



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIA COGNITIVA

DINÁMICA E INTEGRACIÓN DEL
MICROCIRCUITO CÓRTICOESTRIATAL

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIÓL. ANA BRISA GARCÍA VILCHIS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY

UNIDAD DE BIOMÉDICAS FES-I

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO. NOVIEMBRE, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elvira Galarraga, tutora principal de este trabajo, por todo el aprendizaje que recibí, ha sido un honor trabajar juntas, aprendí no solo en lo profesional, también crecí personalmente.

Al Dr. José Bargas y la Dr. Elizabeth Echeagaray, miembros de mi comité por todo su apoyo, por enriquecer este trabajo con su conocimiento y recomendaciones, por sus comentarios y disposición siempre. Además de ser unos excepcionales maestros, son magníficos seres humanos.

A los revisores de mi tesis: Dra. Magda Giordano, Dr. Luis Carrillo, Dr. Marco Herrera y Dr. Román Rosi, por las aportaciones finales que fueron clave para mejorarlo.

Al Biólogo Dagoberto Tapia, al Físico Antonio Laville, a la Dra. Ariadna Aparicio y la M. en C Xóchitl Ayala, tanto por la asistencia técnica, así como por el manejo de ratones utilizados en este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio BL-101 y BL-103 que de una u otra manera me transmitieron su conocimiento, en especial al Ingeniero Miguel Serrano y a los Dres. Ricardo Hernández, José Aceves y Jesús Pérez: gracias por todo el tiempo destinado a compartir no solo sus enseñanzas, sino su amistad; fueron una pieza fundamental para esta labor, reconozco y aprecio su compañerismo y fraternidad.

Finalmente, quiero reconocer a las personas más importantes para mí: a mis padres Eliseo y María que son los cimientos de mi formación; a mis hermanas Luvia, Liz y Scarlett, así como a mis cuñados Víctor, René y Hadid a quienes considero mis hermanos. Gracias por motivarme a alcanzar mis anhelos, cada uno ha dado aportes invaluable que me servirán para toda la vida; a mis sobrinos Camilo, Luna, Barack, Lucio y Mahal que son la razón por la que cada día quiero ser una mejor persona.

A ti Miguel, mi compañero y mejor amigo. Por acompañarme y ser tan generoso con tu conocimiento, por regalarme tu tiempo y por compartir el espacio.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN	4
3.1	<i>Ganglios Basales</i>	4
3.2	<i>Estriado y sus principales clases neuronales</i>	4
3.3	<i>Patrones de actividad de las SPNs</i>	6
3.4	<i>Componente GABAérgico de las neuronas espinosas de proyección</i>	7
3.5	<i>Corrientes de Ca²⁺ de las neuronas espinosas de proyección</i>	8
3.6	<i>Aferentes del núcleo estriado</i>	9
3.7	<i>Vías córticoestriatal y tálamoestriatal</i>	9
3.8	<i>Microcircuitos neuronales del núcleo estriado</i>	11
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
5.	OBJETIVOS	13
6.	HIPÓTESIS	14
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	15
7.1	<i>Modelos animales</i>	15
7.2	<i>Preparación de la rebanada</i>	16
7.3	<i>Electrofisiología</i>	16
7.4	<i>Identificación de neuronas registradas electrofisiológicamente</i>	16
7.5	<i>Estimulación</i>	17
7.6	<i>Imágenes de Ca²⁺</i>	17
7.7	<i>Procesamiento de imágenes</i>	18
7.8	<i>Identificación de neuronas registradas electrofisiológicamente</i>	18
7.9	<i>Detección de la actividad neuronal a partir de los videos de imagenología de Ca²⁺</i>	19
7.10	<i>Análisis de la actividad poblacional</i>	19
7.11	<i>Detección de ensambles neuronales</i>	20
7.12	<i>Identificación de dinámicas temporales de los ensambles neuronales</i>	20

7.13	<i>Análisis de datos y estadística</i>	22
7.14	<i>Fármacos</i>	22
8.	RESULTADOS	23
8.1	<i>La activación sináptica evoca diferentes dinámicas de Ca²⁺ + intracelular somática y el número de potenciales acciones evocados en las D1 y D2-SPNs</i>	23
8.2	<i>Papel de la inhibición en la integración sináptica de las SPNs</i>	28
8.3	<i>Acciones de los canales CaV₃ en la integración sináptica de las SPNs</i>	32
8.4	<i>Diferencias en la contribución de los canales CaV₃ durante las respuestas sinápticas supraumbrales en las SPNs</i>	36
8.5	<i>Los canales de CaV₃ se pueden detectar en potenciales sinápticos subumbrales</i>	40
8.6	<i>Efecto del bloqueo de canales CaV₃ en las curvas de intensidad-respuesta de potenciales sinápticos por debajo del umbral</i>	42
8.7	<i>Comparación de las entradas excitadoras al microcircuito estriatal</i>	45
8.8	<i>Importancia de las neuronas hub ante la estimulación cortical y talámica</i>	57
8.9	<i>La estructura jerárquica en microcircuitos del estriado control, estimulación cortical y talámica</i>	60
9.	DISCUSIÓN	63
9.1	<i>Contribución de los canales de CaV₃ en D1 y D2 - SPNs</i>	63
9.2	<i>Consecuencias de la expresión de diferentes canales de CaV₃ en la integración sináptica</i>	67
9.3	<i>Activación del microcircuito estriatal</i>	68
10.	CONCLUSIÓN	69
11.	BIBLIOGRAFÍA	71

1. RESUMEN

Se han reportado diferentes respuestas supraumbrales ante estimulación cortical en neuronas de proyección estriatales (SPN) de la vía directa (D1) e indirecta (D2) de roedores. Las respuestas consisten en potenciales sinápticos prolongados de origen polisináptico e intrínseco, en el que las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje desempeñan un papel relevante. Al estudiar simultáneamente las imágenes de Ca^{2+} y las respuestas de voltaje en el soma de estas neuronas, durante la activación de la vía corticoestriatal, mostramos que la codificación de respuestas sinápticas mediante trenes de potenciales de acción (PA) en las SPNs son diferentes: el disparo de PA en las D1-SPNs aumenta gradualmente, en paralelo a la entrada de Ca^{2+} , en función de la intensidad del estímulo. En contraste, las D2-SPNs alcanzan un número máximo de PA evocados desde bajas intensidades de estímulo, simultáneamente la entrada de Ca^{2+} se ve limitada y permanecen sin variación a pesar de aumentar la fuerza del estímulo. En este tipo de neuronas al alcanzarse cierta intensidad del estímulo se producen potenciales de Ca^{2+} propagados al soma que se ven reflejados como un aumento repentino en la amplitud de la señal de Ca^{2+} , a pesar de estos cambios el número de PA no se ve modificado, este fenómeno nunca se pudo observar en las D1-SPNs. Estos disparos de PA constantes a pesar de los estímulos cambiantes sugirieron la participación de potenciales inactivadores subyacentes. Descubrimos que las corrientes de Ca_v3 contribuyen a la entrada de Ca^{2+} en ambas clases de SPNs, pero tienen un efecto más notable en las D2-SPNs, donde se reveló un disparo de bajo umbral. El bloqueo de canales Ca_v3 retrasó el fuerte aumento de la activación en las D2-SPNs. El bloqueo de la inhibición aumentó el número de PA emitidos por las D2-SPNs, sin cambiar el disparo en las D1-SPNs. Estas diferencias en la integración sináptica permiten una disimilitud biofísica: la inhibición dendrítica parece ser más relevante para las D2-SPN. Esto podría implicar diferencias en los conjuntos de interneuronas que afectan a cada clase de SPN. Para describir estas interacciones en el circuito neuronal estriatal, registramos de manera simultánea decenas de neuronas mediante imagenología de calcio en el núcleo estriado. Se establecieron parámetros de estimulación que produjeron respuestas polisinápticas y supraumbrales tanto desde el

tálamo como desde la corteza, en ambos casos las neuronas mostraron respuestas colectivas coherentes con la teoría de los ensambles neuronales en el cerebro. Los patrones de respuesta muestran alternancia, recurrencia y exhiben ciclos reverberantes de actividad durante varios minutos después de la estimulación eléctrica. Sugerimos que las diferencias fisiológicas descritas para los dos tipos de aferentes no producen diferencias aparentes en cuanto a la capacidad de activar el microcircuito estriatal, sin embargo estos resultados no pueden descartar diferencias funcionales presinápticas entre ambos tipos de aferentes.

2. ABSTRACT

Different corticostriatal suprathreshold responses in direct and indirect striatal projection neurons (SPNs) of rodents have been reported. Responses consist in prolonged synaptic potentials of polysynaptic and intrinsic origin, in which voltage-gated Ca^{2+} currents play a role. Recording simultaneous Ca^{2+} imaging and voltage responses at the soma, while activating the corticostriatal pathway, we show that encoding of synaptic responses into trains of action potentials (APs) is different in SPNs: firing of APs in D1-SPNs increase gradually, in parallel with Ca^{2+} entry, as a function of stimulus intensity. In contrast, D2-SPNs attain a maximum number of evoked spikes at low stimulus intensities, Ca^{2+} entry is limited, and both remain the same in spite of increasing stimulus strength. Stimulus needs to reach certain intensity, to have propagated Ca^{2+} potentials to the soma plus a sudden step in Ca^{2+} entry, without changing the number of fired APs, phenomena never seen in D1-SPNs. Constant firing in spite of changing stimulus, suggested the involvement of underlying inactivating potentials. We found that Ca_v3 currents contribute to Ca^{2+} entry in both classes of SPNs, but have a more notable effect in D2-SPNs, where a low-threshold spike was disclosed. Blockade of Ca_v3 channels retarded the steep rise in firing in D2-SPNs. Inhibition block increased the number of spikes fired by D2-SPNs, without changing firing in D1-SPNs. These differences in synaptic integration enable a biophysical dissimilarity: dendritic inhibition appears to be more relevant for D2-SPNs. This may imply distinctions in the set of interneurons affecting each SPN class.

3. INTRO DUCIÓN

3.1 Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB) son un grupo de estructuras subcorticales presentes en los vertebrados y conectan a la corteza cerebral con una gran cantidad de sistemas neuronales que afectan el comportamiento. Su función más conocida es la de ejercer control sobre los movimientos motores voluntarios (Graybiel, 1997; Kravitz et al., 2010). Además, los GB participan en múltiples funciones sensoriales, en tareas de aprendizaje motor, cognitivas, de toma de decisiones, motivacionales y emocionales (DeLong & Wichmann, 2015; Graybiel & Smith, 2014).

La mayor parte de la neuroanatomía de los GB ha sido estudiada en roedores y confirmada en primates. Los núcleos que componen los GB en los roedores son el estriado (NE), el globo pálido en su porción interna y externa (globo pálido interno y globo pálido externo, la sustancia nigra en su parte reticulata y compacta y el núcleo subtalámico. El modelo clásico de funcionamiento de los GB se fundamenta en que la información aferente se procesa en el NE y se envía a través de las neuronas espinosas medianas de proyección (SPNs) de manera directa e indirecta hacia los núcleos de salida de los GB (globo pálido interno y substantia nigra reticulata). Estas dos vías de salida poseen SPNs que se diferencian en la expresión de sus receptores a dopamina y distintos neuropéptidos (Gerfen et al., 1990). Este modelo ha suministrado las bases para comprender los cambios funcionales ocurridos en los GB en desordenes del movimiento tales como la enfermedad de Parkinson, discinesia tardía, entre otros (Albin et al., 1989; DeLong, 1990).

3.2 Estriado y sus principales clases neuronales

El NE es el núcleo con mayor tamaño de los GB y el principal núcleo de entrada de información al sistema. Recibe aferentes glutamatérgicas provenientes de prácticamente toda la corteza cerebral y de los núcleos intralaminares del tálamo, es decir, recibe copias de órdenes y de programas motores planeados y en ejecución (Bargas & Galarraga, 2000). En el NE se puede hacer una división anatómica y funcional, la región dorsomedial se ha relacionado con funciones sensoriales, motrices y asociativas. En la región ventral se

encuentra el núcleo accumbens, el cual se relaciona con el sistema de recompensa (Schultz, 2016) mientras que el estriado dorsolateral recibe los comandos de la corteza somatosensorial (McGeorge & Faull, 1989; Ragsdale & Graybiel, 1981).

Las SPNs constituyen el 95 % de la población neuronal del NE, se caracterizan por liberar el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) y toman su nombre debido a sus características morfológicas: el tamaño de sus somas es de 12-20 μm de diámetro; sus dendritas moderadamente arborizadas llenas de espinas; y su axón principalmente proyecta fuera del estriado hacia otras estructuras (globo pálido interno y substantia nigra reticulata) aunque también posee axones colaterales que inervan al mismo estriado (Kawaguchi et al., 1990; DiFiglia et al., 1976). Estas neuronas están distribuidas de manera homogénea en el NE, en contraste con la organización citoarquitectónica de otras regiones del cerebro (Kemp & Powell, 1971) y son las principales neuronas de salida del NE.

Las SPNs se dividen clásicamente en dos grandes poblaciones, las neuronas de la vía directa y de la vía indirecta. Las diferencias se encuentran en los distintos núcleos de proyección de sus neuronas, en la expresión de subtipos de receptores de dopamina, así como una variedad de otros marcadores moleculares.

Las SPNs de la vía directa (D1-SPNs) están caracterizadas por la alta expresión de receptores a dopamina de la subclase D1, las proteínas G estimuladoras G_s y G_{olf} , y los neuropéptidos sustancia P y dinorfina. Estas neuronas proyectan directamente hacia los núcleos de salida de los GB (globo pálido interno y substantia nigra reticulata). Por otro lado, las SPNs de la vía indirecta (D2-SPNs), que envían sus axones al globo pálido externo y se caracterizan por la alta expresión de receptores a dopamina de la subclase D2, el receptor de adenosina A2A y la coexpresión de encefalinas (Gerfen et al., 1990). Además de lo anterior, una manera inequívoca para diferenciar a estas neuronas es su respuesta electrofisiológica supraumbral (Flores-Barrera et al., 2009; Arias- García et al., 2017).

El restante 5% de la población neuronal total está constituido por una amplia diversidad de interneuronas que se pueden dividir en dos categorías: las interneuronas gigantes no espinosas colinérgicas, que constituyen el 0.5-1% de la población total del NE (Bolam et al., 1984; Kawaguchi & Kubota, 1993), y los diferentes subtipos de interneuronas GABAérgicas

que forman el resto 3-4% (Kita, 1993). Estos conjuntos de interneuronas por lo regular no proyectan fuera del NE (DiFiglia et al., 1976; Bishop et al., 1982).

Otra clasificación de las interneuronas del NE usada comúnmente en la literatura, a partir de sus propiedades inmunocitoquímicas, electrofisiológicas y anatómicas que divide a estas en tres grupos: las interneuronas que expresan parvalbúmina (PV) o de disparo rápido (FS), cuya principal característica es la presencia de trenes de potenciales de acción capaces de alcanzar altas frecuencias (>200 espigas/s), además poseen una espesa arborización axónica (Tepper et al., 2010; Kawaguchi et al., 1995; Kawaguchi, 1993,1997); las interneuronas colinérgicas (ChAT o TAN), estas neuronas por lo general presentan potenciales de acción de manera tónica y son positiva histoquímicamente a acetilcolinesterasa (Wilson et al., 1990); por último, las interneuronas que liberan neuropéptido Y, óxido nítrico sintasa (NOS) y somatostatina (SOM) conocidas comúnmente como interneuronas NPY o LTS, estas células generan espigas de Ca^{2+} de bajo umbral de activación (generados por canales de Ca^{2+} tipo T), que en consecuencia genera ráfagas de potenciales de acción. Llegan a generar potenciales prolongados en forma de meseta en respuesta a pulsos despolarizantes en el soma, por lo cual también se les denomina PLTS, su arborización dendrítica y axónica es menor con respecto a las neuronas de proyección (Kawaguchi, 1993,1995, 1997; Tepper et al., 2010).

3.3 Patrones de actividad de las SPNs

Las SPNs reciben miles de entradas sinápticas excitadoras ubicadas mayoritariamente en sus espinas dendríticas, sin embargo, las SPNs son células inhibitoras y por lo tanto no son capaces de proveer una fuente de retroalimentación excitadora hacia la red neuronal estriatal. En su lugar las SPNs pueden exhibir un comportamiento comúnmente relacionado con dos estados, uno inactivo y otro activo, debido a sus propiedades intrínsecas o bien, porque están en una red que se los impone y pueden expresarse como parte de una variedad de estados de actividad. Estos mecanismos que dan lugar a potenciales de membrana preferidos se pueden clasificar mejor según la estabilidad intrínseca de cada estado. En el cuerpo estriado el potencial de reposo de las SPNs es cercano a -85 mV y tanto

in vivo como *in vitro* se ha demostrado que estas neuronas se mueven entre un estado inactivo hiperpolarizado cercano al reposo (-80 mV, *down-state*) y uno activo despolarizado (-50 mV, *up-state*) en respuesta a su entrada sináptica. La estimulación cortical y/o talámica son necesarias para la generación de *up-states* en las SPNs (O'Donnell & Grace, 1995; Wilson et al, 1993; Wilson & Kawaguchi, 1996; Kasanetz et al, 2006) y se han observado durante la ejecución de movimientos (Mahon et al, 2006) y después de la administración de NMDA en preparaciones estriatales *in vitro* (Vergara et al, 2003). Por otro lado, el consenso explicativo de los *down-states* gira en torno a las colaterales axónicas inhibitorias de las SPNs, las cuales al ser excitadas producen una fuerte inhibición sobre las SPNs débilmente excitadas favoreciendo que permanezcan en *down-state*. Estos efectos de red más las propiedades intrínsecas de las SPNs, aunado a las entradas excitadoras al estriado permite que los grupos de neuronas pasen de un estado activado al otro.

3.4 Componente GABAérgico de las neuronas espinosas de proyección

Las diferencias en la inhibición GABAérgica entre las D1-SPNs y las D2-SPNs durante respuestas córticoestriatales supraumbrales pueden inferir sus marcadores moleculares (Flores-Barrera et al., 2010). Las respuestas de D1-SPNs son más prolongadas y las respuestas de D2-SPNs repolarizan más rápidamente después de breves trenes de potenciales de acción. La inhibición inicialmente hiperpolariza a las D1-SPNs con respecto al umbral de disparo, restringiendo así el disparo inicial, pero más tarde ayuda a mantener una despolarización en meseta (Bartos et al., 2007). Por el contrario, la inhibición es sólo hiperpolarizante con respecto al umbral de disparo en las D2-SPNs (Flores-Barrera et al., 2009).

El comportamiento anterior se explica en parte por la distribución diferente de las corrientes intrínsecas que modifican los componentes sinápticos durante las respuestas ortodrómicas, es decir, por la participación de las conductancias de potasio dependientes de Ca^{2+} (Kca's) tipo BK y SK, las cuales son fundamentales para entender la diferente integración sináptica que las D1-SPNs y las D2-SPNs exhiben al recibir comunicación sináptica de la corteza y del tálamo. En el caso particular de las D1-SPNs, las Kca's tienen

una activación paulatina y sostenida durante la respuesta sináptica supraumbral, mientras que en las D2-SPNs las Kca's tienen una activación cuasi-instantánea y transitoria durante la respuesta sináptica supraumbral (Arias-García et al., 2013).

3.5 Corrientes de Ca²⁺ de las neuronas espinosas de proyección

La principal vía de entrada de Ca²⁺ en las neuronas es a través de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, los cuales están involucrados y son claves en una gran variedad de procesos regulatorios celulares (Rasmussen & Barrett, 1984; Miller, 1988;).

Se han descrito e identificado varios tipos de canales de Ca²⁺ activados por voltaje en las SPNs: por un lado, los canales de bajo umbral de activación tipo T de inactivación rápida, y por otro lado los canales de alto umbral de activación, el tipo L de inactivación lenta, el tipo N de inactivación intermedia, los canales P/Q de inactivación lenta e intermedia respectivamente y los R de inactivación rápida. El principal efecto de la presencia de estos canales en las SPNs es la de proporcionar diferentes características al patrón de disparo de estas neuronas (Bargas et al., 1994).

Las corrientes de Ca²⁺ de tipo L (CaV₁), contribuyen con una despolarización lenta que facilita el disparo repetitivo de las SPNs (Hernández-López et al., 1997; Pérez-García et al., 2003b). Por otro lado, el Ca²⁺ que entra por los canales N y P/Q, activan corrientes salientes de potasio de tipo SK y BK que determinan la aparición de un postpotencial hiperpolarizante (PPH), y que por tanto reprimen el disparo de estas neuronas (Vilchis et al., 2000; Pérez-García et al., 2003b).

Por su parte los canales de Ca²⁺ de tipo T (CaV₃) generan espigas de Ca²⁺ de bajo umbral, despolarizaciones de rebote, aumento y repolarización rápida de respuestas sinápticas (Pérez-Reyes, 2003,). En las dendritas, pueden contribuir a generar transiciones de estado (Kerr & Plenz, 2002; Carter & Sabatini, 2004; Plotkin & Surmeier, 2011, 2014), dar forma a respuestas supraumbrales (Galarraga et al., 1997; Carter et al., 2007; Flores-Barrera et al., 2009; Vizcarra-Chacón et al., 2013), y generar potenciales de Ca²⁺ autoregenerativos (Bargas et al., 1991a; Day et al., 2008; Flores-Barrera et al., 2010; Arias-García et al., 2013).

3.6 Aferentes del núcleo estriado

El NE está situado en un punto donde favorece la convergencia de aferentes glutamatérgicas de forma masiva provenientes de la capa V de la corteza cerebral (Kemp & Powell, 1970; McGeorge & Faull, 1989) y de los núcleos intralaminares talámicos (McFarland & Haber, 2000; Smith et al., 2004). Además, recibe aferentes dopaminérgicas procedentes de la SNc (Wilson, 2004), aferentes colinérgicas del núcleo pedúnculo pontino y el núcleo tegmental laterodorsal del tallo cerebral (Dautan et al., 2016) y recientemente descrito, aferentes del GPe (Saunders et al., 2016).

De esta manera, el NE es el principal sitio de integración de información en los GB. (Kemp & Powell, 1971; Zheng & Wilson, 2002).

3.7 Vías córticoestriatal y tálamoestriatal

La transmisión sináptica de las vías córticoestriatal y tálamoestriatal se considera de vital importancia en el control motor, en funciones cognitivas, de plasticidad y en desordenes neurodegenerativos de los GB (Calabresi et al., 2000).

Los estudios anatómicos y de comportamiento sugieren fundamentalmente diferentes funciones de estas dos vías. Primero, el sistema córticoestriatal está relacionado con la realización de tareas voluntarias y/o habituales dirigidas a alcanzar metas (Balleine et al., 2007, 2009). En general se piensa que esta vía proporciona información a los GB sobre la cual se seleccionan y modifican las acciones motoras provenientes de la corteza cerebral. Por otro lado, el sistema tálamoestriatal, que se origina principalmente en los núcleos intralaminares del tálamo (parafascicular y centromedial) es el sustrato neural para los turnos de atención, el cese de la actividad motora en curso cuando aparece un estímulo ambiental saliente y en la iniciación y ejecución de secuencias de movimientos (Lacey et al., 2005; Raju et al., 2008; Díaz-Hernández et al., 2018).

Estas dos principales aferencias excitadoras al NE se pueden diferenciar por la expresión del transportador vesicular de glutamato (VGLuTs). El ácido ribonucleico mensajero (mRNA) para VGLuT1, pero no para VGLUT2 se expresa masivamente en las neuronas neocorticales, incluyendo la capa V de las neuronas córticoestriatales, mientras que mRNA para VGLuT2,

pero no para VGLUT1 es altamente expresado en las neuronas del tálamo que proyectan al NE (Fremeau et al., 2001).

Los análisis cuantitativos revelan que las aferencias córticoestriatales y tálamoestriatales inervan en un grado similar tanto a las neuronas espinosas medianas de la vía directa como de la vía indirecta (Lacey et al., 2005; Raju et al., 2008). Sin embargo, estas dos aferencias anatómicamente son muy diferentes, las terminales axónicas de las neuronas piramidales corticales inervan profusamente al NE dejando sólo algunos contactos sinápticos sobre las espinas dendríticas de las SPNs (Cowan & Wilson, 1994). En cambio, las reconstrucciones axónicas de la vía tálamoestriatal, muestran que estas terminales se ramifican y van dejando pequeños racimos axónicos que posiblemente dejen varios botones terminales sobre las SPNs (Deschênes et al., 1995, 1996).

Por otro lado, de todas las sinapsis corticales en el NE, el 90% se forman en las espinas dendríticas y solo el 5% en los ejes dendríticos. El restante 5% de las sinapsis se llevan a cabo en el soma de las neuronas del NE (Cowan & Wilson, 1994). El número de sinapsis provenientes de la vía tálamoestriatal es similar al de la vía córticoestriatal (Lacey et al., 2005; Raju et al., 2008), la única diferencia entre ellos es que las aferentes provenientes del núcleo intralaminar hacen contacto preferencial con los ejes dendríticos más que con las espinas, a diferencia de las provenientes del núcleo parafascicular que son similares en este aspecto a las de la vía córticoestriatal (Lacey et al., 2007).

Ante la evidencia mostrada, los circuitos neuronales presentes en el NE reciben en términos generales igual grado de entradas excitadoras procedentes de ambas vías sinápticas (Vandermaelen & Kitai, 1980; Ding et al., 2008).

Una de las más importantes diferencias descritas entre ambas vías tiene que ver con la innervación preferencial sobre tipos neuronales en el NE, se ha descrito que la vía córticoestriatal inerva preferencialmente a las interneuronas PV y la vía tálamoestriatal a las interneuronas ChAT (Deschênes et al., 1996; Smith et al., 2004; Raju et al., 2006; Lacey et al., 2007). La pregunta que surge al ver este diseño anatómico es si de alguna manera está relacionado con una diferencia funcional, estudios recientes (Arías-García et al., 2018) muestran que la innervación del tálamo o de la corteza no es electrofisiológicamente

diferente sobre las principales clases de interneuronas estriatales, aunque el tema sigue a discusión por otros grupos de trabajo (Tepper & Koós, 2016).

3.8 Microcircuitos neuronales del núcleo estriado

Las neuronas no trabajan de manera aislada, forman grupos que funcionalmente realizan las mismas tareas (responden a un estímulo dado), a este conjunto de neuronas se les denomina ensambles neuronales. Al conjunto de ensambles neuronales que se combinan de forma iterativa y difusa para formar tareas cada vez más complejas los conocemos como microcircuitos neuronales.

Las bases teóricas del funcionamiento de estos microcircuitos fueron dadas en 1949 por Donald Hebb en sus famosos postulados que plantean que las sinapsis que más se usan se refuerzan (potenciación de largo plazo) y las que menos se usan se debilitan (depresión de largo plazo). De aquí que, si las sinapsis cambian su fuerza con el uso, entonces deberían formarse circuitos conectados de forma preferente para el flujo de la actividad neuronal (Hebb, 1949).

Hebb postuló además que lo que fluye por el microcircuito neuronal es el disparo sincronizado o correlacionado de estos ensambles neuronales antes mencionados. Sugirió que estos ensambles se asocian y se disocian alternándose la actividad. La plasticidad sináptica en las redes neuronales es fundamental para la reorganización de redes mediante los mismos circuitos ya establecidos.

La actividad de estos ensambles neuronales ha mostrado ser recurrente (lo sugiere la plasticidad sináptica), alternante (principio de inhibición recíproca), y reverberante (Grillner 2006; Carrillo-Reid et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2016). Estas reverberaciones se activarían de manera coordinada cuando sea necesario realizar rutinas de trabajo, evocar recuerdos o hacer computaciones internas (Einchenbaum & Davies, 1998). La actividad de estos pequeños ensambles neuronales resultaría ser el sustrato neuronal sobre el cual se construyen los procesos relacionados con el aprendizaje y condicionamiento.

Las neuronas estriatales en condiciones basales presentan pocos potenciales de acción *in vitro* (Crutcher & DeLong, 1984; Kimura, 1992; Carrillo-Reid et al., 2008). Debido a esto el

NE está clasificado como un núcleo “silente”; es una de las características especiales que lo hace distinto con el resto de los núcleos de los GB (Kita & Kitai, 1991; Ibanez-Sandoval et al., 2007).

El NE sale de este estado silente cuando es activado por la corteza, o por el tálamo (Brown & Hestrin, 2009; Smith y Bolam, 1990). Las múltiples acciones del glutamato son mediadas por los receptores NMDA, AMPA y kainato (Ozawa et al., 1998).

El resultado de la estimulación cortical o talámica puede presentar respuestas sinápticas que duran cientos de milisegundos, capaces de generar trenes de potenciales de acción (Bargas et al., 1991; Kita, 1996). Estas respuestas incluyen entradas polisinápticas o reverberantes que sugieren la participación de todo el microcircuito estriatal además de respuestas autoregenerativas intrínsecas, (Wilson, 1986; Bargas et al., 1991; Kita, 1996; O’Donnell, 2003; Vergara et al., 2003; Flores-Barrera et al., 2009) y son el primer paso para el procesamiento e integración del microcircuito estriatal (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a). Es posible que en el microcircuito estriatal las interneuronas dirijan la dinámica de selección de ensambles neuronales (formados principalmente por SPNs) para habilitar salidas de información (estados de activación); mientras que las SPNs al ser dirigidas por las interneuronas, filtran la información de entrada, participan en múltiples estados de activación de la red estriatal y al alternarse se logra mantener una memoria del comando motor ejecutado (Carrillo-Reid et al., 2008; López-Huerta et al., 2013; Vizcarra-Chacón et al., 2013).

