



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
Instituto de Fisiología Celular  
Neurociencias**

LA DOPAMINA AUMENTA LAS CORRIENTES DE CALCIO Cav1 EN  
INTERNEURONAS ESTRIATALES “FAST SPIKING”

# TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

**ERNESTO ALBERTO RENDON OCHOA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. JOSÉ BARGAS DÍAZ

[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDÉS

[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Octubre, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



## *A MI PAPÁ*

Gracias por todo, por ser esa inspiración inagotable  
Esa fuente de saber; ese enigma, ese faro y sostén de todos nosotros  
Donde estés, quisiera inventarte un cielo para ti solito  
Uno hermoso, como el que mereces,  
donde estés feliz y en paz.  
Siempre te amaré. Se te extraña hasta el alma.

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre, que siempre estuvo ahí conmigo apoyándome incondicionalmente. No sé a dónde hubiera llegado sin ella.

A mi hermano, con quien podía compartir bromas y liberarse un poco.

A la familia Ochoa, con quien siempre puedo contar y encontrar un cálido hogar.

A Monse, la cual me ha apoyado en todo este proceso. Siempre con la palabra correcta, siempre con la mirada y la sonrisa correctas para encaminar mis pasos. Por ser esa musa que inspira poniendo el ejemplo de esfuerzo, trabajo, corazón noble y perseverancia. No sabes cuánto he aprendido de ti.

Al Dr Bargas, porque además de ser un gran tutor, siempre lograba transmitir esa pasión y gusto por la ciencia que pocas personas logran. Uno aprendía algo nuevo con cada plática que tuviera y era un placer platicar en su oficina. Gracias Dr, nunca olvidaré el apoyo académico y humano que me dio en mis momentos más difíciles.

A los miembros de mi comité tutorial: al Dr Gómora y al Dr Jesús, que siempre me apoyaron con sus comentarios y observaciones.

A mis senseis, el Dr Omar Hernández por sus enseñanzas y sobre todo a la Dra Teresa Hernández, de la cual no he dejado nunca de aprender y aprecio con todo mi ser. Espero volvernos a reencontrar.

A Veck y Aldo, los disociados y a Vladimir y Mario por tantos años de amistad y trabajo.

A mis compañeros del laboratorio BL-103 y BL-101, particularmente a Miguel, Chucho, Duhne y Alejandra.

A mis compañeras del instituto, Tzitzí, por los consejos, buenas vibras y tantas pláticas filosóficas, literarias y sobre todo, las biológicas. A Arleth, por esas pláticas en su cubículo sobre la vida y otras cuestiones.

A Belén, porque siempre tenía una contagiosa sonrisa en el rostro y alumbraba todo rincón con ella.

A Oscar, mi mejor amigo. Porque siempre confió en mí y que iba a lograr esto y más. Desde su trinchera siempre apoyando y animando. Amistades sinceras hay muy pocas.

A Silvia, por todo y más.

## INDICE

1.	RESUMEN.....	7
1.	ABSTRACT .....	8
2.	INTRODUCCIÓN.....	9
2.1.	Los ganglios basales .....	9
2.2.	El microcircuito estriatal.....	9
2.2.1.	Las neuronas espinosas medianas.....	9
2.2.2.	Las interneuronas estriatales: orquestadoras de la actividad estriatal. ....	11
2.3.	Interneuronas Fast Spiking.....	12
2.3.1.	Características electrofisiológicas.....	13
2.3.2.	Conectividad aferente y eferente.....	14
2.4.	Los moduladores de la actividad estriatal.....	15
2.4.1.	La dopamina.....	15
2.4.2.	Otros neuromoduladores estriatales.....	16
2.5.	Canales de Ca <sup>2+</sup> .....	16
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4.	METODOLOGÍA.....	19
4.1.	Sujetos experimentales .....	19
4.2.	Preparación de neuronas disociadas y rebanadas de cerebro.....	20
4.3.	Registros de fijación de voltaje de corrientes de calcio .....	21
4.4.	Registros de fijación de corriente en rebanadas de cerebro.....	22
4.5.	Registros de imagenología de calcio .....	23
4.6.	Inmunofluorescencia .....	23
4.7.	Fármacos.....	24
4.8.	Análisis de datos .....	24
4.9.	Contribución de cada tipo de canal de Ca <sup>2+</sup> a la corriente global de Ca <sup>2+</sup> .....	25
5.	RESULTADOS .....	26

5.1.	Canales de $Ca^{2+}$ expresados en las interneuronas FSI .....	28
5.2.	La activación del receptor de DA D1 aumenta las corrientes de $Ca^{2+}$ en las FSI disociadas	31
5.3.	El receptor tipo D1 aumenta las corrientes de $Ca^{2+}$ tipo Cav1.....	32
5.4.	Los receptores D1 aumentan la frecuencia de disparo al modular los canales Cav1 en las FSI.....	34
5.5.	La activación de los receptores D1 facilita la actividad de las FSI en el microcircuito estriatal dorsal. ....	36
6.	DISCUSIÓN.....	38
6.1.	Canales de $Ca^{2+}$ expresados en las interneuronas FSI .....	38
6.2.	Acciones dopaminérgicas sobre las corrientes de $Ca^{2+}$ en las FSI estriatales.	40
7.	REFERENCIAS .....	42

# 1. RESUMEN

Las interneuronas fast spiking (FSI) son un grupo de interneuronas GABAérgicas que proveen una importante inhibición de tipo “feed-forward” hacia las neuronas estriatales y expresan la proteína queladora de calcio, parvalbúmina (PV). Estas reciben inervación cortical y talámica, además de estar acopladas por sinapsis químicas y eléctricas entre ellas, volviéndose elementos críticos en el procesamiento estriatal. Es sabido que la dopamina (DA) despolariza a estas interneuronas a través de receptores clase D<sub>1</sub>, sin embargo, a la fecha no hay ningún estudio acerca del efector molecular final de este fenómeno. Uno de los posibles candidatos son los canales de Ca<sup>2+</sup>, sin embargo, ningún estudio ha determinado la presencia de estos canales en interneuronas FSI ni sobre los efectos de la DA sobre ellos. El objetivo de este estudio es entonces determinar la presencia de los canales de Ca<sup>2+</sup> en las FSI y las acciones de la DA sobre ellos. Para determinar esto, realizamos registros de fijación de voltaje en célula entera de FSI disociadas agudamente en ratones transgénicos PV-Cre. Fueron identificados los canales de Ca<sup>2+</sup> presentes en el soma de las FSI: Cav1, Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3 and Cav3, siendo el canal Cav1 el que más aporta a la corriente global de Ca<sup>2+</sup>. Utilizando el agonista selectivo de los receptores dopaminérgicos de la clase D<sub>1</sub>, SKF – 81297 (SKF), se encontró que la activación de este receptor provoca un aumento en las corrientes de Ca<sup>2+</sup>. El bloqueo del canal Cav1 suprimió los efectos de la DA sobre las corrientes de Ca<sup>2+</sup>, sugiriendo que éste es el único canal de Ca<sup>2+</sup> que es modulado por la DA. En rebanadas de cerebro, la aplicación de SKF provoca un aumento en la frecuencia de disparo y de la rheobase. En experimentos de imagenología de Ca<sup>2+</sup> se mostró que la activación del receptor D<sub>1</sub> provoca el aumento en la actividad de las FSI en el microcircuito estriatal. El bloqueo de los Cav1 con nifedipina disminuyó el aumento de la actividad provocada por el SKF aunque ésta no llegó a niveles del control. Se concluye que la activación del receptor D<sub>1</sub> en las FSI provoca un aumento en las corrientes de Ca<sup>2+</sup> Cav1, y que estas corrientes contribuyen al aumento en la actividad de estas interneuronas.



# 1. ABSTRACT

Striatal fast-spiking interneurons (FSI) are a subset of GABAergic cells that express the calcium-binding protein, parvalbumin (PV). They provide feed-forward inhibition to striatal projection neurons (SPNs), receive cortical, thalamic and dopaminergic inputs and are coupled together by electrical and chemical synapses, thus functioning as important components of the striatal circuitry. It is known that dopamine (DA) depolarizes FSI via D<sub>1</sub>-class DA receptors. However, no studies about the molecular effectors underlying these actions have been defined. Hence, in this study, we set to determine the nature of the ion channels involved in DA's actions by studying Ca<sup>2+</sup> currents.

Whole-cell recordings in acutely dissociated and identified FSI from PV-Cre transgenic mice were used to show that FSI express an array of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel classes: Cav1, Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3 and Cav3. However, the Cav1 Ca<sup>2+</sup> channel was shown to carry most of the Ca<sup>2+</sup> currents in FSI. Activation of a D<sub>1</sub>-like class of DA receptors by the D<sub>1</sub>-receptor selective agonist SKF-81297 (SKF) enhanced whole-cell Ca<sup>2+</sup> currents through Cav1 channel modulation. Our study shows that previous block of Cav1 channels with nifedipine occludes the actions of SKF, suggesting that no other Ca<sup>2+</sup> channel is modulated by D<sub>1</sub>-receptor activation. Bath application of SKF to brain slices increased the firing rate and activity of FSI, as measured with both whole-cell and Ca<sup>2+</sup> imaging recordings. These actions were reduced by nifedipine. In conclusion, our study highlights the role of Cav1 Ca<sup>2+</sup> channels in DA modulation of FSI. Under this scheme, the facilitatory actions of DA on FSI are partly due to positive modulation of Cav1 Ca<sup>2+</sup> channels.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Los ganglios basales

Los ganglios basales (GBs) son un grupo de núcleos subcorticales involucrados en el procesamiento motor, funciones cognitivas, emocionales, selección de acciones y toma de decisiones. Forman una red que integra la información proveniente de la corteza, del tálamo y del tallo cerebral (Bolam *et al.*, 2000; Lévesque *et al.*, 2003). Este grupo de núcleos actúan como interfase entre el sistema motor y el sistema límbico (Smith *et al.*, 1998). En cuanto al sistema motor, los núcleos considerados controladores de comandos motores son: el neoestriado o caudado-putamen (NSt), el globo pálido externo (GPe), el núcleo subtalámico (NST), el globo pálido interno (GPI), la sustancia nigra *pars reticulata* (SNr) y la sustancia nigra *pars compacta* (SNc) (Bolam *et al.*, 2000, Wichmann y DeLong, 2003). De acuerdo con los modelos computacionales, se puede categorizar a los GBs como dos subsistemas relacionados. Primero, el eje principal que corresponde a las estructuras que codifican la información del tálamo y corteza a los centros motores. Segundo, los moduladores que ajustan la actividad de los GBs y modulan el flujo de información corticoestriatal como la acetilcolina o la dopamina (Deffains *et al.*, 2016).

El neoestriado es el más grande y principal núcleo de entrada de los ganglios basales. Este procesa las entradas aferentes de la corteza y del tálamo e integra esa información junto con la modulación de diversos neuromoduladores para comandar el comportamiento motor (Parent & Hazrati, 1995).

### 2.2. El microcircuito estriatal.

#### 2.2.1. Las neuronas espinosas medianas.

La actividad del núcleo estriado se procesa a través de microcircuitos conformados por neuronas espinosas medianas (NEM) y diversos tipos de interneuronas (Pérez-Ortega *et al.*, 2016; Tepper *et al.*, 2018). Las NEM conforman

el 95 % de la población estriatal. Estas neuronas GABAérgicas procesan las entradas sinápticas corticales, talámicas y de otros núcleos de los GB hacia los núcleos de salida a través de, entre otras, dos vías principales: la vía directa y la vía indirecta (Smith *et al.*, 1998; Kravitz, *et al.*, 2010). Las neuronas de la vía directa expresan el receptor a dopamina (DA) clase D1 (tipos D1 y D5) y, junto con el ácido gamma aminobutírico (GABA), co-expresan y co-liberan sustancia P y dinorfina. Esta subpoblación neuronal proyecta sus axones directamente hacia los núcleos de salida: el GPi y la SNr (Gerfen, *et al.*, 1990; Surmeier *et al.*, 1995; Hernandez-Lopez *et al.*, 1997). Las neuronas de la vía indirecta expresan el receptor a DA clase D2 (tipos D2, D3 y D4) y además del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), co-expresan y co-liberan encefalinas; asimismo proyectan al GPe (Hernandez-Lopez *et al.*, 2000). Debido a que no proyectan directamente a los núcleos de salida, se les denomina neuronas de la “vía indirecta”, pues subsecuentes relevos sinápticos adicionales son necesarios para llegar al GPi y a la SNr (Gerfen *et al.*, 1990, Smith, *et al.*, 1998; Kravitz, *et al.*, 2010; Tepper *et al.*, 2010; Tepper, *et al.*, 2018).

La actividad global y sostenida de cada una de las vías muestra efectos contrarios en el organismo (Kravitz, *et al.*, 2010, 2012): cuando la vía directa es activada, las NEM de esta vía (dNEM) inhiben a los núcleos de salida (GPi/SNr) que disminuyen su disparo tónico. Esto provoca una desinhibición de los circuitos tálamo-corticales que controlan los movimientos voluntarios o dirigidos a un objetivo, y se activan los circuitos del puente y del tallo cerebral que controlan el tono muscular y la actividad de los centros generadores de pautas. La vía directa, por lo tanto, genera el movimiento. Por otro lado, cuando se activan las neuronas de la vía indirecta (iNEM), éstas inhiben a las neuronas tónicas del GPe. Al inhibir este núcleo, el NST es liberado de esa inhibición, provocando una excitación del GPi y del SNr. Por lo tanto, se inhiben los circuitos tálamo-corticales que controlan los movimientos voluntarios y dirigidos. También son inhibidas las neuronas de tallo cerebral, circuitos del puente y la actividad de los centros generadores de pautas, provocando el cese de los movimientos (Smith, *et al.*, 1998; Kravitz, *et al.*, 2010, 2012; Takakusaki, *et al.*, 2004). Aunque este modelo se considera predominante en el campo, también se ha propuesto que la manera en la que se genera el movimiento

es a través de un fino balance entre ambas vías (Tecuapetla *et al.*, 2014). Este último modelo sugiere que la actividad conjunta y en coordinación de estas dos vías es necesaria para la correcta ejecución, selección e iniciación de los movimientos (Cui *et al.*, 2013; Tecuapetla *et al.*, 2014).

