BL (2004) State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron* 44: 483–493. doi: 10.1016/j.neuron. 2004.10.013
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Bargas J. (2008) Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol.* 99: 1435-1450. doi: 10.1152/jn.01131.2007

- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibáñez-Sandoval O, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Bargas J. (2009) Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 101: 737-749. doi: 10.1152/jn.90975.2008.
- Carrillo-Reid L, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E, Bargas J. (2011) Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: receptor-specific configuration of cell assemblies. *J Neurosci* 31: 14972-14983. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3226-11.2011.
- Castle M, Aymerich MS, Sanchez-Escobar C, Gonzalo N, Obeso JA, Lanciego JL (2005) Thalamic innervation of the direct and indirect basal ganglia pathways in the rat: ipsi- and contralateral projections. *J Comp Neurol* 483:143–153. doi:10.1002/cne.20421
- Cowan RL Wilson CJ (1994) Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *J Neurophysiol* 71:17-32.
- Day M, Wokosin D, Plotkin JL, Tian X, Surmeier DJ (2008) Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J Neurosci* 28: 11603–11614. doi:10.1523/JNEUROSCI.1840-08.2008
- Dautan D., Hacıoğlu Bay H, Bolam JP, Gerdjikov TV, Mena-Segovia J. (2016). Extrinsic Sources of Cholinergic Innervation of the Striatal Complex: A Whole-Brain Mapping Analysis. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 1. doi.org/10.3389/fnana.2016.00001
- Deisseroth K. (2015). Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature neuroscience*, 18, 1213-1225.
- DeLong MR, & Wichmann T (2015). Basal ganglia circuits as targets for neuromodulation in Parkinson disease. *JAMA neurology*, 72(11), 1354-1360.
- Deschênes M, Bourassa J, Parent A (1995) Two different types of thalamic fibers innervate the rat striatum. *Brain Res* 701: 288-292
- Deschênes M, Bourassa J, Doan VD, Parent A (1996) A single-cell study of the axonal projections arising from the posterior intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Eur J Neurosci*. 8:329–343.
- Deng YP, Lei WL, Reiner A (2006) Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. *J Chem Neuroanat* 32:101-116.
- Deng YP, Wong T, Wan JY, Reiner A. (2014). Differential loss of thalamostriatal and corticostriatal input to striatal projection neuron types prior to overt motor symptoms in the Q140 knock-in mouse model of Huntington's disease. *Frontiers in systems neuroscience* 8, 198.
- Ding J, Peterson JD, Surmeier DJ (2008) Corticostriatal and thalamostriatal synapses have distinctive properties. *J Neurosci* 28:6483-6492. doi:10.1523/JNEUROSCI.0435-08.2008
- Ding JB, Guzman JN, Peterson JD, Goldberg JA, Surmeier DJ (2010) Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron* 67: 294–307. doi:10.1016/j.neuron.2010.06.017
- Doig NM, Moss J, Bolam JP (2010) Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci* 30:14610 – 14618. doi:10.1523/JNEUROSCI.1623-10.2010
- Doig NM, Magill PJ, Apicella P, Bolam JP, Sharott A (2014) Cortical and thalamic excitation mediate the multiphasic responses of striatal cholinergic Interneurons to motivationally salient stimuli. *J Neurosci* 34:3101–3117. doi:10.1523/JNEUROSCI.4627-13.2014
- Dubach M, Schmidt R, Kunkel D, Bowden D, Martin R, German C (1987). Primate neostriatal neurons containing tyrosine hydroxylase: immunohistochemical evidence. *Neuroscience letters*, 75, 205-210.