Por mucho tiempo el control de la salida funcional del estriado se le ha asignado a la inhibición de tipo *feedforward* (inhibición que las interneuronas GABAérgicas ejercen sobre las SPNs) ya que es bastante robusta. La conexión de una sola de estas interneuronas con las SPNs es capaz de retrasar su disparo, teniendo un fuerte control sobre la excitabilidad y salida funcional de las SPNs (Koós & Tepper, 1999). Pero ahora se sabe que la inhibición *feedback* (inhibición sobre las SPNs por las colaterales axónicas que las SPNs) es lo suficientemente fuerte como para controlar el disparo de los ensambles neuronales en el microcircuito estriatal (López-Huerta et al., 2013).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las respuestas de las D1-SPNs y las D2-SPNs son muy diferentes y en este trabajo nos planteamos estudiar los canales de Ca^{2+} para poder observar alguna contribución en estas diferencias. Previamente se han descrito y estudiado los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente en las SPNs (L, N, P/Q y R) registradas en neuronas disociadas (sin dendritas) y sujetas a modulación de transmisores a través de diferentes receptores (dopaminérgicos, muscarínicos, somatostatinérgicos, adrenérgicos etc) (Bargas et al., 1991, 1994).

Una alternativa para poder explicar estas diferencias es la distribución y expresión diferente de las corrientes de Ca^{2+} , ya que se sabe que su localización en la membrana somatodendrítica depende del desarrollo embrionario (Salgado et al., 2005).

Se ha reportado que los canales de Ca^{2+} tipo T se pueden registrar en somas aislados de neuronas SPNs inmaduras, pero no se han observado en SPNs. Esta clase de canales de Ca^{2+} (T) se han descrito en las espinas dendríticas de las SPNs (Carter & Sabatini, 2004) sin diferenciar el tipo de neurona SPNs.

Hasta el momento se desconoce la función de estos canales en las espinas dendríticas de las SPNs y tampoco se sabe si existen diferencias funcionales entre las SPNs por la expresión de estos canales en sus dendritas.

De haber diferencias ¿Qué implicaciones tendría en el microcircuito estriatal?, ¿Qué diferencias podría haber para la integración de las entradas sinápticas al estriado (corteza vs tálamo)? y ¿Qué diferencias en el disparo neuronal podría haber entre las D1 y D2-SPNs?

5. HIPÓTESIS

La expresión de canales CaV_3 en las SPNs es diferente, por lo que la integración de las respuestas sinápticas es distinta en los dos tipos neuronales de SPNs (tipo D1 y D2).

Mediante el bloqueo de los canales CaV_3 podrán estudiarse características distintivas en las D1-SPNs y D2-SPNs, si, además observamos simultáneamente la dinámica de Ca^{2+} en estos experimentos tendremos más herramientas para dilucidar la participación de estas neuronas y el efecto de los canales CaV_3 en el microcircuito estriatal.

Las D1-SPNs y D2-SPNs procesan de distinta manera la información en términos de potenciales de acción generados ante su integración sináptica.

En el NE existen grupos de neuronas con actividad correlacionada que se asocian a lo largo de varios segundos y cuya actividad puede evocarse con un estímulo eléctrico “adecuado”. Si esto es cierto entonces el NE puede activarse por estimulación eléctrica de la vía córticoestriatal y tálamoestriatal, sus principales aferentes, sin la aplicación de NMDA. Se podrá cuantificar el efecto a nivel de red de la estimulación por ambas vías aferentes.

6. OBJETIVOS

Diferenciar las poblaciones de D1-SPNs y D2-SPNs mediante marcadores moleculares o huellas electrofisiológicas.

Estudiar las dinámicas de Ca^{2+} y de potenciales de acción generados en las D1-SPNs y D2-SPNs, producidas de manera ortodrómica y mediante estimulación somática directa.

Estudiar el efecto de bloquear el componente gabaérgico en: las respuestas sinápticas, en la dinámica de Ca^{2+} y en los potenciales de acción generados por las SPNs.

Estudiar la participación de canales de calcio tipo CaV_3 durante los transitorios de calcio provocados por estimulación ortodrómica.

Disecar la contribución de los canales CaV_3 en presencia de bicuculina.

Establecer las bases de codificación de las SPNs ante un estímulo eléctrico.

Estudiar los componentes y la dinámica del microcircuito estriatal estimulando las vías córticoestriatal y tálamoestriatal.

Cuantificar parámetros de redes que nos permitan sintetizar el comportamiento de estos microcircuitos neuronales.

7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Modelos animales

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices internacionales para el uso ético de animales experimentales establecidos en las pautas del *National Institutes of Health* y los protocolos detallados fueron presentados y aprobados por el

Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (NOM-062-Z00-1999; procedimientos de laboratorio EGP-41-14). Los roedores fueron alojados en una sala libre de patógenos, en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, con una temperatura controlada, y que permite la comida y el agua a voluntad. Se minimizo la cantidad de animales usados en los experimentos con el fin de evitar el sufrimiento animal, pero manteniendo la significancia estadística.

Se realizaron registros electrofisiológicos in vitro, imágenes de Ca^{2+} en el soma e inmunocitoquímica para identificar las neuronas en ratas y ratones entre los días postnatales (DP) 30–60 (juvenil a adulto joven, macho o hembra). Los registros electrofisiológicos en célula entera y las imágenes de Ca^{2+} se realizaron simultáneamente en varios experimentos (ver más abajo). Se usaron las siguientes cepas: (a) ratas Wistar, (b) Tg (Drd1-EGFP) X60Gsat / Mmmh (BAC-D1; Nathaniel Heintz, The Rockefeller University, GENSAT n°: 000297-MU), (c) Tg (Drd2-EGFP) S118Gsat / Mmnc (BAC-D2; Nathaniel Heintz, The Rockefeller University, 000230-UNC) y (d) ratones C57BL / 6 NCRL. No se encontraron diferencias en las repuestas estudiadas entre especies dentro de cada clase neuronal estudiada (D1 y D2-SPNs; Arias-García et al., 2018), lo cual es evidencia de la robustez entre especies/cepas de los resultados que obtuvimos. Por lo tanto, nuestros resultados muestran experimentos de ratones o ratas, consideramos repetitivos y un desperdicio de animales ilustrar cada experimento en ratones y ratas como muestras separadas. En su lugar, se agrupan los casos de diferentes sujetos experimentales como en trabajos anteriores (Arias-García et al., 2018). Todas las diferencias descritas hasta ahora se han reproducido de manera similar en ambas especies (Arias-García et al., 2013; Vizcarra - Chacón et al., 2013) y los resultados en este trabajo no son una excepción.

7.2 Preparación de la rebanada

Los sujetos se anestesiaron intraperitonealmente con ketamina (85 mg / kg) - xilazina (15 mg / kg) y se perfundieron con una solución salina helada (que contiene en mM: 120 NaCl, 3 KCl, 25 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$ y 11 glucosa, 300 mOsm / l, pH 7,4, gaseado con 95% de O_2 y 5% CO_2) para remover sus cerebros y preservar la viabilidad celular.

Un total de 58 animales fueron utilizados en este estudio. Se obtuvieron rebanadas parasagitales que incluían el neostriado (250–350 μm de espesor) utilizando un vibratomo (Pelco, Ted Pella, Redding, CA, EE. UU.) y se incubaron en solución salina a temperatura ambiente durante al menos 1 h. Después, las rebanadas se transfirieron a una cámara de registro sumergida y se perfundieron continuamente con la solución salina (Flores-Barrera et al., 2010).

7.3 Electrofisiología

Los registros de voltaje se realizaron a partir de las SPNs del estriado dorsomedial o dorsolateral usando pipetas de parche (3–6 $\text{M}\Omega$) llenas con (en mM): 115 K_2HPO_4 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 0,5 EGTA, 0,2 Na_2ATP , 0,2 Na_3GTP , biocitina al 0,5% y fluo-4 (20-30 μM ; Arias-García y otros, 2018).

Las respuestas se adquirieron con un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments, Foster City, CA, EE. UU.). Las señales fueron digitalizadas a 10 kHz usando una tarjeta AT - MIO - 16E4 (National Instruments, Austin, TX, EE. UU.) y se guarda en una computadora PC usando Im-Patch ©, un software de acceso abierto diseñado en LabView (National Instruments; <http://www.im-patch.com>).

7.4 Identificación de neuronas registradas electrofisiológicamente

Se identificaron las SPNs dentro del cuerpo estriado dorsal de ratones eGFP BAC-D1 o BAC-D2 por su expresión aumentada de proteína verde fluorescente (eGFP) utilizando microscopía de epifluorescencia. Los registros electrofisiológicos (respuestas sinápticas supraumbrales) predijeron células positivas o negativas eGFP con una precisión superior al 95%. También se inyectó biocitina para el etiquetado doble (Arias-García et al., 2018; Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013). Las rebanadas se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS, se cortaron en un vibratomo a 40 μm y se incubaron en estreptavidina conjugada con Cy3 1:200 disuelto en PBS (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, ESTADOS UNIDOS).

7.5 Estimulación córticoestriatal

La disposición de electrodos necesaria para obtener respuestas córticoestriatales por encima del umbral se ha descrito anteriormente (Flores-Barrera et al., 2009). Brevemente, la estimulación de las áreas sensoriomotora corticales se realizó con electrodos bipolares concéntricos (25–50 μm en la punta; FHC, Bowdoinham, ME, EE. UU.; el uso de los mismos electrodos es importante para tener un estímulo estereotipado reproducible). Un solo pulso cuadrado de 0,1 ms se suministró para evocar las respuestas sinápticas deseadas, mientras que el potencial de membrana de las SPNs se mantuvo a -80 mV cerca del potencial de reposo o "*down-state*" de estas células (un potencial de mantenimiento constante también es importante para lograr un estímulo estereotipado reproducible). Para comparar la integración sináptica entre las D1 y D2-SPNs, se utilizó un tren de cuatro potenciales sinápticos a 20 Hz en la mayoría de los experimentos.

La variación de la intensidad del estímulo (0.2–0.68 μA) produjo una serie de respuestas sinápticas que aumentan en amplitud y evocan potenciales de acción (AP).

7.6 Imágenes de Ca^{2+}

Se obtuvieron imágenes de Ca^{2+} en el soma con resolución de célula única y registros electrofisiológicos en célula entera simultáneos utilizando un microscopio equipado con un objetivo de inmersión en agua de 40 \times (XLUMPlanFI, Olympus, Center Valley, PA, EE. UU.), que proporciona un campo de imagen de 190 \times 190 μm de tamaño. Para observar los cambios en la fluorescencia, se enviaron pulsos de luz con una longitud de onda de 488 nm que fueron entregados a la preparación a través de un iluminador Lambda LS (Sutter Instruments, Petaluma, CA, EE. UU.) conectado al microscopio a través de fibra óptica. Se adquirieron secuencias de imágenes (películas cortas) con una cámara de alta resolución que cuenta con sistema de refrigeración para disminuir el ruido de las imágenes (CoolSnap K4, Photometrics, Tucson, AZ, EE. UU.; consulte Pérez-Ortega et al., 2016) a una tasa de adquisición de 4-6 Hz (60-100ms de tiempo de exposición) a intervalos de tiempo de 5–10 min durante los experimentos que duraron al menos 1h. La corteza cerebral se estimuló con un tren de cuatro pulsos a 20 Hz. Las neuronas fueron primero identificadas por su perfil

electrofisiológico (Arias-García et al., 2018; Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013), lo que permite que transcurra un tiempo necesario para que el indicador de Ca^{2+} , fluo-4 Salt (20–30 μM) (Invitrogen, Carlsbad, CA), contenido en las pipetas difunda desde el soma a las dendritas. Los transitorios de Ca^{2+} fueron analizados posteriormente a los experimentos (*off-line*).

7.7 Procesamiento de imágenes

El procesamiento de imágenes se realizó con Image J (v.1.49q, National Institutes of Health) y programas personalizados escritos en MATLAB (The Math-Works, Natick, MA). Las regiones de interés (ROI) correspondientes a los contornos somáticos se identificaron manualmente con una plantilla circular cuyo radio que se eligió en cada caso. Las señales de fluorescencia dependientes de Ca^{2+} dentro de cada ROI se calcularon a lo largo del tiempo como $(F_i - F_o) / F_o$, donde F_i : intensidad de fluorescencia en cualquier cuadro y F_o : intensidad de fluorescencia de fondo local (4 veces el diámetro de ROI). De esta manera se corrigieron los fenómenos de fotoblanqueo y ruido. Todas las grabaciones fueron examinadas manualmente para eliminar artefactos.

7.8 Detección de la actividad neuronal a partir de los videos de imagenología de Ca^{2+}

Para inferir la actividad neuronal dada la señal de fluorescencia (imagenología de Ca^{2+}) se usó una versión modificada del algoritmo *fast-oopsi* (Vogelstein et al., 2010). Este algoritmo entrega para cada neurona una señal que corresponde a la probabilidad de disparo de potenciales de acción en cada instante de tiempo, se calculó la desviación estándar (SD) de cada señal y si el valor superaba un umbral de 2 SD se consideraban como potenciales de acción (actividad neuronal); los valores que superaron el umbral antes descrito se establecieron en 1 y los valores inferiores en 0. Estos valores se inspeccionaron visualmente para no confundirlos con el ruido en las grabaciones. De esta manera, se obtuvo un vector fila binario $1 \times F$ para cada neurona donde F indica el número de cuadros en el video y cuyos valores representan la actividad de la neurona en cada instante de tiempo. Luego construimos una matriz (matriz de rastreo) con estos vectores binarios $N \times F$, donde N

denota el número de neuronas analizadas. Estos datos de actividad binarios se utilizaron para análisis posteriores.

7.9 Análisis de la actividad poblacional

Para asegurarnos de considerar en nuestros análisis solamente conjuntos de neuronas que se mantienen interactuando durante el transcurso de los experimentos, calculamos el coeficiente de correlación de Pearson entre la actividad de cada par de neuronas en cada matriz de rastreo (filas en la matriz de rastreo binaria $N \times F$ mencionada en la sección anterior). Este cálculo produce una matriz de correlación $N \times N$ simétrica, las correlaciones negativas se establecieron en cero. Un valor en la matriz de correlaciones cercano a uno representa una alta correlación entre los dos patrones de actividad de un determinado par de neuronas de la población total durante el experimento. Posteriormente colocamos un umbral para preservar una proporción significativa del 5% de las correlaciones más altas. La matriz resultante la llamamos matriz de similitud significativa.

7.10 Detección de ensambles neuronales

Después de obtener la matriz similitud significativa de la actividad neuronal a lo largo del tiempo, definimos una red funcional ponderada con los valores de dicha matriz (Bruno et al., 2015). Para encontrar una división óptima de la red en grupos de neuronas con patrones de actividad semejantes, calculamos el parámetro de redes conocido como modularidad (Newman, 2006) definida formalmente como $Q = \{\text{número de enlaces dentro de un módulo}\} - \{\text{número esperado de dichos enlaces}\}$. Este algoritmo maximiza la división de redes en grupos muy interconectados entre si y poco conectados con los demás grupos presentes en la red, además tiene la ventaja de determinar automáticamente el número de grupos presentes. La maximización del parámetro de modularidad Q de la red funcional ponderada (formada por la matriz de similitud y por lo tanto cada conexión informando acerca de la similitud en el patrón de disparo de las neuronas) revela los ensambles neuronales en el experimento, entendiéndose estos como grupos de neuronas con patrones semejantes de actividad correlacionada significativamente durante el experimento. Los análisis se

realizaron con programas personalizados escritos en MATLAB (The Math-Works, Natick, MA). Este programa incluía algunos algoritmos de la caja de herramientas de conectividad cerebral (<https://sites.google.com/site/bctnet/>). La visualización de la red se realizó utilizando la plataforma de visualización de grafos de código abierto Gephi (<https://gephi.org/>).

7.11 Identificación de dinámicas temporales de los ensambles neuronales

La coactividad de las neuronas se calculó sumando las columnas de la matriz de rastreo, en ciertos periodos de tiempo es posible observar que los distintos ensambles neuronales suelen tener periodos con mayor actividad de las neuronas que los forman. El número significativo de neuronas coactivas significativamente en cada ensamble neuronal en un momento dado de tiempo (eventos de ensamble) se calculó obteniendo los valores más altos en la distribución acumulativa de las neuronas activas en cada cuadro del video. Estos valores se corroboraron contra los obtenidos bajo la hipótesis nula de que las neuronas se disparan al azar. Para estas pruebas, los datos de actividad se permutaron barajando la actividad de cada neurona en un momento dado, manteniendo sus niveles de actividad y el intervalo de tiempo entre la actividad neuronal durante el experimento. En todos los casos, el umbral elegido (5% de los valores más altos) supera las pruebas de significación a las que fue sometido bajo el paradigma de permutación (Sasaki et al., 2007).

7.12 Análisis de redes

El análisis de redes se realizó en cada uno de los grafos formados como se ha descrito en secciones anteriores (considerando a cada neurona activa como un nodo, una neurona se consideró conectada funcionalmente con otra si entre ellas existía un valor distinto a cero en la matriz de similitud significativas). Con el fin de mantener los resultados comparables a otros trabajos (Pérez-Ortega et al., 2016) se tomó un tiempo de 9 minutos para formar estas redes neuronales, debido a que si se tomaba más tiempo la probabilidad de cada nodo de conectarse con otro se aumentaba y la red resultante mostraba demasiadas conexiones producto de sus variables interacciones a medida que se incrementa el tiempo de registro.

En teoría de redes complejas una red “libre de escala” (*scale-free*) es aquella en la cual algunos nodos están altamente conectados, los conocidos como nodos concentradores (*hubs*), aunque regularmente el número de conexiones de casi todos los nodos es relativamente bajo. En términos generales la probabilidad $P(k)$ de que un nodo de la red esté conectado con k nodos en este tipo de redes es proporcional a $k^{-\gamma}$ es decir, siguen una ley de potencias. Con el fin de comprobar si las redes que obtuvimos eran “libres de escala”, se obtuvo la distribución de conexiones $P(k)$ de cada una de las redes. La forma práctica de calcular el exponente γ es graficar la distribución de grado en escala log-log, esta función se ajusta mediante regresión lineal a una línea recta donde la pendiente corresponde al parámetro buscado. El valor del exponente γ es usado como una prueba de que la forma de conectarse de las neuronas en las redes neuronales no sigue un patrón estocástico o regular (Barabási & Oltvai, 2004; Boccaletti et al., 2006).

Las redes “libres de escala” presentan por lo tanto una conexión preferencial entre sus elementos, forman una arquitectura jerárquica, en este tipo de redes existen nodos concentradores que organizan la dinámica de las redes y permiten tanto la alternancia, la recurrencia y la reverberación de sus elementos (en este caso los distintos ensambles neuronales y sus elementos: las neuronas). Para poder cuantificar un parámetro estadístico semejante al de las redes “libres de escala” calculamos el coeficiente de agrupamiento (una medida de cuanto están conectados entre sí los nodos vecinos de un nodo específico; Watts & Strogatz, 1998) en función del grado de nodo: $C(k)$. Esta distribución también pueda ser aproximada a una función potencia de la forma $C(k)$ proporcional a $k^{-\alpha}$ donde el parámetro α corresponde nuevamente a la pendiente de la línea recta ajustada por esta función en escala log-log (Pérez-Ortega et al., 2016).

7.13 Análisis de datos y estadísticas

Se usó la sustracción digital para obtener componentes sensibles a los antagonistas bicuculina, gabazina o canales CaV_3 . Los valores estadísticos en texto y en los histogramas se presentan como media \pm SEM (Error estándar de la media), aunque los gráficos de caja comparan las distribuciones de las muestras con medianas, medias y cuantiles (5, 25, 75,

95). Las muestras independientes se compararon con las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney. Se compararon más de dos muestras con ANOVA Kruskal-Wallis y pruebas post hoc Mann-Whitney con ajustes de Holm-Sidak. La prueba de Wilcoxon se utilizó para comparar la misma muestra de neuronas antes y después del tratamiento (Glantz, 2012). Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos. El área bajo las respuestas sinápticas córticoestriatales por debajo del umbral de disparo se obtuvo por integración numérica y luego se normalizó en el área bajo la respuesta sináptica en el umbral AP (Flores-Barrera et al., 2009). Los porcentajes de cambio en estas áreas son proporcionales a la intensidad de estimulación (curvas intensidad-respuesta) en cada clase de las SPNs.

Las curvas se ajustaron a funciones sigmoideas de la forma: $R_A(i) = R_{max}/(1 + e^{-k(i-i_h)})$, donde $R_A(i)$ es el área bajo la respuesta en función de la intensidad de estimulación i , R_{max} es el área máxima bajo máxima respuesta, k es el factor de pendiente, e i_h es la intensidad de estimulación necesaria para alcanzar la mitad de la respuesta máxima (Vizcarra-Chacón et al., 2013).

7.14 Fármacos

Los antagonistas de los receptores de GABA_A bicuculina (10 μ M) o gabazina (10 μ M, Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, EE. UU.) se prepararon diariamente y se disolvieron en la solución salina del baño durante los registros.

El antagonista selectivo del canal de Ca²⁺ de tipo CaV₃ (T) NNC 55-0396 (10 μ M), TTA-A2 (10 μ M) y Fluo-4 sal (20-30 μ M, Alomone Labs, Israel); Se utilizó TTA - A2 en lugar de NNC 55-0396 con resultados similares. Las muestras reportadas solo incluyen NNC 55-0396.

8. RESULTADOS

8.1 La activación sináptica evoca diferentes dinámicas de Ca²⁺ intracelular somático y diferente número de potenciales de acción en las D1 y D2-SPNs

La obtención de imágenes de Ca²⁺ en el soma mientras se inducen respuestas sinápticas controladas con un estímulo no se ha descrito ni comparado antes en las SPNs. La mayoría

de las entradas sinápticas se reciben en las dendritas de las SPNs, el resultado de la integración sináptica se dirige al soma donde se generan los potenciales de acción evocados (eAP) y se genera una entrada de Ca^{2+} . La pregunta a responder en este trabajo fue si este proceso es el mismo o diferente entre las D1 y D2-SPNs cuando sus respuestas son evocadas con el mismo protocolo de estimulación (es decir, cuatro estímulos sinápticos de intensidad creciente a 20 Hz).

Los perfiles electrofisiológicos correspondieron a los descritos anteriormente para cada clase de SPNs en ratas y ratones (Arias-García et al., 2013, 2018; Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013). Aquí, mostramos que las diferencias en los transitorios de Ca^{2+} intrasomáticos y el número de PA fueron diferentes entre las dos clases de SPNs después del mismo conjunto de estímulos. Las respuestas a las entradas sinápticas (Figura 1 a la izquierda) también se hicieron en comparación con los obtenidos después de inyecciones de corrientes intrasomáticas (Figura 1a la derecha).

La amplificación de los registros mostrados en la Figura 1a muestra las respuestas de voltaje evocadas con trenes de cuatro estímulos córticoestriales de intensidad creciente a 20 Hz elegidas de una D1-SPN. El conjunto completo de respuestas de las que se tomaron los primeros trazos se muestra en la segunda fila en una base de tiempo más corta para compararlos con los transitorios de Ca^{2+} intrasomáticos (tercera fila). Las barras grises indican que los transitorios de Ca^{2+} intracelulares duran más que los eAP (Carrillo-Reid et al., 2008). A intensidades de estímulo altas, pueden inducirse potenciales sinápticos prolongados después del tren de estímulo y estas despolarizaciones puede provocar el disparo de varios PA (intensidades de estímulo en la parte inferior) en el caso de una D1-SPN, pero no así en el caso de una D2-SPN en condiciones control. Los insertos en la Figura 1 muestran ejemplos de ROIs de cada clase de neurona llena de fluo-4 (20–30 μM) a través de electrodo de registro. En el caso de las D1-SPNs, las amplitudes de los transitorios de Ca^{2+} se miden en la ROI y se observa que aumentan gradualmente en proporción a la intensidad del estímulo y el número de eAP (Figuras 1a y 2a, b). Los transitorios de Ca^{2+} que aumentan gradualmente también se evocaron después de la aplicación somática de pasos de corriente despolarizantes (Figura 1b). Figura 2c muestra el número de eAP frente a los

cambios en la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} en el soma, enfatizando que la entrada de Ca^{2+} y la activación de los eAP son graduales y dependen de la intensidad del estímulo en las D1-SPNs como se ve desde el soma, lo que sugiere que las neuronas siguen un código de frecuencia (Gerstner et al., 1997).

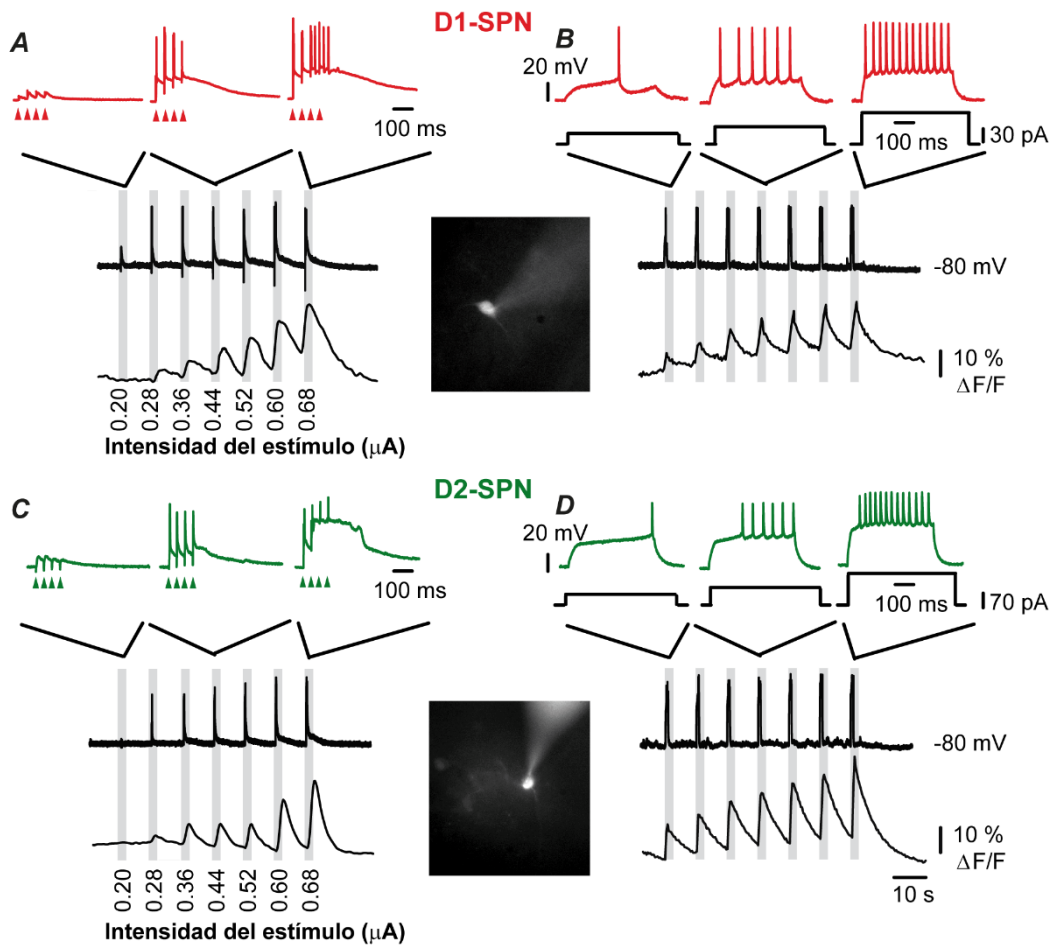


FIGURA 1. Registros simultáneos de transitorios de Ca^{2+} somáticos y respuestas de voltaje en neuronas de proyección estriatal (SPNs). Los paneles de la izquierda a y c, la fila superior muestra las respuestas de voltaje elegidas de la fila inferior mostradas en una escala de tiempo más corta en respuesta a trenes de cuatro estímulos sinápticos (0,1 ms a 20 Hz cada 10 s) con intensidades crecientes (intensidades de estímulo en la parte inferior). Los paneles de la derecha b y d: disparo provocado por inyecciones de corriente intracelular (registros

de voltaje en la parte superior). Las últimas filas en la izquierda y la derecha muestran transitorios de Ca^{2+} intracelular como se ve en el área somática de las fotografías. (a) En las D1-SPNs, el Ca^{2+} intracelular aumenta gradualmente en proporción a la magnitud de la respuesta sináptica. Después de alcanzar el umbral, el número de eAP también aumenta gradualmente (ver Figura 2). En el recuadro se muestra la región de interés (ROI) que corresponde al área del soma que se llenó con el electrodo de registro que contenía fluo-4 Salt (20–30 μ M). (b) Registros similares después de inyecciones intracelulares de corriente en el soma de una D1-SPN. (c) En D2-SPN, la entrada de Ca^{2+} cambia poco a medida que aumenta la intensidad del estímulo en paralelo con un número menor de eAP (ver Figura 2) en comparación con D1-SPN. Si la intensidad del estímulo aumenta aún más, el Ca^{2+} aumenta de manera escalonada hasta la saturación, mientras que los potenciales de Ca^{2+} regenerativos se propagan al soma. El recuadro muestra la ROI. (d) Si las inyecciones de corriente intracelular provocan un disparo en el soma de una D2-SPN, el Ca^{2+} aumenta gradualmente, así como el disparo, como en D1-SPN, sugiere que la diferencia en las respuestas sinápticas tiene su origen en el nivel dendrítico. Se ilustran registros de ratones BAC-D1 y BAC-D2 con fluo-4 Salt en los electrodos de registro.

Se obtuvo un resultado contrastante cuando se realizaron experimentos similares en las D2-SPNs (Figura 1c; los paneles y las filas están ordenados como en Figura 1a). Las respuestas sinápticas córticoestriales se evocaron con los mismos estímulos de intensidad creciente (Figura 1c fila superior: algunos registros desde la segunda fila se ilustran con una base de tiempo más corta). Sin embargo, los transitorios de Ca^{2+} aumentan o cambian ligeramente, mientras que el número de eAP aumentan rápidamente a un máximo y luego permanece constante a pesar del aumento del estímulo sináptico (Figuras 1c y 2d, e). Los estímulos con las intensidades más altas aumentan la entrada de Ca^{2+} hasta la saturación de forma ascendente (Figura 1c tercera fila, Figura 2d). Sin embargo, el número de eAP permanecen igual. En cambio, los potenciales de Ca^{2+} regenerativos se propagan al soma a intensidades más altas, lo que explica el paso en la entrada de Ca^{2+} (Figuras 1c y 2e). Cuando el número de eAP se grafica contra la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} en el área somática (Figura

2f), la diferencia en la integración sináptica entre las D1 y D2-SPNs se enfatiza (Figura 2c, f). En las D2-SPNs, el disparo se limita a un máximo después de una entrada sináptica determinada.