### 2.2.2. Las interneuronas estriatales: orquestadoras de la actividad estriatal.

Como se comentó anteriormente, las NEM comprenden alrededor del 95% de la población neuronal, el otro 5 % lo componen una variedad de interneuronas, en las que se encuentran las gigantes colinérgicas (0.5 ~ 1%) y una variedad de neuronas GABAérgicas (3 ~ 4 %) (Tepper *et al.*, 2010b, 2018). Las interneuronas, a pesar de ser escasas en números en comparación con las NEM, juegan un papel esencial en la función estriatal. De entre todas las interneuronas, las más estudiadas son las colinérgicas, NPY y fast spiking (FSI). Las interneuronas colinérgicas (ChAT) representan el único tipo no GABAérgico de interneurona estriatal. Se piensa que juegan un papel fundamental en el circuito de recompensa y en la modulación en general, ya que reciben inervación de corteza, tálamo y GPe, además de entradas dopaminérgicas provenientes de la SNc (Aosaki, *et al.*, 1994; Klug *et al.*, 2018; Tepper & Bolam, 2004). Las ChAT ejercen el control nicotínico y muscarínico sobre diversas interneuronas estriatales, aunque las NEM sólo expresan receptores muscarínicos, a pesar de lo cual, se sabe que juegan un papel fundamental en la respuesta sináptica de las NEM ajustando su excitabilidad (Pérez-Ramírez *et al.*, 2015). Las ChAT son neuronas tónicas, que liberan acetilcolina en ausencia de entradas sinápticas, por lo tanto, proveen una liberación constante de acetilcolina que contribuye a mantener las propiedades de toda la red estriatal en reposo y en activo. Además, hacen sinapsis con otro tipo de interneuronas GABAérgicas, modulando así a toda la red estriatal (Tepper & Bolam, 2004; Elghaba *et al.*, 2016; Faust *et al.*, 2016; Owen, *et al.*, 2018). Otro tipo de interneurona, en este caso GABAérgica, expresa los péptidos neuropéptido Y (NPY), somatostatina y óxido nítrico sintasa. Esta clase de interneurona tiene 3 subclases. Una tipo FSI, otra de adaptadoras rápidas (FAI) y otra caracterizada por presentar espigas de calcio de

bajo umbral (low threshold spikes (LTS)), o un plateau de calcio prolongado (Munoz-Manchado et al., 2014; Tepper & Bolam, 2004). Estas interneuronas proveen inhibición hacia las NEM y otras interneuronas y reciben entradas desde la corteza y el tálamo (Arias-García et al., 2018). Las interneuronas ChAT proveen modulación sobre ellas. Cabe señalar que, cuando son desprovistas de DA, estas neuronas cambian su tipo de disparo a uno oscilatorio, haciéndolas potencialmente importantes en patologías como PD (Tepper & Bolam, 2004; Elghaba et al., 2016; Faust et al., 2016).

El tipo de interneuronas que abordamos en este trabajo de tesis son las de disparo rápido o fast spiking (FSI), las cuales se definirán con más detalle en la siguiente sección.

### 2.3. Interneuronas Fast Spiking.

Las FSI son una subpoblación de interneuronas GABAérgicas que se caracterizan por poder disparar a frecuencias muy altas, además de contener diversos marcadores moleculares necesarios para establecer su correcto funcionamiento: 1) el quelante de calcio parvalbúmina (PV), que se cree ayuda en el fino control del disparo neuronal y de las ráfagas (Orduz et al., 2013), 2) la enzima GAD-67 sintetizadora de GABA y 3) la expresión del canal de potasio Kv3.1 de la familia *Shaw*, también necesario para el control del disparo y para alcanzar frecuencias altas (Lenz et al., 1994; Kawaguchi et al., 1995; Monyer & Markram, 2004; Plotkin et al., 2005). La inhibición provista por estas interneuronas es esencial para la correcta función estriatal, ya que están asociadas a la integración de ensambles neuronales, cognición, aprendizaje de procedimiento, desarrollo motor y adicciones (Koós & Tepper, 1999; Ramanathan et al., 2002; Sohal et al., 2009; Tepper et al., 2010; Berke, 2011; Pérez-Ortega et al., 2016; Xu, et al., 2016; Yamada et al., 2016; Owen et al., 2018). Están distribuidas en diferentes núcleos como en la corteza, el hipocampo y el estriado (Tepper, et al., 2004). La mayoría son de tamaño mayor, comparado con las NEM (Tepper et al., 2010). Sus dendritas se extienden en un diámetro de hasta 200 – 300  $\mu\text{m}$  desde el soma. Su axón es ramificado y denso. En las dendritas, las FSI tienen uniones comunicantes dendro-dendríticas,

las cuales pueden coordinar el disparo de muchas de ellas y controlar de manera más específica a las NEMs (Russo, et al., 2013).

Además de su rol fundamental en el funcionamiento del microcircuito estriatal, las FSI están relacionadas con diversas enfermedades mentales, tales como el desorden del espectro autista (ASD, por sus siglas en inglés) o el síndrome de Tourette (Rapanelli, et al., 2017). Individuos con el síndrome de Tourette tienen de 50-60% menor cantidad de interneuronas PV+ y ChAT+ que individuos normales (Kalanithi, et al., 2005; Katakoa, et al., 2010). Por otro lado, se ha descrito que eliminar selectivamente ~50% de estas interneuronas, produce un comportamiento estereotipado de ansiedad y déficit social muy marcado en ratas macho (Rapanelli, et al., 2017).

### 2.3.1. Características electrofisiológicas.

Las FSI son fácilmente reconocibles por sus características electrofisiológicas. La mayoría es silente en reposo y presentan un potencial muy hiperpolarizado ( $< -70$  mV); disparan ráfagas de potenciales de acción (menores a 0.5 ms) a frecuencias que pueden alcanzar hasta 400 Hz con inyecciones de corriente, además de presentar muy poca adaptación. Presentan también potenciales hiperpolarizantes amplios, una baja resistencia de entrada, una relación corriente-voltaje relativamente lineal y rectificación antes pulsos hiperpolarizantes de corriente (Kawaguchi, *et al.*, 1995; Koós y Tepper, 1999, 2002; Bracci, et al., 2003; Tepper, et al., 2010). Otra característica es que estas neuronas presentan oscilaciones sub-umbrales de membrana en los periodos de reposo, entre las ráfagas de disparos, cuando son despolarizadas hasta los -50 mV. Estas oscilaciones son independientes de  $Ca^{2+}$ , pero son abolidas en presencia de tetrodotoxina (TTX), indicando que algunas conductancias de  $Na^{+}$  son necesarias para su generación (Bracci, et al., 2003). Entre otros canales, la presencia del canal  $Kv3$  ayuda a repolarizar rápidamente al potencial de acción y alcanzar y mantener las altas frecuencias de disparo (Erisir *et al.*, 1999).

### 2.3.2. Conectividad aferente y eferente.

Uno de los principales blancos de estas interneuronas FSI son las NEMs. Sus botones sinápticos rodean a las NEMs a manera de cestas en el soma y a lo largo de las dendritas proximales y, de esta manera, proveen una importante y poderosa acción inhibitoria. Con un solo disparo, las FSI son capaces de retrasar o incluso inhibir la generación de potenciales de acción de las NEMs de ambas vías (Bennett & Bolam, 1994; Koós & Tepper, 1999; Ramanathan *et al.*, 2002; Gittis *et al.*, 2010; Tepper *et al.*, 2010; Klaus *et al.*, 2011; Szydlowski *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha encontrado que las FSI no proyectan a interneuronas ChAT o LTS, únicamente a las NEM y a ellas mismas (Szydlowski *et al.*, 2013; Straub, *et al.*, 2016). Sin embargo, entre ellas, las FSI están conectadas por uniones comunicantes, por lo que se cree que pueden sincronizarse ante eventos específicos o suprimir la actividad de las FSI en la red al remover disparos asincrónicos. También se cree que puedan funcionar como filtros ante distintas frecuencias (Zhang *et al.*, 2014) delineando el tamaño de los ensambles neuronales (Owen *et al.*, 2018).

La corteza cingulada, motora primaria y secundaria y la corteza somatosensorial son las principales innervaciones corticales a las FSI estriatales (Klug *et al.*, 2018). Inervan directamente en el pericarión y las dendritas a través de sinapsis asimétricas (Bennett & Bolam, 1994; Ramanathan *et al.*, 2002; Tepper *et al.*, 2010). Esta propiedad provee un mecanismo de inhibición feed-forward, incrementando la selectividad de las respuestas de las NEMs a entradas corticales, así como en el procesamiento de la información corticoestriatal (Fino & Venance, 2010; Tritsch & Sabatini, 2012; Klug *et al.*, 2018). Además de la corteza, el tálamo también proyecta hacia estas interneuronas. Los núcleos parafasciculares y el núcleo reticular talámico son los núcleos talámicos con mayores entradas a las FSI (Assous *et al.*, 2017; Klug *et al.*, 2018; Arias-García *et al.*, 2018). De entre los GB, el GPe es el único que proyecta a las FSI estriatales, provocando IPCS robustos cuando se estimulan la vía palidoestriatal (Klug *et al.*, 2018). Todos estos datos sumados muestran que las FSI están implicadas en la integración sensorial y motora

proveniente del tálamo, corteza y GPe. Es posible pensar que la información talámica y cortical es integrada por estas interneuronas y transmitida a las NEM a través de inhibición de grupos de NEM o bien al sincronizar diferentes grupos de ellas (Owen et al., 2018).

## 2.4. Los moduladores de la actividad estriatal.

### 2.4.1. La dopamina

La DA es una de las catecolaminas más abundantes de todo el cerebro. La importancia de esta molécula radica en la enorme cantidad de procesos que modula. Tanto en sistema periférico como en el sistema nervioso central, la DA ejerce sus acciones a través de 5 receptores: D1, D2, D3, D4, D5 codificados en el humano por los genes *DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4* y *DRD5*, respectivamente (Vallone et al., 2000). Las acciones de la DA en el organismo son variadas y extensas, ya que participa en: el movimiento voluntario, la regulación del sueño, la regulación hormonal, la regulación simpática así como en la visión, el olfato, el afecto, la atención, la memoria, la recompensa, la alimentación, etc. (Beaulieu, et al., 2014). Todos los receptores a DA (DAR) son miembros de la familia de receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G, los cuales se pueden subdividir en receptores clase D1, acoplados a una proteína G tipo s/olf o de clase D2, asociados a una proteína G tipo i/o. La estimulación canónica de los D1R en las NEM activa la adenilato ciclasa (AC) que incrementa la concentración de cAMP intracelular. Este aumento estimula a la proteína cinasa A (PKA) que fosforila canales de  $Ca^{2+}$  de la subfamilia Cav1, aumentando la excitabilidad (Galarraga et al., 1997; Hernandez-Lopez et al., 1997). Por otro lado, los D2R inhiben a la AC, disminuyendo la cantidad de cAMP intracelular (Missale et al., 1998). En las NEM, los D2R también activan a la fosfolipasa C (PLC). Ésta inicia una cascada de señalización que termina con la activación de la proteína fosfatasa 2B (PP-2B) que desfosforila canales de  $Ca^{2+}$  tipo Cav1 y, por lo tanto, se reduce la excitabilidad neuronal (Hernandez-Lopez et al., 2000). En el caso de las ChAT, la DA modula las corrientes de calcio al regular las propiedades de disparo así como el curso temporal y forma de los potenciales de acción (Bennett et al., 2000). Por su



parte, las FSI estriatales expresan los receptores a DA de tipo D5 (clase D1) (Bracci, *et al.*, 2002). La activación de estos receptores provoca una despolarización acompañada de potenciales de acción en el estriado (Bracci, *et al.*, 2002; Centonze, *et al.*, 2002), corteza prefrontal (Gorelova *et al.*, 2002; Kröner *et al.*, 2007) y en la amígdala (Kröner *et al.*, 2006). En la presinápsis inhibe la liberación de GABA a través de la activación de los receptores D2 (Bracci, *et al.*, 2002) y la aumenta a través de receptores D1 (Nava-Asbell, *et al.*, 2007; Cruz-Trujillo, *et al.*, 2013; Briones-Lizardi, *et al.*, 2019).

#### 2.4.2. Otros neuromoduladores estriatales.

Las FSI son igualmente moduladas por la acetilcolina (ACh). La aplicación de ACh reduce los IPSPs de las FSI sobre las NEM a través de la activación de receptores muscarínicos. Por otro lado, se encontró que la ACh produce una excitación sobre las FSI a través de la activación de los receptores nicotínicos. Esta excitación es suficiente para provocar potenciales de acción (PA) en FSI previamente silentes y es independiente de receptores de glutamato, ya que los bloqueadores de los mismos no provocan disminución en la respuesta (Koos & Tepper, 2002).