- Dube L, Smith AD, Bolam JP (1988) Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origin in contact with distinct medium-size spiny neurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 267: 455–471. doi:10.1002/cne.902670402
- English DF, Ibanez-Sandoval O, Stark E, Tecuapetla F, Buzsaki G, Deisseroth K, Tepper JM, Koos T (2011) Novel GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nat Neurosci* 15:123–130. doi:10.1038/nn.2984
- Faust TW, Assous M, Shah F, Tepper JM, Koós T (2015) Novel fast adapting interneurons mediate cholinergic-induced fast GABAA inhibitory postsynaptic currents in striatal spiny neurons. *Eur J Neurosci* 42: 1764-1774. doi:10.1111/ejn.12915
- Faber LE, & Sah P (2007) Functions of SK channels in central neurons *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 34: 1077–1083
- Fakler B, & Adelman JP (2008) Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59:873-81.
- Feingold, J., Gibson, D. J., DePasquale, B., & Graybiel, A. M. (2015). Bursts of beta oscillation differentiate postperformance activity in the striatum and motor cortex of monkeys performing movement tasks. *PNAS*. 12(44), 13687–13692. doi.org/10.1073/pnas.1517629112
- 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. doi:10.3389/fnsys.2010.00015
- Flores-Barrera E, Vizcarra-Chacón B J , 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.doi:10.3389/fnsys. 2011.00015
- Freund TF, Bolam JP, Björklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Powell JF, Smith AD (1985) Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J Neurosci* 5:603-616.
- Galarraga E, Hernandez-Lopez S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J (1999) Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19:3629–3638
- Galvan A, Smith Y (2011) The primate thalamostriatal systems: Anatomical organization, functional roles and possible involvement in Parkinson's disease. *Basal Ganglia* 1:179-189. doi:10.1016/j.baga.2011.09.001
- Gittis AH, Nelson AB, Thwin MT, Palop JJ, Kreitzer AC (2010) Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *J Neurosci* 30:2223-34. doi:10.1523/JNEUROSCI.4870-09.2010.
- Goldberg JA, Reynolds JN (2011) Spontaneous firing and evoked pauses in the tonically active cholinergic interneurons of the striatum. *Neurosci*15:98:27-43.doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.067. Epub 2011 Sep 8.
- Gonzales K, & Smith Y (2015). Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1349(1), 1-45.
- Graybiel AM, & Grafton ST (2015). The striatum: where skills and habits meet. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(8), a021691.
- Groenewegen H (2003) The Basal Ganglia and Motor Control. *Neural plasticity* 10: 107-120.
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci*. 15:2369-2382
- Haber SN. (2014). The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. *Neuroscience*, 282, 248-257.

- Hernández-Flores T, Hernández-González O, Pérez-Ramírez MB, Lara-González E, Arias-García MA, Duhne M, Pérez-Burgos A, Prieto AG, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J. (2015) Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M<sub>4</sub>-type receptors. *Neuropharmacology*, 89, 232-244. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.09.028
- Hernandez-López S., Bargas J., Surmeier D. J., Reyes A., Galarraga E (1997) D1 Receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-Type Ca21 conductance. *J. Neurosci.* 17(9): 3334-3342.
- Huerta-Ocampo, 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: 1787-1800. doi:10.1007/s00429-013-0601-z
- Ibanez-Sandoval O, Tecuapetla F, Unal B, Shah F, Koos T, Tepper JM (2010) Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. *J Neurosci* 30:6999–7016. doi:10.1523/JNEUROSCI.5996-09.2010
- Ibanez-Sandoval O, Tecuapetla F, Unal B, Shah F, Koós T, Tepper JM. (2011) A Novel Functionally Distinct Subtype of Striatal Neuropeptide Y Interneuron. *J Neurosci* 31: 16757–16769. doi:10.1523/JNEUROSCI.2628-11.2011
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13:4908–4923
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527–535
- Kawaguchi Y (1997) Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neuroscience Research*. 27: 1–8
- Kim HF, & Hikosaka O. (2015). Parallel basal ganglia circuits for voluntary and automatic behaviour to reach rewards. *Brain*, 138(7), 1776-1800. doi: 10.1093/brain/awv134
- Kimura, M., Minamimoto, T., Matsumoto, N., & Hori, Y. (2004). Monitoring and switching of cortico-basal ganglia loop functions by the thalamo-striatal system. *Neuroscience research*, 48(4), 355-360. doi: 10.1016/j.neures.2003.12.002
- Kita T, Kita H, Kitai ST (1985) Effects of 4-Aminopyridine (4-AP) on Rat Neostriatal Neurons in an In Vitro Slice Preparation. *Brain Research*, 361: 10-18
- Kita H (1996). Glutamatergic and Gabaergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations *Neuroscience*. 4:925-940.
- Koos T, Tepper JM (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2:467–472. doi:10.1038/8138
- Koos T, Tepper JM, Wilson CJ (2004) Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24:7916–7922 doi:10.1523/JNEUROSCI.2163-04.2004
- Kohashi, T., & Carlson, B. A. (2014). A fast BK-type KCa current acts as a postsynaptic modulator of temporal selectivity for communication signals. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 286. <http://doi.org/10.3389/fncel.2014.00286>
- Künzle H. (2006) Thalamo-striatal projections in the hedgehog tenrec. *Brain research* 100: 78-92
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PRL, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviors by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), 622–626. <http://doi.org/10.1038/nature09159>
- Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60: 543-554. doi:10.1016/j.neuron.2008.11.005
- Lacey CJ, Bolam JP, Magill PJ (2007) Novel and distinct operational principles of intralaminar thalamic neurons and their striatal projections. *J Neurosci* 27:4374–4384. doi:10.1523/JNEUROSCI.5519-06.2007