Los disparos limitados por entradas presinápticas son comunes en las neuronas que siguen un código poco denso (*sparse coding*; Pérez-Orive et al., 2002), que en parte depende de ser evocado sobre un potencial inactivador (Poo & Isaacson, 2009). Esta evidencia previa nos hizo enfocarnos en el papel de los canales de CaV_3 en la integración sináptica de las SPNs.

La inyección de pasos de corriente despolarizantes en el soma (Figura 1d) en las D2-SPNs induce aumentos graduales en la entrada de Ca^{2+} , así como aumentos en el número de eAP, similares a los de las D1-SPN, lo que sugiere que los fenómenos observados durante la activación sináptica emergen en las dendritas.

El número máximo de eAP después de cuatro potenciales sinápticos en la intensidad más alta fue de 6.93 ± 0.69 en las D1-SPNs ($n = 15$), en paralelo con un aumento gradual en las magnitudes de los transitorios de Ca^{2+} (Figura 2c). En contraste, las amplitudes de los transitorios de Ca^{2+} normalizadas cambian poco en función de la intensidad sináptica en las D2-SPNs, hasta que se alcanza una intensidad dada y se produce un salto repentino a la saturación (Figura 2d; $n = 6$ neuronas), en paralelo con un número máximo de eAP (Figura 2f; 4.33 ± 0.42 AP; $n = 14$ neuronas; $p = 0.01$; prueba de Mann-Whitney; comparada con D1-SPNs).

Los experimentos muestran que la activación ortodrómica y la entrada correspondiente de Ca^{2+} reflejan aumentos en la fuerza sináptica en las D1-SPNs, pero no en las D2-SPNs que siguen disparando el mismo número de PA (Figura 2b inserto) incluso cuando aumentan las respuestas sinápticas. Entradas sinápticas más fuertes sólo propagan potenciales regenerativos al soma (Bargas et al., 1991) pero no aumenta el número de PA. Estos resultados sugieren una diferencia en la integración sináptica entre las D1 y D2-SPNs: la integración sináptica en las D1-SPNs es gradual y acumulativa, mientras que en las D2-SPNs se mantiene constante incluso cuando aumenta la intensidad del estímulo (Figura 2e inserto).

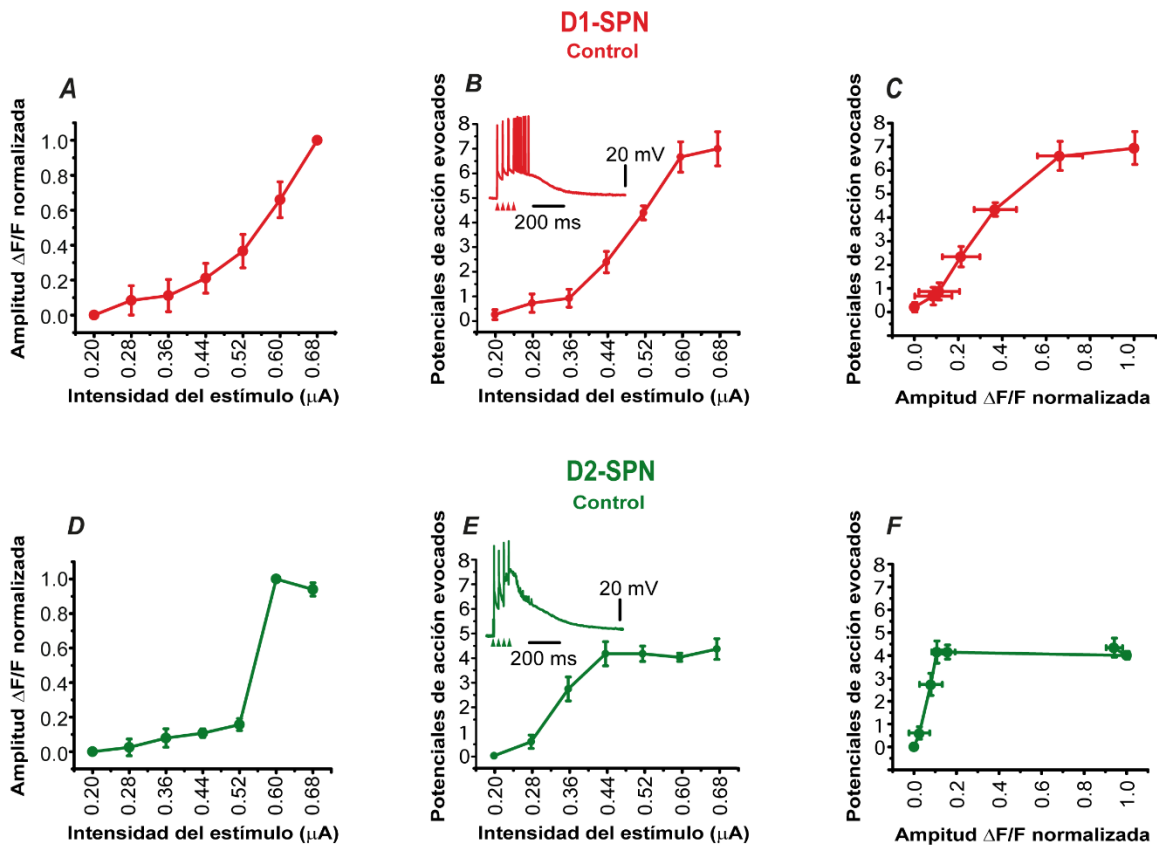


FIGURA 2. Gráficas de intensidad-respuesta en las SPNs. (a) Amplitud de los transitorios de Ca^{2+} normalizadas en función de la intensidad del estímulo en D1-SPNs ($n = 9$ neuronas). Los puntos son medias \pm SEM. (b) eAP en función de la intensidad del estímulo. En el recuadro se muestra un registro representativo donde se observa una despolarización prolongada después de los potenciales sinápticos que generan el disparo de varios PA. (c) eAP graficados contra la entrada de Ca^{2+} normalizada. En D1-SPNs, la estimulación sináptica se traduce en incrementos graduales en la entrada de Ca^{2+} y número de eAP (máximo = 6.93 ± 0.69 PA; $n = 15$ neuronas). (d) Entrada de Ca^{2+} en función de la intensidad del estímulo en una muestra de D2-SPNs, se notan aumentos leves después de los estímulos iniciales y un salto repentino a la saturación después de que se alcanza una cierta intensidad de estímulo ($n = 6$ neuronas). (e) eAP en función de la intensidad del estímulo en una D2-SPN: el número de eAP aumenta repentinamente después de los estímulos iniciales para lograr un máximo que permanece

igual a pesar de aumentar la intensidad del estímulo (máximo = 4.33 ± 0.42 potenciales de acción; $n = 14$ neuronas; $p = 0.01$, prueba Mann-Whitney, comparación entre D1 y D2-SPNs). (f) eAP graficados contra la entrada de Ca^{2+} en el soma: el aumento repentino de eAP y la diferencia en el número máximo de eAP con respecto a las D1-SPNs son más notables.

8.2 Papel de la inhibición en la integración sináptica de las SPNs

Las filas superiores de la Figura 3a, b muestran las respuestas de voltaje provocadas por el tren de potenciales sinápticos de intensidad creciente (que se muestra en el fondo). La segunda fila muestra un conjunto completo de estas respuestas ortodrólicas en una base de tiempo más corta para compararlas con los transitorios de Ca^{2+} somáticos ($\Delta F / F$) en una D1-SPN representativa. En una neurona en condiciones control (Figura 3a) y después de ser tratada con 10 μ M de bicuculina (o gabazina) (Figura 3b), la entrada de Ca^{2+} aumenta gradualmente en proporción a la intensidad del estímulo. Se muestra la superposición de respuestas máximas (Figura 3c) alcanzadas.

En los registros control y después del bloqueo de la inhibición se exhiben un número similar de eAP. El control (rojo) tiene un componente despolarizante bloqueado por bicuculina, revelando la despolarización GABAérgica prolongada, característica de una D1-SPN (Flores-Barrera et al., 2010). Gráficas de intensidad-respuesta (I-R) de las amplitudes de los transitorios de Ca^{2+} normalizadas en función de la intensidad del estímulo muestran que el bloqueo de inhibición no cambia el incremento gradual de Ca^{2+} de las D1-SPN (Figura 3d, $n = 9$ neuronas en cada muestra). Los eAP en función de la intensidad del estímulo también aumentan gradualmente en ambos casos y el número máximo de PA a la mayor intensidad de estímulo no cambia significativamente con respecto a los controles (Figura 3e: 8.56 ± 0.84 APs; $n = 9$ neuronas; $p = 0.08$; Prueba de Mann-Whitney). Cuando el número de eAP se graficó contra las amplitudes de los transitorios de Ca^{2+} (Figura 3f; trazo negro) se observa que la inhibición no cambia el aumento gradual en ambas condiciones en las D1-SPNs.

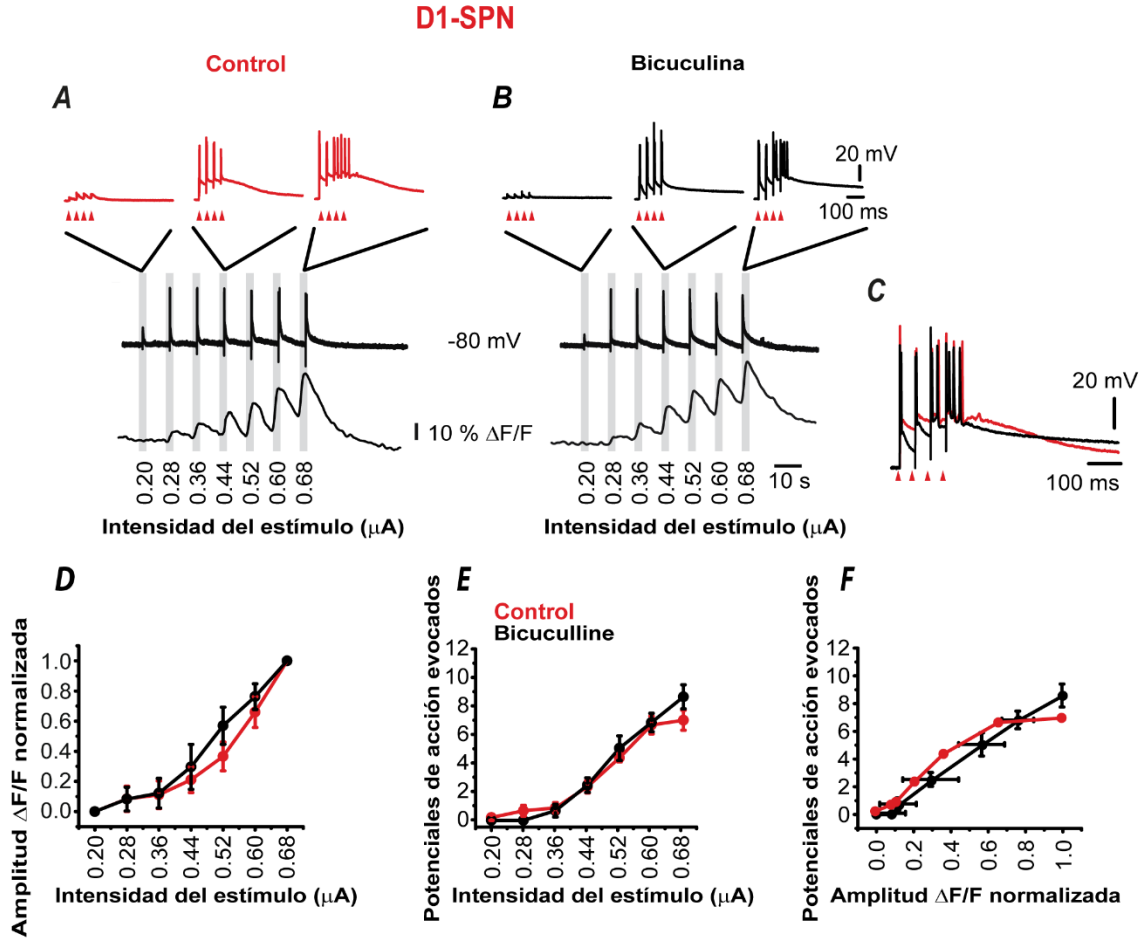


FIGURA 3. El bloqueo de la inhibición no cambia las gráficas de Intensidad-Respuesta (I-R) de D1-SPNs. (a, b) Las filas superiores muestran las respuestas de voltaje elegidas de la segunda fila en una escala de tiempo más corta en respuesta a trenes de cuatro estímulos (0,1 ms a 20 Hz cada 10 s) de intensidades crecientes (en el fondo). La tercera fila muestra transitorios de Ca^{2+} intracelulares que acompañan las respuestas ortodrómicas como se ve en el área de soma en una D1-SPN representativa. En ambos casos: control (izquierda) y bloqueo de receptores $GABA_A$ (derecha), Ca^{2+} y número de eAP aumentan gradualmente en proporción a la magnitud de las respuestas. (c) Superposición de las dos últimas respuestas en control y tras el bloqueo de los receptores de $GABA_A$. La despolarización del control (rojo) se reduce con bicuculina (negro), lo que revela la acción de GABA despolarizante característica de D1-SPNs (Flores-Barrera et al., 2010). (d) Gráficos I-R de amplitudes de

transitorios de Ca^{2+} normalizadas en función de la intensidad del estímulo. El bloqueo de la inhibición no cambia significativamente la acumulación gradual de Ca^{2+} de D1-SPN (n = 9 neuronas en cada muestra). (e) El número de eAP en función de la fuerza sináptica no cambia significativamente después de bloquear la inhibición (8.56 ± 0.84 PA; n = 9 neuronas $p = 0.08$; prueba de Mann-Whitney; muestra con bloqueo de inhibición vs. controles). (f) Gráfica del número de eAP contra la amplitud de los transitorios Ca^{2+} en el soma, el aumento gradual después del bloqueo de la inhibición (trazo negro) no cambia significativamente con respecto al control (rojo).

Un resultado diferente fue revelado en las D2-SPNs. Como antes, las filas superiores de la Figura 4a, b muestran respuestas ortodrómicas seleccionadas, en la segunda fila una escala de tiempo más corta. Los transitorios de Ca^{2+} intrasomáticos que acompañan estas respuestas se muestran en la tercera fila. En el control (Figura 4a) y durante el bloqueo de los receptores de GABA_A (Figura 4b), el Ca^{2+} no aumenta gradualmente en proporción a la intensidad del estímulo, en su lugar de repente salta a la saturación después de alcanzar cierta intensidad. Una vez que se alcanza esta intensidad, tanto la respuesta de Ca^{2+} como el número de eAP apenas cambian por aumentos adicionales en la fuerza sináptica.

La superposición de las respuestas de voltaje en control y después del bloqueo de receptores de GABA_A (Figura 4c) muestra que el bloqueo de la inhibición induce una mayor despolarización y el disparo de más PA en las D2-SPNs (Flores-Barrera et al., 2010). Las gráficas I-R de las amplitudes de los transitorios de Ca^{2+} normalizadas en función de la intensidad del estímulo muestra que el bloqueo de la inhibición facilita la repentina entrada de Ca^{2+} en las D2-SPNs, que ahora ocurre con intensidades de estímulo más débiles (Figura 4d; n = 6 neuronas en cada muestra). En consecuencia, el bloqueo de la inhibición suprime el comportamiento de saturación del número de eAP, ahora, continúan aumentando en función de la intensidad del estímulo: como se muestra en los últimos tres puntos en la Figura 4e: $4,14 \pm 0,31$ frente a $6,17 \pm 0,98$; $p = 0,026$; 4.0 ± 0.17 vs. 7.33 ± 1.12 ; $p = 0,002$ y $4,33 \pm 0,42$ frente a $10 \pm 1,73$; $p = 0,045$; (controles vs bloqueo; n = 6 neuronas; pruebas Mann-Whitney). Cuando el número de eAP se grafica contra la amplitud de los transitorios

de Ca^{2+} (Figura 4f) se observa que la inhibición es una de las fuerzas que limitan el número máximo de eAP en las D2-SPNs. Esta acción inhibitoria se suma a la acción antes reportada de las corrientes de K^+ activadas por Ca^{2+} (Arias-García et al., 2013).

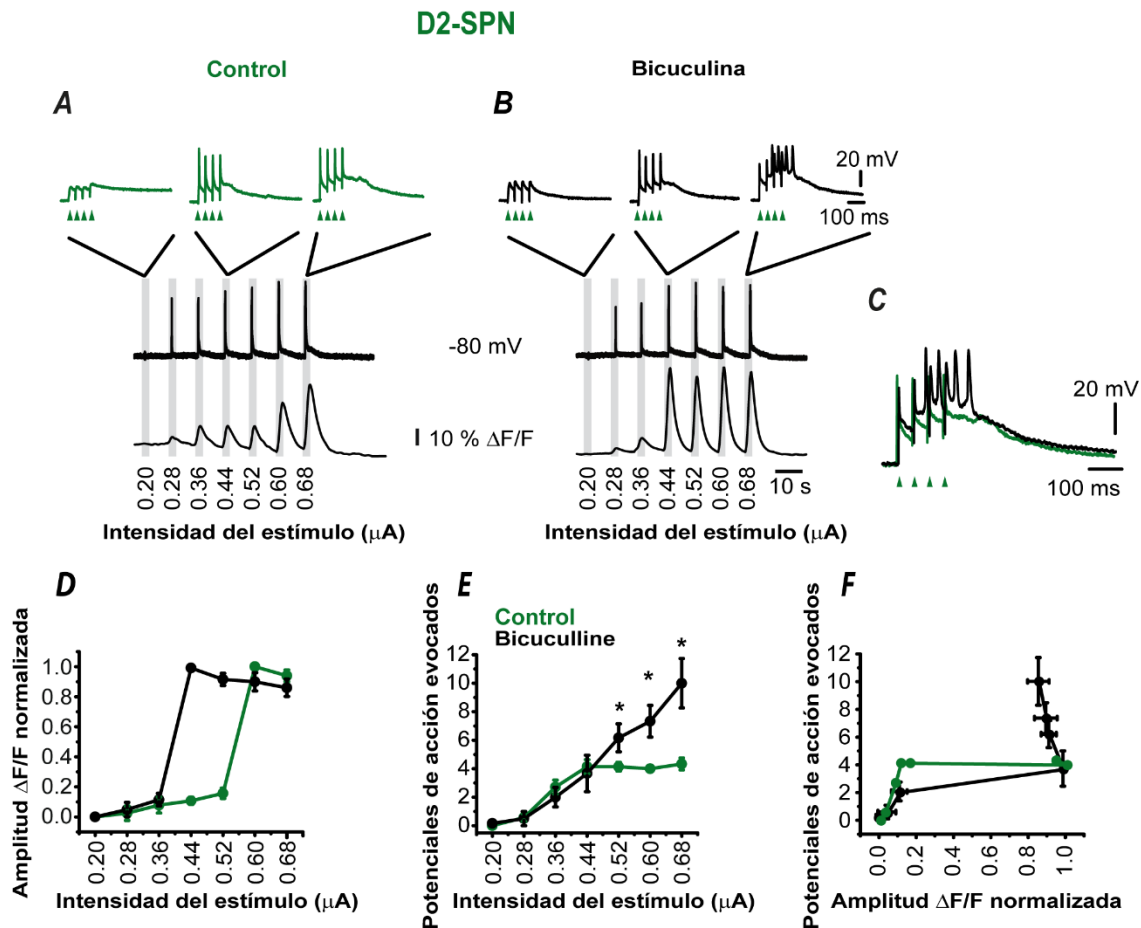


FIGURA 4. El bloqueo de la inhibición modifica las gráficas de Intensidad-Respuesta de D2-SPNs. (a, b) Las filas superiores muestran respuestas ortodrómicas elegidas de la segunda fila en una escala de tiempo más corta. La tercera fila muestra los transitorios de Ca^{2+} intracelulares inducidos por las respuestas ortodrómicas. Tenga en cuenta que en ambos casos: control (izquierda) y bloqueo de receptores GABA_A (derecha), el Ca^{2+} no aumenta gradualmente en proporción a la intensidad del estímulo, de repente salta a la saturación después de alcanzar cierta intensidad de estímulo. A partir de ese momento, la respuesta de Ca^{2+} apenas cambia por más que aumenta la intensidad del estímulo. (c) Superposición de

las dos últimas respuestas en control y después del bloqueo de receptores de GABA_A. El bloqueo de la inhibición induce una despolarización más grande y la activación de más eAP en D2 - SPN. (d) Gráficas I-R de las amplitudes de los transitorios de Ca²⁺ normalizado en función de la intensidad del estímulo muestran que el bloqueo de inhibición facilita el aumento en la entrada de Ca²⁺ que se está produciendo con una intensidad de estímulo más débil (n = 6 neuronas en cada muestra). (e) Después del bloqueo de inhibición, el número de eAP no se satura como en el control, sigue aumentando en función de la intensidad del estímulo (10 ± 1.73 potenciales de acción después del bloqueo de inhibición; n = 6 neuronas; los tres últimos puntos de la gráfica I-R fueron significativos (*): p = 0.026; p = 0,002; p = 0,045; en comparación con los controles, pruebas de Mann-Whitney). (f) Gráfica del número de eAP contra el transitorio de Ca²⁺ intrasomático: el límite en el número de eAP a intensidades de estímulo más altas se pierde divergiendo de los controles (verde), lo que sugiere que la inhibición limita el número de picos disparados por D2-SPNs.

8.3 Acciones de los canales CaV₃ en la integración sináptica de las SPNs

Como en las figuras anteriores, la fila superior muestra que las respuestas de voltaje aumentan en función de la intensidad del estímulo (Figura 5a, b), estas respuestas son ampliaciones de respuestas en la segunda fila que se muestran en una base de tiempo más corta para comparar con los transitorios de Ca²⁺ registrados simultáneamente (tercera fila). La Figura 5a muestra el control y la Figura 5b ilustra respuestas similares obtenidas en presencia de 10 μM NNC 55-0396 (NNC), un antagonista muy selectivo de los canales de Ca²⁺ CaV_{3.2} y canales de CaV₃ en general. El bloqueo de los canales de CaV₃ redujo tanto la magnitud de las respuestas sinápticas y de los transitorios de Ca²⁺. La Figura 5c muestra una superposición de las respuestas máximas antes y después del bloqueo de los canales CaV₃. Las gráficas I-R de los transitorios de Ca²⁺ intracelulares muestran divergencia: el bloqueo de los canales de CaV₃ disminuye el aumento gradual de la entrada de Ca²⁺ en comparación con los controles (Figura 5d; n = 9 neuronas en control y n = 6 neuronas durante NNC). Los eAP aumentan gradualmente con la fuerza sináptica y las frecuencias máximas obtenidas no fueron significativamente diferentes de los controles (Figura 5e; 5.17 ± 0.70 PA; n = 6

neuronas, durante NNC, $p = 0,12$ vs. controles; Pruebas Mann-Whitney). Si los eAP se grafican contra los transitorios somáticos de Ca^{2+} (Figura 5f) se ve que casi el mismo número de eAP se alcanza, aunque se reduce la entrada de Ca^{2+} .

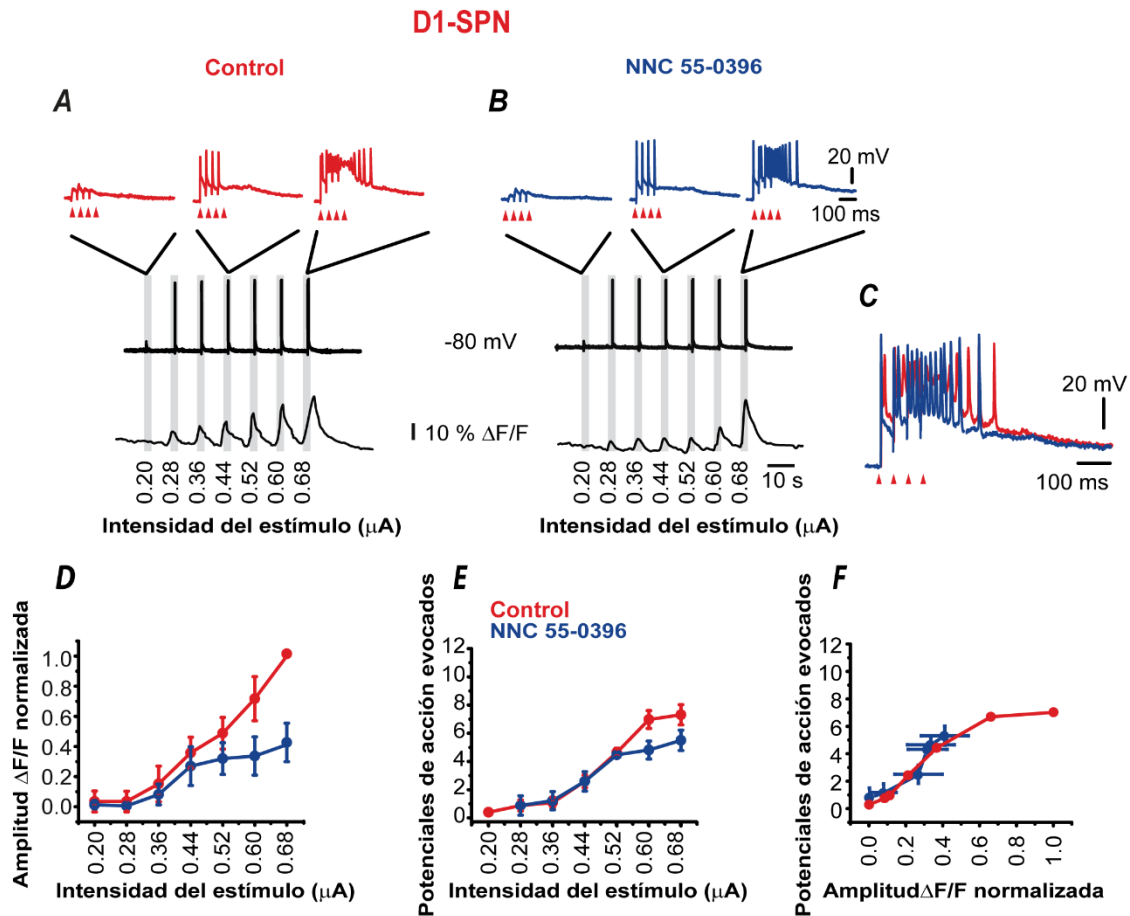


FIGURA 5. Contribución de los canales CaV_3 en la integración sináptica en D1-SPNs. (a) La entrada de Ca^{2+} aumenta gradualmente en D1-SPN a medida que aumenta la intensidad del estímulo; se observan respuestas más amplias y el número eAP debido a los aumentos en la intensidad del estímulo. (b) El bloqueo de los canales de CaV_3 con el antagonista selectivo NNC 55-0396 (NNC) $10 \mu M$ reduce tanto las despolarizaciones inducidas sinápticamente como los transitorios de Ca^{2+} intracelulares. (c) Superposición de respuestas sinápticas máximas en ambas condiciones. (d) Los aumentos en la entrada de Ca^{2+} somático tienden a disminuir después del bloqueo de los canales de CaV_3 ($n = 9$ neuronas en control y $n = 6$

neuronas durante NNC). (e) Los eAP en función de la intensidad del estímulo no cambian significativamente después del bloqueo de los canales CaV_3 y se mantiene su aumento gradual con la fuerza sináptica (5.17 ± 0.70 número máximo de potenciales de acción durante NNC; $n = 6$ neuronas; $p = 0.12$; Prueba de Mann–Whitney). (f) Gráfica del número de eAP frente a los transitorios de Ca^{2+} intrasomáticos revela que el número de eAP se reduce solo ligeramente a pesar de una menor entrada de Ca^{2+} en estas condiciones.

En el caso de las respuestas sinápticas de las D2-SPNs, sus eAP y sus transitorios de Ca^{2+} intracelulares también disminuyen después del bloqueo de CaV_3 (Figura 6a–e). Sin embargo, hay un importante cambio cualitativo: el aumento repentino en la entrada de Ca^{2+} fue virtualmente abolido, lo que sugiere que los canales CaV_3 están relacionados en su generación, independientemente de la activación posterior de los canales de CaV_1 y $CaV_{2.2}$ para generar potenciales de Ca^{2+} que se propaguen al soma en intensidades de estimulación más altas (Higley & Sabatini, 2008). Se obtuvieron resultados similares con otro antagonista selectivo de los canales de CaV_3 : $10 \mu M$ TTA-A2 ($n = 2$). Los incrementos en la entrada de Ca^{2+} se hicieron graduales (Figura 6d; $n = 6$ neuronas en control y $n = 8$ neuronas con NNC). El número de eAPs aumentó menos bruscamente (dos puntos durante el aumento fueron significativamente más grandes que los controles *): 2.71 ± 0.49 control vs. 0.75 ± 0.37 en NNC; $p = 0.016$ y 4.14 ± 0.49 en el control vs. 2.25 ± 0.53 durante NNC; $p = 0,026$; $n = 8$ neuronas durante NNC; Pruebas Mann-Whitney). Cuando el número de eAPs se grafica contra la magnitud de los transitorios de Ca^{2+} somáticos (Figura 6f), los eAPs mantienen su tendencia a alcanzar un máximo (3.5 ± 0.38 durante NNC; $p = 0,24$; Prueba Mann-Whitney vs. controles) a pesar de la pérdida del aumento repentino en la entrada de Ca^{2+} , lo que sugiere que este aumento no contribuye al número de eAPs, sino que es un reflejo de potenciales de Ca^{2+} propagados. Debido a que los canales CaV_3 están involucrados en el fuerte aumento de los eAP y el salto a la saturación en la entrada de Ca^{2+} presente en las D2-SPNs, pero no en las D1-SPNs, la diferencia en la contribución de los canales de CaV_3 entre estas clases de neuronas juega un papel muy importante en ambas clases de neuronas.