### 2.5. Canales de $\text{Ca}^{2+}$

Los canales de calcio activados por voltaje (VGCC por sus siglas en inglés) son canales que responden a una despolarización de la membrana, abriéndose y permitiendo el paso de cationes al interior de la célula. Se han identificado 5 grandes familias de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que se pueden agrupar en dos categorías: los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral (HVA por sus siglas en inglés) y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de bajo umbral (LVA) (Catteral, 2011; Simms & Zamponi, 2014; Nanou & Catteral, 2018). Todos los HVA tienen características en común: Se activan a potenciales relativamente despolarizados (alrededor de 0 ~ 10 mV, dependiendo el tipo celular); tienen una alta selectividad a  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones fisiológicas; son permeables no solo a  $\text{Ca}^{2+}$ , sino también a  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ ; presentan el fenómeno de fracción molar anómala; son bloqueados por  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  y se vuelven permeables a  $\text{Na}^+$  si no hay

$\text{Ca}^{2+}$  presente (Nowycky, et al., 1985; Catterall, et al., 2005; Catterall, 2011; Shuba, 2014). La principal característica de los canales LVA es su capacidad de activarse a potenciales relativamente hiperpolarizados (cerca del potencial de reposo), recuperarse rápidamente de la inactivación y cerrarse lentamente produciendo prominentes colas de corriente (Nowycky, et al., 1985; Pérez-Reyez, 2003). Asimismo a través de la generación de picos de bajo umbral, pueden llevar a la generación de ráfagas y oscilaciones (Pérez-Reyes, 2003). Los canales HVA están formados por 3 subunidades: la subunidad  $\alpha$  formadora del poro, y las subunidades  $\beta$  y  $\delta$  de anclaje, estos incluyen a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  Cav1, Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3. Los canales LVA constituyen a los canales Cav3 y aparentan faltar de subunidades (Catterall, et al., 2005). Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo Cav1 se distinguen por tener una inactivación lenta, una activación a potenciales relativamente despolarizados y ser sensibles a dihidropiridinas (también llamados tipo L de “long-lasting currents”) (Catterall, et al., 2011). Por su parte, los canales Cav3 se activan a potenciales mucho más hiperpolarizados (alrededor de -60 ~ -50 mV en neuronas), se inactivan rápidamente y tienen una lenta desactivación (denominados tipo T por “transient” o “Tiny”) (Nowycky, et al., 1985; Pérez-Reyez, 2003; Shuba, 2014). Los canales Cav2.2 o tipo-N (por “non-L, nor-T” o “neuronal”) fueron inicialmente distinguidos de los Cav1 y Cav3 por su dependencia de voltaje intermedia, no tan hiperpolarizada como los Cav3, ni tan despolarizada como los Cav1. Son sensibles a  $\omega$ -conotoxina GVIA. Los canales Cav2.1 fueron registrados por primera vez en neuronas de Purkinje (tipo P de Purkinje) y se distinguen por tener sensibilidad a la toxina  $\omega$ -agatoxina IVA (Catterall, 2011). Otros canales con afinidad menor a la toxina  $\omega$ -agatoxina IVA fueron identificados (tipo Q), sin embargo, ya que se originan por splicing alternativo de los canales tipo P, la clasificación es conjunta (canales tipo P/Q) (Bourinet et al. 1999). Los canales Cav2.3 son insensibles a la mayoría de los péptidos bloqueadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , sólo son sensibles al SNX-482 de la tarántula *Hysterocrates gigas* (Newcomb, et al., 1998).

Cada uno de los canales juega un papel primordial en el la fisiología de la neurona. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inicia una cascada de respuestas fisiológicas que

dependiendo del tipo de célula y canal de  $\text{Ca}^{2+}$  que se trate, promoverá diferentes respuestas (Catterall, 2011). Por ejemplo, en las células del músculo cardiaco la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales  $\text{Cav}1$ , promueve la contracción y relajación al modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Bers, 2002). En neuronas espinosas medianas el bloqueo del canal  $\text{Cav}1$  provoca una disminución en la frecuencia de disparo y un colapso en la curva IF (Pérez-Garcí, et al., 2003). Este canal por tanto modula directamente la frecuencia de las neuronas. En el caso de los canales  $\text{Cav}2.1$  y  $\text{Cav}2.2$  se ha encontrado que modulan la liberación de neurotransmisores en el hipocampo (Wheeler, et al., 1994; Simms & Zamponi, 2014), en sinapsis corticoestriatales (Bargas, et al., 1998) y en interneuronas FSI corticales (Zaitsev, et al., 2007). En el estriado se ha observado que estos canales modulan la frecuencia, ya que al bloquearlos se da un aumento en la frecuencia de disparo (Pérez-Garcí, et al., 2003). A los canales  $\text{Cav}3$  se han asociado con el disparo en marcapasos, la generación de ráfagas y disparos repetitivos (Pérez-Reyez, 2003; Catterall, et al., 2011; Shuba, 2014). Por último, a los canales  $\text{Cav}2.3$  (Tipo R de “residual”) se les ha asociado con liberación de neurotransmisores y corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en dendritas (Catterall, 2011). Como se observa, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen un papel fundamental en el correcto funcionamiento de las neuronas. Entender su funcionamiento, así como identificar las neuronas que los expresan y la corriente relativa de cada uno, conlleva a un mejor entendimiento del microcircuito neuronal, así como el posible desarrollo de fármacos que actúen sobre estos canales, como los antiepilépticos (Rajakulendran & Hanna, 2016; Shi, et al., 2016).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia de las interneuronas FSI en el microcircuito estriatal y en diversas enfermedades, es vital. Por ende, es necesario entender la manera en la que son moduladas así como la manera en la que influyen en la dinámica del estriado. De aquí se deriva que conocer los tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que expresan, así como el blanco molecular de la modulación dopaminérgica, ayudará a entender mejor la dinámica de estas interneuronas en condiciones fisiológicas y patológicas.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Sujetos experimentales

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las normas técnicas y de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), de la guía del Instituto Nacional de Salud (NIH por sus siglas en inglés, NIH Publication No. 8023, revisado en 1978) y del comité de bioética del Instituto de Fisiología Celular (UNAM, FTA03-14). Se utilizaron ratones de la línea B6;12P2-*Pvalb<sup>tm1(cre)Arbr</sup>/J* (PV-Cre; Silvia Arber, Friederich Miescher Institute; Jackson Labs, stock # 008069) denominados ratones PV+, para fines de simplificación. Los sujetos experimentales fueron alojados en cajas (4-5 ratones por caja) y mantenidos durante un periodo de Luz/Oscuridad de 12:12 horas con una temperatura de 20 – 21°C. Todos los animales tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*. Con el fin de identificar a las interneuronas PV+, los ratones transgénicos PV-Cre (postnatal 21) fueron anestesiados i.p. con una mezcla de ketamina (Bayer, 75 mg/kg) y xilacina (Bayer, 10 mg/kg) y con el uso de un estereotáxico (coordenadas relativas a bregma: anteroposterior: +0.9, lateral:  $\pm$  2.8 y ventral 5.8) se les inyectó intraestriatalmente alguno de los siguientes constructos virales (Universidad de Pennsylvania Vector Core): AAV2/1.CAG.Flex.tdTomato.WPRE.Bgh (Honguki Zeng) se usó para identificar las neuronas PV+ durante los registros de célula completa en neuronas disociadas agudamente. El constructo AAV1.Syn.Flex.GCaMP6f.WPRE.SV40 (Chen *et al.*, 2013) se usó para los registros de imagenología de calcio y el constructo AAV1.CAG.Flex.eGFP.WPRE.bGH (Allen institute) para los registros electrofisiológicos de fijación de corriente en rebanadas de cerebro. Las coordenadas relativas a bregma fueron las siguientes: AP=0.9, ML =  $\pm$  1.2, DV = -3. El volumen total de virus inyectado fue de 0.8  $\mu$ l por un periodo de 10 minutos (Figura 1A). Los animales fueron monitoreados por dos semanas para asegurar su completa recuperación y expresión de la proteína fluorescente (Figura 1B).

## 4.2. Preparación de neuronas disociadas y rebanadas de cerebro

Las rebanadas de cerebro y las neuronas agudamente disociadas fueron obtenidas y registradas como se describe en trabajos anteriores (Bargas *et al.*, 1994; Perez-Burgos *et al.*, 2008, 2010; Hernández-González *et al.*, 2014). Brevemente, los ratones PV-Cre fueron anestesiados con una mezcla de xilacina (15 mg/kg i.p. Rompun, Bayer) y ketamina (85 mg/kg i.p. Anesket) para ser decapitados. Sus cerebros fueron removidos y sumergidos en una solución salina que contenía (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 11 glucosa, 0.2 tiourea y 0.2 de ácido ascórbico (25°C; pH: 7.4 con HCl, 300 ± 5 mOsm/l con glucosa y saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Utilizando un vibratomo (1000 Classic, Warner Instruments, Hamden, USA) se obtuvieron rebanadas sagitales de 300 µm de grosor, las cuales fueron transferidas a la misma solución salina por 1 hora a 34°C. Cuando los registros fueron hechos en rebanadas de cerebro, fueron transferidas a una cámara y perfundidas a 5 ml/min con solución salina saturada con 95% de O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Cuando los registros fueron hechos en neuronas disociadas, el estriado dorsal fue disectado de las rebanadas y puesto en una solución salina que contenía: 10 mM de HEPES y 0.5 mg/ml de papaína (*Carica papaya*) (Calbiochem, Cat # 5125. San Diego. Ca) a 34°C. Después de 20 – 25 minutos de digestión enzimática, los estriados fueron transferidos a una solución salina con bajo calcio (0.4 mM CaCl<sub>2</sub>). Las neuronas disociadas se obtuvieron mecánicamente con el uso de pipetas Pasteur de diferente diámetro. El sobrenadante (1 ml) fue puesto sobre una caja de Petri, el cual fue montado en un microscopio invertido (Nikon Instruments, Melville, NY, 20x/0.4 NA). Se permitió la adhesión de las células a la base de la caja de Petri durante 10 a 15. La caja de Petri contenía: 1 ml de solución salina de registro (en mM): 0.001 tetrodotoxina (TTX), 140 NaCl, 3 KCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 10 de glucosa (pH: 7.4 con NaOH; 300 ± 5 mOsm/l con glucosa). Las neuronas tdTomato positivas fueron visualizadas con una lámpara UV (X-Cite; EXFO, Ontario, Canada).

### 4.3. Registros de fijación de voltaje de corrientes de calcio

Los registros de fijación de voltaje fueron realizados en interneuronas estriatales PV+ con un diámetro de 10 – 12  $\mu\text{M}$  y una capacitancia de 6 – 7 pF con pocas o ausentes dendritas (Perez-Burgos *et al.*, 2010; Hernández-González *et al.*, 2014). Las pipetas de cristal de borosilicato para patch clamp (WPI, Sarasota, FL, USA) fueron estiradas con ayuda de un puller (Flaming-Brown, Sutter Instrument Corporation, Novato, CA, USA) y pulidas con una microforja. La solución interna estuvo compuesta de (en mM): 180 N-metil-D-glucamina (NMDG), 40 HEPES, 10 EGTA, 4  $\text{MgCl}_2$ , 2 ATP, 0.4 GTP y 0.1 leupeptina (pH= 7.2 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $280 \pm 5$  mOsm/l; temperatura ambiente de 25 °C). Se utilizaron electrodos con una resistencia de 3–6  $\text{M}\Omega$  en el baño. Los potenciales de unión fueron corregidos antes de los registros. Los registros de las corrientes de calcio fueron obtenidos con un amplificador (Axon Instruments, Foster City, CA, USA, modelo 144a), controlados y registrados con pClamp (versión 8.2, RRID: rid\_000085) y una interfaz DMA a 125 kHz (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Las corrientes registradas corresponden a iones  $\text{Ba}^{2+}$  fluyendo a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , como se ha descrito en artículos previos (Bargas *et al.*, 1994; Perez-Burgos *et al.*, 2010; Hernández-Flores *et al.*, 2015). El ion  $\text{Ba}^{2+}$ , además de fungir como acarreador de carga, es un potente bloqueador de los canales de  $\text{K}^+$ . El  $\text{K}^+$  intracelular fue reemplazado por 180 mM de NMDG. Las corrientes de  $\text{Na}^+$  fueron bloqueadas con 1  $\mu\text{M}$  de TTX. Las corrientes aisladas de esta manera fueron bloqueadas completamente con 200 mM de  $\text{Cd}^{2+}$  (fig. 1 F) mostrando que son corrientes a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por simplicidad, nos referiremos a estas corrientes como corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . La relación corriente-voltaje o curva IV, fue generada antes y después de cada fármaco. La figura 1C muestra una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  evocada por comandos rectangulares de voltaje de -80 a -50 mV de 200 ms, con pasos de 10 mV de manera creciente. La figura 1D muestra una respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  representativa a una rampa de voltaje (0.7 mV/ms) desde -80 a 50 mV. Cuando coinciden ambos protocolos, es de suponer que las técnicas son complementarias

y que existe un control espacial aceptable del voltaje (Fig. 1F). Por claridad, sólo se mostrarán corrientes provocadas por rampas de voltaje.

#### 4.4. Registros de fijación de corriente en rebanadas de cerebro

Los registros obtenidos bajo fijación de corriente fueron realizados con la variante de célula entera en interneuronas PV+ identificadas de ratones PV-Cre de 14 a 28 días posterior a la inyección del virus. Se obtuvieron rebanadas sagitales de 230 – 300  $\mu\text{M}$  de grosor con ayuda de un vibratomo (1000 Classic, Warner Instruments, Hamden, USA). Las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro con un flujo continuo de solución salina saturada con oxígeno (5 ml/min) a temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ). Las interneuronas estriatales fueron identificadas utilizando iluminación de epifluorescencia, visualizadas con videomicroscopía de contraste de interferencia infraroja con un objetivo de inmersión de 40X (0.8 NA; Nikon Instruments, Melville, NY). Las micropipetas de registro de borosilicato (WPI, Sarasota, FL, USA) con diámetro externo de 1.5 mm, fueron pulidas con una microforja (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) a una resistencia final de 4 – 6  $\text{M}\Omega$ . Se llenaron con solución interna (en mM): 120  $\text{KSO}_3\text{CH}_4$ , 10 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 0.5  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 2 ATP-Mg, and 0.3 GTP-Na (pH=7.3, 290 mOsm/l). Los registros fueron hechos con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA) y los datos fueron adquiridos con el software diseñado en el laboratorio en el ambiente LabView: Im-Patch©. Las curvas intensidad-frecuencia se generaron utilizando inyecciones de corriente de 25 pA desde un potencial hiperpolarizado hasta llegar al menos a +500 pA en todos los casos. Las relaciones corriente-voltaje fueron hechas en la modalidad de fijación de corriente y superimpuestas a las obtenidas en la modalidad de fijación de voltaje. Ambos registros ajustaron bien, por lo que se sugiere que ni el balance del puente o la resistencia en serie fueron un problema.

Los datos digitalizados fueron importados y analizados en Origin v8, microcal (Northampton, MA), y MatLab (The Mathworks Inc.). Los datos se

representan como medias  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Las pruebas estadísticas utilizadas fueron Wilcoxon de una cola, Friedman y ANOVA de una vía. La prueba *post hoc* utilizada fue la prueba de Dunn.