- Lapper SR, Bolam JP (1992) Input from the frontal-cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neurosci* 51:533–545
- 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*. 11: 4964–4975. doi:10.1523/JNEUROSCI.4721-12.2013
- Lorente de No R (1938) Analysis of the activity of the chains of internuncial neurons. *J Neurophysiol* 1: 207–244
- Mahon S, Vautrelle N, Pezard L, Slaght SJ, Deniau JM, Chouvet G, Charpier S (2006). Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep–wake cycle. *The Journal of neuroscience*, 48, 12587-12595.
- Matamales M, Bertran-Gonzalez J, Salomon L, Degos B, Deniau JM, Valjent E, Girault JA (2009). Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PLoS one*, 4(3), e4770. doi: 10.1371/journal.pone.0004770
- Matsumoto N, Minamimoto T, Graybiel AM, Kimura M (2001). Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events. *Journal of Neurophysiology*, 85(2), 960-976.
- Mink JW (1996) the basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Progress in Neurobiology*. 50:381- 425.
- Minamimoto T, Hori Y, Kimura M (2005). Complementary process to response bias in the centromedian nucleus of the thalamus. *Science*, 308(5729), 1798-1801. doi: 10.1126/science.1109154
- Munson JB, Sybert GW (1979) Properties of single fibre excitatory post-synaptic potentials in triceps surae motoneurons. *J Physiol* 296: 329-342.
- Muñoz-Manchado AB, Foldi C, Szydlowski S, Sjulson L, Farries M, Wilson C, Silberberg G, Hjerling-Leffler J (2016) Novel Striatal GABAergic Interneuron Populations Labeled in the 5HT3a(EGFP) Mouse. *Cereb Cortex* 26:96-105. doi:10.1093/cercor/bhu179
- Ngo-Anh TJ, Bloodgood BL, Lin M, Sabatini BL, Maylie J, Adelman JP (2005) SK channels and NMDA receptors form a Ca<sup>2+</sup>-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat Neurosci*. 5:642-649
- Pérez-Garci E, Bargas J, Galarraga E (2003). The role of Ca<sup>2+</sup> channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport*, 14(9), 1253-1256. doi: 10.1097/01.wnr.0000081861.45938.71
- Pérez-Ortega J, Duhne M, Lara-González E, Plata V, Gasca D, Galarraga E, Hernández-Cruz A, Bargas J (2016) Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiology of disease*, 91, 347-361.
- Pérez-Ramírez MB, Laville A, Tapia D, Duhne M, Lara-González E, Bargas J, Galarraga E. (2015) KV7 channels regulate firing during synaptic integration in GABAergic striatal neurons. *Neural Plasticity* 2015:472676. doi:10.1155/2015/472676
- Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman JN, Galarraga E, Bargas J (2005) Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurophysiol* 93: 2507-2519. doi:10.1152/jn.00853.2004
- Perk CG, Wickens JR, Hyland BI (2015) Differing properties of putative fast-spiking interneurons in the striatum of two rat strains. *Neurosci* 294: 215-226. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.02.051
- Pineda JC, 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: 287-294
- Planert H, Szydlowski SN, Hjorth JJ, Grillner S, Silberberg G (2010) Dynamics of synaptic transmission between fast-spiking interneurons and striatal projection neurons of the direct and indirect pathways. *J Neurosci* 30:3499–3507. doi:10.1523/JNEUROSCI.5139-09.2010

- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J., Hernández-Martínez, R., Rueda-Orozco, P., Galarraga, E, Bargas, J. (2013). Global actions of nicotine on the striatal microcircuit. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7, 78. doi.org/10.3389/fnsys.2013.00078
- Plotkin JL, Wu N, Chesselet MF, Levine MS (2005). Functional and molecular development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons and their cortical inputs. *European Journal of Neuroscience*, 22(5), 1097-1108. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04303.x
- Plotkin JL, Day M, Surmeier DJ (2011) Synaptically driven state transitions in distal dendrites of striatal spiny neurons. *Nat Neurosci* 14: 881-888. doi:10.1038/nn.2848
- Plotkin, J. L., Shen, W., Rafalovich, I., Sebel, L. E., Day, M., Chan, C. S., & Surmeier, D. J. (2013). Regulation of dendritic calcium release in striatal spiny projection neurons. *Journal of Neurophysiology*, 110(10), 2325–2336. doi.org/10.1152/jn.00422.2013
- Postuma RB, Dagher A (2006) Basal ganglia functional connectivity based on a meta-analysis of 126 positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging publications. *Cereb Cortex*. 16:1508-1521.
- Raju DV, Shah DJ, Wright TM, Hall RA, Smith Y (2006) Differential synaptology of vGluT2-containing thalamostriatal afferents between the patch and matrix compartments in rats. *J Comp Neurol*. 1499:231-43.
- Rall W (1967) Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for different soma-dendritic distributions of synaptic input. *J Neurophysiol* 30: 1138-1168.
- Rall W, Burke RE, Holmes WR, Jack JJB, Redman SJ, Segev I (1992) Matching dendritic neuron models to experimental data. *Physiol Rev* 72:159-186.
- Reig R, & Silberber G (2014). Multisensory integration in the mouse striatum. *Neuron*, 83(5), 1200-1212. doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.033
- Reyes A, Galarraga E, Flores-Hernández J, Tapia D, Bargas J (1998) Passive properties of neostriatal neurons during potassium conductance blockade. *Exp Brain Res* 120:70-84.
- Rudkin TM, & Sadikot (1999) Thalamic input to parvalbumin-immunoreactive gabaergic Interneurons. Organization in normal striatum and effect of neonatal decortications. *Neurosci* 88:1165–1175
- Saunders A, Huang KW, Sabatini BL (2016) Globus Pallidus Externus Neurons Expressing parvalbumin Interconnect the Subthalamic Nucleus and Striatal Interneurons. *PLoS ONE* 11:e0149798. doi:10.1371/journal.pone.0149798
- Sah P (1996) Ca<sup>2+</sup> activated K currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci*. 19: 150-154
- Sciamanna G, Tassone A, Mandolesi G, Puglisi F, Ponterio G, Martella G, Madeo G, Bernardi G, Standaert DG, Bonsi P, Pisani C (2012) Cholinergic Dysfunction Alters Synaptic Integration between Thalamostriatal and Corticostriatal Inputs in DYT1 Dystonia. *J Neurosci* 32:11991–12004. doi:10.1523/JNEUROSCI.0041-12.2012
- Sciamanna G, Ponterio G, Mandolesi G, Bonsi P, Pisani A (2015) Optogenetic stimulation reveals distinct modulatory properties of thalamostriatal vs corticostriatal glutamatergic inputs to fast spiking interneurons. *Scientific Reports* 5:16742. doi:10.1038/srep16742
- Schultz W (2016). Reward functions of the basal ganglia. *Journal of Neural Transmission*, 1-15.
- Schulz J, Pitcher T, Savanthrapadian S, Wickens J, Oswald M, & Reynolds J (2011). Enhanced high-frequency membrane potential fluctuations control spike output in striatal fast-spiking interneurons in vivo. *The Journal of physiology*, 589 (17), 4365-4381.
- Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1985) Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci*. 5:776-794.
- Shepherd GM (2013). Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(4), 278-291.

Shuen JA, Chen M, Gloss B, Calakos N (2008). *Drd1a*-tdTomato BAC transgenic mice for simultaneous visualization of medium spiny neurons in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *The Journal of neuroscience*, 28(11), 2681-2685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5492-07.2008

Sidibe M, & Smith Y (1999). Thalamic inputs to striatal interneurons in monkeys: synaptic organization and co-localization of calcium binding proteins. *Neuroscience*, 89(4), 1189-1208.

Smeal RM, Gaspar RC, Keefe KA, Wilcox KS (2007) A rat brain slice preparation for characterizing both thalamostriatal and corticostriatal afferents. *J Neurosci Meth* 159:224 –235. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.07.007

Smeal RM, Keefe KA, Wilcox KS (2008) Differences in excitatory transmission between thalamic and cortical afferents to single spiny efferent neurons of rat dorsal striatum. *Eur J Neurosci* 28:2041–2052. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06505.x

Smith Y, Raju DV, Pare JF, Sidibé M (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci* 27:520–527. doi:10.1016/j.tins.2004.07.004

Smith Y, Raju D, Nanda B, Pare JF, Galvan A, Wichmann T (2009) The thalamostriatal systems anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Res Bull* 78: 60–68. doi:10.1016/j.brainresbull.2008.08.015

Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR (2012). Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 213-246. doi: 10.1038/npp.2011.212

Smith, Y., Galvan, A., Ellender, T. J., Doig, N., Villalba, R. M., Huerta-Ocampo, I., ... Bolam, J. P. (2014). The thalamostriatal system in normal and diseased states. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8, 5. <http://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00005>

Stern EA, Kincaid AE, Wilson CJ (1997) Spontaneous Subthreshold Membrane Potential Fluctuations and Action Potential Variability of Rat Corticostriatal and Striatal Neurons In Vivo. *J Neurophysiol* 77:1697-1715

Stocker M, Pedarzani P (2000) Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci*. 2000 5:476-93.

Stocker M (2004) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci*.10:758-770.

Szydlowski SN, Pollak Dorocic I, Planert H, Carlén M, Meletis K, Silberberg G (2013) Target selectivity of feedforward inhibition by striatal fast-spiking interneurons. *J Neurosci* 33:1678-1683. doi:10.1523/JNEUROSCI.3572-12.2013

Taverna S, Canciani B, Pennartz CM (2007) Membrane properties and synaptic connectivity of fast-spiking interneurons in rat ventral striatum. *Brain Res* 1152:49–56. doi:10.1016/j.brainres.2007.03.053

Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J, Galarraga E (2007) Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24:10258-10263

Tepper JM, Bolam JP (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current opinion in neurobiology*, 14(6), 685-692. doi: 10.1016/j.conb.2004.10.003

Tepper JM, Tecuapetla F, Koós T, Ibáñez-Sandoval O (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat* 4:150. doi:10.3389/fnana.2010.00150

Thomas TM, Smith Y, Levey AI, Hersch SM (2000) Cortical inputs to m2-immunoreactive striatal interneurons in rat and monkey. *Synapse* 37: 252–261

Thorn CA, Graybiel AM (2010) Pausing to regroup: thalamic gating of cortico-basal ganglia networks. *Neuron* 67:75–178. doi:10.1016/j.neuron.2010.07.010

Tseng KY, Snyder-Keller A, O'Donnell P (2007) Dopaminergic modulation of striatal plateau depolarizations in corticostriatal organotypic cocultures. *Psychopharmacology* 191: 627–640. doi:10.1007/s00213-006-0439-7

- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR (2002) Inhibitory Interactions between Spiny Projection Neurons in the Rat Striatum. *J Neurophysiol* 88:1263-1269.
- 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 cortico striatal slice. *J Physiol* 15:169–182. doi: 10.1113/jphysiol.2003.050799
- Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galván E, Galarraga E (2000) Ca<sup>2+</sup> channels that activate Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience*, 95: 745-752.
- Vilchis C, Bargas J, Pérez- Rosello T, Salgado H, Galarraga E (2002) Somatostatin modulates Ca<sup>2+</sup> currents in neostriatal. *Neuroscience* 3: 555-567.
- Vizcarra-Chacón B, Arias-García MA, Pérez-Ramirez MB, Flores-Barrera E, Tapia D, Drucker-Colin R., Bargas J, Galarraga E (2013) Contribution of different classes of glutamate receptors in the cortico-striatal polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neurosci* 14:60. doi:10.1186/1471-2202-14-60
- Wall NR, De La Parra M, Callaway EM, Kreitzer AC (2013) Differential Innervation of direct and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron* 79: 347–360. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.014
- Pan WX, Mao T, Dudman J T (2010). Inputs to the dorsal striatum of the mouse reflect the parallel circuit architecture of the forebrain. *Frontiers in neuroanatomy*, 4, 147. doi: 10.3389/fnana.2010.00147
- Wilson CJ, Groves PM (1981) Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Research*, 220: 67-80.
- Wilson C J, Chang H T, Kitai ST (1990) Firing Patterns and Synaptic Potentials of Identified Giant Spiny Interneurons in the Rat Neostriatum. *The Journal of Neuroscience*. 70: 508-519
- Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16:2397–2410
- Wilson CJ. (2004) Basal Ganglia. En: *The synaptic organization of the brain*, Ed Shepherd GM 5th Edition, pp 361-414 Oxford University Press, Oxford
- Wu YW, Kim JI, Tawfik VL, Lalchandani RR, Scherrer G, Ding JB (2015). Input-and cell-type-specific endocannabinoid-dependent LTD in the striatum. *Cell report*. 1, 75-87.