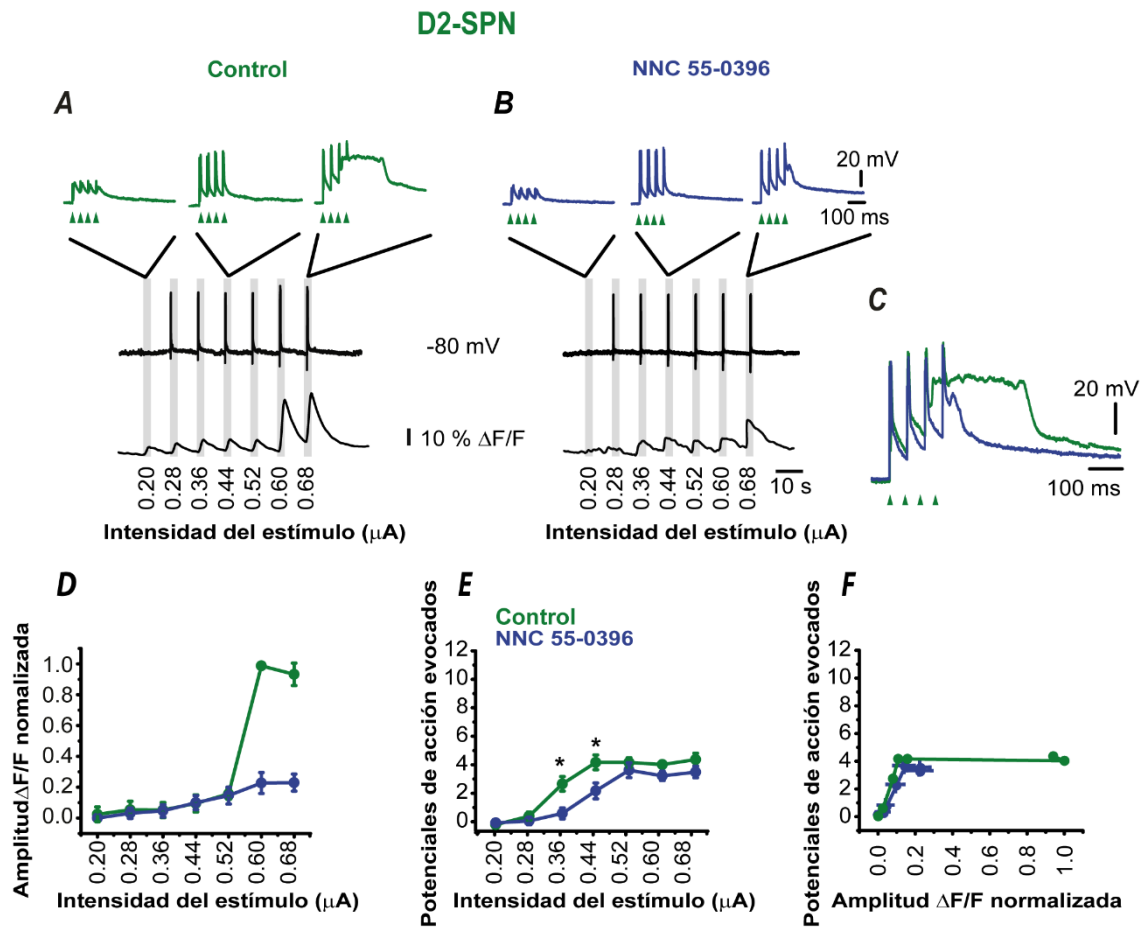


FIGURA 6. Contribución de los canales CaV_3 en la integración sináptica en D2-SPNs. (a) De manera similar a los experimentos en las Figuras 1c y 4a, la entrada de Ca^{2+} permanece casi constante a medida que aumenta la fuerza sináptica en D2-SPNs, hasta que se alcanza una intensidad crítica de estímulo y se produce un aumento repentino de Ca^{2+} , los aumentos adicionales en la intensidad del estímulo no aumentan la entrada de Ca^{2+} como si la respuesta estuviera saturada. Las respuestas de voltaje a las intensidades de estímulo más fuertes con frecuencia muestran potenciales de Ca^{2+} propagados. (b) El bloqueo de los canales de CaV_3 con NNC disminuye las respuestas sinápticas y los transitorios de Ca^{2+} intracelulares, y lo más importante, se elimina el aumento en la entrada de Ca^{2+} . (c) Superposición de respuestas sinápticas máximas antes y después de NNC. (d) Después de NNC, los aumentos en la entrada de Ca^{2+} se hacen graduales y se eliminan los aumentos

repentinos ($n = 6$ en control y $n = 8$ en NNC). (e) Durante el NNC, los eAP en función de la intensidad del estímulo aumentan de manera menos abrupta en comparación con los controles. Se conserva el número máximo de potenciales de acción. (f) La grafica muestra el número de eAP contra transitorios somáticos de Ca^{2+} , se alcanza el número máximo de eAPs con menos despolarización y entrada de Ca^{2+} .

8.4 Diferencias en la contribución de los canales CaV_3 durante las respuestas sinápticas supraumbrales en las SPNs

Como se muestra arriba, la inhibición limita el número de eAP en las D2-SPNs, pero no en las D1-SPNs. Para observar cómo estos factores interactúan con las respuestas sinápticas supraumbrales después de un estímulo cortical único, se evocaron respuestas supraumbrales en las D1-SPNs (Figura 7a, b) y D2-SPNs (Figura 7c, d). Con el fin de observar las contribuciones de la inhibición y la de los canales CaV_3 ambos componentes fueron bloqueados de manera secuencial como se describió anteriormente (Flores-Barrera et al., 2010). La Figura 7a muestra la acción de 10 μ M bicuculina (o gabazina) en una D1-SPN: el control es el trazo rojo y el bloqueo del receptor $GABA_A$ se representa con el trazo negro. El cruce entre ambos trazos (rojo y negro) reveló un potencial de inversión para la inhibición de aproximadamente -65 mV (Bracci & Panzeri, 2006; Flores-Barrera et al., 2009; Jiang & North, 1991; Kita, 1996; Misgeld et al., 1982). Se muestra una resta digital de ambos trazos en la parte inferior donde puede observarse una respuesta bifásica.

Con respecto al umbral de disparo, el bloqueo de inhibición primero despolariza el comienzo de la respuesta, a partir de entonces, bloquea un componente inhibitorio de la despolarización que prolonga la despolarización sináptica en cientos de milisegundos.

En estas respuestas supraumbrales (0.1 ms, $\approx 0.7 \mu$ A) el bloqueo de inhibición disminuyó a la mitad el ancho de las respuestas de las D1-SPNs al suprimir esta despolarización $GABA$ érgica tardía (Figura 7e). Después de antagonizar con los receptores $GABA_A$, los canales de CaV_3 se bloquearon con NNC 10 μ M (Figura 7b traza azul). Este tratamiento cambió ligeramente la respuesta supraumbrales de las D1-SPNs. Una resta digital del

componente sensible a NNC reveló una contribución despolarizante de los canales de CaV_3 en las respuestas de las D1-SPNs vistas desde el soma (Figura 7b).

El bloqueo de los receptores de $GABA_A$ en las respuestas supraumbrales de las D2-SPNs siempre indujo una despolarización y un disparo aumentado. El bloqueo de la inhibición aumentó la duración media en las D2-SPNs (Flores-Barrera et al., 2010) que muestra una diferencia en contraste con las D1-SPNs (cf. Figura 7e, f). La resta digital del componente sensible a la bicuculina revela solo una inhibición hiperpolarizante con respecto al umbral de disparo, no un componente bifásico, ya que la rápida caída de la respuesta de las D2-SPNs sustituye a la despolarización tardía prolongada observada en las D1-SPNs (La Figura 7c compara con la Figura 7a). La convergencia de respuestas con y sin bicuculina también rondó los -65 mV en la mayoría de las D2-SPNs. Durante el bloqueo de los receptores de $GABA_A$, los canales CaV_3 se bloquearon posteriormente y se pudo apreciar una reducción sustancial de la respuesta sináptica ortodrómica debido a la supresión de la despolarización sensible a NNC (Figura 7d, f).

La resta digital del componente sensible a NNC reveló un componente despolarizante oculto que se asemeja a un disparo de bajo umbral, como se ve desde el soma (Plotkin et al., 2011). Esta despolarización sensible a NNC explica la gran despolarización inducida por la bicuculina en las respuestas control (Figura 7c, f). Los resultados a partir de muestras de ambas clases de SPNs se resumen en las gráficas (Figura 7e-g). Los diagramas de caja de Tukey en la Figura 7e muestran ese bloqueo inhibitorio que siempre redujo la duración media de las respuestas de las D1-SPNs ($p < 0,001$, prueba de Mann-Whitney con ajustes post hoc de Holm-Sidak con $\alpha = 0,01$ para comparaciones por pares, $n = 18$ neuronas en control, $n = 12$ neuronas después del bloqueo inhibitorio, y $n = 7$ neuronas con NNC, ANOVA Kruskal-Wallis $p < 0,001$). La acción subsiguiente del NNC $10 \mu M$ no fue significativa con respecto al bloqueo de receptores de $GABA_A$ (Figura 7e; $p = 0.37$, Prueba de Mann-Whitney con ajustes post hoc de Holm-Sidak con $\alpha = 0.01$).

En contraste, el bloqueo inhibitorio despolarizó y mejoró significativamente la duración a la amplitud media de las respuestas sinápticas de las D2-SPNs en comparación con los controles (Figura 7f; $p < 0.001$; prueba de Mann-Whitney con ajustes post hoc Holm-Sidak

con $\alpha = 0.01$ para comparaciones por pares, $n = 17$ neuronas en control, $n = 13$ neuronas en bloqueo inhibitorio; ANOVA Kruskal-Wallis: $p < 0.001$) que revelaron una diferencia sustancial entre ambas clases de neuronas. Una adición posterior de NNC durante las acciones de bicuculina en las D2-SPNs ahora disminuyó la duración a la amplitud media del sináptico (Figura 7f; $p = 0.025$, prueba de Mann-Whitney con ajustes Holm-Sidak post hoc con $\alpha = 0.05$ para comparaciones por pares, $n = 6$ neuronas en NNC). La resta digital reveló una despolarización sensible al NNC que se asemeja a un disparo de bajo umbral (también vea el recuadro en la Figura 3b en Flores-Barrera, 2011), lo que sugiere una mayor contribución de los canales CaV_3 en la respuesta sináptica de las D2-SPNs. Finalmente, comparamos las restas digitales de componentes sensibles a NNC (canales CaV_3) después del boqueo de la inhibición (durante bicuculina) en ambas clases de neuronas. Hubo diferencias significativas entre las D1 y D2-SPNs (Figura 7g; $p = 0.004$; prueba de Mann-Whitney; $n = 6$ neuronas en cada muestra), lo que sugiere una mayor contribución de los canales CaV_3 en las D2-SPNs.

Además de los canales CaV_1 y $CaV_{2,2}$, la mayor amplitud de los potenciales generados por los canales CaV_3 activados por las sinapsis corticales en las dendritas de las D2-SPNs son una parte de las diferencias entre las respuestas ortodrómicas de las D1 y D2-SPNs, sin importar la cepa de roedores utilizada (Flores-Barrera et al., 2011; Higley & Sabatini, 2008).

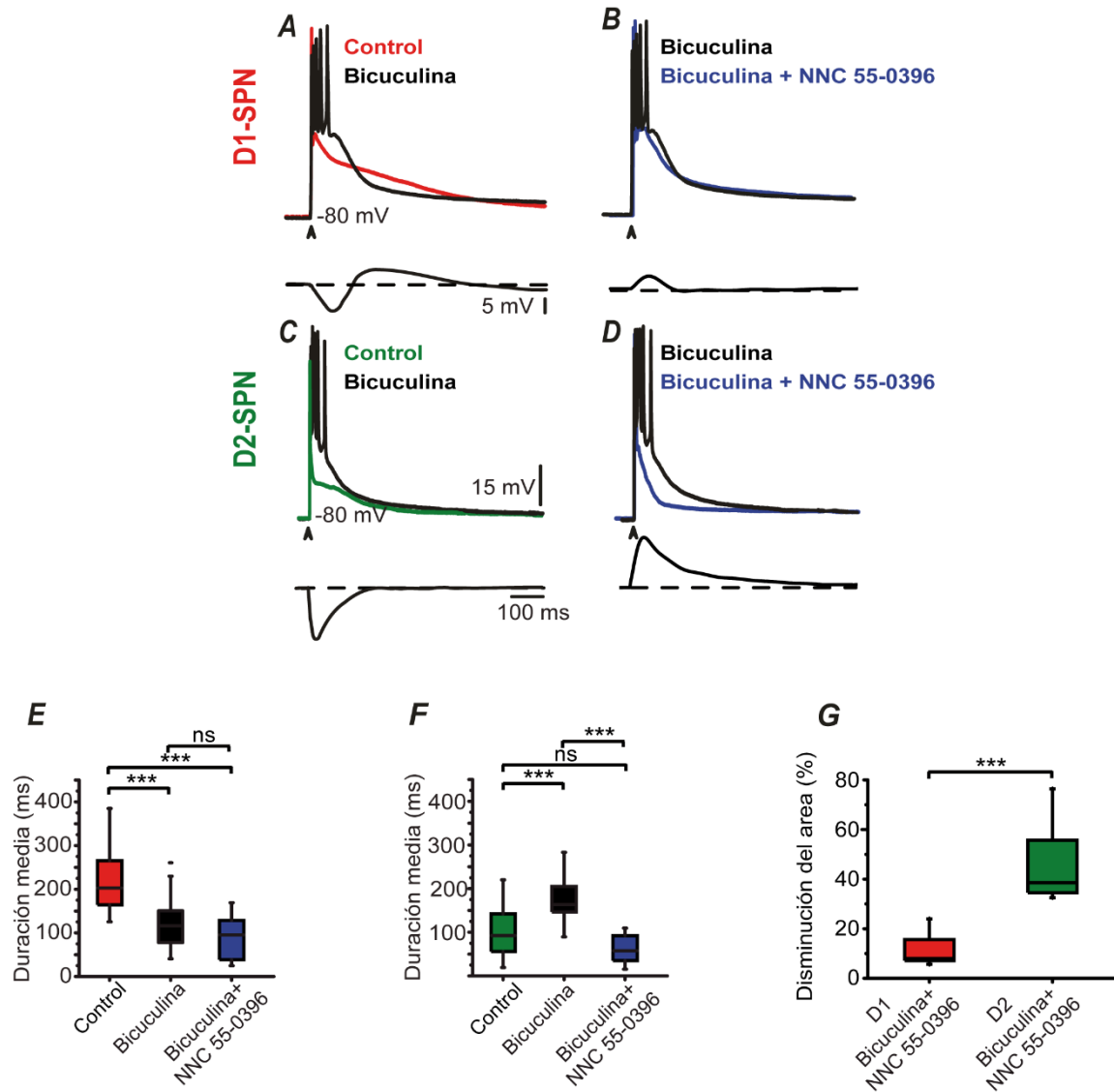


FIGURA 7. Diferencias en la contribución de los canales CaV_3 durante las respuestas supraumbrales en las SPNs. Los trazos de arriba son las respuestas sinápticas córticoestriatales supraumbrales antes y después de los tratamientos. Los trazos inferiores son restas digitales entre los trazos en la parte superior. (a) El bloqueo de los receptores de $GABA_A$ con bicuculina despolariza y aumenta el disparo al comienzo de la respuesta en las D1-SPNs, pero bloquea el componente inhibitor de la despolarización que se presenta más adelante en el tiempo. La sustracción digital del componente sensible a bicuculina muestra primero una hiperpolarización y luego una inhibición despolarizante con respecto al umbral

de disparo. (b) Cuando los canales CaV_3 se bloquean con NNC después de la acción bicuculina, la sustracción digital revela un pequeño componente despolarizante sensible a NNC en las respuestas de D1-SPN como se ve en el soma. (c) El bloqueo de los receptores $GABA_A$ en las respuestas ortodrómicas D2-SPN induce una despolarización con aumento en el disparo. La sustracción digital del componente inhibitorio bloqueado indica una inhibición hiperpolarizante con respecto al umbral de disparo. (d) Bloqueo de los canales CaV_3 después de la acción bicuculina en D2-SPN: la sustracción digital revela una gran despolarización generada por los canales de CaV_3 , que se asemeja a una espiga de bajo umbral. (e) Resumen de tratamientos en una muestra de D1-SPNs midiendo la duración a la amplitud media de las respuestas. Bicuculina redujo significativamente la duración a la amplitud media de las respuestas de D1-SPN con respecto a los controles ($p < 0,001$, prueba Mann-Whitney, $n_1 = 18$ y $n_2 = 12$ neuronas). La posterior adición de NNC no produjo efectos significativos ($p = 0,37$, prueba de Mann-Whitney, $n = 7$ neuronas en cada muestra). (f) En contraste, el bloqueo $GABAérgico$ no aumentó la duración a la amplitud media significativamente en las D2-SPNs ($p < 0,001$ comparando las duraciones a la amplitud media; prueba de Mann-Whitney con Holm-Sidak post hoc, $n = 17$ neuronas en control, $n = 13$ neuronas en el bloqueo inhibitorio). La adición posterior de NNC ahora disminuye la duración a la amplitud media significativamente ($p = 0.025$, prueba de Mann-Whitney con ajustes Holm-Sidak post hoc, $n = 6$ neuronas en NNC). (g) Comparación de las amplitudes de los componentes sensibles a NNC en ambas clases de células obtenidas con la sustracción digital después de bloquear la inhibición: se obtiene una diferencia significativa en la contribución de los canales CaV_3 ($p = 0,004$; prueba de Mann-Whitney; $n = 6$ neuronas en cada muestra).

8.5 La contribución de los canales CaV_3 se pueden detectar en potenciales sinápticos subumbrales

Anteriormente hemos reportado que la duración a la amplitud media y las áreas bajo las respuestas sinápticas son significativamente diferentes entre D1 y D2-SPNs cuando se comparan potenciales sinápticos subumbrales (Flores-Barrera et al., 2010). Por este motivo, queríamos estudiar si la acción de los canales CaV_3 puede revelarse en los potenciales

sinápticos subumbrales registrados en el soma, aunque lo que llega al soma es solo la respuesta de voltaje como resultado de las operaciones dendríticas en el sitio de la generación de sinapsis. La Figura 8a muestra que los efectos de la adición de NNC 10 μ M pueden detectarse en las respuestas subumbrales córticoestriatales de las D1-SPNs (el rojo es control frente al bloqueo de canales CaV_3 en azul). Sin embargo, midiendo el área bajo el potencial sináptico en una muestra de células no pudimos detectar diferencias significativas debido a la varianza de las respuestas (Figura 8b; $p = 0,47$; $n = 7$ neuronas; Prueba Wilcoxon).

Se realizaron experimentos similares con las respuestas córticoestriatales subumbrales en las D2-SPNs: verde (control) y azul (después del bloqueo de canales CaV_3), Figura 8c. En este caso, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la muestra (Figura 8d; $p = 0.004$; $n = 8$ neuronas; prueba Wilcoxon) y la acción de los canales CaV_3 se pudo detectar en el soma, lo que sugiere que incluso los potenciales sinápticos subumbrales revelan la influencia de estos canales en las D2-SPNs.

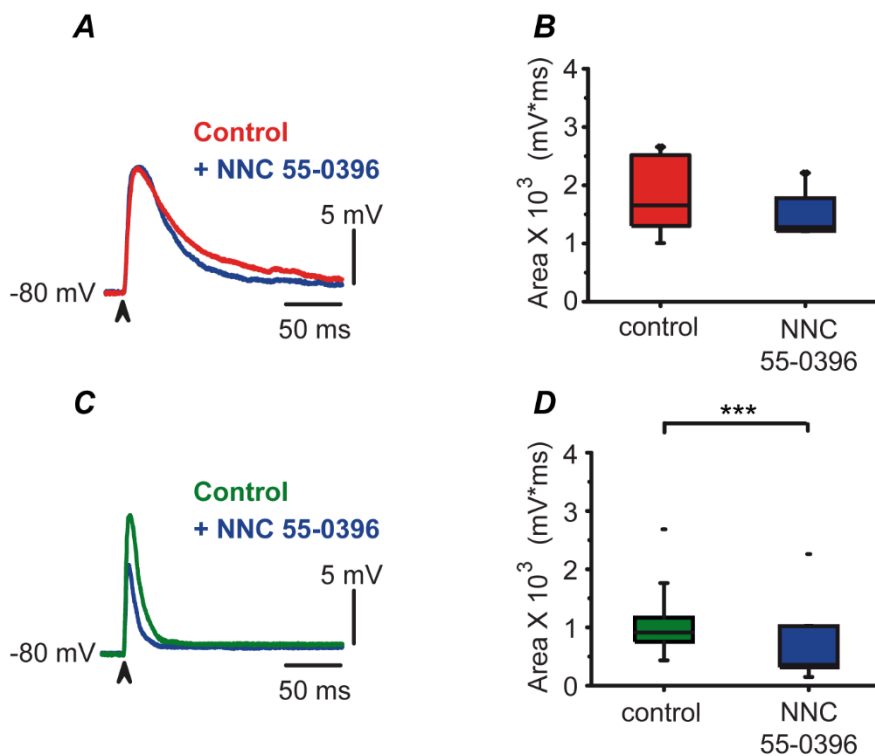


FIGURA 8. La contribución de los canales CaV_3 se puede detectar en potenciales sinápticos subumbrales. (a) Acción de NNC $10 \mu M$ en las respuestas córticoestriatales subumbrales en una D1-SPN: el trazo rojo es el control y el azul después del bloqueo de canales CaV_3 . (b) La adición de NNC no cambia significativamente el área bajo la respuesta de las respuestas sinápticas subumbral en una muestra de D1-SPN ($p = 0,47$; $n = 7$ neuronas; prueba Wilcoxon). (c) Efecto del NNC en las respuestas córticoestriatales subumbrales en una D2-SPN: el trazo verde es control y azul después del bloqueo de los canales CaV_3 . (d) Las diferencias en el área bajo la respuesta sináptica se vuelven significativas con respecto a los controles ($p = 0,004$; $n = 8$ neuronas; prueba Wilcoxon).

8.6 Efecto del bloqueo de canales CaV_3 en las curvas intensidad-respuesta de potenciales sinápticos subumbral

La Figura 9 muestra las respuestas sinápticas córticoestriatales que evocaron un solo potencial de acción en una D1-SPN representativa (Figura 9a) y una D2-SPN (Figura 9d), los trazos azules son respuestas después de la aplicación de NNC y las sustracciones digitales en la parte inferior muestran que ambas clases de neuronas tienen un componente sensible a NNC (corroborando los resultados mostrados con imágenes de Ca^{2+} en las Figuras 5 y 6). Las áreas máximas bajo la respuesta fueron de 9783 ± 172 mV·ms en los controles a 7616 ± 345 mV·ms después del bloqueo de los canales CaV_3 en la D1-SPN (prueba Mann-Whitney; $n_1 = 10$, $n_2 = 7$; $p = 0.04$) y de 8394 ± 264 mV·ms en controles a 4811 ± 114 mV·ms luego del bloqueo de los canales CaV_3 en la D2-SPNs (prueba Mann-Whitney; $n_1 = 12$, $n_2 = 6$; $p = 0.02$), confirmando que los canales CaV_3 contribuyen a las despolarizaciones sinápticas generadas en las dendritas de las D1-SPNs y D2-SPNs. Las curvas intensidad-respuesta de las respuestas subumbrales evocadas con diferentes intensidades de estimulación hasta alcanzar las respuestas máximas se muestran en la Figura 9b, e (ver Material y Métodos y Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013). La variable graficada para las curvas intensidad-respuesta fue el área bajo las respuestas sinápticas evocadas a diferentes intensidades (Figura 9b para D1-SPNs y Figura 9e para D2-SPNs). Se obtuvieron curvas en presencia de NNC $10 \mu M$ (trazos azules). En todos los casos, las curvas intensidad-respuesta

se ajustaron a funciones sigmoideas que implican que, cualitativamente, y cuando los potenciales de acción no se activan, las respuestas sinápticas en ambas clases de neuronas alcanzan el soma como procesos acumulativos, lo que sugiere que las diferencias observadas en las entradas Ca^{2+} entre estas clases de neuronas se asocian con el disparo de los eAP y no con los eventos sinápticos subyacentes per se, que solo reflejan el voltaje que llega al soma (ver también: Figura 5 en Vizcarra-Chacón et al. al., 2013; Pérez-Ramírez et al., 2015). Estos resultados muestran que la entrada iónica que incluye Ca^{2+} debido a la activación del receptor de glutamato ionotrópico induce despolarizaciones graduales y acumulativas que llegan al soma en ambas clases de neuronas y no podría explicar las diferencias en la activación de los eAP entre ellos cuando se estimulan con el mismo tren de estímulos.

En las D1-SPNs, el factor k (pendiente de la función sigmoide) fue significativamente mayor en comparación con el bloqueo de los canales CaV_3 . Cambió de k : 3.71 ± 0.09 en los controles a 4.28 ± 0.24 después del bloqueo (prueba t de dos muestras; $n_1 = 10$, $n_2 = 7$; $p = 0.02$). Sin embargo, la intensidad para obtener una respuesta de media amplitud i_h : 1.08 ± 0.02 y 1.06 ± 0.03 no fue significativamente diferente después del bloqueo (prueba t de dos muestras; $n_1 = 10$, $n_2 = 7$; $p = 0,59$). En el caso de D2-SPNs k fue significativamente menor después del bloqueo de los canales CaV_3 : 3.89 ± 0.09 en los controles y 3.25 ± 0.05 después del bloqueo de CaV_3 (prueba t de dos muestras; $n_1 = 12$, $n_2 = 6$; $p = 0.0002$). Sin embargo, i_h era 1.13 ± 0.02 en los controles y 1.18 ± 0.02 después del bloqueo (prueba t de dos muestras; $n_1 = 12$, $n_2 = 6$; $p = 0.22$). Dado que el estímulo necesario para alcanzar la mitad de las respuestas sinápticas máximas (i_h) no cambió significativamente, y es el parámetro mejor vinculado con cuántos aferentes presinápticos están siendo reclutados por la misma intensidad de estímulo, los resultados sugieren que los cambios se producen en las amplitudes de las respuestas en función de la intensidad del estímulo son de origen postsináptico. El parámetro k refleja mejor la tasa de reclutamiento de sinapsis. Solo se redujo en las D2-SPNs después de suprimir el componente despolarizante de los canales CaV_3 .

Finalmente, las diferencias entre las respuestas de las D1-SPNs y D2-SPNs también se midieron utilizando la duración a la amplitud media de las respuestas máximas (Figura 9c, f para D1-SPN y D2-SPN, respectivamente). Para D1-SPN (Figura 9c) el cambio no fue significativo de 247 ± 35 a 152 ± 43 ms (prueba Mann-Whitney; $n_1 = 10$, $n_2 = 7$; $p = 0.057$). Para D2-SPNs (Figura 9f) el cambio fue de 159 ± 27 a 89 ± 28 ms después del bloqueo de canales CaV_3 (prueba Mann-Whitney; $n_1 = 12$, $n_2 = 10$; $p = 0.022$; Figura 9f), sugiriendo nuevamente que los canales CaV_3 afectan más las respuestas sinápticas en las D2-SPNs.

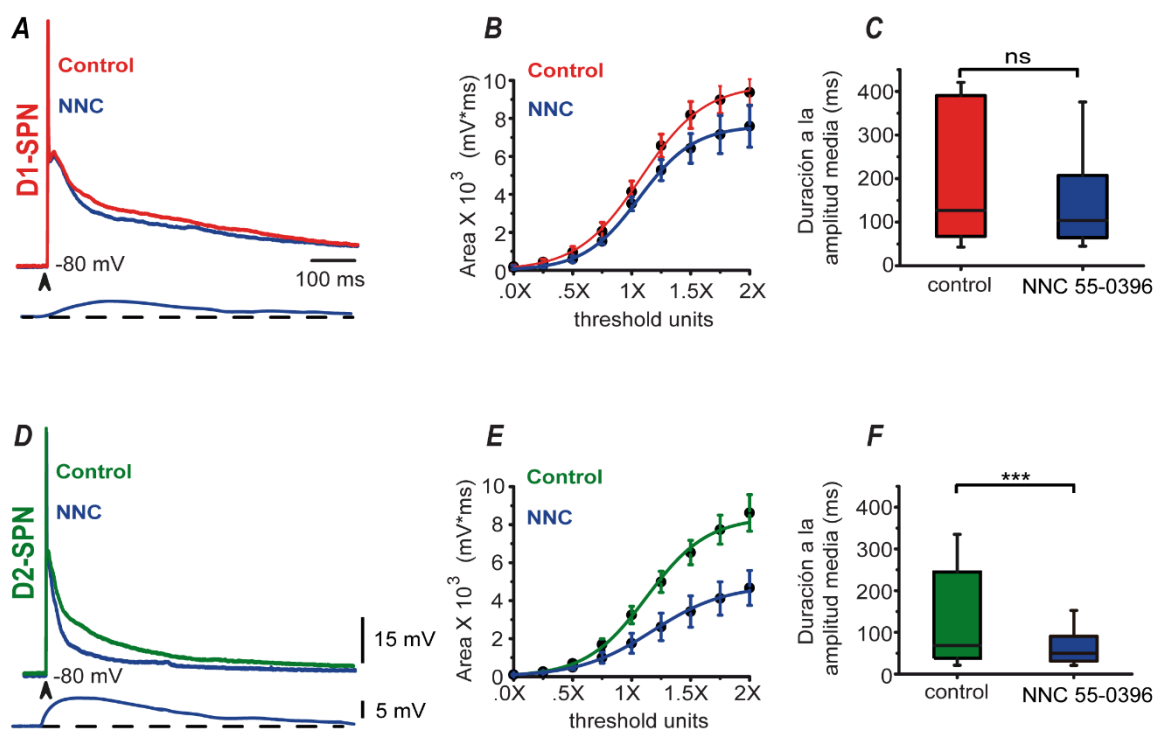


FIGURA 9. Curvas intensidad-respuesta de las despolarizaciones subumbrales: acción del bloqueo de canales CaV_3 . (a) La intensidad de los estímulos sinápticos se aumentó hasta que se evocó un potencial de acción. Acción de $10 \mu\text{M}$ NNC 55-0396 (NNC), un antagonista selectivo de los canales CaV_3 en una D1-SPN.