#### 4.5. Registros de imagenología de calcio

Los registros de imagenología de calcio fueron obtenidos de rebanadas de ratones PV+ que expresaban GCamp6f. Las rebanadas fueron perfundidas continuamente con una solución salina con (en mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaHPO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 0.2 tiourea y 0.2 de ácido ascórbico (25 °C; Ph: 7.4 con HCl, 300  $\pm$  5 mOsm/l con glucosa, saturado con 95% de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>). Se utilizó un microscopio equipado con un objetivo de inmersión en agua de 20 x (0.95 NA XLUMPlanFI, Olympus, Center Valley, PA) con campo visual de 750 x 750  $\mu$ m. Para observar cambios espontáneos en la intensidad de fluorescencia de la GCamp6f, se dieron pulsos de luz a 488 nm (15 – 50 ms de exposición) con un iluminador Lambda LS (Sutter Instruments, Petaluma, CA) conectado al microscopio con una fibra óptica. Secuencias de imágenes o películas (~ 180 s) fueron adquiridos con el software Im-Patch© con intervalos de 5 – 10 minutos durante  $\geq$  60 minutos con una cámara CoolSnap K4 (Photometrics, Tucson, AZ) y cuadros 100 – 250 ms/imagen. La entrada de Ca<sup>2+</sup> fue observada como fluorescencia transitoria somática en interneuronas PV+ en el cual, la primera derivada del transitorio de calcio en el tiempo refleja la actividad eléctrica (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). La actividad de cada célula fue representada como un punto en la gráfica de tipo raster.

#### 4.6. Inmunofluorescencia

Los ratones PV-Cre fueron infectados como se ha descrito previamente (Aras-García, et al., 2018): anestesiados con ketamina (120 mg/kg i.p.) y xilacina (30 mg/kg, i.p.) y perfundidos con una solución de 4% de paraformaldehído en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Posteriormente, los animales fueron decapitados y sus cerebros removidos del cráneo y fijados toda la noche en una solución de 4% de paraformaldehído en PBS. Los cerebros fueron cortados con



un vibratomo en rebanadas de 40  $\mu\text{m}$  e incubadas 30 minutos con 1% de albumina bovina con el fin de bloquear cualquier sitio de unión no específico. Posteriormente se incubaron por 36 horas con un anticuerpo policlonal de conejo contra parvalbúmina (anti PV 1:2000 Abcam) disuelto en PBS con 0.25% de triton-X. Las rebanadas fueron entonces lavadas 3 veces con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario de cabra contra conejo durante una hora (1:200) conjugado con FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las muestras fueron montadas con medio Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y observadas con un microscopio confocal ZEISS LSM 700.

## 4.7. Fármacos

Los fármacos fueron aplicados por un sistema de gravedad. Un tubo de vidrio fue colocado a 100  $\mu\text{m}$  de la neurona de registro en dirección del flujo para aplicar los fármacos. Los cambios de solución fueron realizados con un sistema de microválvulas controladas con un sistema D.C. (Lee; Essex, CT, USA). Este método permitió cambios rápidos en la aplicación de fármacos (Perez-Rosello, 2005; Hernández-González *et al.*, 2014; Hernández-Flores *et al.*, 2015). Para los registros de fijación de corriente, los fármacos fueron administrados en el baño de registro. Las sustancias utilizadas fueron el agonista del receptor de DA tipo D1 SKF 81297 (Cat# S143), el antagonista del receptor D1 SCH 23390 (Cat# 125941-87-9), el antagonista del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  Cav1 nicardipina (Cat# N7510) obtenidos de Sigma-Aldrich-RBI (St Louis, MO, USA); el bloqueador del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  Cav2.2  $\omega$ -conotoxin GVIA (Cat# C-300), el bloqueador del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  Cav3 TTA-P2 (Cat# T-155), el bloqueador del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  Cav2.3 SNX-482 (Cat# RTS-500), el bloqueador de los canales de  $\text{Na}^+$  tetrodotoxina (TTX) (Cat# T-550) de Alomone Laboratories y el bloqueador del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  Cav2.1  $\omega$ -agatoxina TK (Cat# 4294-s) de Peptides International (Louisville, KY, USA).

## 4.8. Análisis de datos

La colección de datos digitalizados fue analizada y graficada utilizando software comercial (Origin v8, Microcal, Northampton, MA, USA; RIDD: rid\_000069).

Reportamos medias  $\pm$  EEM del porcentaje de cambio de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las muestras raramente seguían una distribución normal, por lo que también se reportan medianas y el rango intercuartílico 25 – 75 de las corrientes absolutas. Fueron utilizadas las pruebas de Friedman, Kruskal-Wallis o Wilcoxon con la comparación múltiple de Dunn. El análisis de Friedman y Wilcoxon fueron utilizados cuando se comparaban corrientes o frecuencia en la misma neurona en dos o tres diferentes condiciones (antes, durante y después de la aplicación de algún fármaco). Se utilizó el valor de  $p < 0.05$  como umbral de significancia. El análisis se llevó a cabo en GraphPad Prism 6.01. CA. USA.

#### 4.9. Contribución de cada tipo de canal de $\text{Ca}^{2+}$ a la corriente global de $\text{Ca}^{2+}$ .

La obtención de la contribución de cada tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  a la corriente global ha sido descrita previamente (Vilchis *et al.*, 2002). Brevemente, para estimar la contribución de cada tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , se toma la cantidad de corriente bloqueada por cada uno de los antagonistas: nicardipina,  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -CgTx),  $\omega$ -agatoxina TK ( $\omega$ -AgTx), TTA-P2 (TTA) y SNX-482 (SNX). Esta cantidad de corriente fue definida como la contribución de cada canal a la corriente global normalizada a 100% sin los demás antagonistas. En ocasiones se aplicó más de un antagonista en secuencia y cada vez en diferente orden. Posteriormente los datos fueron incluidos en el siguiente sistema de ecuaciones lineales:

$$0_{X1} + N_{X2} + PQ_{X3} + T_{X4} + R_{X5} = A$$

$$L_{X1} + 0_{X2} + PQ_{X3} + T_{X4} + R_{X5} = B$$

$$L_{X1} + N_{X2} + 0_{X3} + T_{X4} + R_{X5} = C$$

$$L_{X1} + N_{X2} + PQ_{X3} + 0_{X4} + R_{X5} = D$$

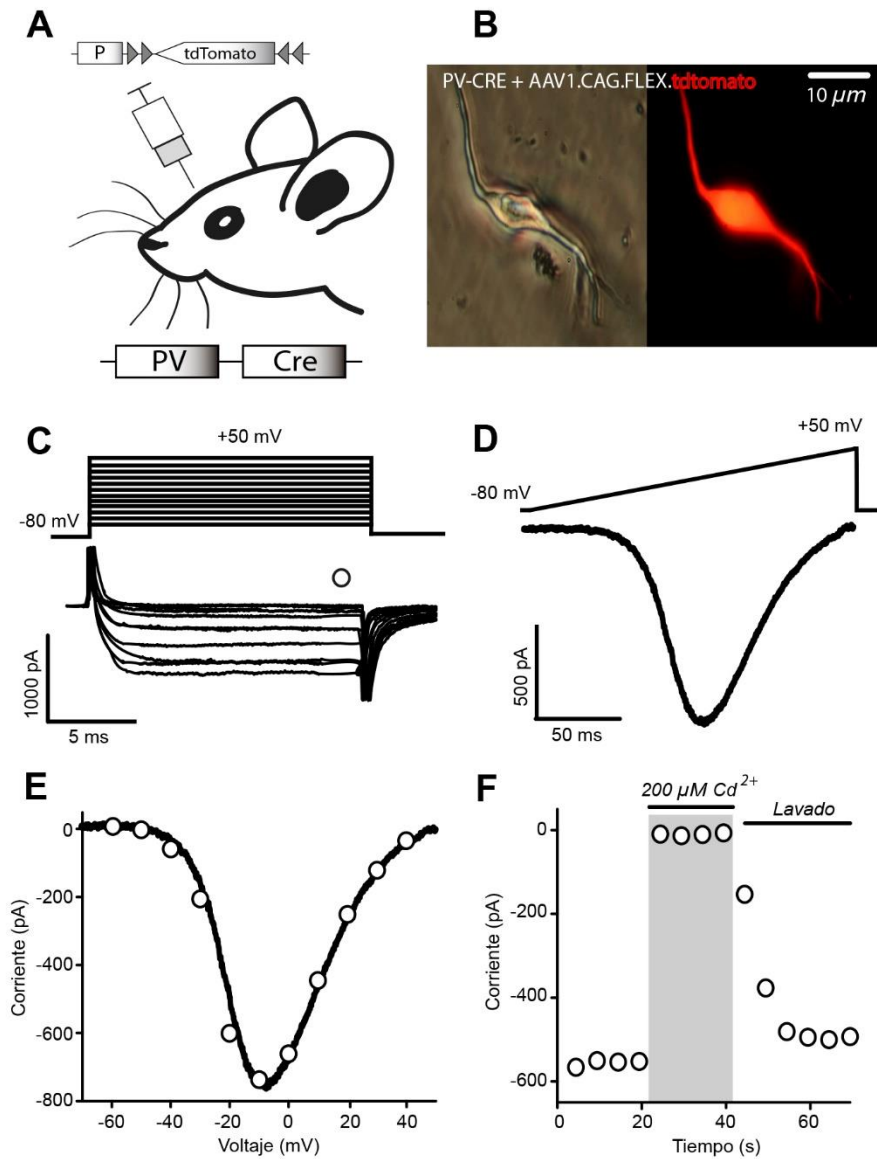
$$L_{X1} + N_{X2} + PQ_{X3} + T_{X4} + 0_{X5} = E$$

Donde  $L$ ,  $N$ ,  $PQ$ ,  $T$  y  $R$  son la contribución en porcentaje de cada tipo de canal a la corriente global. El coeficiente  $PQ$  se refiere al aporte de corriente del tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ca}_v2.1$  ( $P/Q$ ). El cero muestra cuando un canal fue bloqueado por su antagonista selectivo, por tanto, un coeficiente  $L$ ,  $N$ ,  $PQ$ ,  $T$  o  $R$  fue reemplazado

con cero cuando el canal correspondiente es bloqueado.  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $D$  o  $E$  representan el porcentaje de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  remanente comparada contra la corriente control en ausencia del bloqueador de  $\text{Ca}^{2+}$ .  $x_1$  -  $x_5$  son las variables desconocidas, en otras palabras, los valores con los cuales los coeficientes  $L$ ,  $N$ ,  $PQ$ ,  $R$  y  $T$  son multiplicados para determinar el porcentaje de contribución de cada tipo de canal a la corriente global de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 5. RESULTADOS

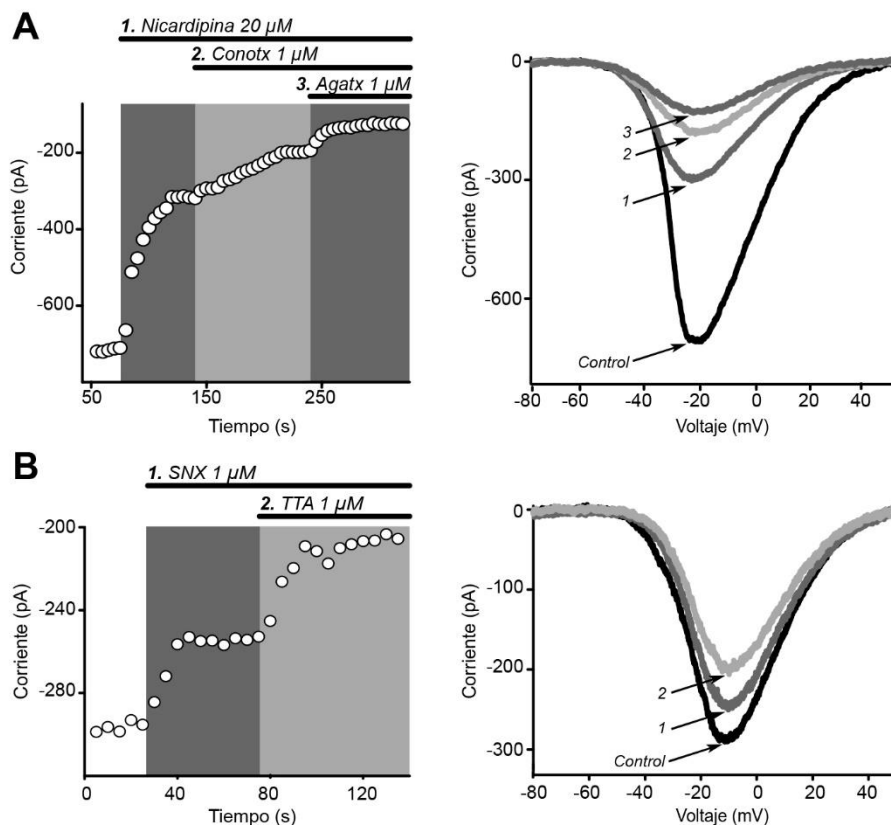
Las interneuronas FSI expresan a la PV, proteína queladora de  $\text{Ca}^{2+}$ , (Kawaguchi *et al.*, 1995; Koos & Tepper, 2002) y el receptor a DA de tipo D1, el D5. La DA despolariza a estas interneuronas y puede incluso generar potenciales de acción (Bracci, *et al.*, 2002; Bracci *et al.*, 2003; Centonze *et al.*, 2003). Aunque estos efectos pueden ser suficientes para explicar algunos efectos de la DA sobre estas interneuronas, muy poco se conoce sobre los mecanismos moleculares responsables de este efecto o incluso el efector final de esta respuesta. Con ayuda de ratones transgénicos PV-Cre, disecamos las acciones que tiene la DA sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en interneuronas estriatales FSI PV+ disociadas. Los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  fueron bloqueados (Fig. 1F).