En la parte inferior, la resta digital muestra la contribución actual de CaV_3 a la despolarización sináptica. (b) Media \pm SEM de las áreas bajo respuestas sinápticas en función de la intensidad del estímulo: curvas intensidad-respuesta ajustados a funciones

*sigmoidales normalizadas a unidades de umbral. (c) Las diferencias en la duración a la amplitud media en las respuestas de las D1-SPNs no fueron significativas ($p = 0.057$) después del bloqueo de CaV_3 . (d) Acción de NNC sobre la respuesta córticoestriatal de una D2-SPN. En la parte inferior: la resta digital muestra la contribución actual de CaV_3 a la despolarización. (e) Media \pm SEM de gráficos intensidad-respuesta en las D2-SPNs. (f) Las diferencias en la duración a la amplitud media del ancho en las respuestas de las D2-SPNs fueron estadísticamente significativas (** $p = 0.022$; pruebas de Mann-Whitney con ajustes post hoc Holm-Sidak).*

8.7 Comparación de las entradas excitadoras al microcircuito estriatal

Los resultados anteriores muestran como las SPNs de manera individual integran entradas sinápticas córticoestriatales de forma distinta. Además, estas neuronas tienen una dinámica de Ca^{2+} y generación de PA diferencial. El siguiente paso fue estudiar al NE a nivel poblacional tras la estimulación de sus vías córticoestriatal y tálamoestriatal, en este caso, no tenemos identificadas a las D1-SPNs, D2-SPNs ni los diferentes tipos de interneuronas, trabajo que esperamos realizar en siguientes estudios con ayuda de animales transgénicos. Esta es nuestra primera aproximación a responder la pregunta sobre cómo el NE procesa la información proveniente de las cortezas y del tálamo.

De tal manera que utilizamos la técnica de imagenología de Ca^{2+} para tal fin, la cual permite estudiar al mismo tiempo decenas de neuronas con resolución de célula única. Se obtuvieron rebanas horizontales de 300 μm de espesor y con un ángulo de 20°, esto con el objetivo de activar específicamente la corteza o el tálamo (Smeal et al., 2007). Cabe mencionar que este ángulo conserva tanto la vía córticoestriatal como la vía tálamoestriatal, posteriormente se incubaron con el indicador de Ca^{2+} fluo-4. Se tomaron videos de duración variable (ver materiales y métodos) en la región del estriado dorsomedial (800x800 μm de área).

En la Figura 10b se muestra la imagen de todas las neuronas incubadas de un experimento representativo. Manualmente se seleccionan las ROI correspondientes a los somas de las neuronas activas durante todo el experimento, con ello obtenemos la coordenada de cada

neurona en el tejido (Figura 10c). Con el fin de comprobar que nuestros experimentos de fluorescencia reflejaban indirectamente la actividad eléctrica celular se realizaron registros electrofisiológicos simultáneos con imagenología de Ca^{2+} (Figura 10d, e). De esta manera pudimos determinar la correspondencia que hay entre el disparo de potenciales de acción y el cambio de fluorescencia en la neurona.

En la Figura 10e1-2 se muestran registros de voltaje ante pulsos de corriente de intensidad creciente inyectados en el soma, lo que produjo un incremento en el número de potenciales de acción, en la Figura 10e3 se observó el cambio de fluorescencia asociado, la sensibilidad del fluoróforo se detecta desde los primeros potenciales de acción y va incrementando de manera proporcional a la cantidad de disparos de la neurona. Para inferir la actividad de las neuronas usamos el método de deconvolución no negativa, este método calcula la probabilidad de que haya existido un PA dado un transitorio de Ca^{2+} observable (Vogelstein et al., 2010). Posteriormente colocamos un umbral (2 desviaciones estándar) arriba del cual se consideró que la neurona tenía actividad significativa (Figura 10e4)

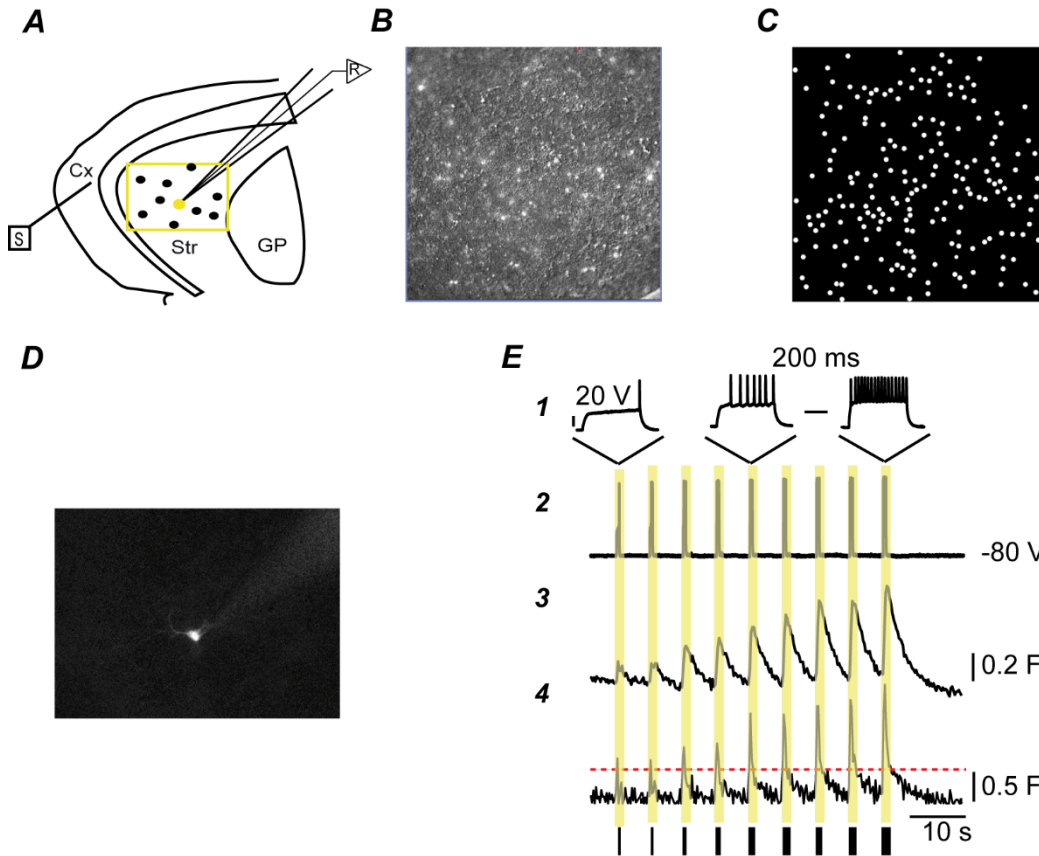


FIGURA 10. Esquema de un experimento: adquisición simultánea del registro de potenciales de acción (electrofisiología) y de los transitorios de Ca^{2+} intracelular que estos provocan (imagenología). (a) Esquema que representa una rebanada horizontal que conserva la vía córticoestriatal. El recuadro amarillo muestra el área de visualización, un cuadrado de $800 \times 800 \mu\text{m}$ de estriado. Se realizó imagenología de Ca^{2+} y registros simultáneos de imagenología de Ca^{2+} con registros electrofisiológicos con la técnica de patch-clamp en modalidad de célula entera. (b) Imagen de neuronas incubadas con fluo-4 AM en estriado dorsomedial. (c) Selección manual de los somas neuronales de las neuronas activas y sus coordenadas en el tejido cerebral durante el experimento. (d) Ejemplo de una neurona registrada simultáneamente con imagenología de Ca^{2+} (barra de escala: XX μm). (e1-2) Amplificación de trazos de voltaje en respuesta a pulsos de corriente despolarizaste

inyectada en el soma. (e3) Cambio de fluorescencia asociado a la entrada de Ca^{2+} que producen los potenciales de acción. (e4) Probabilidad de actividad neuronal dado los transitorios de Ca^{2+} .

Una vez hecho esto fue posible reconstruir la actividad eléctrica de manera indirecta de cada una de las neuronas en la porción de tejido neuronal. En la Figura 11a se muestra en una gráfica tipo raster el resumen de la actividad neuronal, cada fila representa una neurona y cada punto negro representa actividad significativa de esa neurona dado el análisis descrito anteriormente (Figura 10e4). El experimento tiene una duración de 30 min donde podemos ver la dinámica de 200 neuronas simultáneamente. En la parte derecha del panel 11a se muestra el porcentaje de cuadros activos de cada una de las neuronas a lo largo del experimento con respecto al total de cuadros adquiridos durante el video. El histograma en la parte inferior del raster muestra la suma de la actividad neuronal en cada cuadro del video (250 ms). El raster no muestra aparentemente una estructura, pero existen instantes de tiempo donde la suma de la actividad de las neuronas es muy grande (picos de sincronía).

Procediendo con el análisis calculamos la similitud entre la actividad de todas las neuronas en el raster, tratando de buscar grupos de neuronas con patrones de disparo similares, como criterio de similitud escogimos la correlación cruzada, en la sección 11b observamos la matriz de similaridad obtenida entre todas las neuronas presentes en el experimento. Como algoritmo de agrupamiento usamos el modularidad (Newman, 2006). Este algoritmo está más orientado a la teoría de redes, pero aquí lo aplicamos al problema de encontrar la mejor división posible entre grupos buscando maximizar la similitud entre los elementos dentro de un grupo y minimizar la relación de ellos con otros grupos (Figura 11c). Los grupos que obtuvimos los identificamos como ensambles neuronales (ver materiales y métodos). En la Figura 11d observamos la matriz de similaridad, pero esta vez ordenada de acuerdo a como están numeradas las neuronas en la sección 11c, es decir, ordenadas de acuerdo a los ensambles neuronales a los que pertenecen, se pudo observar como las manchas amarillas

que corresponden a una alta similaridad son compartidas precisamente con las neuronas que ahora están clasificadas como integrantes de un ensemble neuronal dado.

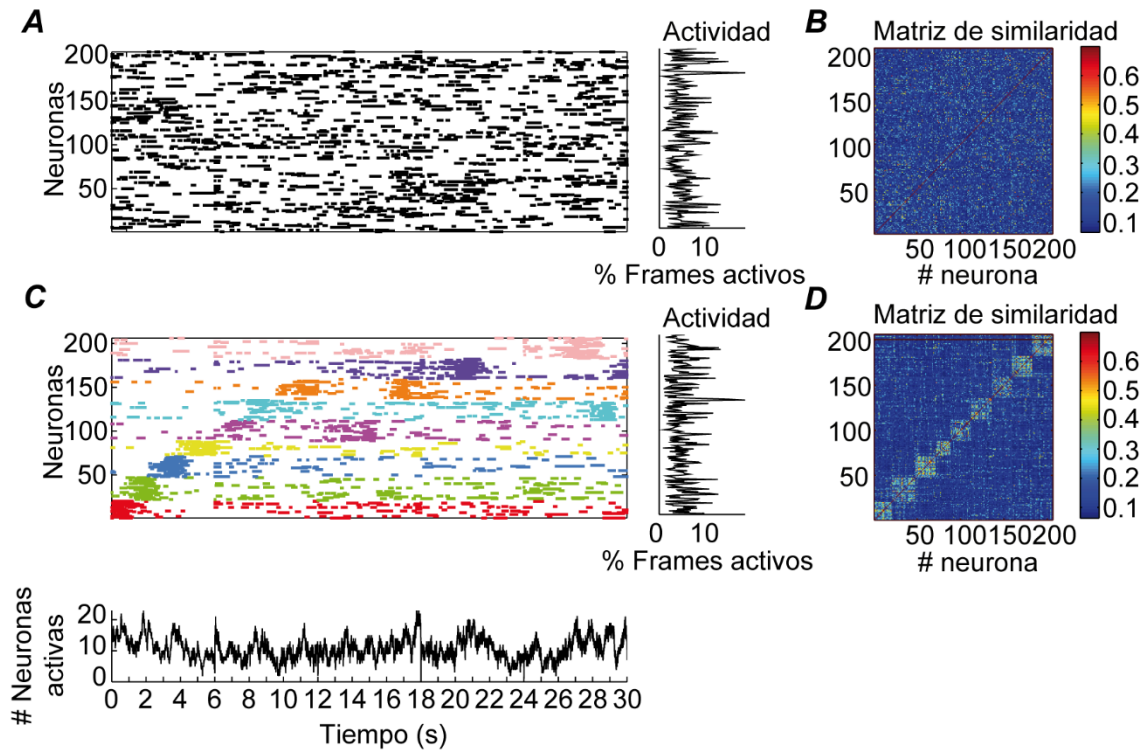


FIGURA 11. Caracterización de la actividad poblacional espontánea en el núcleo estriado.

(a) Grafica tipo raster donde se representan las neuronas activas durante 30 min. (b) Matriz de similaridad (correlaciones) entre las neuronas del mismo experimento, las neuronas están desordenadas. (c) Raster con las neuronas ordenadas y coloreadas de acuerdo a su pertenencia a un determinado ensemble. Los histogramas a la derecha de cada raster son la suma de la actividad de las neuronas a lo largo del experimento. El histograma inferior indica la suma de la actividad neuronal en cada intervalo de tiempo (250 ms). (d) Matriz de similaridad ordenada de acuerdo a la pertenencia de cada neurona a un determinado ensemble. La barra de colores de ambos mapas de correlaciones indica que las neuronas están muy correlacionadas en colores cálidos y poco o nada correlacionadas en colores fríos.

Dentro de cada ensemble neuronal se buscan los intervalos de tiempo con mayor coactividad, solamente consideramos para el análisis posterior los picos de coactividad que

forman el 5% de los valores más altos para cada ensamble, de esta forma en la Figura 12a se tienen los disparos coactivos de cada grupo en el raster (eventos de ensambles). En la Figura 12b se muestra la actividad sumada de cada ensamble neuronal identificado, equivalente a las secciones inferiores de los raster que hemos mostrado hasta el momento, pero en este caso cada uno por cada ensamble neuronal presente en el experimento. Hasta este punto hemos develado la estructura interna del experimento: los ensambles se activan de manera recurrente y a diferentes tiempos durante el experimento, muestran secuencias de activación y ciclos de actividad reverberante. La representación simplificada de los eventos de ensambles se muestra en la Figura 12c representados como círculos coloreados acorde a su pertenencia a un determinado ensamble y con una línea mostrando las secuencias temporales que forman en conjunto de tal forma que esto forma la secuencia de los estados del microcircuito. En la sección 12d observamos el histograma de coactividad neuronal del experimento general con manchas de colores donde cada ensamble tuvo un evento significativo.

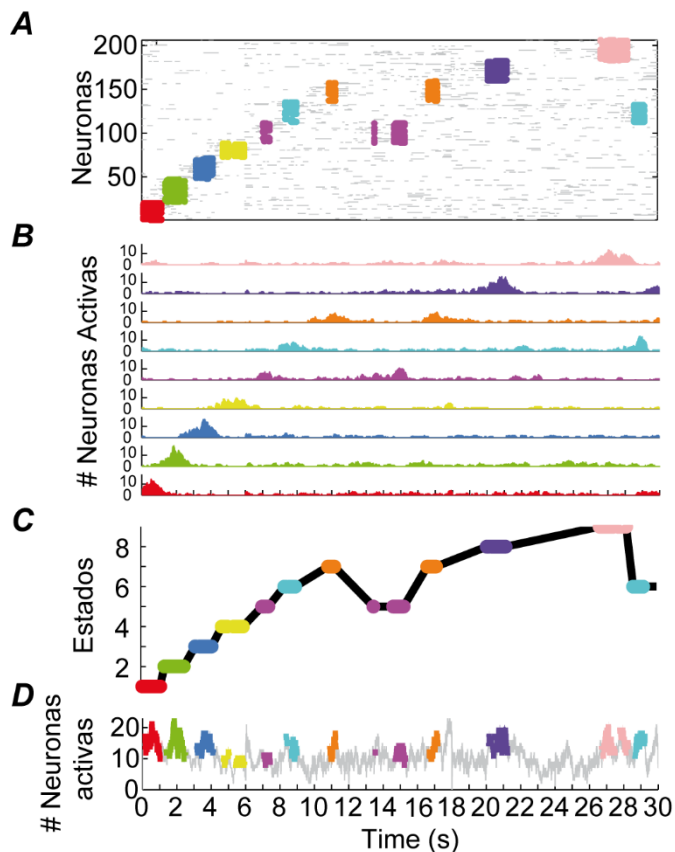


FIGURA 12. Secuencias de activación de ensambles neuronales en el núcleo estriado. (a) Gráfica tipo raster con las neuronas ordenadas de acuerdo a la pertenencia de su ensamble, solo se encuentran coloreados los instantes de tiempo donde cada ensamble que presentó picos de coactivación neuronal significativa (eventos de ensambles). (b) Suma de la actividad de las neuronas a lo largo del experimento. (c) Picos significativos de coactividad representados como círculos coloreados de acuerdo a su pertenencia a un determinado ensamble, la línea muestra las secuencias temporales que forman en conjunto. (d) Suma de la actividad neuronal en cada intervalo de tiempo (250 ms), están coloreados ensambles de eventos respectivos de la Figura 12a.

El siguiente paso dado fue estudiar el microcircuito estriatal fuera de la situación control. Para tal fin procedimos a realizar estimulación eléctrica con ayuda de un electrodo bipolar (ver métodos) en la capa V de la corteza motora o en los núcleos intralaminares del tálamo. Se utilizó un tren de 4 pulsos a 20 Hz, con este estímulo fuimos capaces de producir actividad polisináptica en el microcircuito. Escogimos este estímulo después de varias pruebas debido a que el efecto neto sobre la red es el de aumentar la tasa de disparo de las neuronas presentes en el experimento con respecto a la actividad control, este estímulo no hace que las neuronas dejen de disparar (sospecha de que murieron) o genera una ola de actividad que activa a una gran cantidad de neuronas en un pequeño instante de tiempo y cuya actividad viaja por la red de manera patológica. Una vez estandarizados los protocolos de estimulación eléctrica, se realizaron experimentos para comparar la dinámica estriatal al estimular las distintas aferentes glutamatérgicas (corteza y tálamo). En el esquema la Figura 13a se representa la disposición del electrodo de estimulación en la corteza y el campo de registro en una rebanada horizontal con un ángulo de 20°. La actividad celular espontánea en el cuerpo estriado dorsal se registró durante varios minutos (Figura 13b). La estimulación eléctrica se hizo en el minuto 9 de registro en todos los experimentos (Figura 13b1 punta de flecha). Dicha estimulación activó el microcircuito estriatal revelando secuencias continuas de picos significativos de coactividad neuronal durante al menos 20 minutos más. De esta manera, la actividad evocada de docenas de neuronas se observó

simultáneamente. En la Figura 13b2 se muestra la actividad sumada de cada ensamble neuronal identificado. En la sección 13b3 se observa la suma de la actividad neuronal en cada intervalo de tiempo, están coloreados ensambles de eventos respectivos de la Figura 13b1.

Para comparar la actividad global en el microcircuito estriatal antes y después del estímulo cortical, calculamos la actividad acumulada de todas las neuronas en cada experimento, revelando un aumento de neuronas activas después del estímulo eléctrico (Figura 13c).

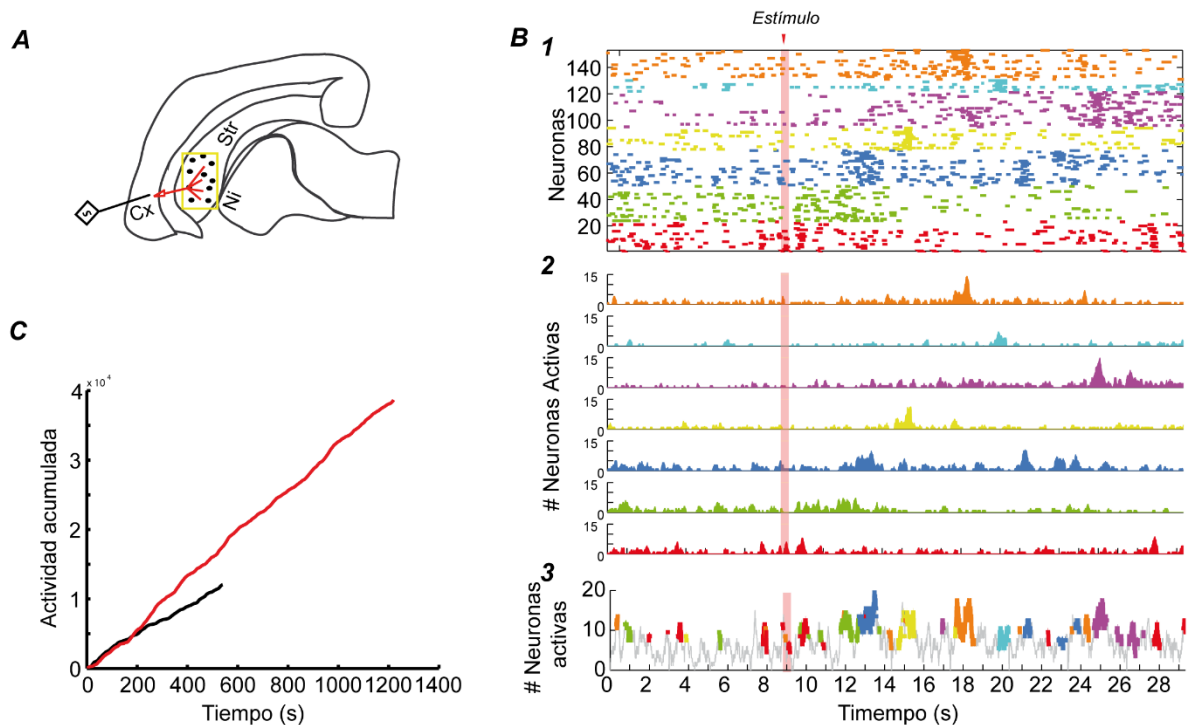


FIGURA 13. Activación del microcircuito estriatal por estimulación eléctrica cortical. (a) Esquema de la rebanada con la disposición del electrodo de estimulación y el campo de registro. (b1) Grafica tipo raster con el protocolo de estimulación en la corteza. El momento de estimulación se muestra con una punta de flecha en la parte superior del raster. (b2) Suma de la actividad de las neuronas a lo largo del experimento. (b3) Suma de la actividad neuronal en cada intervalo de tiempo (250 ms), están coloreados ensambles de eventos

respectivos. (c) La gráfica muestra con líneas continuas la actividad acumulativa (suma de células coactivas a lo largo del tiempo) del raster mostrado arriba antes (línea negra) y después del estímulo eléctrico (línea roja).

La Figura 14a muestra los eventos de ensambles en el experimento completo, los ensambles coloreados representan secuencias de activación y ciclos de actividad reverberante (Figura 14a y 16a) en una mayor proporción que la actividad en situación control. La secuencia temporal de la activación de los ensambles neuronales se muestra en la Figura 14b, así como el histograma de coactividad en la Figura 14c. La estimulación cortical provocó un aumento significativo de la actividad neuronal por minuto de todas las neuronas presentes en varias rebanadas de 7.7 ± 0.3 en situación control a 10.3 ± 0.3 después de la estimulación cortical (Figura 14d; $p < 0.001$; $n = 859$ neuronas obtenidas de 6 rebanadas; prueba de los rangos con signo de Wilcoxon). De la misma manera en relación a los eventos de ensambles contabilizados en cada intervalo de un minuto (un evento es contabilizado si dura 250 ms) hubo un aumento significativo de 0.8 ± 0.2 en situación control a 6.7 ± 0.9 después de la estimulación cortical (Figura 14e; $p < 0.001$; $n = 33$ ensambles obtenidos de 6 rebanadas; prueba de los rangos con signo de Wilcoxon).

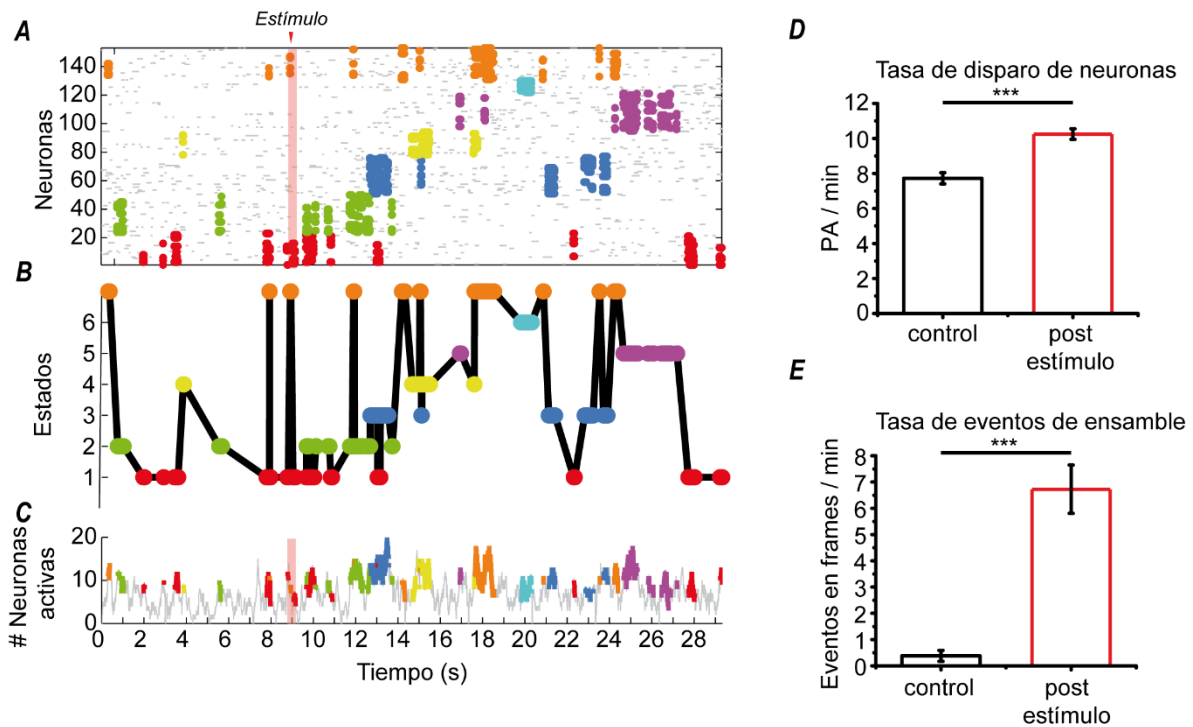


FIGURA 14. Patrones de ensambles neuronales evocados por estimulación córticoestriatal. (a) Gráfica tipo raster con las neuronas ordenadas de acuerdo a la pertenencia a su ensamble, solo se encuentran coloreados los instantes de tiempo donde cada ensamble presentó eventos significativos. (b) Eventos de ensambles denotados como círculos coloreados acorde a su pertenencia a un determinado ensamble y con una línea mostrando las secuencias temporales que forman en conjunto. (c) Suma de la actividad neuronal en cada intervalo de tiempo (250 ms), están coloreados los respectivos eventos de ensambles del panel a. (d) Diagramas de caja que comparan los cuadros activos por minuto antes y después del estímulo: claramente se puede observar un incremento de actividad después del estímulo. (e) Diagramas de caja que comparan los eventos de ensamble antes y después del estímulo eléctrico.

Un resultado similar a la estimulación cortical se obtuvo mediante la estimulación de la vía tálamoestriatal. El esquema de la Figura 15a representa la disposición del electrodo de estimulación en el tálamo y el campo de registro en una rebanada horizontal con un ángulo de 20°. La actividad celular espontánea en el cuerpo estriado dorsal se registró durante varios minutos, se muestran de diferente color los distintos ensambles neuronales identificados en el experimento (Figura 15b). Posteriormente un único tren de 4 pulsos a 20 Hz en los núcleos intralaminares del tálamo (Figura 15b1 punta de flecha) activó el microcircuito estriatal revelando una mayor cantidad de secuencias continuas de picos

significativos de coactividad neuronal durante al menos 20 minutos posterior al estímulo. En la Figura 15b2 se muestra la actividad sumada de los ensambles neuronales identificados. Se comparó la actividad global en el microcircuito estriatal antes y después del estímulo talámico, note la diferencia en las pendientes de las líneas que representan la actividad acumulada en el tiempo para cada situación, revelando un aumento de neuronas activas después del estímulo Figura 15c.