**Fig. 1. Corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en interneuronas estriatales disociadas FSI-PV+.** **A)** Esquema del protocolo de infección a ratones PV-Cre con un adenovirus que contenía el constructo TdTomato en el estriado dorsal. **B)** Fotografía representativa de una interneurona estriatal disociada FSI. Nótese que aún conserva dendritas proximales, aunque de longitud muy corta. Izquierda: campo claro; derecha: fluorescencia de la misma FSI expresando la proteína tdTomato. **C)** Corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de TTX obtenidas en respuesta a comandos de voltaje desde -80 a +50 con intervalos de 10 mV y 200 ms de duración. (la corriente capacitiva y las colas de corriente fueron cortadas). **D)** Corriente entrante provocada por una rampa de voltaje de -80 a +50 mV (0.7 mV/ms), **E)** Curva corriente-voltaje (I-V) donde los círculos vacíos indican las mediciones después de los comandos rectangulares de voltaje y la línea continua es la corriente provocada por el comando en forma de rampa. Nótese la superposición de ambas mediciones como si fuese un ajuste. Esto permite establecer que existe una fijación espacial de voltaje aceptable y que ambos protocolos son complementarios. **F)** Curso-temporal de la amplitud máxima de la corriente en el control, al agregar 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  y después del lavado.

## 5.1. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ expresados en las interneuronas FSI

Las FSI fueron identificadas utilizando ratones transgénicos, los cuales expresan a la proteína Cre-recombinasa, bajo el control del promotor de PV. Con ayuda de un aparato estereotáxico, los ratones fueron inyectados con un virus adeno asociado en el estriado dorsal, permitiendo la expresión selectiva de la proteína tdTomato únicamente en las FSI estriatales. Se optó por utilizar neuronas agudamente disociadas para evitar entradas indirectas de alguna fuente como aferentes, uniones comunicantes, o entradas axonales o dendríticas.



**Fig. 2. Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el soma de las interneuronas estriatales FSI-PV+.** **A)** Izquierda. Curso-temporal de la amplitud máxima de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la aplicación secuencial de nicardipina,  $\omega$ -CgTx y  $\omega$ -AgTx, con el fin de bloquear los canales Cav1 (L), Cav2.2 (N) y Cav2.1 (PQ) respectivamente. Derecha: Curvas I-V representativas que muestran la reducción de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la adición de cada bloqueador. **B)** Izquierda. Curso-temporal de la amplitud máxima durante la aplicación secuencial de SNX y TTA con el fin de bloquear los canales Cav2.3 (R) y Cav3 (T), respectivamente. Derecha: Curvas I-V representativas que muestran la reducción de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la adición de cada bloqueador. La contribución de cada canal a la corriente global de  $\text{Ca}^{2+}$  se obtiene introduciendo los datos de todos los experimentos a un sistema de ecuaciones (Métodos).

Como primer paso, indagamos la presencia de los diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en el soma de estas interneuronas. Como segundo paso, estimamos la contribución de cada uno de esos canales a la corriente global de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  tiene una amplia gama de funciones, que van desde la señalización, secuestro y transporte de receptores, control de excitabilidad y sobrevivencia celular, hasta la transcripción de proteínas y control de genes. Este abanico de funciones está dado en buena parte por el tipo de canal por donde ingresa el  $\text{Ca}^{2+}$  así como de fuentes intracelulares (Catterall, 2011), de tal suerte que el presente trabajo no lleva por objetivo discernir la función de cada tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino determinar la diversidad de los canales presentes en el soma de estas interneuronas. El curso temporal de la amplitud máxima de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  antes, durante y después de la aplicación de cada bloqueador se muestra en las figuras 2A, B y está resumida en la tabla 1. Los antagonistas fueron administrados en distinto orden y de manera aleatoria solos o en combinación con otros antagonistas. La reducción de la corriente provocada por cada antagonista fue comparada con la corriente global en ausencia del mismo. Para determinar si al canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo Cav1 (tipo L) contribuía a la corriente global de  $\text{Ca}^{2+}$ , se le aplicó nicardipina a la célula. Como se muestra en la figura 2A, concentraciones saturantes de nicardipina (20  $\mu\text{M}$ ) provocaron una reducción de  $38 \pm 1.1 \%$  de la corriente global de  $\text{Ca}^{2+}$  normalizada al 100% en condiciones control ( $n=12$ ;  $P = 0.0001$ ; Kruskal-Wallis y prueba de Dunn para este y los demás casos. El porcentaje de disminución fue obtenido por el sistema de ecuaciones descrito previamente en la sección de Metodología). Como se puede observar, el canal Cav1 contribuye en buena parte a la corriente global de  $\text{Ca}^{2+}$ , es posible entonces que el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a través de este canal sea el responsable de la despolarización y la generación de potenciales de acción, ya que una de las propiedades de este tipo de canal es su lenta inactivación dependiente de voltaje (Hernandez-Lopez *et al.*, 2000; Bracci, *et al.*, 2002; Pérez-Garci *et al.*, 2003; Catterall, 2011). Para el canal Cav2.2 (tipo N) se utilizó el bloqueador selectivo  $\omega$ -CgTx a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , el cual reveló que este canal aporta  $23.4 \pm 0.7 \%$  a la corriente global (Fig. 2A, tabla 1;  $P = 0.0001$ ;  $n = 14$ ). La aportación del canal Cav2.1 (tipo P/Q), revelada por el uso de 1  $\mu\text{M}$  de

$\omega$ -AgTx, fue de  $11.1 \pm 1.4$  % (Fig. 2A; tabla 1;  $P = 0.0009$ ). El bloqueador del canal Cav2.3 (tipo R), SNX-482 demostró que este canal tiene un aporte considerable de:  $20 \pm 2$  % (Fig. 2B; Tabla 1;  $n = 6$ ;  $P = 0.0005$ ). Finalmente, el canal Cav3 (tipo T) contribuye de manera modesta a la corriente global con un  $7.4 \pm 2.3$  % (Fig. 2B; tabla 1;  $n=13$ ;  $P = 0.0069$ ). Como puede observarse, todas las clases de canal de calcio de alto umbral de activación (HVA) y de bajo umbral (LVA) **se** expresan en estas interneuronas. El papel que cumple cada uno de estos canales en las propiedades de estas interneuronas es material de estudios futuros.

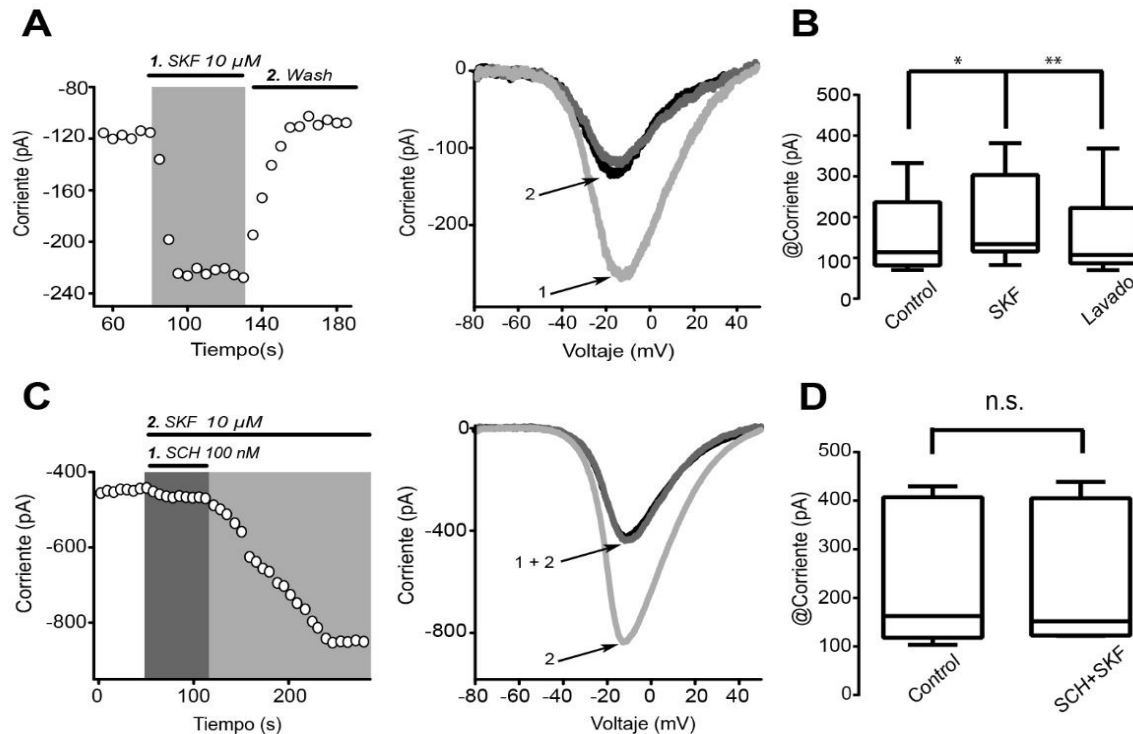
<b>Tabla 1. Contribución del porcentaje de cada canal de Ca<sup>2+</sup> a la corriente global de Ca<sup>2+</sup></b>					
<b>Antagonista</b>	<b>Nicardipina</b>	<b><math>\omega</math>-conotoxina</b>	<b><math>\omega</math>-agatoxina</b>	<b>SNX-482</b>	<b>TTA-P2</b>
<b>Concentración</b>	20 $\mu$ M	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M
<b>Canal de Ca<sup>2+</sup> bloqueado</b>	Cav1	Cav2.2	Cav2.1	Cav2.3	Cav3
<b>% de corriente bloqueada (media <math>\pm</math> EEM)</b>	$38 \pm 1.1$	$23.4 \pm 0.7$	$11.1 \pm 1.4$	$20 \pm 2$	$7.4 \pm 2.3$
<b>n</b>	12	14	14	6	13
<b>p</b>	0.0001	0.0001	0.0033	0.00009	0.0202

**Tabla 1. Contribución del porcentaje de cada canal de Ca<sup>2+</sup> a la corriente global de Ca<sup>2+</sup>.** La segunda fila indica el antagonista utilizado. La tercera fila muestra las concentraciones saturantes de los antagonistas usados. La cuarta fila corresponde a la clase de canal de Ca<sup>2+</sup> bloqueado. La quinta fila muestra la media  $\pm$  EEM de la corriente de Ca<sup>2+</sup> bloqueada por cada antagonista. Los antagonistas fueron probados solos o en secuencias aleatorias. Los porcentajes fueron obtenidos con un sistema de ecuaciones con datos de todos los experimentos (Metodología). La sexta fila corresponde al tamaño de la muestra: número de neuronas probadas con cada antagonista. La séptima fila muestra el valor de la significancia del bloqueo de cada canal en la corriente global (Kruskal-Wallis ANOVA post hoc Dunn para cada comparación comparada con el control: la corriente global de Ca<sup>2+</sup>).

## 5.2. La activación del receptor de DA D1 aumenta las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ en las FSI disociadas

Para saber si la despolarización observada por la DA sobre las FSI está relacionada con las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , se ejecutaron experimentos de fijación de voltaje en FSI disociadas. En la figura 3A se muestra el efecto de 10  $\mu\text{M}$  del agonista dopaminérgico D1: SKF81297 (SKF) y el subsecuente lavado. La estimulación del receptor D1 provoca un aumento en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $34 \pm 14\%$  (Figs. 3A, B;  $n = 8$ . Prueba de Friedman ANOVA  $F_{2,14} = 13$ ,  $P=0.0003$ ; \*  $P=0.05$ , \*\*  $P=0.01$ ; con prueba de Dunn *post hoc*). Cuando el agonista es eliminado del baño (lavado), la corriente regresa a niveles control. El aumento provocado por el SKF es significativamente diferente como se muestra en las gráficas de cajas (fig. 3B). El efecto del SKF fue completamente bloqueado en presencia del antagonista D1 SCH (fig. 3C). Al quitar el antagonista, el aumento de corriente es evidente (Fig. 3C), concluyendo que es probablemente a través del receptor D5 (Bracci, *et al.*, 2002; Centonze *et al.*, 2003), que se induce el aumento de la corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . No se encontraron diferencias significativas cuando se comparó la amplitud de corriente en condiciones control y en presencia de la combinación SCH/SKF (fig. 3D) ( $n=8$ ; Wilcoxon T test  $P > 0.9999$ ). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por otros autores (Bracci, *et al.*, 2002) y la expresión de receptores clase D1 (tipo D5), ya que es a través de estos receptores que la DA aumentaría las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ .



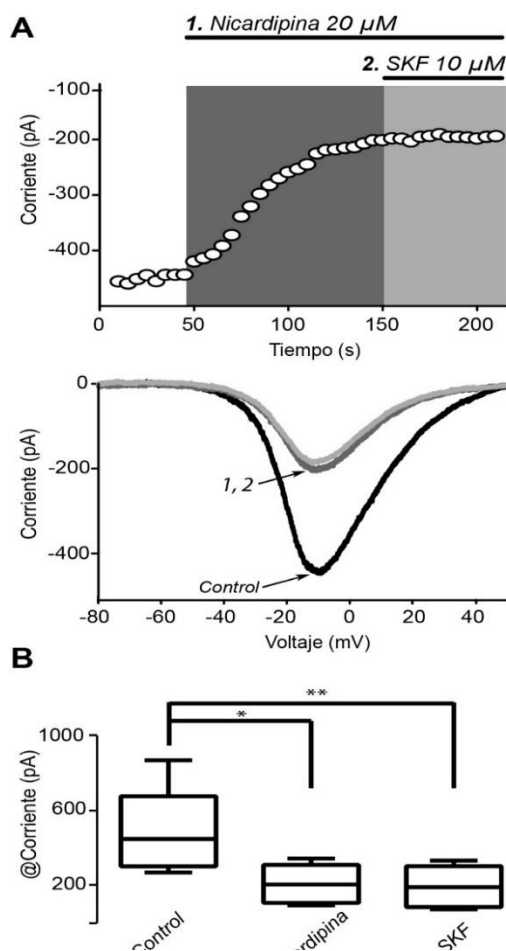


**Fig. 3. La activación del receptor Dopaminérgico de la clase D1 aumenta las corrientes de  $Ca^{2+}$  en interneuronas estriales FSI-PV+.** **A)** Izquierda, curso-temporal de la amplitud máxima de la corriente de  $Ca^{2+}$  antes, durante y después de la aplicación de 10  $\mu$ M del agonista SKF. La corriente aumenta  $34 \pm 14\%$ . El efecto es completamente reversible. Derecha: curvas I-V representativas de momentos del curso-temporal que ejemplifican el aumento provocado por el agonista y el lavado. **B)** gráficas de caja que muestran diferencias significativas entre los 3 tratamientos (prueba de Friedman ANOVA  $F_{2,14} = 13$ ,  $P=0.0003$ ; \*  $P=0.05$ , \*\*  $P=0.01$ ; con prueba de Dunn post hoc). **C)** Izquierda: curso-temporal de la amplitud máxima de la corriente de  $Ca^{2+}$  con la combinación SCH/SKF y la posterior eliminación del antagonista. Se concluye que la respuesta del agonista SKF es exclusivamente a través de receptores tipo D1, ya que la combinación SCH/SKF no provoca ninguna respuesta. Al momento de quitar el antagonista SCH, el efecto del SKF es evidente. Derecha: curvas I-V representativas de momentos del curso-temporal. **D)** Gráficas de cajas que demuestran que no existen diferencias a la amplitud de la corriente en control y en presencia de la combinación SCH/SKF.

### 5.3. El receptor tipo D1 aumenta las corrientes de $Ca^{2+}$ tipo $Ca_v1$ .

Una vez observado el aumento en las corrientes de  $Ca^{2+}$  debido a la activación del receptor D1, nos preguntamos qué canales o familia de canales de  $Ca^{2+}$  estaban siendo modulados por la DA, ya que se ha observado en neuronas espinosas medianas, que dependiendo del tipo de canal de  $Ca^{2+}$  activado, será la respuesta o vía de señalización que se active (Pérez-Garci *et al.*, 2003; Catterall, 2011). Por lo anterior, hicimos experimentos bloqueando los canales de  $Ca^{2+}$  y

activando el receptor tipo D1. El canal Cav1 es de los que más aporta a la corriente global de  $Ca^{2+}$ , además, está relacionado con despolarizaciones sostenidas en neuronas espinosas medianas (Pérez-Garci *et al.*, 2003), por lo que fue el primero que se probó.



**Figura 4. El agonista del receptor D1 aumenta las corrientes de  $Ca^{2+}$  mediadas por el canal Cav1.** **A) Arriba:** Curso-temporal de la reducción en la amplitud de la corriente de  $Ca^{2+}$  debida a la nifedipina. La acción del SKF es bloqueada después del efecto de nifedipina. **Abajo:** Curvas I-V representativas de momentos del curso temporal. **B)** Gráfica de cajas mostrando que el SKF no actúa si los canales Cav1 están bloqueados

La figura 4A (superior) muestra el curso-temporal de la amplitud máxima durante la aplicación de 20  $\mu M$  de nifedipina. Como se puede observar, la adición de nifedipina disminuye la corriente global al bloquear los canales tipo Cav1 en un  $55.4 \pm 7.8 \%$  (figs. 4A, B;  $n = 8$ ; Prueba de Friedman  $F_{2,14} = 13$ ,  $P=0.0003$ ;  $*p = 0.05$ ,  $**p = 0.01$  con *post hoc* Prueba de Dunn). Una vez obtenida una respuesta estable, se añadió SKF al baño de perfusión; el agonista selectivo del receptor D1: SKF. El SKF ya no logró modular la corriente de  $Ca^{2+}$  remanente ( $P=0.9999$ ; prueba de Dunn). Este resultado apunta a que la nifedipina bloquea toda la acción del agonista D1 sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$ , indicando que es a través del canal Cav1 que la DA modula la corriente global de  $Ca^{2+}$ .

Esta acción de la DA sobre las interneuronas FSI es similar a la observada en las neuronas espinosas

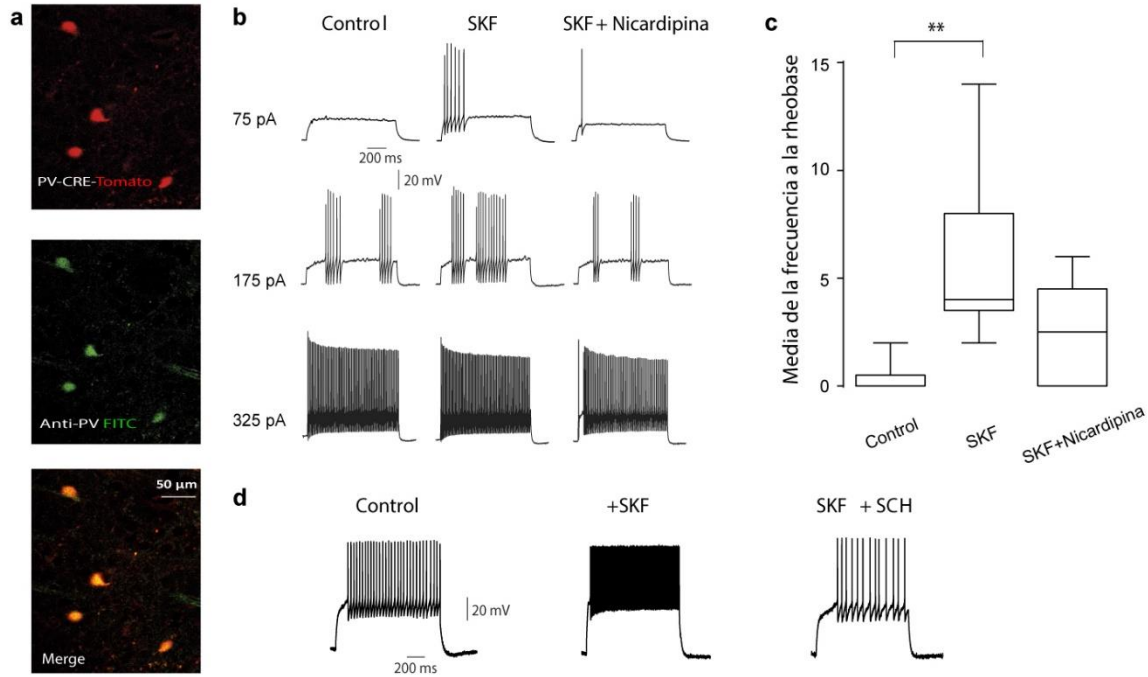
medianas de la vía directa, excepto que no intervienen el DARPP-32 ni la PP1, hasta donde se puede colegir. A esta última hay que inhibirla para poder observar la acción de los agonistas D1 sobre la corriente de calcio de las neuronas de proyección de la vía directa. En el caso de la FSI no hubo que inhibir fosfatasa para

ver el efecto. El receptor tipo D1 aumenta corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por Cav1 (Surmeier *et al.*, 1995; Hernandez-Lopez *et al.*, 1997), lo que conlleva a un aumento en la frecuencia de disparo. Por lo que debemos averiguar si en el caso de las interneuronas también se modula el disparo. Bajo nuestro esquema experimental, los canales de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  fueron bloqueados (con el fin de aislar las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ), por lo que aún se desconoce si también son modulados por la DA y si son importantes para influenciar la frecuencia de disparo, la excitabilidad o algún efecto sobre la red.

#### 5.4. Los receptores D1 aumentan la frecuencia de disparo al modular los canales Cav1 en las FSI

La técnica de neuronas disociadas es una herramienta muy útil para investigar los efectos directos de algún receptor sobre la función de una neurona en específico. Es posible observar, sin interferencias, los efectos sobre alguna corriente iónica en específico. Sin embargo, es necesario complementar los experimentos de neuronas disociadas para observar si el aumento de la corriente Cav1, es suficientemente robusto como para explicar, por ejemplo, una facilitación en la descarga de potenciales de acción (Bracci *et al.*, 2002; Centonze *et al.*, 2003), o bien, si este efecto se debe a otra corriente o a un efecto de la red. Para averiguar esto, se realizaron experimentos de fijación de corriente en rebanadas de cerebro de ratones PV-Cre infectados con un fluoróforo EGFP. La infección fue corroborada por inmunocitoquímica con un anticuerpo contra PV conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Fig. 5A). Asimismo, se identificaron las características electrofisiológicas típicas de estas interneuronas: tasas de disparo altas y rápidas con poca adaptación, presencia de ráfagas de potenciales de acción (“stuttering”) intercaladas con silencios. La aplicación del agonista SKF indujo un incremento en la tasa promedio de disparo con estímulo de rheobase (Fig. 5B y 5C;  $n = 6$ ;  $P < 0.0001$ ; Friedman ANOVA con post hoc Dunn utilizando la tasa promedio de disparo de 300 pA). Notablemente, la adición de nicardipina revirtió parcialmente el aumento provocado por el SKF (Fig. 5C). El efecto es específico del receptor D1, ya que la

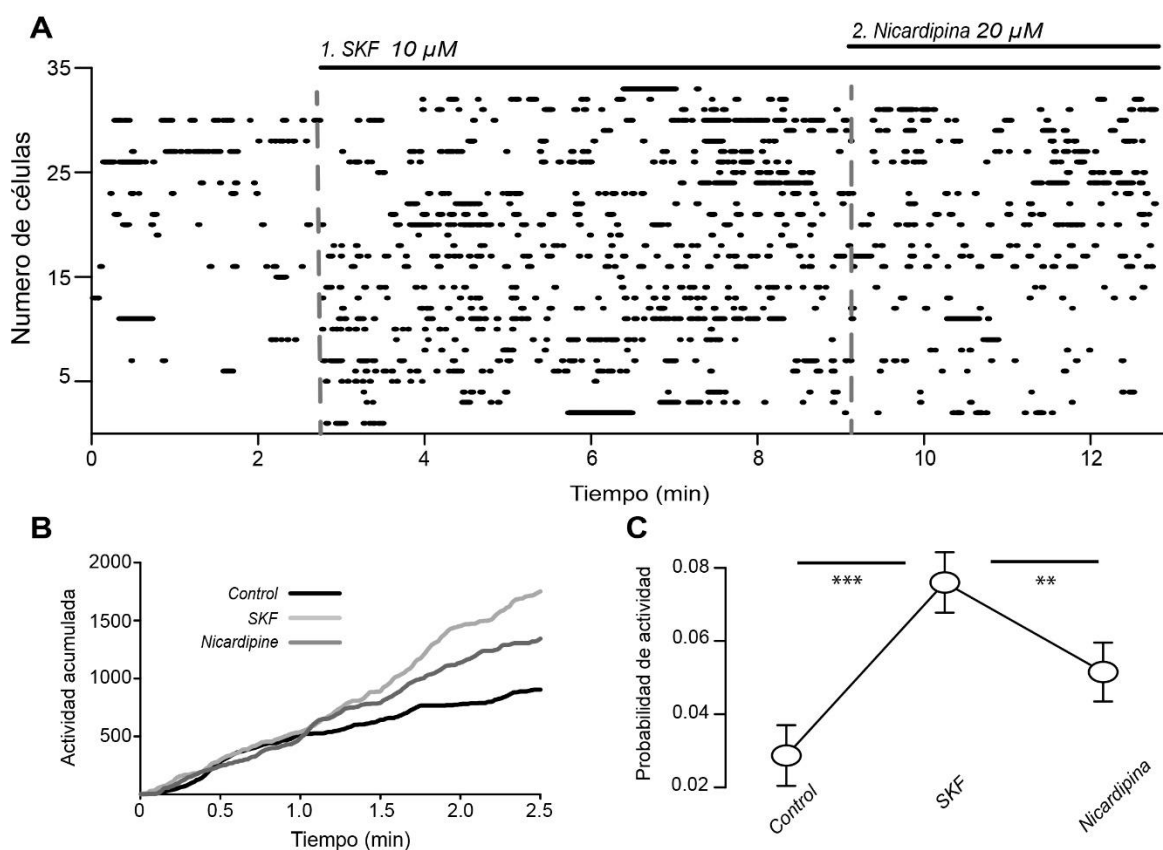
acción del SKF es bloqueada por la presencia del antagonista del receptor D1 (SCH) (Fig. 5D). Estos resultados muestran que el aumento en la corriente Cav1 induce un incremento en la frecuencia de disparo.



**Figura 5. El SKF incrementa la actividad de interneuronas FSI-PV+.** **A)** Arriba: preparación inmunocitoquímica de neuronas FSI obtenidas de un ratón PV-Cre infectado con el virus adeno-asociado dt-Tomato (en rojo). Centro: Corroboración con el anticuerpo FITC contra PV. Abajo: Sobreposición. **B)** Disparo evocado con diferentes intensidades de corriente intracelular. La aplicación de SKF incrementa la tasa de disparo. 20  $\mu$ M nicardipina anula el efecto de SKF, sugiriendo que el efecto es a través de canales de  $Ca^{2+}$  Cav1. **C)** Gráficas de cajas comparando la media de la frecuencia con  $I =$  rheobase ( $n=6$ ;  $p<0.0021$ ; Friedman ANOVA con post hoc con prueba de Dunn usando la frecuencia media a la rheobase). **D)** Aplicación del antagonista SCH elimina el aumento en la frecuencia provocado por el SKF confirmando la participación del receptor clase D1.

## 5.5. La activación de los receptores D1 facilita la actividad de las FSI en el microcircuito estriatal dorsal.

Finalmente, nos preguntamos si la activación de los receptores D1 podría facilitar el número de interneuronas FSI activas en el microcircuito estriatal. Para probar esta hipótesis fue necesario realizar experimentos de imagenología de  $\text{Ca}^{2+}$  con resolución de célula única en rebanadas de cerebro de ratones transgénicos PV-Cre que expresaban a la proteína GCaMP6f bajo el promotor PV. Con esta técnica es posible visualizar varias interneuronas PV+ en un campo visual dado.