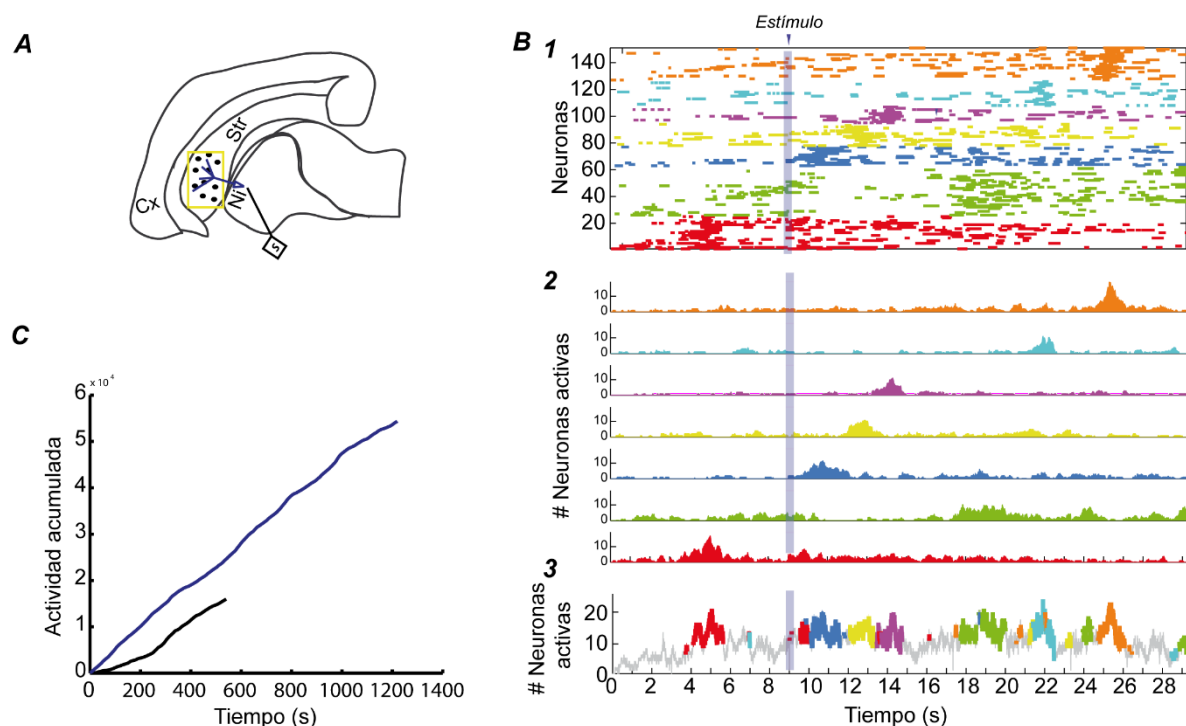


FIGURA 15. Activación del microcircuito estriatal por estimulación eléctrica talámica. (a) Esquema de la rebanada con la disposición del electrodo de estimulación y el campo de registro. (b1) Grafica tipo raster con el protocolo de estimulación en el tálamo. El momento de estimulación se muestra con una punta de flecha en la parte superior del raster. (b2) Suma de la actividad de las neuronas a lo largo del experimento. (b3) Suma de la actividad neuronal en cada intervalo de tiempo (250 ms), están coloreados ensambles de eventos respectivos. (c) La gráfica muestra con líneas continuas la actividad acumulada (suma de células coactivas a lo largo del tiempo) del experimento representativo antes (línea negra) y después del estímulo (línea azul).

En la Figura 16a se muestran coloreados los distintos eventos de los ensambles identificados en el análisis de modularidad (5% de los picos de coactividad más altos para el histograma de cada ensamble), observamos también el instante del estímulo eléctrico con una sombra gris en el minuto 9. En la sección 16b observamos el diagrama de estos eventos de ensambles donde podemos seguir la dinámica total del microcircuito a través de la línea negra que une temporalmente a dichos eventos (coloreados de acuerdo a su ensamble). El histograma con los instantes de tiempo de la aparición de los distintos eventos también se muestra en la Figura 16c. Se observa que a partir del minuto 9, correspondiente al instante de tiempo de entrega del tren de pulsos eléctricos, aparece una dinámica totalmente distinta con respecto a la baja actividad del estriado en situación control. La estimulación talámica provocó un aumento significativo de la actividad neuronal por minuto de todas las neuronas presentes en varias rebanadas de 8.6 ± 0.4 en situación control a 11.2 ± 0.3 después de la estimulación cortical (Figura 15d; $p < 0.001$; $n = 1092$ neuronas obtenidas de 7 rebanadas; prueba de los rangos con signo de Wilcoxon). De la misma manera en relación a los eventos de ensambles contabilizados en cada intervalo de un minuto hubo un aumento significativo de 0.3 ± 0.1 en situación control a 6.2 ± 0.7 después de la estimulación cortical (Figura 15e; $p < 0.001$; $n = 49$ ensambles obtenidos de 7 rebanadas; prueba de los rangos con signo de Wilcoxon).

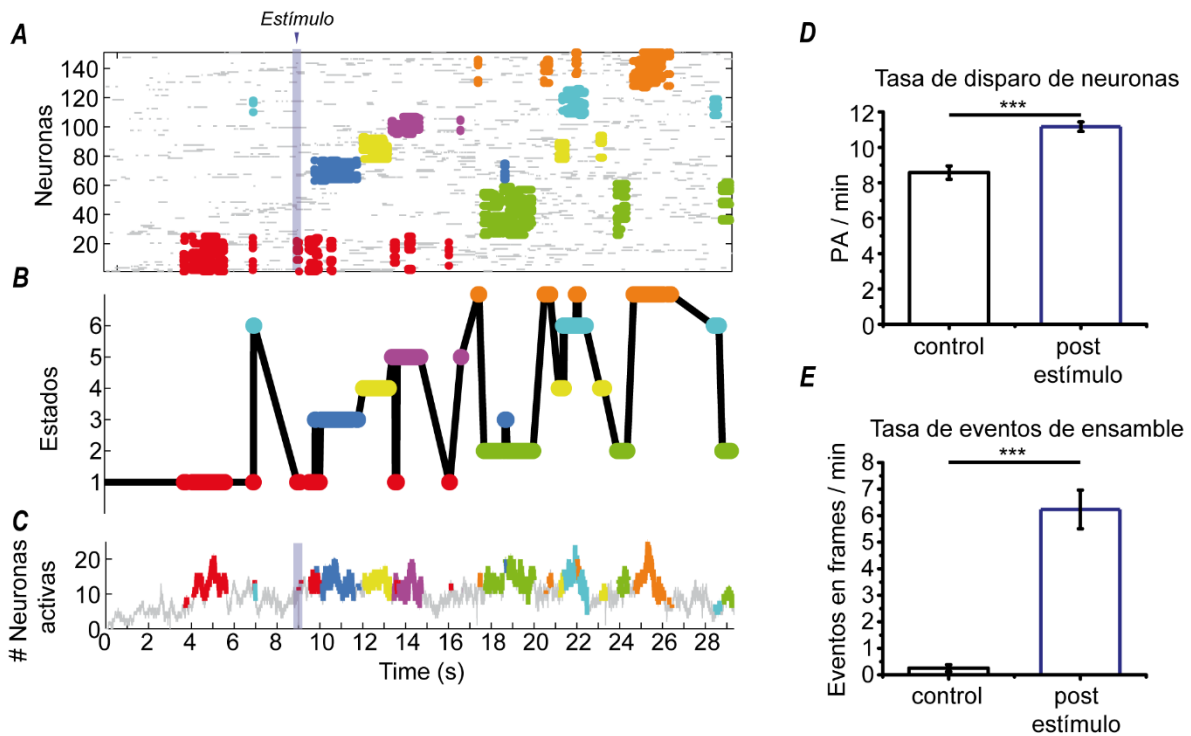


FIGURA 16. Patrones de ensambles neuronales evocados por estimulación tálamoestriatal. (a) Gráfica tipo raster con las neuronas ordenadas de acuerdo a la pertenencia a su ensamble, solo se encuentran coloreados los instantes de tiempo donde cada ensamble presentó eventos de ensambles. (b) Eventos de ensamble denotados como círculos coloreados acorde a su pertenencia a un determinado ensamble y con una línea mostrando las secuencias temporales que forman en conjunto. (c) Suma de la actividad neuronal en cada intervalo de tiempo (250 ms), están coloreados los respectivos eventos de ensambles del panel a. (d) Diagramas de caja que comparan la actividad individual neuronal por minuto antes y después del estímulo: claramente se puede observar un incremento de actividad después del estímulo. (e) Diagramas de caja que comparan los eventos de ensamble en cada cuadro del video.

8.8 Importancia de las neuronas hub ante la estimulación cortical y talámica

La generación repetitiva de estas respuestas polisinápticas activa el microcircuito estriatal por varios minutos, tanto desde la corteza como desde el tálamo. Con el fin de encontrar una diferencia en la estructura de la actividad evocada por la estimulación de estas dos vías descritas en el microcircuito estriatal abordamos el problema con la metodología de la teoría de redes complejas. Construimos la red del microcircuito usando las matrices de similitud (Figura 11b) de cada experimento, como están construidas con la correlación cruzada eso nos da un rango de valores de -1 a 1, con el objeto de obtener una red binaria

funcional (0 no existe y 1 si existe conexión funcional) se colocó un umbral variable para cada correlación entre pares presente en cada experimento (ver materiales y métodos). Con este procedimiento se forma la matriz adyacente de la red, la cual contiene toda la información para construir una red.

En la Figura 17a podemos ver la red del microcircuito en situación control, la localización de las neuronas ha sido dispuesta formando un círculo (visualización circular), las neuronas pertenecientes a un ensamble dado se encuentran marcadas con un color y lugar específico. Observe la cantidad de conexiones que existen entre los distintos ensambles. En la sección 17b observamos la distribución de grado de las neuronas en la red, en líneas punteadas tenemos el ajuste a la función ley potencia (ver materiales y métodos). Las redes que siguen la ley potencia tienen muchas neuronas con pocas conexiones y pocas neuronas con muchas conexiones, justo como podemos observar en el efecto de “cola larga” que posee la distribución que ahí se muestra, las pocas neuronas que tienen un alto número de conexiones se conocen como neuronas concentradoras o “*hubs*”, en otras palabras, muestran redes con una organización jerárquica. En la Figura 17c se observa la misma distribución, pero con los ejes en escala logarítmica, las funciones que siguen la ley potencia forman una línea recta en la escala log-log, y la pendiente de esta línea es un parámetro en teoría de redes complejas que da una buena cuantificación de la estructura de la red, en este caso $\gamma=1.3$. En la sección 17d-f encontramos la red y la distribución de conexiones del microcircuito resultado de estimular la vía tálamoestriatal, existe una mayor interacción de los elementos de la red y se ve reflejado en el cambio de pendiente a un valor de $\gamma=0.6$, lo cual indica que hubo un número de mayor de “*hubs*” con respecto a los demás elementos de la red. Lo mismo podemos decir para la red resultado de la estimulación de la vía córticoestriatal, valores pequeños de γ a menudo reflejan redes con mayor interacción entre sus elementos sin importar el grado (número de conexiones) que poseen en la estructura de la red, sin llegar a casos extremos donde las todas las neuronas tienen el mismo número de conexiones (red regular).

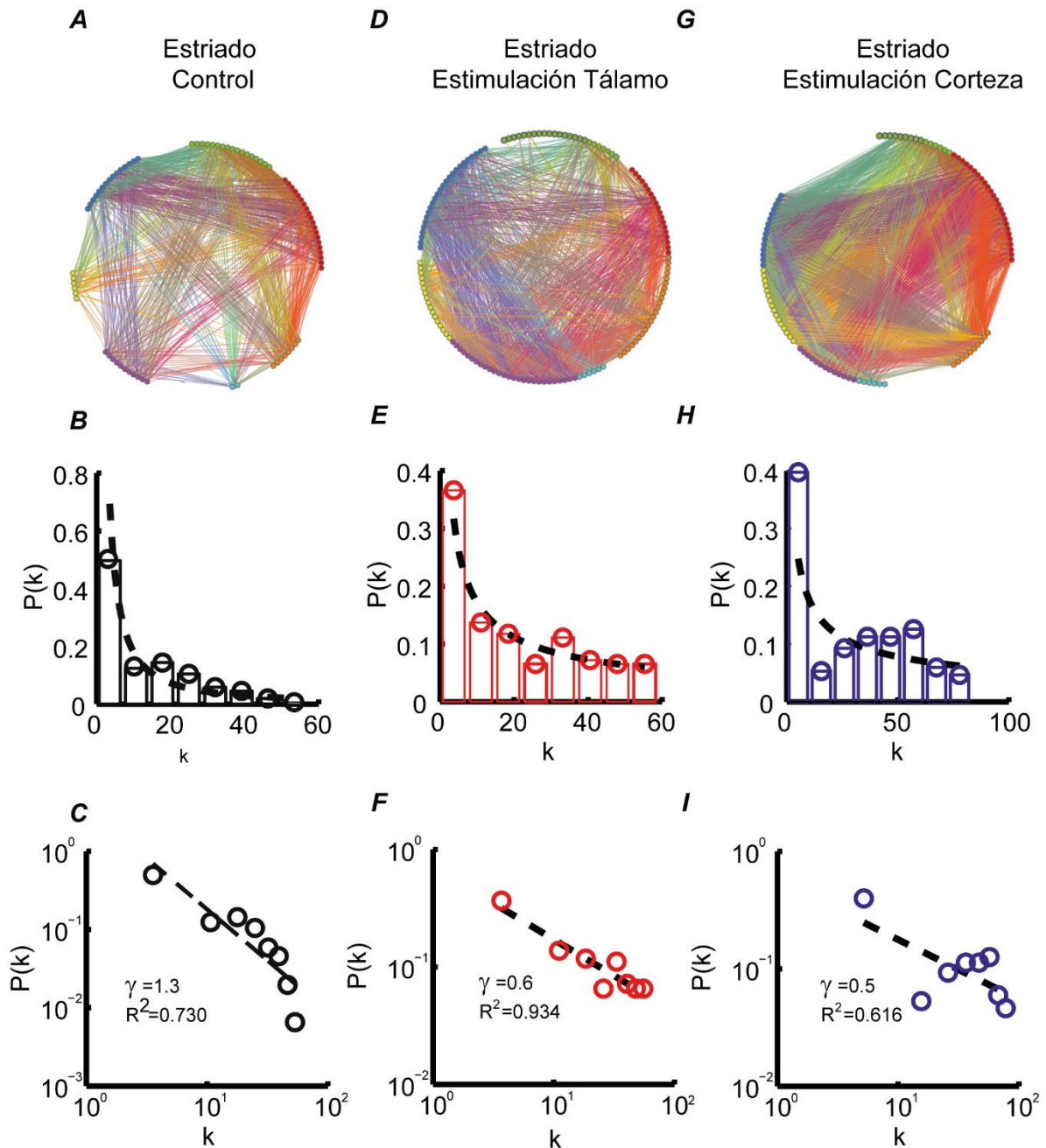


FIGURA 17. Visualización circular de las conexiones de los microcircuitos del estriado en diferentes condiciones y su distribución de conexiones mostrando la relevancia de las neuronas altamente conectadas. (a) El microcircuito del estriado control representativo y reordenado circularmente para observar mejor la estructura interna de las conexiones funcionales. (b) Distribución del número de conexiones $P(k)$, observe el efecto de “cola larga”. (c) Gráfica log–log de la distribución de conexiones se aproxima a una línea recta. Por tanto, se realizó

un ajuste de la función potencia que tuvo como exponente $\gamma = 1.3$, confirmando una estructura jerárquica en la cual pocas neuronas están muy conectadas (hubs) (d-f): Análisis de la distribución de conexiones del microcircuito del estriado con estimulación en el tálamo representativo. Note que se incrementan el número de conexiones y que el valor de $\gamma = 0.6$, indicando un cambio en la estructura de la red. (g-i) Análisis de la distribución de conexiones del microcircuito del estriado con estimulación en la corteza representativo. Note que se incrementan el número de conexiones con respecto al control y que el valor de $\gamma = 0.5$, indicando un cambio en la estructura de la red.

8.9 La estructura jerárquica en microcircuitos del estriado control, estimulación cortical y talámica

Otra forma de develar la estructura de las redes es la distribución del coeficiente de agrupamiento (ver materiales y métodos), en la Figura 18a observamos la gráfica correspondiente a tal medición, nuevamente la forma de cola larga es evidencia de la existencia de pocas neuronas con un valor alto de este coeficiente, recordemos que este parámetro es una medida que representa la forma en la cual están conectados los vecinos de un nodo específico (en analogía a las redes sociales que tanto se conocen entre sí mis conocidos). El valor de la pendiente en la gráfica log-log es una medida directa de la estructura de la red en relación a lo que hemos mencionado.

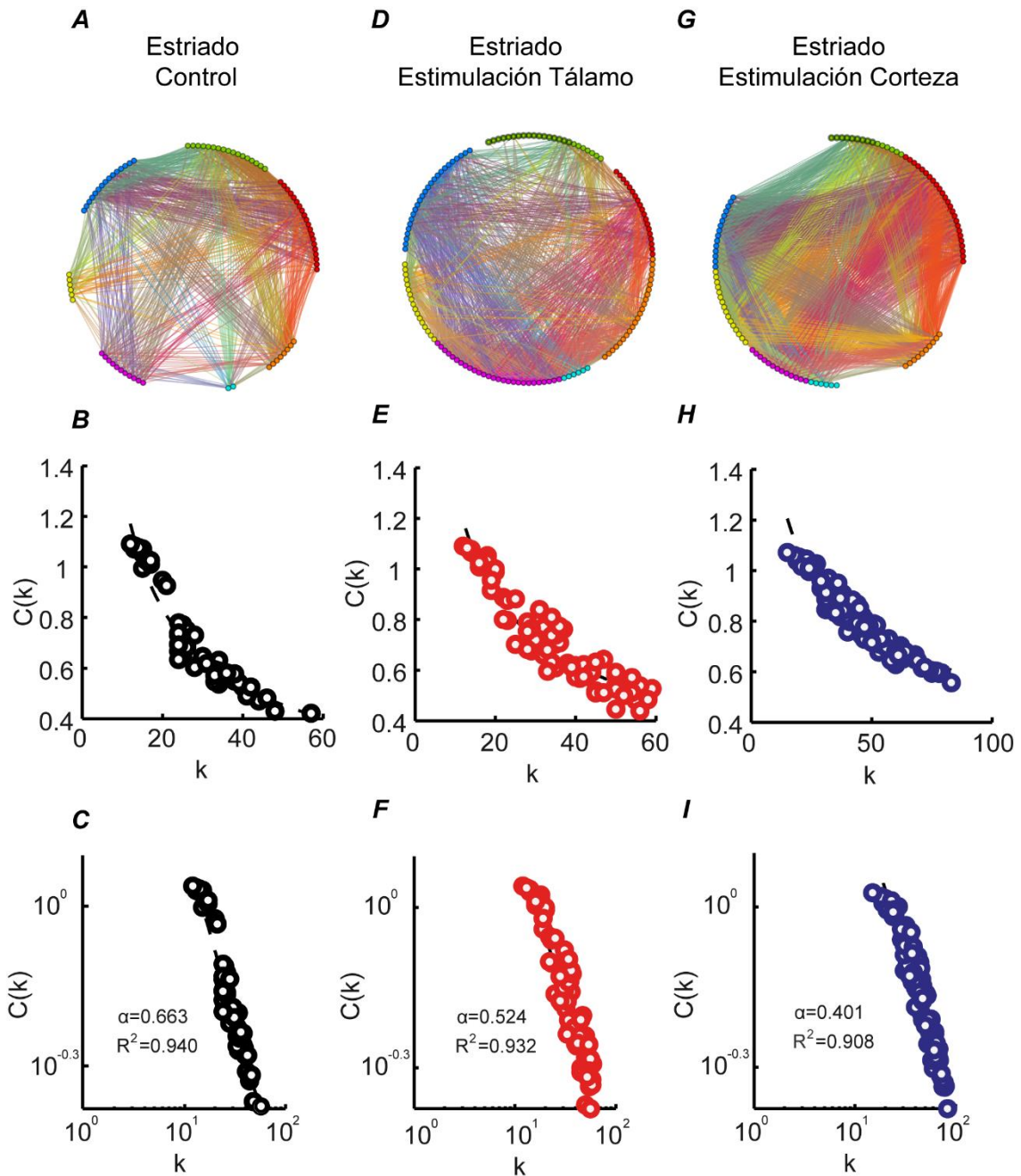


FIGURA 18. Visualización circular de las conexiones de los microcircuitos del estriado en diferentes condiciones para denotar la arquitectura jerárquica medida a través del coeficiente de agrupamiento. (a) Distribución del coeficiente de agrupamiento $C(k)$ de la red estriatal en situación control, observe el efecto de “cola larga”. (b) Gráfica log–log de la distribución del coeficiente de agrupamiento, se aproxima a una línea recta. Por tanto, se realizó un ajuste

de la función potencia que tuvo como exponente $\alpha = 0.6$, confirmando una estructura jerárquica en la cual pocas neuronas están conectadas a neuronas que también están conectadas entre sí. (c-d) Análisis de la distribución de coeficiente de agrupamiento para la red después de estimular la vía tálamoestriatal. (e-f) Análisis de la distribución de coeficiente de agrupamiento para la red después de estimular la vía córticoestriatal. Se observa un cambio muy pequeño indicando que la estructura jerárquica de la red no se pierde después del estímulo eléctrico.

En la Figura 19a podemos ver el diagrama de cajas correspondiente al parámetro γ , como se hizo notar en la Figura 17 el efecto de estimular tanto en la corteza como en el tálamo resulta en una disminución de este parámetro. El hecho de que la pendiente en situación control sea de $\gamma = 1.03 \pm 0.05$ refleja lo que en teoría de redes complejas se conoce como una red de “mundo real”, se han reportado redes en la naturaleza con este rango de valores. Sin embargo, valores más altos en este parámetro se han identificado como patológicos (Pérez-Ortega et al., 2016). Aquí obtenemos valores de $\gamma = 0.67 \pm 0.04$ y $\gamma = 0.67 \pm 0.02$ para las redes que resultan después de la estimulación eléctrica que manifiestan que la red se movió a un estado fuera de lo normal (control) pero no hacía un estado patológico, como podemos ver en los rasters anteriores la dinámica de los ensambles neuronales y por lo tanto de las neuronas individuales muestra un enriquecimiento, como habíamos buscado, logramos activar el circuito estriatal con un estímulo que no lleva al sistema a un estado de terminación (muerte neuronal). Estas diferencias fueron significativas al compararse con la situación control ($p < 0.001$; $n_1 = 13$ redes control, $n_2 = 66$ redes con estimulación en corteza, 6 rebanadas; $p < 0.001$; $n_1 = 13$ redes control, $n_2 = 77$ redes con estimulación en tálamo; prueba Mann-Whitney con ajustes de Holm-Sidak). La sección 19b muestra los resultados para el parámetro α , correspondiente a la pendiente de la recta formada en log-log de la distribución de coeficiente de agrupamiento. En situación control $\alpha = 0.51 \pm 0.01$, valores $\alpha > 0.6$ han sido asociados con situaciones patológicas (Pérez-Ortega et al., 2016). Aquí los valores obtenidos después del estímulo eléctrico van en dirección contraria a la patología y son significativamente diferentes a la situación control ($\alpha = 0.38 \pm 0.01$ y $\alpha = 0.43 \pm 0.01$,

corteza y tálamo) indicando que las redes resultantes son totalmente funcionales ($p < 0.001$; $n_1 = 13$ redes control, $n_2 = 66$ redes con estimulación en corteza, 6 rebanadas; $p < 0.001$; $n_1 = 13$ redes control, $n_2 = 77$ redes con estimulación en tálamo; prueba Mann-Whitney con ajustes de Holm-Sidak).

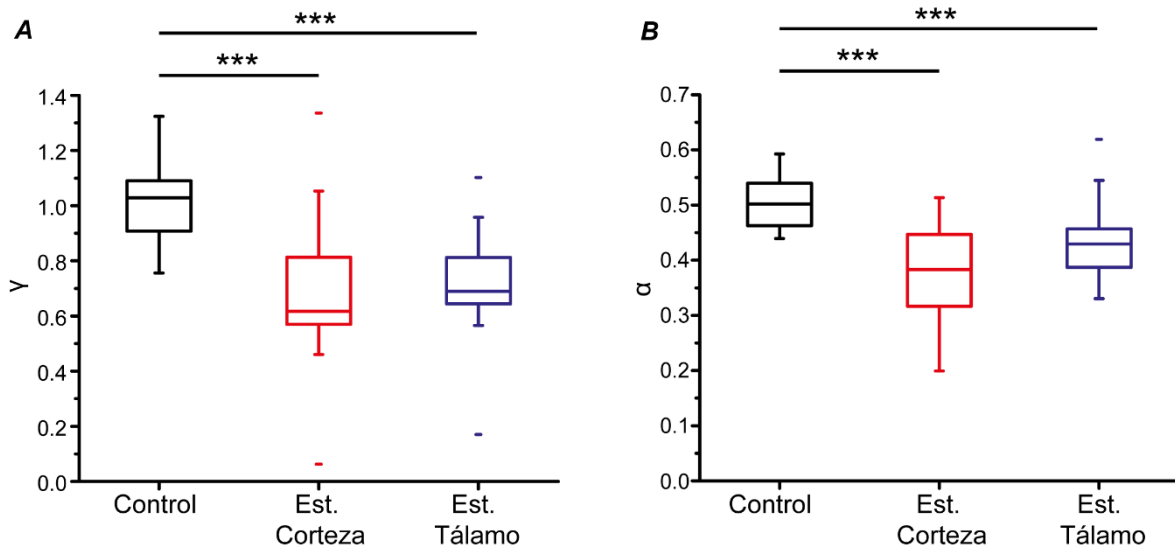


FIGURA 19. Comparación estadística de los parámetros de red entre los microcircuitos del estriado espontáneo y después de las estimulaciones eléctricas. Gráficas de caja que resumen la información de las distribuciones, los percentiles y el promedio de los parámetros de red. (a) Comparación de los exponentes de las distribuciones de grado (γ) ajustadas a una función potencia genérica. (b) Comparación de los exponentes del coeficiente de agrupamiento en función de las conexiones (α) ajustadas a la función potencia.

9. DISCUSIÓN

9.1 Contribución de los canales de CaV_3 en las D1 y D2-SPNs

El principal hallazgo de aplicar el mismo estímulo ortodrómico (cuatro potenciales sinápticos a 20 Hz con intensidades que varían de 0.2 a 0.68 μA al mismo potencial de membrana de las SPNs, fue que procesan sus entradas sinápticas de manera diferente: en las D1-SPNs aumenta el número de eAP en función de la intensidad del estímulo y las magnitudes de las respuestas sinápticas, por el contrario, las neuronas D2-SPNs alcanzan un número máximo de eAP con intensidades de estímulo más débiles y este número

permanece constante a pesar del aumento de la intensidad del estímulo. La entrada de Ca^{2+} en el soma es gradual y acumulativa, como el número de eAPs disparados en las D1-SPNs. Debido a que las sinapsis de la corteza se distribuyen en las dendritas de las SPNs en forma pasiva (Cowan & Wilson, 1994), la entrada de Ca^{2+} y los eAPs pueden inferirse como proporcionales a la activación de entradas sinápticas en las D1-SPNs, pareciéndose a un código de frecuencia (Gerstner et al., 1997). Por el contrario, los eAPs en las D2-SPNs hacen que la entrada de Ca^{2+} en el soma aumente lentamente, lo que implica que las D2-SPNs tienen un mínimo de entradas sinápticas necesarias para alcanzar su máximo disparo de PA. Las neuronas que alcanzan un disparo máximo con estímulos débiles son comunes durante un código poco denso (*sparse coding*, ventanas detectoras de coincidencias). Estas neuronas tienen dos características: la activación se produce por encima de los potenciales de inactivación y la inhibición limita el número de PA (Poo & Isaacson, 2009). Ambas características se encontraron en las D2-SPNs.

Sin embargo, cuando la intensidad del estímulo es muy alta en las D2-SPNs, se producen dos fenómenos en paralelo: primero, los potenciales regenerativos de Ca^{2+} se propagan hacia el área somática; y segundo, hay un aumento repentino en la entrada de Ca^{2+} que se satura, ya que un estímulo adicional no lo cambia. Probablemente, los eventos de Ca^{2+} regenerativos no se propagan hacia el axón, por lo tanto, estos potenciales pueden verse como otra forma de limitar el número de AP disparados por las D2-SPNs. Estos fenómenos no están presentes en D1-SPNs. Otras formas de limitar el número de eAP son la inhibición sináptica y la rápida activación de las corrientes salientes a través de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (ver Arias-García, et al 2013). Las D1-SPNs exhiben una activación más lenta de los canales de Ca^{2+} dependientes de K^+ (Arias-García et al., 2013).

¿Cuál sería el potencial de inactivación que puede contribuir a limitar la duración, y por lo tanto el número de eAP, por las entradas sinápticas en las D2-SPNs? Diferentes fuentes de Ca^{2+} afectan las respuestas sinápticas en SPN a nivel dendrítico.

Los canales CaV_1 se descartan ya que la corriente que generan se desactiva lentamente y el potencial resultante dura toda la respuesta en ambas clases de células (Flores-Barrera et al., 2011). La entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de glutamato ionotrópicos también

se descarta debido a que la despolarización que producen aumenta gradualmente como una función de la intensidad del estímulo en ambas clases de células (Vizcarra-Chacón et al., 2013) y no pudo explicar sus diferencias en la eAP o la dinámica de Ca^{2+} somática. Sin embargo, los canales de CaV_3 aparecen como un buen candidato ya que se inactivan rápidamente (Pérez-Reyes, 2003; Senatore, et al 2014) y se han demostrado en espinas dendríticas de SPN (Carter & Sabatini, 2004; Higley & Sabatini, 2008). En contraste, estos canales no están presentes de manera significativa en el soma y la membrana dendrítica proximal de los SPNs (Bargas et al., 1994).

Las evidencias descritas en este trabajo que respaldan que los canales CaV_3 generan un potencial de inactivación que contribuye de manera importante a la despolarización sináptica en D2-SPN son: (a) El fuerte aumento de la entrada de Ca^{2+} somático a intensidades de estimulación altas se elimina junto con los potenciales de Ca^{2+} propagados cuando los canales CaV_3 son bloqueados con el antagonista selectivo NNC. Este fuerte aumento en la entrada de Ca^{2+} está ausente en D1-SPNs y constituye una diferencia principal en la forma en que el Ca^{2+} entra en el área somática en ambas clases de células. Es posible que los potenciales de Ca^{2+} propagados al soma no se deban a los canales CaV_3 , sino que se activan en las dendritas (Flores-Barrera et al., 2011). (b) En paralelo con este fenómeno, el aumento repentino de un máximo de eAP en las D2-SPNs durante el aumento de la intensidad del estímulo se reduce significativamente cuando se bloquean los canales CaV_3 , sugiriendo que los canales CaV_3 contribuyen a este comportamiento. La entrada de Ca^{2+} también está reducida en las D1-SPNs cuando los canales CaV_3 están bloqueados, no así el disparo acumulativo de los eAP, proporcional a la intensidad del estímulo, lo que sugiere que los canales CaV_3 no contribuyen significativamente a este comportamiento.