**Figura 6. El SKF incrementa la actividad de interneuronas FSI-PV+ en el microcircuito estriatal.**

**A)** Gráfica tipo raster de la actividad de varias FSI ( $n=33$ , identificadas por fluorescencia y extraídas de 6 experimentos diferentes provenientes de 3 ratones diferentes). En estos experimentos la actividad eléctrica puede ser inferida como cambios en la fluorescencia inducida por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pérez-Ortega et al., 2016). Los puntos en cada fila del raster muestran la actividad de una sola FSI. Panel izquierdo: Actividad de las FSI en condiciones control, sin estimulación. Panel del centro: la adición de 10  $\mu\text{M}$  SKF incrementa el número de FSI activas en el circuito. Nótese que previamente a la adición de SKF algunas FSI estaban silentes. Panel derecho: la adición de 20  $\mu\text{M}$  de nicardipina reduce el número de FSI activas, mostrando que el SKF aumenta la actividad de red de las FSI al facilitar las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  del canal Cav1. **B)** Resumen de la actividad acumulada de los experimentos en A. **C)** Resumen de la probabilidad de actividad en cada condición.

Para los experimentos se utilizaron 6 rebanadas de 3 ratones diferentes en condiciones de disparo espontáneo. Se construyó una gráfica tipo raster, donde cada punto representa el momento de una neurona FSI en un intervalo de tiempo (Metodología). El raster de la fig. 6A fue construido con la información de todas las interneuronas registradas y graficadas juntas como se ha descrito previamente (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Plata *et al.*, 2013; Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Los cambios en la fluorescencia fueron obtenidos antes y durante la aplicación de SKF y de SKF más nicardipina durante un periodo total de 13 minutos. Se estudió un área de 750 x 750  $\mu\text{M}$  del estriado dorsal que contenía interneuronas FSI que expresaban al indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  GCaMP6f ( $n = 33$  FSI identificadas). El panel izquierdo de la fig. 6A del raster muestra la actividad de las FSI en condiciones control sin ningún fármaco o excitación externa. Se observa poca actividad de estas interneuronas en condiciones control. En contraste, cuando se añadieron 10  $\mu\text{M}$  SKF al baño, la cantidad de FSI activas incrementó (Fig. 6A, panel del centro). Lo que sugiere que la DA modula al número de interneuronas FSI que están activas en el microcircuito en un momento dado. La figura 6B muestra la actividad acumulada del microcircuito en control, con SKF y con SKF más nicardipina. La figura 6C muestra la probabilidad de actividad celular bajo cada una de las condiciones (intervalos en los cuales está activa la neurona / número total de intervalos: media  $\pm$  EEM). En condiciones control, la actividad intervalo por intervalo fue de  $0.03 \pm 0.008$ . Después de la adición de SKF, la actividad aumenta a  $0.07 \pm 0.008$  (Fig 6B, Fig 6C; prueba de Friedman ANOVA  $F_{2, 64} = 29.63$ ,  $P < 0.0001$ ; con post hoc de Dunn). Estos resultados nos sugieren que la DA efectivamente regula cuantas interneuronas FSI están activas en el microcircuito estriatal en un momento dado. Para indagar la participación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  Cav1, 20  $\mu\text{M}$  de nicardipina fueron añadidos durante el aumento de actividad provocado por el SKF (6A, panel derecho). La actividad acumulada bajó a un  $0.05 \pm 0.008$  (Fig 6B,  $P = 0.01$ , post hoc de Dunn). El bloqueo provocado por nicardipina no disminuyó la actividad hasta valores control. Esto puede sugerir varios escenarios: que el agonista active alguna propiedad de red, como por ejemplo otras neuronas en el microcircuito, o que no todo el efecto facilitador del receptor

tipo D1 puede explicarse al aumentar las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo Cav1 y existan otras conductancias en juego. Más experimentos se necesitan para dilucidar este punto.

## 6. DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra que la activación de los receptores de DA de la clase D1, muy probablemente de tipo D5, aumentan las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de los canales Cav1, lo que lleva a una facilitación en la tasa de disparo y a un aumento en la actividad de estas interneuronas en el microcircuito estriatal. Esta es la primera evidencia de un efector molecular que media las acciones de la DA en esta clase de interneuronas.

### 6.1. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ expresados en las interneuronas FSI

El primer reto del presente estudio fue la obtención de interneuronas FSI de ratones transgénicos disociadas en una buena cantidad para poder estudiar los canales iónicos y los efectos de los fármacos sobre ellas. El uso de neuronas disociadas permite eliminar entradas de otras neuronas, uniones comunicantes y efectos de red para poder estudiar los efectos directos de los fármacos (Bargas et al., 1994; Vilchis et al., 2002; Hernández-González et al., 2014; Hernández-Flores et al., 2015). Una vez obtenidas las FSI disociadas, el segundo objetivo fue la disección de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el soma de las FSI, así como la estimación de su aporte a la corriente global de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se observó que las FSI expresan un abanico de las 4 diferentes clases de canales HVA (Cav1, Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3), así como un discreto aporte de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  LVA (Cav3). Encontramos que el canal Cav1 es el que contribuye más a la corriente global de calcio de la FSI seguido de los canales Cav2.2 y Cav2.3, los cuales, combinados, hacen más del 80% de toda la corriente global de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, junto con otros canales iónicos (Rudy and McBain, 2001; Erisir et al., 1999), los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  moldean y proveen las propiedades características de las FSI (Lenz et al., 1994; Erisir et al., 1999; Bennett et al., 2000; Rudy and McBain, 2001) e incluso podrían ser moduladas por vías de señalización similares a las encontradas en las NEMs

(Bargas et al., 1991, 1994, 1999, Hernandez-Lopez et al., 1997, 2000; Vilchis et al., 2002). El papel de cada uno de estos canales en el soma de estas interneuronas está pobremente estudiado. A los canales Cav1 se les ha involucrado con la frecuencia de disparo en otros tipos celulares (ver más adelante). A los canales Cav2.2 junto con los Cav2.1 se les ha encontrado que modulan la liberación de GABA y otros neurotransmisores de las terminales sinápticas (Zaitsev, et al., 2007; Evans & Zamponi, 2006) y en el soma de las NEM están asociados con la modulación del potencial hiperpolarizante (Pérez-García, et al., 2003), sin embargo su papel en las FSI es a la fecha desconocido. Al canal Cav2.3 igualmente se le ha asociado con liberación de neurotransmisores de la SNc (Bergquist & Nissbrandt, 2003) y con la formación de LTP en el hipocampo (Dietrich, et al., 2003), sin embargo su papel en el soma de las neuronas es a la fecha desconocido. Este estudio por tanto sirve como una primera aproximación al estudio de los diferentes canales de Ca<sup>2+</sup> en el soma, ya que los canales Cav2.2 y Cav2.3 tienen un aporte nada discreto a la corriente global de Ca<sup>2+</sup>. Nuestros resultados puede llevar a un mejor entendimiento del papel de estas interneuronas en el microcircuito estriatal (Gittis et al., 2011; Damodaran et al., 2014; Perez-Ortega et al., 2016). Por otro lado, este conocimiento se puede aplicar para mejorar la terapéutica de diversas enfermedades neurológicas relacionadas con las FSI, tales como estrés y ansiedad, esquizofrenia o síndromes como Tourette, Huntington y algunas canalopatías (Xu, et al., 2016; Cepeda, et al., 2013; Rossignol et al., 2013; Tottene et al., 2011; Kataoka et al., 2010; Kalanithi et al., 2005). Otra posibilidad es la de estudiar de mejor manera la forma en la que la depleción de dopamina en el estriado, característico de la enfermedad de Parkinson, tienen efecto sobre los receptores dopaminérgicos de las interneuronas FSI y su consecuente cambio de modulación sobre los canales de Ca<sup>2+</sup> (ver siguiente sección).



## 6.2. Acciones dopaminérgicas sobre las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ en las FSI estriatales.

Con el fin de investigar las consecuencias de activar el receptor a DA de las FSI, probablemente el receptor D5, el agonista selectivo SKF fue utilizado. Del mismo modo, el uso de neuronas disociadas fue fundamental, ya que esta técnica permite eliminar todo tipo de entradas y efectos colaterales (Galarraga et al., 1997; Hernández-López et al., 1997). Los resultados arrojaron que, efectivamente, la activación de este receptor aumenta las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . El bloqueo de este canal con nicardipina, elimina por completo la acción del agonista dopaminérgico sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , concluyendo que este es el único canal de  $\text{Ca}^{2+}$  que es modulado por la DA via receptores clase D1. Es de notarse que esta modulación de la DA sobre la corriente Cav1 es similar en porcentaje a la encontrada en las NEMs de la vía directa, con la única excepción de que en estas interneuronas no fue necesario inhibir las fosfatasa (e.g., PP-1) para que el agonista aumente las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . La proteína DARPP-32 parece ser exclusiva de las NEMs, por lo que se infiere que a pesar de que el efector es el mismo, la vía de señalización debe de ser diferente o tener sus peculiaridades. A la fecha no hay ningún estudio sobre la vía de señalización de este receptor en las FSI estriatales por lo que sería un interesante tema de investigación.

En las NEM, la corriente por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  Cav1 despolariza y facilita el disparo provocado por inyecciones intracelulares de corriente (Galarraga et al., 1997; Hernández-López et al., 1997; Pérez-García, *et al.*, 2003) lo que parece ser también ser el caso en estas interneuronas. La facilitación llevada a cabo por este canal, que es un canal de inactivación lenta (Catterall, 2011) promueve y mantiene el disparo evocado en varias FSI, además que facilita a la plasticidad sináptica de corto plazo (Tecupletla, et al., 2007). Al administrar SKF el disparo aumenta en los experimentos de fijación de corriente, por lo que es coherente que la lenta y sostenida despolarización dada por los canales Cav1, ayuden, junto con otras conductancias, a mantener las altas frecuencias observadas en las FSI. Asimismo,

en los experimentos de imagenología de calcio, se muestra que al activar los canales Cav1 por el SKF, aumenta el número de neuronas activas en el microcircuito. Este aumento de actividad se revierte parcialmente al administrar la nicardipina. La actividad no regresa del todo a condiciones control y se mantiene por varios minutos. Lo cual apunta a que el tono dopaminérgico regula la cantidad de neuronas FSI que deben estar activas modulando la tasa de disparo durante alguna tarea. Como se sabe que la actividad de las FSI define a las neuronas que pertenecen a los ensambles neuronales (Owen et al., 2018), se infiere que mejoran la ejecución de la misma. Es sabido que las FSI resuenan a frecuencias que se encuentran en la banda gamma (Beatty, et al., 2015) y que estas mismas son el origen del ritmo gamma en los circuitos neuronales (Hu, et al., 2014; Sohal, et al., 2009). El ritmo gamma, aberrantes y excesivo, está presentes en la esquizofrenia (McNally & McCarley, 2016), por lo tanto, parece coherente la relación entre el papel de las FSI y la DA en enfermedades psiquiátricas.

Finalmente, el número de FSI activadas por la DA en el microcircuito estriatal después del bloqueo de los canales Cav1 por la nicardipina no regresa a niveles control. Esto se puede deber a varias razones. Una de ellas es que el SKF no afecta únicamente a las FSI en el microcircuito, si no también otras proyecciones o colaterales dando efectos de red. Otra explicación es que la DA no sólo aumenta las corrientes de Ca<sup>2+</sup>, si no que a su vez facilita o inhibe otras conductancias además del canal Cav1.

Las FSI (junto con las demás interneuronas estriatales; Koós y Tepper, 1999) proveen una poderosa inhibición tipo feed-forward, seleccionando y reclutando ensambles de NEMs necesarias para la ejecución de alguna acción (Carrillo-Reid et al., 2011; Tecuapetla et al., 2014; Kulik et al., 2016). En este sentido, la DA modula los comandos corticales al modular corrientes iónicas, la actividad de las FSI, y de las NEM (Tecuapetla, et al., 2007).

El poder estudiar interneuronas disociadas estriatales a través de registros electrofisiológicos, abre la posibilidad de estudiar la acción de los diferentes canales

(tanto  $\text{Ca}^{2+}$  como de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ ) que son modulados, estudiar otros ligandos, o bien registrar otras interneuronas estriatales, como la muscarina en las ChAT.

## 7. REFERENCIAS

Aosaki T, Tsubokawa H, Ishida A, Watanabe K, Graybiel AM, Kimura M. (1994). Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J Neurosci*, 14:3969-3984.

Arias-García MA, Tapia D, Laville JA, Calderón VM, Ramiro-Cortés Y, Bargas J, Galarraga E (2018). Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Struct Funct*. 223:1229 – 1253.

Assous M, Kaminer J, Shah F, Garg A, Koós T, & Tepper JM (2017) Differential processing of thalamic information via distinct striatal interneuron circuits. *Nat. Commun.*, 8:15860.

Bargas J, Ayala GX, Hernández E, Galarraga E (1998).  $\text{Ca}^{2+}$ -channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res. Bull.*, 45:521-524.

Bargas J, Howe A., Eberwine J, Cao Y & Surmeier DJ (1994). Cellular and molecular characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J. Neurosci.*, 14:6667–6686.

Bargas J, Surmeier DJ, & Kitai ST (1991). High- and low-voltage activated calcium currents are expressed by neurons cultured from embryonic rat neostriatum. *Brain Res.*, 541:70–74.

Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR (2015). Dopamine receptors – IUPHAR review 13. *Br J Pharmacol*. 172:1- 23.

Beatty JA, Song SC. & Wilson CJ (2015). Cell-type-specific resonances shape the responses of striatal neurons to synaptic input. *J Neurophysiol*. 113:688–700.

Bennett BD & Bolam JP (1994). Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neuroscience*. 62:707–719.

Berke JD (2011). Functional properties of striatal fast-spiking interneurons. *Front. Syst. Neurosci*. 5:45.

Bers DM. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198–205.

Bolam JP, Hanley JJ, Booth P & Bevan MD (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196:527–542.

Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J & Snutch TP (1999). Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci.* 2(5):407-15.

Bracci E, Centonze D, Bernardi G & Calabresi P (2002). Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J. Neurophysiol.* 87:2190–2194.

Bracci E, Centonze D, Bernardi G & Calabresi P (2003). Voltage-dependent membrane potential oscillations of rat striatal fast-spiking interneurons. *J. Physiol.* 549:121–130.