(c) El bloqueo de la inhibición GABAérgica fue diferente en las D1-SPNs en comparación con las D2-SPNs: disminuyeron las respuestas en la duración a la amplitud media en las D1-SPNs y aumentó en las D2-SPNs (Figura 7e, f). La razón de este comportamiento fue que el bloqueo de la inhibición generó una despolarización significativamente más fuerte en las D2-SPNs (Figura 7g). Se demostró que esta despolarización más fuerte es un pico de bajo umbral presente en las D2-SPNs y ausente en las D1-SPNs (consulte la Figura 7b, d). Este

pico de bajo umbral fue abolido al bloquear los canales CaV_3 como en otras células que los expresan. Se sabe que estos canales están presentes en las dendritas de las D2-SPNs (Carter & Sabatini, 2004). Aquí, mostramos su influencia cuando las respuestas sinápticas alcanzan el soma y se generan AP. De hecho, si los AP son generados por las inyecciones de corriente en el soma, el disparo de las D2-SPNs es acumulativo y gradual, siendo una función de la intensidad del estímulo, como en las D1-SPNs, lo que apoya que el comportamiento particular de estas células durante la estimulación cortical se deba a procesamiento dendrítico. Antes del uso de animales transgénicos, se había observado que las SPNs revelan dos comportamientos diferentes cuando se hiperpolarizan durante las respuestas sinápticas de supraumbrales: uno muestra una despolarización de meseta y el otro muestra un pico de bajo umbral (Bargas et al., 1991). (d) El bloqueo de los canales CaV_3 deprime significativamente los potenciales sinápticos por debajo del umbral en las D2-SPNs, no así en las D1-SPNs. Esta depresión ocurre durante toda la función sigmoidea de las curvas intensidad-respuesta de las respuestas sinápticas por debajo del umbral en ambas clases neuronales. Sin embargo, al alcanzar las respuestas máximas (R_{MAX} , ver material y métodos), solo la mitad del ancho de las respuestas de las D2-SPNs se vio afectada significativamente. El hecho de que las funciones de las curvas intensidad-respuesta en ambas clases de neuronas fueran sigmoidales y acumulativas confirma que no es el aumento gradual en las respuestas sinápticas que llegan al soma lo que causa las diferencias en el disparo, sino el componente activo agregado por los canales CaV_3 en las D2-SPNs son necesarios. Dicho esto, el bloqueo de los canales CaV_3 no fue suficiente para evitar alcanzar el máximo disparo de D2-SPN. El bloqueo de la inhibición sináptica fue necesario para abolir este máximo, de modo que las D2-SPNs aumentaron el número de eAP en función de la fuerza sináptica. Esta es otra característica de las neuronas que actúan como detectores de coincidencia (Pérez-Orive et al., 2002; Poo & Isaacson, 2009). El bloqueo de inhibición también desplaza el salto en la entrada de Ca^{2+} hacia un estímulo más débil en las D2-SPNs. Estas propiedades sugieren que las interneuronas que controlan la inhibición dendrítica son cruciales en la vía indirecta.

La evidencia anterior que muestra las contribuciones diferenciales de los canales CaV_3 en las respuestas sinápticas entre las D1-SPNs y D2-SPNs, no excluye otras posibles diferencias intrínsecas o extrínsecas que requieren más investigación.

9.2 Consecuencias de la expresión diferencial de canales CaV_3 en la integración sináptica

En resumen, el antagonista selectivo de los canales CaV_3 , NNC 55-0396 (10 μ M; NNC) no cambió la naturaleza de la respuesta gradual de las D1-SPNs. En contraste, el mismo antagonista cambio considerablemente el comportamiento de salto de la entrada de Ca^{2+} en las D2-SPNs con fuertes intensidades de estímulo y, al mismo tiempo, disminuyó el aumento de disparos de eAP hacia su máximo con las intensidades de estímulo más débiles. Sin embargo, no aumento el número máximo de eAPs. Es importante destacar que la inhibición junto con la activación de las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Arias-García y otros, 2013) tiene el papel de limitar el número de eAP activados en las D2-SPNs. Debido a que la inhibición GABAérgica tiene el mismo potencial de inversión en ambas clases de neuronas (Bracci y Panzeri, 2006; Flores-Barrera et al., 2009; Jiang & North, 1991; Kita, 1996; Misgeld et al., 1982), las aparentes diferencias en la inhibición entre las SPNs (Flores-Barrera et al., 2011) parecen deberse, al menos en parte, a las diferencias en la expresión de los canales CaV_3 . Finalmente, la propagación de potenciales de Ca^{2+} hacia el soma también puede actuar para limitar el número de eAP por las D2-SPN.

Cuando están activas las neuronas del estriado forman ensambles neuronales que alternan su actividad (Carrillo-Reid et al., 2009). Estos conjuntos están conformados por grupos de neuronas, cada una a cargo de un acto motor (Klaus et al., 2017). Si, además, algunas neuronas en el circuito tienen una ventana de tiempo limitada para disparar, estas neuronas pueden funcionar como detectores de coincidencia (Poo & Isaacson, 2009). De hecho, los disparos de las D2-SPNs se inician durante el inicio o finalización de la acción (Cui et al., 2013). En contraste, los disparos de las D1-SPNs están durante la ejecución del movimiento. Por lo tanto, las diferentes propiedades de codificación descritas aquí pueden ser la base de los diferentes roles de las D1-SPNs y D2-SPNs durante el comportamiento. Un código de tasa gradual en las D1-SPNs está de acuerdo con el hecho de que el movimiento durante la

acción debe responder a la demanda (Cui et al., 2013; Parker et al., 2018). Por el contrario, cuando ocurre una operación inesperada (Ding et al., 2010), la necesidad de iniciar o detener una acción repentinamente puede utilizar mejor un detector de coincidencia. Estas diferencias sugieren una variación en las conexiones corticales a los elementos de los conjuntos neuronales dependiendo de qué área de la corteza se está activando transitoriamente durante el comportamiento (Choi et al., 2018).

9.3 Activación del microcircuito estriatal

La dinámica de los microcircuitos neuronales durante el comportamiento y aprendizaje es poco conocida. Muchos ensambles neuronales desaparecen durante el parkinsonismo, lo que deja un conjunto altamente recurrente (Aparicio-Juárez et al., 2017; Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016), recientemente registros in vitro de actividad espontánea en animales privados de dopamina se ha demostrado que ambas poblaciones SPNs participan y además aumentaron en cierta medida su actividad (Jáidar et al., 2019). Además, la inhibición colateral se pierde considerablemente durante esta condición (López-Huerta et al., 2013; Taverna et al., 2008). Estos fenómenos pueden explicar los estados sincrónicos y la dificultad para iniciar o detener los movimientos en la enfermedad de Parkinson.

En términos de las estimulaciones eléctricas en el NE por la vía córticoestriatal y tálamoestriatal se cuantificó un aumento de la actividad de neuronas únicas, así como de los distintos ensambles neuronales presentes en el tejido. Estos ensambles se activan de manera coordinada, muestran reverberaciones, recurrencias y alternancia entre sus elementos.

Las redes neuronales activadas por ambas vías aferentes poseen distribuciones de conexiones funcionales y coeficiente de agrupamiento representativas de las redes reales (siguen la ley potencia). Estas redes neuronales biológicas se organizan de manera jerárquica, es esta característica la que permite que grupos de neuronas presenten actividad correlacionada la cual produce alternancia entre los diferentes ensambles. Es posible que los diferentes tipos neuronales participaren de manera diferencial dentro de estos ensambles. En particular nos interesa el posible papel coordinador de las

interneuronas. En trabajos futuros esperamos poder discernir con ayuda de animales transgénicos el papel de cada uno de los tipos de interneuronas del NE. Ya que actualmente poseemos las herramientas cuantitativas para poder identificar cuáles son las neuronas con más alta jerarquía dentro de la red, es decir, podemos distinguir cuales son las neuronas que coordinan la actividad del microcircuito.

10. CONCLUSIÓN

La estimulación sináptica de la vía córticoestriatal reveló diferencias en las propiedades de codificación de las D1 y D2-SPNs. Las D1-SPNs disparan APs y aumenta gradualmente la entrada de Ca^{2+} somático, en función de la intensidad del estímulo. En contraste, las D2-SPNs alcanzan un número máximo de AP con bajas intensidades de estímulo y con un cambio mínimo en la entrada de Ca^{2+} somático. Sin embargo, si la fuerza sináptica alcanza un cierto valor, el número de disparos no aumenta, sino que, se propagan los potenciales de Ca^{2+} y se produce un salto en la entrada de Ca^{2+} . Este comportamiento de las D2-SPNs se elimina cuando se bloquean los canales CaV_3 . La sustracción del componente bloqueado revela un disparo de bajo umbral en las D2-SPNs no visto en las D1-SPNs como se observa desde el soma. La inhibición sináptica rápida no cambia las propiedades de codificación de las D1-SPNs, por el contrario, hace que las D2-SPNs aumenten el número máximo de eAP y el salto en Ca^{2+} con menor intensidad de estímulo. Concluimos que las diferencias en la contribución de los canales CaV_3 ayudan a conferir diferentes propiedades a las clases de SPNs. Además de las respuestas a la dopamina, estas diferentes propiedades de codificación pueden subyacer a las diferentes funciones que tienen estas neuronas en los circuitos de los ganglios basales.

Por otro lado, los resultados de imagenología de Ca^{2+} indican que se pueden encontrar parámetros de estimulación que producen respuestas polisinápticas y supraumbrales tanto desde el tálamo como desde la corteza. Ambas redes después del estímulo muestran incrementos en la actividad neuronal y sus parámetros de redes que se alejan de lo patológico, al contrario, la dinámica de los microcircuitos que se hallan inmersos en esas redes aumentan sus interacciones entre sí, enriqueciendo la cantidad de información que

la red podría estar codificando en esos instantes. No hay evidencia de que las dinámicas de las redes una vez estimuladas sea diferente entre sí, probablemente con otros protocolos de estimulación podríamos identificar diferencias sustanciales en la actividad evocada. Es relativamente reciente el contar con métodos para registrar y observar la actividad conjunta de varias neuronas simultáneamente. La técnica que hemos usado en este trabajo, la imagenología de Ca^{2+} , nos permiten estudiar la interacción de decenas de neuronas al mismo tiempo. Estos experimentos nos ayudan a entender cómo funcionan los microcircuitos de pequeña escala, nos permiten observar su dinámica temporal y su estructura intrínseca. Uno de los pasos más importantes en este tipo de estudios es definir parámetros cuantitativos que definan diferentes clases de microcircuitos y que podamos distinguirlos los microcircuitos sanos y funcionales de los patológicos o aberrantes (Pérez-Ortega et al., 2016). Todo esto con el fin último de encontrar las reglas de funcionamiento de los microcircuitos neuronales. En este trabajo proponemos distintas formas de efectuar tal análisis con herramientas cuantitativas sólidas. La meta es encontrar las propiedades emergentes de las interacciones neuronales a escala histológica (tejido neuronal donde es posible visualizar decenas de neuronas).

11. BIBLIOGRAFÍA

Ade, K. K., Janssen, M. J., Ortinski, P. I., & Vicini, S. (2008). Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *Journal Neuroscience*. 28 (5): 1185-97.

Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neuroscience*. 12 (10): 366-75.

Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., & Bargas, J. (2017). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *European Journal of Neuroscience*.

Arias-García, M. A., Tapia, D., Flores-Barrera, E., Pérez-Ortega, J. E., Bargas, J., & Galarraga, E. (2013). Duration differences of corticostriatal responses in striatal projection neurons depend on calcium activated potassium currents. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 7: 63.

Arias-García, M. A., Tapia, D., Laville, J. A., Calderón, V. M., Ramiro-Cortés, Y., Bargas, J., & Galarraga, E. (2018). Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Structure and Function*. 223 (3): 1229-1253.

Balleine, B. W., Delgado, M. R., & Hikosaka, O. (2007). The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *Journal of Neuroscience*. 27 (31): 8161-5.

Balleine, B. W., Liljeholm, M., & Ostlund, S. B. (2009). The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behavioural Brain Res*. 199 (1): 43-52.

Barabási, A. L., Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics*. 5 (2): 101-13.

Bargas, J., Galarraga, E., & Aceves, J. (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Research*. 539 (1): 159-63.

Bargas, J., Galarraga, E. (2000). La acción neuromoduladora de la dopamina sobre los ganglios basales. Ciencia al día. Instituto de Fisiología Celular.

Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y., & Surmeier, D. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *Journal of Neuroscience*. 14 (11 Pt 1): 6667-86.

Bartos, M., Vida, I., & Jonas, P. (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature Reviews Neuroscience*. 8 (1): 45-56.

Bishop, G. A., Chang, H. T., Kitai, S. T. (1982). Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience*. 7 (1): 179-91.

Bolam, J. P., Wainer, B. H., & Smith, A. D. (1984). Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience*. 12 (3): 711-8.

Boccaletti, S., Latora, V., Moreno, Y., Chávez, M., Hwang, D. (2006). Complex networks: structure and dynamics. *Physics Reports*. 424 (4-5): 175-308.

Bolam, J. P., Wainer, B. H., & Smith, A. D. (1984). Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience*. 12 (3): 711-8.

Bracci, E., & Panzeri, S. (2006). Excitatory GABAergic effects in striatal projection neurons. *Journal of Neurophysiology*. 95 (2): 1285-90.

Brown, S. P., & Hestrin, S. (2009). Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. *Nature*. 457 (7233): 1133-6.

Bruno, A. M., Frost, W. N., & Humphries, M. D. (2015). Modular deconstruction reveals the dynamical and physical building blocks of a locomotion motor program. *Neuron*. 86 (1): 304-18.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G. A., Pisani, A., Sancesario, G., & Bernardi, G. (2000). Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*. 61 (3): 231-65.

Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., & Vargas, J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *Journal of Neurophysiology*. 99 (3): 1435-50.

Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernández, A., Vergara, R., Galarraga, E., & Vargas, J. (2009). Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *Journal of Neurophysiology*. 102 (2): 682-90.

Carter, A. G., & Sabatini, B. L. (2004). State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron*. 44 (3): 483-93.

Carter, A. G., Soler-Llavina, G. J., & Sabatini, B. L. (2007). Timing and location of synaptic inputs determine modes of subthreshold integration in striatal medium spiny neurons. *Journal of Neuroscience*. 27 (33): 8967-77.

Choi, K., Holly, E. N., Davatolhag, M. F., Beier, K. T., & Fuccillo, M. V. (2018). Integrated anatomical and physiological mapping of striatal afferent projections. *European Journal of Neuroscience*.

Cowan, R. L., & Wilson, C. J. (1994). Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *Journal of Neurophysiol.* 71 (1): 17-32.

Crutcher, M. D., & DeLong, M. R. (1984). Single cell studies of the primate putamen. II. Relations to direction of movement and pattern of muscular activity. *Experimental Brain Research*. 53(2): 244-58.

Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., & Costa, R. M. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*. 494 (7436): 238-42.

Czubayko, U., & Plenz, D. (2002). Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proceedings of National Academy of Science*. 99 (24): 15764-9.

Dautan, D., Hacıoğlu Bay, H., Bolam, J. P., Gerdjikov, T. V., & Mena-Segovia, J. (2016). Extrinsic Sources of Cholinergic Innervation of the Striatal Complex: A Whole-Brain Mapping Analysis. *Frontiers in Neuroanatomy*. 10:1.

Day, M., Wokosin, D., Plotkin, J. L., Tian, X., & Surmeier, D. J. (2008). Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *Journal of Neuroscience*. 28 (45): 11603-14.

Deschênes, M., Bourassa, J., & Parent, A. (1995). Two different types of thalamic fibers innervate the rat striatum. *Brain Research*. 701 (1-2): 288-92.

Deschênes, M., Bourassa, J., Doan, V. D., & Parent, A. (1996). A single-cell study of the axonal projections arising from the posterior intralaminar thalamic nuclei in the rat. *European Journal of Neuroscience*. 8 (2): 329-43.

DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13 (7): 281-5.

DeLong, M. R., & Wichmann, T. (2015). Basal Ganglia Circuits as Targets for Neuromodulation in Parkinson Disease. *JAMA Neurology*. 72 (11): 1354-60.

Díaz-Hernández, E., Contreras-López, R., Sánchez-Fuentes, A., Rodríguez-Sibrán, L., Ramírez-Jarquín, O., & Tecuapetla, F. (2018). The Thalamostriatal Projections Contribute to the Initiation and Execution of a Sequence of Movements. *Neuron*. 100(3):739-752.

DiFiglia, M., Pasik, P., & Pasik, T. (1976). A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Research*. 114 (2): 245-56.

Ding, J., Peterson, J. D., & Surmeier, D. J. (2008). Corticostriatal and thalamostriatal synapses have distinctive properties. *Journal of Neuroscience*. 28 (25): 6483-92.

Ding, J. B., Guzman, J. N., Peterson, J. D., Goldberg, J. A., & Surmeier, D. J. (2010). Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron*. 67 (2): 294-307.

Eichenbaum, H. B., & Davis, J. L. (1998). Biological neural networks. In: Eichenbaum, H., Davies, J.L. (Eds.). *Neuronal Ensembles*. Wiley-Liss, NY. pp. 1-15.

Flores-Barrera, E., Laville, A., Plata, V., Tapia, D., Bargas, J., & Galarraga, E. (2009). Inhibitory contribution to suprathreshold corticostriatal responses: an experimental and modeling study. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 29 (5): 719-31.

Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B.J., Tapia, D., Bargas, J., & Galarraga, E. (2010). Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 4: 15.

Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B. J., Bargas, J., Tapia, D., & Galarraga, E. (2011). Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 5: 15.

Fremeau, R. T Jr., Troyer, M. D., Pahner, I., Nygaard, G. O., Tran, C. H., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., & Edwards, R. H. (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*. 31 (2): 247-60.

Galarraga, E., Hernández-López, S., Reyes, A., Barral, J., & Bargas, J. (1997). Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca ++ conductance. *NeuroReport*. 8 (9-10): 2183-6.

Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J Jr., Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*. 250 (4986): 1429-32.

Gerstner, W., Kreiter, A. K., Markram, H., & Herz, A. V. (1997). Neural codes: firing rates and beyond. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94 (24): 12740-1.

Glantz, S.A. (2012). *Primer of Biostatistics*. 7th Ed. McGraw-Hill.

Graybiel, A. M. (1997). The basal ganglia and cognitive pattern generators. *Schizophrenia Bulletin*. 23 (3): 459-469.

Graybiel, A. M., & Smith, K. S. (2014). Good habits, bad habits. *Scientific American*. 310 (6): 38-43.

Grillner, S. (2006). Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron*. 52 (5): 751-66.

Hebb, D. O. (1949). *The Organization of Behavior*. Wiley, New York.

Hernández-López, S.,argas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., & Galarraga, E. (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ -conductance. *Journal of Neuroscience*. 17 (9): 3334-42.

Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2008). Calcium signaling in dendrites and spines: practical and functional considerations. *Neuron*. 59 (6): 902-13.

Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2010). Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nature Neuroscience*. 13 (8): 958-66.

Ibanez-Sandoval, O., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Mendoza, E., Gomora, J. C., Aceves, J., &argas, J. (2007). Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: possible relevance for Parkinson disease. *Journal of Neurophysiology*. 98 (4): 2311-23.

Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R.,argas, J., & Hernández-Cruz, A. (2010). Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *Journal of Neuroscience*. 30 (34): 11326-36.

Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Nakano, Y., Lopez-Huerta, V. G., Hernandez-Cruz, A.,argas J., Garcia-Munoz, M., Arbuthnott, G. W. (2019). Synchronized activation of striatal direct and indirect pathways underlies the behavior in unilateral dopamine-depleted mice. *Eur Journal of Neuroscience*. 49(11):1512-1528.

Jiang, Z. G., & North, R. A. (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro. *Journal of Physiology*. 443: 533-53.

Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *Journal of Neuroscience*. 13 (11): 4908-23.

Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., & Emson, P. C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *Journal of Neuroscience*. 10 (10): 3421-38.

Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1993). Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *Journal Neurophysiology*. 70 (1): 387-96.

Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neuroscience*. 18 (12): 527-35.

Kawaguchi, Y. (1997). Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neuroscience Research*. 27 (1): 1-8.

Kemp, J. M., Powell, T. P. S. (1971). The structure of the caudate nucleus of the cat: Light and electron microscopic study. *Phil Trans R Soc Lond. Biol.* 262 (845): 383-401.

Kerr, J. N., & Plenz, D. (2002). Dendritic calcium encodes striatal neuron output during up-states. *Journal of Neuroscience*. 22 (5): 1499-512.

Kimura, M. (1992). Behavioral modulation of sensory responses of primate putamen neurons. *Brain Research*. 578 (1-2): 204-14.

Kita, H., & Kitai, S. T. (1991). Intracellular study of rat globus pallidus neurons: membrane properties and responses to neostriatal, subthalamic and nigral stimulation. *Brain Research*. 564 (2): 296-305.

Kita, H. (1993). GABAergic circuits of the striatum. *Progress in Brain Research*. 99: 51-72.

Kita, H. (1996). Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neuroscience*. 70 (4): 925-40.

Klaus, A., Martins, G. J., Paixao, V. B., Zhou, P., Paninski, L., & Costa, R. M. (2017). The Spatiotemporal Organization of the Striatum Encodes Action Space. *Neuron*. 96(4):949.

Koós, T., Tepper, J. M. (1999). Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nature Neuroscience*. 2 (5): 467-72.

Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*. 466 (7306): 622-6.

Lacey, C. J., Bolam, J. P., & Magill, P. J. (2007). Novel and distinct operational principles of intralaminar thalamic neurons and their striatal projections. *Journal of Neuroscience*. 27 (16): 4374-84.

López-Huerta, V. G., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Fiordeliso, T., Drucker-Colin, R., & Bargas, J. (2013). The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of parkinsonism. *Journal of Neuroscience*. 33 (11): 4964-75.

Magee, J. C., Johnston, D. (1995). Characterization of single voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons. *Journal of Physiology*. 487 (1): 67-90.

Markram, H., & Sakmann, B. (1994). Calcium transients in dendrites of neocortical neurons evoked by single subthreshold excitatory postsynaptic potentials via low-voltage-activated calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 (11): 5207-11.

McGeorge, A. J., & Faull, R. L. (1989). The organisation of the projections from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*. 29 (3): 503-37.

Miller, R. (1988). Cortico-striatal and cortico-limbic circuits: A two tiered model of learning and memory function. In: Information Processing by the Brain: Views and Hypotheses from a Cognitive-Physiological Perspective (Markowitsch H, ed). Bern: *Hans Huber Press*. 179–198.

Misgeld, U., Wagner, A., & Ohno, T. (1982). Depolarizing IPSPs and depolarization by GABA of rat neostriatum cells in vitro. *Experimental Brain Research*. 45 (1-2): 108-14.

Newman, M. E. (2006). Modularity and community structure in networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103 (23): 8577-82.

O'Donnell, P. (2003). Dopamine gating of forebrain neural ensembles. *European Journal of Neuroscience*. 17 (3): 429-35.

Parker, J. G., Marshall, J. D., Ahanonu, B., Wu, Y., Kim, T. H., Grewe, B. F., Zhang, Y., Li, J. Z., Ding, J. B., Ehlers, M. D., & Schnitzer, M. J. (2018). Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. *Nature*. 557 (7704): 177-182.

Pérez-Garci, E., Bargas, J., & Galarraga, E. (2003b). The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport*. 14 (9): 1253-6.

Pérez-Orive, J., Mazor, O., Turner, G. C., Cassenaer, S., Wilson, R. I., & Laurent, G. (2002). Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science*. 297 (5580): 359-65.

Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernandez-Cruz, A., & Bargas, J. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuit. *Neurobiology of Disease*. 91: 347-61.

Pérez-Ramírez, M. B., Laville, A., Tapia, D., Duhne, M., Lara-González, E., Bargas, J., & Galarraga, E. (2015). KV7 channels regulate firing during synaptic integration in GABAergic striatal neurons. *Neural Plasticity*. 2015: 472676.

Pérez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiological Reviews*. 83 (1): 117-61.

Plotkin, J. L., Day, M., & Surmeier, D. J. (2011). Synaptically driven state transitions in distal dendrites of striatal spiny neurons. *Nature Neuroscience*. 14 (7): 881-8.

Plotkin, J. L., & Surmeier, D. J. (2014). Multiphoton imaging approaches for studying striatal dendritic excitability. *Methods in Molecular Biology*. 1183: 171-82.

Poo, C., & Isaacson, J. S. (2009). Odor representations in olfactory cortex: "sparse" coding, global inhibition, and oscillations. *Neuron*. 62 (6): 850-61.

Raju, D. V., Shah, D. J., Wright, T. M., Hall, R. A., & Smith, Y. (2006). Differential synaptology of vGluT2-containing thalamostriatal afferents between the patch and matrix compartments in rats. *Journal of Comparative Neurology*. 499 (2): 231-43.

Raju, D. V., Ahern, T. H., Shah, D. J., Wright, T. M., Standaert, D. G., Hall, R. A., & Smith Y. (2008). Differential synaptic plasticity of the corticostriatal and thalamostriatal systems in an MPTP-treated monkey model of parkinsonism. *European Journal of Neuroscience*. 27 (7): 1647-58.

Sasaki, T., Matsuki, N., Ikegaya, Y. (2007). Metastability of Active CA3 Networks. *Journal of Neuroscience*. 27(3):517-528.

Salgado H, Tecuapetla F, Pérez-Rosello T, Pérez-Burgos A, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J (2005). A reconfiguration of CaV2 Ca²⁺ channels current and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *Journal of Neurophysiology*. 94 (6): 3771-87.

Saunders, A., Huang, K. W., & Sabatini, B. L. (2016). Globus Pallidus Externus Neurons Expressing parvalbumin Interconnect the Subthalamic Nucleus and Striatal Interneurons. *PLoS One*. 11 (2): e0149798

Senatore, A., Guan, W., & Spafford, J. D. (2014). CaV₃ T-type channels: regulators for gating, membrane expression, and cation selectivity. *Pflugers Arch*. 466 (4): 645-60.

Schultz, W. (2016). Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues Clin Neurosci.* 18 (1): 23-32.

Smeal, R. M., Gaspar, R. C., Keefe, K. A., & Wilcox, K. S. (2007). A rat brain slice preparation for characterizing both thalamostriatal and corticostriatal afferents. *Journal of Neuroscience Methods.* 159 (2): 224-35.

Smith, Y., Raju, D. V., Pare, J. F., & Sidibe, M. (2004). The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neuroscience.* 27 (9): 520-7.

Taverna, S., Ilijic, E., & Surmeier, D. J. (2008). Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience.* 28 (21): 5504-12.

Tecuapetla, F., Jin, X., Q.Lima, S., & Costa, R. M. (2016). Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell.* 166 (3): 703-715.

Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koós, T., & Ibáñez-Sandoval, O. (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in Neuroanatomy.* 4: 150.

Tepper, J. M., Koós, T. (2016). GABAergic Interneurons of the Striatum. *Handbook of Behavioral Neuroscience.* 157-178.

Vandermaelen, C. P., & Kitai, S. T. (1980). Intracellular analysis of synaptic potentials in rat neostriatum following stimulation of the cerebral cortex, thalamus, and substantia nigra. *Brain Research Bulletin.* 5 (6): 725-33.

Vergara, R., Rick, C., Hernández-López, S., Laville, J. A., Guzmán, J. N., Galarraga, E., Surmeier D. J., & Bargas, J. (2003). Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *Journal of Physiology.* 553 (Pt 1): 169-82.

Vizcarra-Chacón, B. J., Arias-García, M. A., Pérez-Ramírez, M. B., Flores-Barrera, E., Tapia, D., Drucker-Colin, R., Bargas, J., & Galarraga, E. (2013). Contribution of different classes of glutamate receptors in the corticostriatal polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neuroscience.* 14: 60.

Watts, D. J., & Strogatz, S. (1998). Collective dynamics of 'small-world' networks. *Nature.* 393 (6684): 440-2.

Wilson, C. J., Chang, H. T., Kitai, S. T. (1990). Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *Journal Neuroscience.* 10 (2): 508-19.

Wilson, C. J. (1986). Postsynaptic potentials evoked in spiny neostriatal projection neurons by stimulation of ipsilateral and contralateral neocortex. *Brain Research*. 367 (1-2): 201-13.

Wilson, C. J. (2004). Basal ganglia. En: *The synaptic organization of the brain*. Ed. Shepherd GM. Oxford University Press, Oxford. 5 th Edition. 361-414.

Zheng, T., & Wilson, C. J. (2002). Corticostriatal combinatorics: the implications of corticostriatal axonal arborizations. *Journal of Neurophysiology*. 87 (2): 1007-17.