Briones-Lizardi LJ, Cortés H, Avalos-Fuentes JA, Paz-Bermúdez FJ, Aceves J, Erij D & Florán B (2019). Presynaptic control of [3H]-glutamate release by dopamine receptor subtypes in the rat substantia nigra. Central role of D1 and D3 receptors. *Neuroscience.* 28:563 – 579.

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.

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.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP & Striessnig J (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 57:411–425.

Catterall WA (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:1–23.

Centonze D, Grande C, Usiello A, Gubellini P, Erbs E, Martin AB, Pisani A, Tognazzi N, Bernardi G, Moratalla R, Borrelli E & Calabresi P (2003). Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *J. Neurosci.* 23:6245–6254.

Cepeda C, Galvan L, Holley SM, Rao SP, André VM, Botelho EP, Chen JY, Watson JB, Deisseroth K & Lavine MS (2013). Multiple sources of striatal inhibition are differentially affected in Huntington's disease mouse models. *J Neurosci.* 33(17):7393 – 406.

Cruz-Trujillo R, Avalos-Fuentes A, Rangel-Barajas C, Paz-Bermúdez F, Sierra A, Escartín-Perez E, Aceves J, Erlij D & Florán B (2013). D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. *Neuropharmacology.* 67:370 – 8.

Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM & Costa RM (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature,* 494:238–242.

Damodaran S, Evans RC & Blackwell KT (2014). Synchronized firing of fast-spiking interneurons is critical to maintain balanced firing between direct and indirect pathway neurons of the striatum. *J Neurophysiol.* 111:836–848.

Deffains M & Bergman H (2015). Striatal cholinergic interneurons and cortico-striatal synaptic plasticity in health and disease. *Movement Disorders.* 30:1014 – 1025.

Deffains M, Iskhakova L, Katabi S, Haber SN, Israel Z & Bergman H (2016). Subthalamic, not striatal, activity correlates with basal ganglia downstream activity in normal and parkinsonian monkeys. *Elife.* 25(3):1–38.

DeLong MR & Wichmann MD (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol.* 64:20-24.

Elghaba R, Vautrelle N & Bracci E (2016). Mutual Control of Cholinergic and Low-Threshold Spike Interneurons in the Striatum. *Front. Cell. Neurosci.* 10:1–15.

Erisir A, Lau D, Rudy B & Leonard CS (1999). Function of Specific K<sup>+</sup> Channels in Sustained High-Frequency Firing of Fast-Spiking Neocortical Interneurons. *J Neurophysiol,* 82:2476–2489.

Evans RM, Zamponi GW. (2006). Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels--integration centers for neuronal signaling pathways. *Trends Neurosci.* 29(11):617-24.

Faust TW, Assous M, Tepper JM & Koós T (2016). Neostriatal GABAergic Interneurons Mediate Cholinergic Inhibition of Spiny Projection Neurons. *J. Neurosci.* 36:9505–9511.

Fino E & Venance L (2010). Spike-timing dependent plasticity in the striatum. *Front Synaptic Neurosci.* 2:1–10.

Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Barral J & Bargas J (1997). Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *Neuroreport.* 8:2183–2186.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ & Sibley DR (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 250:1429-1432.

Gittis AH, Nelson AB, Thwin MT, Palop JJ & Kreitzer AC (2010). Distinct Roles of GABAergic Interneurons in the Regulation of Striatal Output Pathways. *J. Neurosci.* 30:2223–2234.

Hernández-Flores T, Hernández-González O, Pérez-Ramírez MB, Lara-González E, Arias-García MA, Duhne M, Pérez-Burgos A, Prieto GA, Figueroa A, Galarraga E & Bargas J (2015). Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M4-type receptors. *Neuropharmacology.* 89:232–244.

Hernández-González O, Hernández-Flores T, Prieto GA, Pérez-Burgos A, Arias-García MA, Galarraga E & Bargas J (2014). Modulation of Ca<sup>2+</sup>-currents by sequential and simultaneous activation of adenosine A1 and A2A receptors in striatal projection neurons. *Purinergic Signal.* 10:269–281.

Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A & Galarraga E (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J Neurosci.* 17:3334–3342.

Hernandez-Lopez S, Tkatch, T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H & Surmeier DJ (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC $\beta$ 1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci.* 20:8987–8995.

Hu H, Gan J & Jonas P (2014). Fast-spiking, parvalbumin<sup>+</sup> GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science.* 345:1255263-1 - 1255263-13.

Kalanithi PS, Zheng W, Kataoka Y, DiFiglia M, Grantz H, Saper CB, Schwartz ML, Leckman JF & Vaccarino FM (2005). Altered parvalbumin-positive neuron distribution in

basal ganglia of individuals with Tourette syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:13307–13312.

Kataoka Y, Kalanithi PS, Grantz H, Schwartz ML, Saper C, Leckman JF & Vaccarino FM (2010). Decreased number of parvalbumin and cholinergic interneurons in the striatum of individuals with Tourette syndrome. *J Comp Neurol*. 518:277–291.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, & Emson PC (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 8:527–535.

Klaus A, Planert H, Hjorth JJJ, Berke JD, Silberberg G & Kotaleski JH (2011). Striatal Fast-Spiking Interneurons: From Firing Patterns to Postsynaptic Impact. *Front. Syst. Neurosci*. 5:1–17.

Koós T & Tepper JM (2002). Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J. Neurosci*. 22:529–535.

Koós T & Tepper JM (1999). Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat. Neurosci*. 2:467–472.

Kravitz, AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K & Kreitzer AC (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*. 466:622-626.

Kravitz, AV & Kreitzer AC (2012). Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiology (Bethesda)*. 27:167-177.

Kulik, JM, Pawlak AP, Kalkat M, Coffey KR & West MO (2017). Representation of the body in the lateral striatum of the freely moving rat: fast spiking interneurons respond to stimulation of individual body parts. *Brain Res*. 1657:101–108.

Lenz S, Perney TM, Qin Y, Robbins E & Chesselet MF (1994). GABA-Ergic interneurons of the striatum express the shaw-like potassium channel KvS3.1. *Synapse*. 18:55–66.

Lévesque, M., Bédard, A., Cossette, M., & Parent, A. (2003) Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferents projections. *J. Chem. Neuroanat.*, 26, 271–281.

McNally, J.M. & McCarley, R.W. (2016) Gamma band oscillations: a key to understanding schizophrenia symptoms and neural circuit abnormalities. *Curr Opin Psychiatry*. 29, 202–210.

Monyer, H. & Markram, H. (2004) Interneuron Diversity series: Molecular and genetic tools to study GABAergic interneuron diversity and function. *Trends Neurosci.*, 27, 90–97.

Muñoz-Machado, AB, Foldi, C, Szydlowski, S, Sjulson, L, Farries, M, Wuilson, C, Silberberg, G & Hjerling-Leffler, J. (2014). Novel striatal GABAergic interneuron population labeled in the 5HT3<sup>EGFP</sup> mouse. *Cereb Cortex.* 26(1):96 – 105.

Nanou E, Catterall WA. (2018). Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron.* 2;98(3):466-481. doi: 10.1016/j.neuron.2018.03.017.

Nava-Asbell C, Paz-Bermudez F, Erlij D, Aceves J & Florán B. (2007). GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of [(3)H]GABA release in substantia nigra pars reticulata. *Neuropharmacology.* 53(5):631-7.

Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen XH, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, et al. (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37: 15353 15362.

Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.

Orduz, D., Bishop, D.P., Schwaller, B., Schiffmann, S.N., & Gall, D. (2013) Parvalbumin tunes spike-timing and efferent short-term plasticity in striatal fast spiking interneurons. *J. Physiol.*, 591, 3215–3232.

Owen, SF, Berke, JD & Kreitzer, AC. (2018) Fast-Spiking Interneurons Supply Feedforward Control of Bursting, Calcium, and Plasticity for Efficient Learning. *Cell.* 172(4):683-695.

Parent A & Hazrati LN. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev.* 20(1):91-127.

Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., & Vargas, J. (2016) Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol. Dis.*, 91, 347–361.



Pérez-Ramírez, MB, Laville A, Tapia D, Duhne M, Lara-González E, Bargas, J & Galarraga E. (2015)  $K_v7$  channels regulate firing during synaptic integration in GABAergic striatal neurons. *Neural Plasticity*. 2015: 472676.

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

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

Pérez-Garci, E., Bargas, J., & Galarraga, E. (2003) The role of  $Ca^{2+}$  channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport*, 14, 1253–1256.

Perez-Reyes E1. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*. 83(1):117-61.

Perez-Rosello, T. (2005) Cholinergic Control of Firing Pattern and Neurotransmission in Rat Neostriatal Projection Neurons: Role of  $CaV2.1$  and  $CaV2.2$   $Ca^{2+}$  Channels. *J. Neurophysiol.*, 93, 2507–2519.

Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J.E., Barroso-Flores, J., Galarraga, E., & Bargas, J. (2013) Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of parkinsonian tissue in vitro. *Biomed Res. Int.*, 2013.

Plotkin, J.L., Wu, N., Chesselet, M.F., & Levine, M.S. (2005) Functional and molecular development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons and their cortical inputs. *Eur. J. Neurosci.*, 22, 1097–1108.

Rajakulendran S, Hanna MG. (2016) The Role of Calcium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 6(1):a022723. doi: 10.1101/cshperspect.a022723.

Ramanathan, S., Hanley, J.J., Deniau, J.-M., & Bolam, J.P. (2002) Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto GABAergic interneurons in the rat striatum. *J. Neurosci.*, 22, 8158–8169.

Rapanelli, M., Frick, L.R., Xu, M., Groman, S.M., Jindachomthong, K., Tamamaki, N., Tanahira, C., Taylor, J.R. & Pittenger, C. (2017) Targeted interneuron depletion in the

dorsal striatum produces autism-like behavioral abnormalities in male but not female mice. *Biol. Psychiatry*. 82:194–203.

Rossignol, E., Kruglikov, I., van den Maagdenberg, A.M., Rudy, B. & Fishell, G. *Ca<sub>v</sub>2.1* ablation in cortical interneurons selectively impairs fast-spiking basket cells and causes generalized seizures. *Ann Neurol*. 74, 209–222.

Rudy, B. & McBain, C.j. (2001) Kv3 channels: voltage-gated K<sup>+</sup> channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci*. 24, 517–526.

Russo G, Nieuwenhuis TR, Maggi S, Taverna S. (2013). Dynamics of action potential firing in electrically connected striatal fast-spiking interneurons. *Front Cell Neurosci*. 14:7:209.

Shi R, Schroeder GM, Nimarko AF. (2016). Dissecting the Role of P/Q-Type Calcium Channels in Corticothalamic Circuit Dysfunction and Absence Epilepsy. *J Neurosci*. 36(21):5677-5679. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0753-16.2016.

Shuba, Y.M. (2014). Models of calcium permeation through T-type channels. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 466: 635. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1437-3>

Simms BA, Zamponi GW. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*. 2;82(1):24-45. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.016.

Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., & Bolam, J.P. (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, 86, 353–387.

Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459, 698–702.

Straub, C., Saulnier, J.L., Bègue, A., Feng, D.D., Huang, K.W. and Sabatini B.L. (2016) Principles of synaptic organization of GABAergic interneurons in the striatum. *Neuron*, 92, 84–92.

Surmeier, D.J., Bargas, J., Hemmings, H.C., Nairn, A.C., & Greengard, P. (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, 14, 385–397.

Szydlowski, S.N., Pollak Dorocic, I., Planert, H., Carlen, M., Meletis, K., & Silberberg, G. (2013) Target selectivity of feedforward inhibition by striatal fast-spiking interneurons. *J Neurosci*, 33, 1678–1683.

Takakusaki, K., Saitoh, K., Harada, H. and Kashiwayanagi, M. (2004). Role of basal ganglia-brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neurosci Res*, 50, 137-151.

Tecuapetla, F., Carrillo-Reid, L., Bargas, J. Galarraga, E. (2007) Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104, 10258–10263.

Tecuapetla F, Matias S, Dugue GP, Mainen ZF & Costa RM (2014). Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nat. Commun.* 5:4315.

Tepper JM & Bolam JP (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:685–692.

Tepper JM, Koós T & Wilson CJ (2004). GABAergic microcircuits in the neostriatum. *TRENDS in neuroscience*. 27.11:662–669.

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

Tepper JM, Koós T, Ibanez-Sandoval O, Tecuapetla F, Faust TW, Assous M. (2018). Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons: Update 2018. *Front Neuroanat.* 8;12:91.

Tepper JM, Wilson CJ & Koós T. (2008) Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. *Brain Res. Rev.* 58:272–281.

Tottene A, Urbani A & Pietrobon D (2011). Role of different voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in cortical spreading depression: specific requirement of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Channels.* 5:110–114.

Tritsch NX & Sabatini BL (2012). Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron.* 76:33–50.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 24(1):125-32.

Vilchis C, Bargas J, Pérez-Roselló T, Salgado H & Galarraga E (2002). Somatostatin modulates Ca<sup>2+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience.* 109:555–567.

Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 264:107-111

Wichmann T & DeLong MR. (2003). Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci*, 991:199-213.

Xu M, Li L & Pittenger C (2016). Ablation of fast-spiking interneurons in the dorsal striatum, recapitulating abnormalities seen post-mortem in Tourette syndrome, produce anxiety and elevated grooming. *Neuroscience*. 324:321–329.

Yamada K, Takahashi S, Karube F, Fujiyama F, Kobayashi K, Nishi A & Momiyama T (2016). Neuronal circuits and physiological roles of the basal ganglia in terms of transmitters, receptors and related disorders. *J. Physiol. Sci*. 66:435–446.

Zaitsev AV, Povysheva NV, Lewis DA, Krimer LS. (2007) P/Q-type, but not N-type, calcium channels mediate GABA release from fast-spiking interneurons to pyramidal cells in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol*. 97(5):3567-73.

Zhang M, Zhao Z, He P & Wang J (2014). Effect of gap junctions on the firing patterns and synchrony for different external inputs in the striatal fast-spiking neuron network. *Biomed. Mater. Eng*. 24:2635–2644.