Differences in synaptic integration between direct and indirect striatal projection neurons: Role of Ca_v3 channels

Brisa García-Vilchis | Paola Suárez | Miguel Serrano-Reyes | Mario Arias-García |
Dagoberto Tapia | Mariana Duhne | José Bargas  | Elvira Galarraga 

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

Correspondence

Elvira Galarraga, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, DF 04510, México.
Email: egalarra@ifc.unam.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT, 251144 to EG and Frontera 57 to JB) and from Dirección General de Asuntos del Personal académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM IN201517 to EG and IN 201417 to JB)

Abstract

Different corticostriatal suprathreshold responses in direct and indirect striatal projection neurons (SPNs) of rodents have been reported. Responses consist in prolonged synaptic potentials of polysynaptic and intrinsic origin, in which voltage-gated Ca²⁺ currents play a role. Recording simultaneous Ca²⁺ imaging and voltage responses at the soma, while activating the corticostriatal pathway, we show that encoding of synaptic responses into trains of action potentials (APs) is different in SPNs: firing of APs in D1-SPNs increase gradually, in parallel with Ca²⁺ entry, as a function of stimulus intensity. In contrast, D2-SPNs attain a maximum number of evoked spikes at low stimulus intensities, Ca²⁺ entry is limited, and both remain the same in spite of increasing stimulus strength. Stimulus needs to reach certain intensity, to have propagated Ca²⁺ potentials to the soma plus a sudden step in Ca²⁺ entry, without changing the number of fired APs, phenomena never seen in D1-SPNs. Constant firing in spite of changing stimulus, suggested the involvement of underlying inactivating potentials. We found that Ca_v3 currents contribute to Ca²⁺ entry in both classes of SPNs, but have a more notable effect in D2-SPNs, where a low-threshold spike was disclosed. Blockade of Ca_v3 channels retarded the steep rise in firing in D2-SPNs. Inhibition block increased the number of spikes fired by D2-SPNs, without changing firing in D1-SPNs. These differences in synaptic integration enable a biophysical dissimilarity: dendritic inhibition appears to be more relevant for D2-SPNs. This may imply distinctions in the set of interneurons affecting each SPN class.

KEYWORDS

calcium imaging, Ca_v3 channels, inhibition, low-threshold spike, striatal projection neurons, synaptic responses

1 | INTRODUCTION

Previously, we have characterized various differences in the prolonged suprathreshold corticostriatal responses generated by D1-SPNs and D2-SPNs. These differences are enough to identify these neuronal classes in both mice and rats with great precision and predict their molecular markers (Arias-García et al, 2018; Flores-Barrera, Vizcarra-Chacón, Tapia, Bargas, & Galarraga, 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013). D1-SPNs responses are more prolonged, while D2-SPNs responses repolarize faster after briefer trains of action potentials (APs). Inhibition initially hyperpolarizes D1-SPNs with respect to firing threshold thus restraining initial firing, but later it helps to maintain a plateau depolarization that may sustain APs firing (Czubayko & Plenz, 2002; Flores-Barrera et al., 2010). In contrast, inhibition is only hyperpolarizing with respect to firing threshold in D2-SPNs (Flores-Barrera et al., 2010). Nevertheless, the reversal inhibitory potential is similar in all striatal projection

neurons (SPNs) recorded: in between resting and threshold potentials: -65 mV (Bracci & Panzeri, 2006; Flores-Barrera et al., 2009; Jiang & North, 1991; Kita, 1996; Misgeld, Wagner, & Ohno, 1982) and a bimodal distribution of this parameter has not been described. D2-SPNs are considered more excitable (Day, Wokosin, Plotkin, Tian, & Surmeier, 2008), however, they express larger tonic GABAergic inhibition than D1-SPNs (Ade, Janssen, Ortinski, & Vicini, 2008). These differences depend in part on the speed of activation of Ca^{2+} -dependent K^+ currents in each neuronal class (Arias-García et al., 2013). Therefore, an array of mechanisms contributes to these differences but passive properties such as input resistance have been discarded (Arias-García et al., 2018). Here, we show that these differences are in part due to a larger Ca_v3 channels participation in D2-SPNs. Ca_v3 channels are absent in the somatic area of SPNs (Bargas, Howe, Eberwine, Cao, & Surmeier, 1994), but have been demonstrated with two-photon technology in dendritic shafts and spine heads of adult SPNs, where most synaptic entries take place (Carter & Sabatini, 2004; Higley & Sabatini, 2008, 2010). Here, we show evidence that, together with inhibition (Flores-Barrera et al., 2010), a greater participation of Ca_v3 channels in D2-SPNs synaptic responses explains in part the differences in their suprathreshold responses and their synaptic integration.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Animal models

All experiments were carried out in accordance with the international guidelines for the ethical use of experimental animals established in the NIH guidelines and detailed protocols were submitted and approved by the Institutional Committee for Laboratory Animals Care of the Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM (NOM-062-Z00-1999; laboratory procedures EGP-41-14). Rodents were housed in a temperature-controlled, pathogen-free room, on a 12:12 light:dark cycle, and allowed food and water ad libitum, minimizing the number of animals to achieve statistical significance and the avoidance of animal suffering.

As in a previous work (e.g., Arias-García et al., 2018), *in vitro* electrophysiological recordings, Ca^{2+} imaging at the soma and immunocytochemistry were done to identify the neurons in rats and mice between postnatal days (PD) 30–60 (juvenile to young adult, male or female). No species difference could be found in the responses studied (Arias-García et al., 2018). The following strains were used: (a) Wistar rats, (b) Tg (Drd1-EGFP) X60Gsat/Mmmh (BAC-D1; Nathaniel Heintz, The Rockefeller University, GENSAT #: 000297-MU), (c) Tg (Drd2-EGFP) S118Gsat/Mmnc (BAC-D2; Nathaniel Heintz, The Rockefeller University, 000230-UNC), and (d) C57BL/6 NCRL mice. Whole-cell patch clamp recordings and Ca^{2+} imaging were done simultaneously in several experiments (see below). Responses of SPNs from mice and rats were similar within each neuronal class (D1-SPNs and D2-SPNs; Arias-García et al., 2018) evidencing the inter-species/strain robustness of the described phenomena. Therefore, our results show experiments from either mice or rats. Hence, we considered useless, repetitive and a waste of animals to illustrate each experiment in both mice and rats as separate samples. Instead, cases from different experimental subjects are grouped together as in previous work (Arias-García et al., 2018). All differences described until now have been reproduced similarly in both species (Arias-García et al., 2013; Vizcarra-Chacón et al., 2013) and results in this work are not an exception. Hence, we refer to samples of D1-SPNs and D2-SPNs neurons.

2.2 | Slice preparation

Subjects (see above) were anesthetized intra-peritoneally with ketamine (85 mg/kg)-xylazine (15 mg/kg) and perfused with an iced saline solution (containing in mM: 120 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , and 11 glucose, 300 mOsm/l, pH 7.4, gassed with 95% O_2 and 5% CO_2) in order to remove their brains while preserving cellular viability.

A total of 58 animals were used in this study, among them: 8 BAC-D1, 7 BAC-D2, 9 C57BL/6 NCRL mice and 34 rats. Parasagittal brain slices including the neostriatum (250–350- μm thick) were obtained using a vibratome (Pelco, Ted Pella, Redding, CA, USA) and incubated in saline at room temperature for at least 1 h. Afterward, slices were transferred to a submerged recording chamber and continuously superfused with saline (Flores-Barrera et al., 2010).

2.3 | Electrophysiology

Voltage recordings were performed from SPNs of the dorsomedial or dorsolateral striatum using patch pipettes (3–6 M Ω) filled with (in mM): 115 KH_2PO_4 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 0.5 EGTA, 0.2 Na_2ATP , 0.2 Na_3GTP , biocytin 0.5%, and fluo-4 (20–30 μM ; Arias-García et al., 2018). Responses were acquired with an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). The signals were digitized at 10 kHz using an AT-MIO-16E4 board (National Instruments, Austin, TX, USA) and saved in a PC computer using Im-Patch $\text{\textcircled{c}}$, an open access software designed in LabView (National Instruments; <http://www.im-patch.com>).

2.4 | Corticostriatal stimulation

The electrode arrangement needed to obtain suprathreshold corticostriatal responses has been described before (Flores-Barrera et al., 2009). Briefly, the stimulation of cortical sensorimotor areas was performed with concentric bipolar electrodes (25–50 μm at the tip; FHC, Bowdoinham, ME, USA; the use of the same electrodes is important to have a reproducible stereotyped stimulus). A single square pulse of 0.1 ms was delivered to evoke the desired synaptic responses, while the membrane potential of SPNs was held at -80 mV near the resting potential or “down-state” of these cells (a constant holding potential is also important to achieve a reproducible stereotyped stimulus). In order to compare synaptic integration between D1-SPNs and D2-SPNs, a stereotyped train of four synaptic potentials at 20 Hz was used in most experiments. Varying the intensity of the stimulus (0.2–0.68 μA) yielded a series of synaptic responses that increase in amplitude and evoke APs.

2.5 | Calcium imaging

Calcium imaging at the soma with single-cell resolution and simultaneous electrophysiological whole-cell patch clamp recordings were obtained using a microscope equipped with a 40 \times water immersion objective (XLUMPlanFI, Olympus, Center Valley, PA, USA), which renders an image field of 190 \times 190 μm in size. To observe changes in fluorescence, light pulses with a wavelength of 488 nm were delivered to the preparation through a Lambda LS Illuminator (Sutter Instruments, Petaluma, CA, USA) connected to the microscope via fiber optics. Brief image sequences or movies (~ 180 s per epoch) were acquired with a cooled camera (CoolSnap K4, Photometrics, Tucson, AZ, USA; see Pérez-Ortega et al., 2016) with 100–250 ms/image frame. Short movies (100–250 s, 60–100-ms exposure time) were taken at time intervals of 5–10 min during experiments lasting at least 1 h, while the cortex was stimulated with a stereotyped train of four pulses at 20 Hz. Neurons were first identified by their electrophysiological profile (Arias-García et al., 2018; Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013), allowing the necessary time for the calcium indicator, fluo-4 salt (20–30 μM) (Invitrogen, Carlsbad, CA), contained in the pipettes to diffuse from the soma to the dendrites. Calcium transients were analyzed offline. Bulk-loaded somatic contours were manually identified with a circular template whose radius was chosen in each case (ROIs = somatic areas). Calcium-dependent fluorescence signals inside the ROIs were computed along time as $F_i - F_o$, where F_i : fluorescence intensity at any frame and F_o : local background fluorescence intensity (4 times the diameter of ROI). One neuron per slice (in reported samples “n” denotes number of neurons).

2.6 | Identification of recorded neurons

SPNs within the dorsal striatum of BAC-D1 or BAC-D2 eGFP mice were identified by their enhanced expression of green fluorescent protein (eGFP) using epifluorescence microscopy and labeled as D1-SPN or D2-SPN. Electrophysiological recordings (suprathreshold synaptic responses) predicted eGFP-positive or -negative cells with above 95% precision. Biocytin was also injected for double labeling (Arias-García et al., 2018; Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013). The slices were fixed overnight with 4% paraformaldehyde in PBS, cut on a vibratome into 40 μm and incubated in streptavidin conjugated with Cy3 1:200 dissolved in PBS (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA).

2.7 | Data analysis and statistics

Digital subtraction was used to obtain components sensitive to bicuculline, gabazine or Ca_v3 channel antagonists. Statistical values in text and histograms are presented as mean \pm SEM, although box plots compare samples distributions with medians, means, and quantiles (5, 25, 75, 95). Independent samples were compared with Mann–Whitney tests. More than two samples were compared with Kruskal–Wallis ANOVA and post hoc Mann–Whitney tests with Holm–Sidak adjustments. The Wilcoxon test was used to compare the same sample of neurons before and after treatment (Glantz, 2012). $p < 0.05$ values are considered statistically significant, not significant differences are also signaled.

The area under subthreshold corticostriatal synaptic responses was obtained by numerical integration and then normalized to the area under the synaptic response at AP threshold (Flores-Barrera et al., 2009). Percentages of change in these areas are reported and they are proportional to stimulation intensity (input-output curves) in each SPN class. Curves were fitted to sigmoid functions of the form: $RA(i) = RMAX / (1 + \exp(-k*(i - ih)))$, where $RA(i)$ is the area under the response as a function of stimulation intensity, i , $RMAX$ is the maximal area under maximal response, k is the slope factor, and ih is the stimulation intensity needed to reach a half maximal response. These parameters were compared with Mann–Whitney’s U tests (Vizcarra-Chacón et al., 2013).

2.8 | Drugs

GABA_A receptor antagonists bicuculline (10 μM) or gabazine (10 μM) (were prepared daily and dissolved into the bath saline during recordings (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA). The Ca_v3 (T)-type calcium channel selective antagonist NNC 55-0396 (10 μM), TTA-A2 (10 μM)

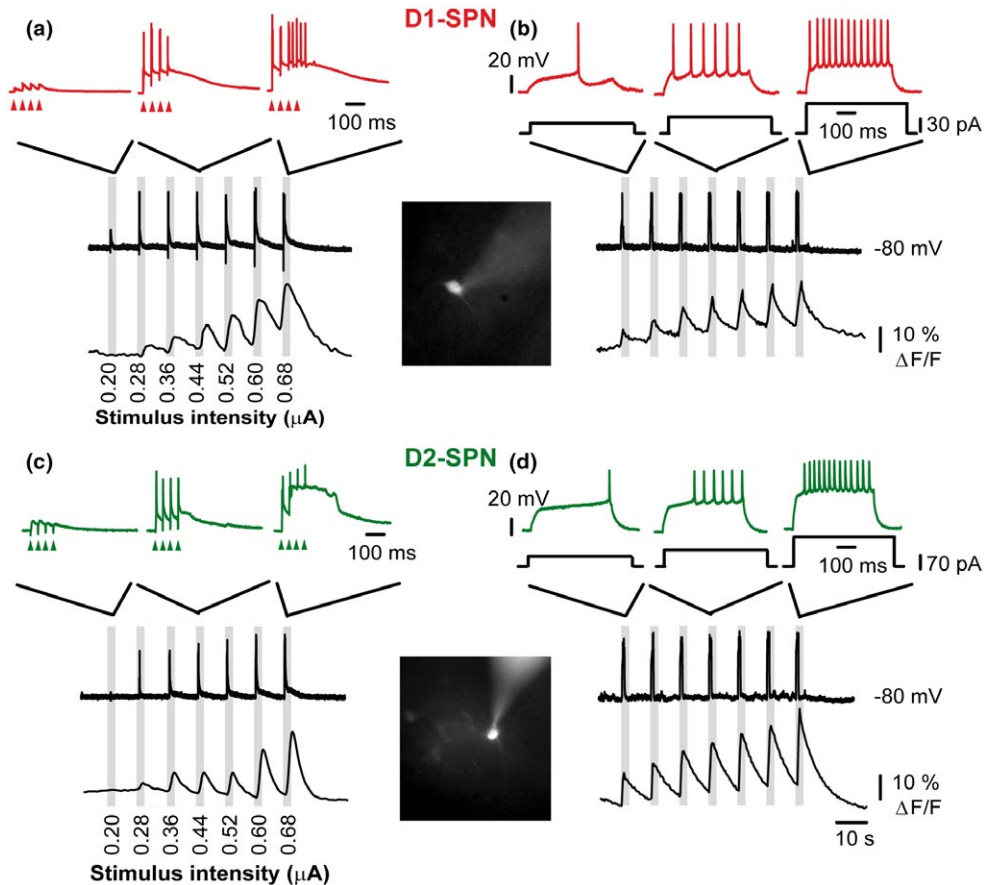


FIGURE 1 Simultaneous recordings of somatic calcium transients and voltage responses in striatal projection neurons (SPNs). In left panels, top row shows chosen voltage responses from bottom row shown at slower time scale in response to trains of four synaptic stimuli (0.1 ms at 20 Hz every 10 s) of increasing intensities (stimulus intensities at the bottom). Right: firing evoked by rectangular intracellular current injections (voltage recordings at top). Last rows in left and right show intracellular Ca^{2+} transients ($\Delta F/F$) as seen at the soma area, occurring during the evoked responses above. (a) In D1-SPNs intracellular Ca^{2+} increases gradually in proportion to the magnitude of the synaptic responses. After reaching threshold, number of evoked APs also increase gradually (see Figure 2). Inset shows the region of interest (ROI) which corresponds to the soma area filled with the recording electrode containing fluo-4 salt (20–30 μM). (b) Similar recordings after intracellular current injections at the soma of a D1-SPN. (c) In D2-SPNs, Ca^{2+} entry changes little with increasing stimulus intensity in parallel with a fewer number of evoked APs (see Figure 2) as compared to D1-SPNs. If stimulus strength is further increased, Ca^{2+} then increases in a step-like manner up to saturation while regenerative Ca^{2+} potentials propagate to the soma. Inset shows ROI, soma filled with the recording electrode containing fluo-4. (d) If intracellular current injections evoke firing at the soma of a D2-SPN, Ca^{2+} increases gradually as well as firing, as in D1-SPNs, suggesting that the difference in synaptic responses have their origin at the dendritic level. BAC-D1 and BAC-D2 mice with fluo-4 salt in the recording electrodes are illustrated

and Fluo-4 salt (20–30 μM , Alomone Labs, Israel); TTA-A2 was used instead of NNC 55-0396 with similar results. Samples reported only include NNC 55-0396.

3 | RESULTS

3.1 | Synaptic activation evokes different somatic intracellular Ca^{2+} dynamics and number of evoked action potentials in D1- and D2-SPNs

Ca^{2+} imaging at the soma while inducing controlled synaptic responses with a stereotyped stimulus has not been described or compared in SPNs. The majority of synaptic inputs are received at SPNs dendrites, the result of synaptic integration goes to the soma where evoked action potentials (eAPs) occur and Ca^{2+} entry is generated. The question to answer in this work is whether this process is the same or different in D1-SPNs and D2-SPNs when their responses are evoked with the same stereotyped stimulation protocol (i.e., four synaptic stimuli of increasing strength at 20 Hz) since chaotic or changing synaptic variables and a varying membrane potential may hide a biophysical difference. Electrophysiological profiles corresponded to those previously described for each class of SPN in both rats and mice (Arias-García et al., 2013,

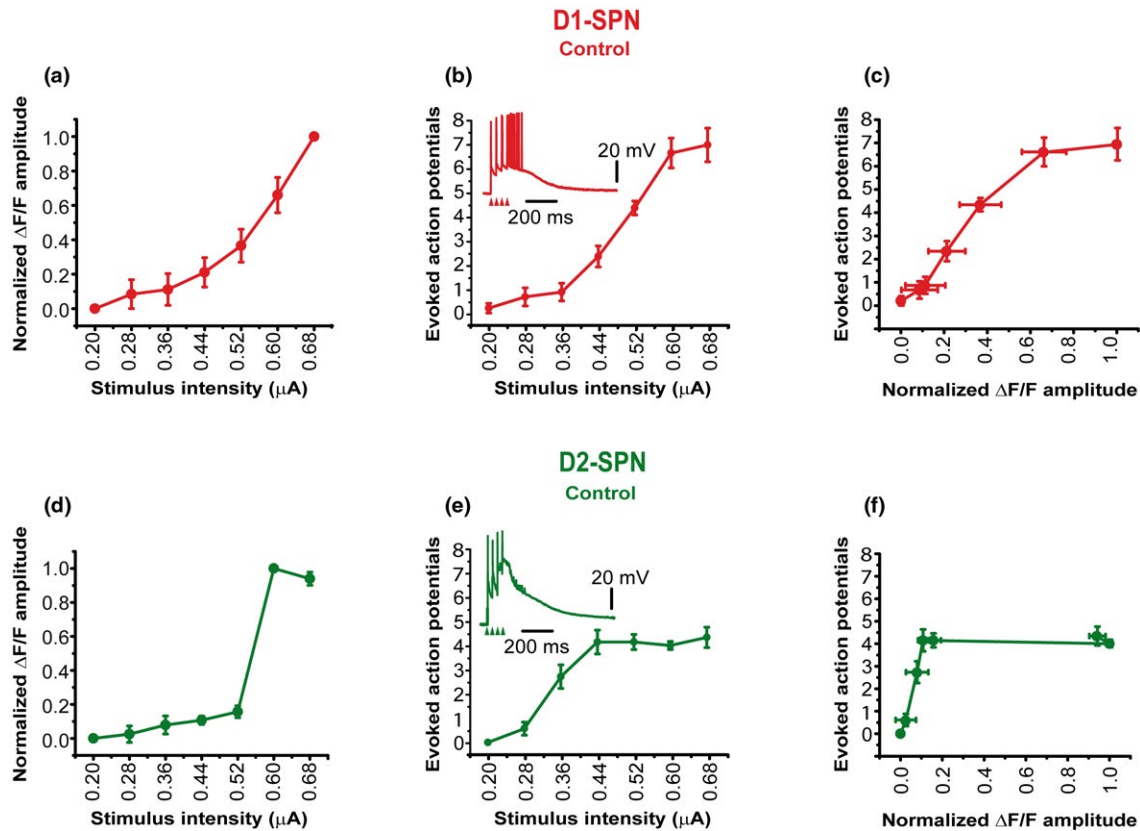


FIGURE 2 Intensity-Response plots. (a) Normalized Ca^{2+} transient amplitudes as a function of stimulus strength in a sample of D1-SPNs ($n = 9$ neurons). Points are means \pm SEM. (b) Evoked action potentials (eAPs) as a function of stimulus intensity. Inset shows a representative prolonged depolarization after synaptic potentials generating the firing of several spikes. (c) eAPs plotted against normalized Ca^{2+} entry to the soma (means plus SEM of both variables are shown). In D1-SPNs, synaptic stimulation is translated into gradual increases in Ca^{2+} entry and number of eAPs fired (maximum = 6.93 ± 0.69 action potentials; $n = 15$ neurons). (d) Ca^{2+} entry as a function of stimulus strength in a D2-SPNs sample, note mild increases after initial stimuli and a sudden step to saturation after a certain stimulus intensity is reached ($n = 6$ neurons). (e) Action potentials fired as a function of stimulus intensity in a D2-SPN: the number of eAPs suddenly rises after initial stimuli to achieve a maximum that remains the same in spite of increasing stimulus strength (maximum = 4.33 ± 0.42 action potentials; $n = 14$ neurons; $p = 0.01$, Mann-Whitney test comparing D1-SPNs and D2-SPNs). (f) eAPs plotted against Ca^{2+} entry to the soma (means plus SEM of both variables are shown): the sudden rise of eAPs to a maximum and the difference with D1-SPNs are more noticeable. For maximal stimulus strength regenerative potentials reach the soma (see inset and Figure 2e), but the number of eAPs remains the same

2018; Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013). Here, we show that differences in intrasomatic Ca^{2+} transients and number of APs fired were evident between both classes of SPNs after the same set of stimuli. Responses to synaptic inputs (Figure 1 left) were also compared with those obtained after intrasomatic currents injections (Figure 1 right).

Top recordings in Figure 1a show chosen voltage responses of a D1-SPN evoked with trains of four corticostriatal stimuli of increasing intensities at 20 Hz. The complete set of responses from which top traces were taken is shown in the second row at a slower time base to compare them with intrasomatic Ca^{2+} transients (third row). Gray bars indicate that intracellular Ca^{2+} transients outlast eAPs firing (Carrillo-Reid et al., 2008). At high stimulus intensities, prolonged synaptic potentials may be induced after the stimulus train and these depolarizations may evoke the firing of several fast APs (stimulus intensities at bottom) in the case of D1-SPNs but not so in the case of D2-SPNs in control conditions. Insets in Figure 1 shows some examples (regions of interest or ROIs) of each neuron class filled with fluo-4 (20–30 μM) through the recording electrode. In the case of D1-SPNs, Ca^{2+} transient amplitudes measured at the soma area ($\Delta F/F$, where ΔF is the change in fluorescence and F is the fluorescence before the stimuli) gradually increase in proportion to stimulus intensity and the number of eAPs (Figures 1a and 2a,b). Gradually increasing Ca^{2+} transients were also evoked after somatic application of depolarizing current steps (Figure 1b). Figure 2c shows the number of eAPs plotted against changes in the amplitude of Ca^{2+} transients at the soma, emphasizing that Ca^{2+} entry and eAPs firing are both gradual and depend on stimulus intensity in D1-SPNs as seen from the soma, suggesting that neurons follow a rate code (Gerstner, Kreiter, Markram, & Herz, 1997).

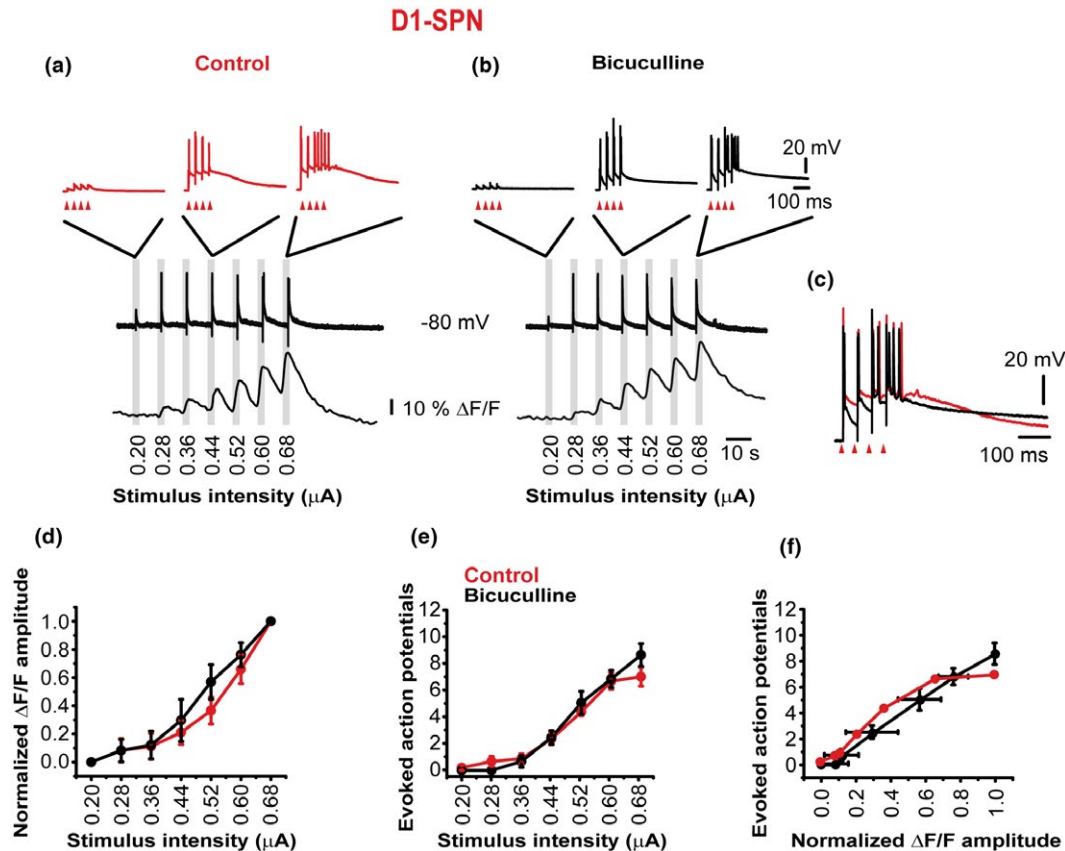


FIGURE 3 Inhibition blockade does not change the Intensity–Response (I–R) plots of D1-SPNs. (a, b) Top rows show chosen voltage responses from second row at a slower time scale in response to trains of four stimuli (0.1 ms at 20 Hz every 10 s) of increasing intensities (at bottom). Third row shows intracellular Ca²⁺ transients (ΔF/F) accompanying the orthodromic responses as seen at the soma area in a representative D1-SPN. In both cases: control (left) and GABA_A-receptors blockade (right), Ca²⁺ and number of evoked action potentials (eAPs) increase gradually in proportion to the magnitude of the responses. (c) Superposition of the last two responses in control and after GABA_A-receptors blockade. Control depolarization (red) is reduced by bicuculline (black), revealing the depolarizing GABA action characteristic of D1-SPNs (Flores-Barrera et al., 2010). (d) I–R plots of normalized Ca²⁺ transients amplitudes as a function of stimulus strength. Inhibition blockade does not change significantly the gradual Ca²⁺ accumulation of D1-SPNs ($n = 9$ neurons in each sample). (e) The number of eAPs as a function of synaptic strength does not significantly change after blocking inhibition: 8.56 ± 0.84 action potentials; $n = 9$ neurons; $p = 0.08$; sample with inhibition blockade, Mann–Whitney test vs. controls). (f) Plot of number of eAPs against amplitude of Ca²⁺ transients at the soma, gradual rise after inhibition blockade (black trace with means and SEMs) does not change significantly with respect to the control (red)

A contrasting outcome was obtained when similar experiments were done in D2-SPNs (Figure 1c; panels and rows are ordered as in Figure 1a). Corticostriatal synaptic responses were evoked with the same stimuli of increasing strength (Figure 1c top row: some recordings from the second row are illustrated with a faster time base). However, Ca²⁺ transients slightly increase or change, while the number of eAPs rapidly escalates to a maximum and then remains constant in spite of increasing synaptic stimulus (Figures 1c and 2d,e). Stronger stimulus intensities increase Ca²⁺ entry up to saturation in a step-up manner (Figure 1c third row, Figure 2d). However, the number of eAPs remains the same. Instead, regenerative Ca²⁺ potentials propagate to the soma at higher intensities explaining the step in Ca²⁺ entry (Figures 1c and 2e). When number of eAPs is plotted against amplitude of Ca²⁺ transients at the soma area (Figure 2f) the difference in synaptic integration between D1-SPNs and D2-SPNs becomes emphasized (cf., Figure 2c,f). In D2-SPNs firing is limited to a maximum after a given synaptic input. Firing limited by presynaptic inputs are common in neurons following a sparse code (Perez-Orive et al., 2002), which in part depends on being fired on top of an inactivating potential (Poo & Isaacson, 2009). This previous evidence made us to focus on the role of Ca_v3 channels in SPNs synaptic integration.

Even so, injection of depolarizing current steps at the soma (Figure 1d) in D2-SPNs induces gradual increases in Ca²⁺ entry as well as increases in the number of eAPs fired, similar to D1-SPNs, suggesting that phenomena observed during synaptic activation emerge at the dendrites.

Maximum number of eAPs fired after four synaptic potentials at the highest strength was 6.93 ± 0.69 ; $n = 15$; in D1-SPNs, in parallel with a gradual increase in the magnitudes of Ca²⁺ transients (Figure 2c) In contrast, normalized Ca²⁺ transients amplitudes change little as a function

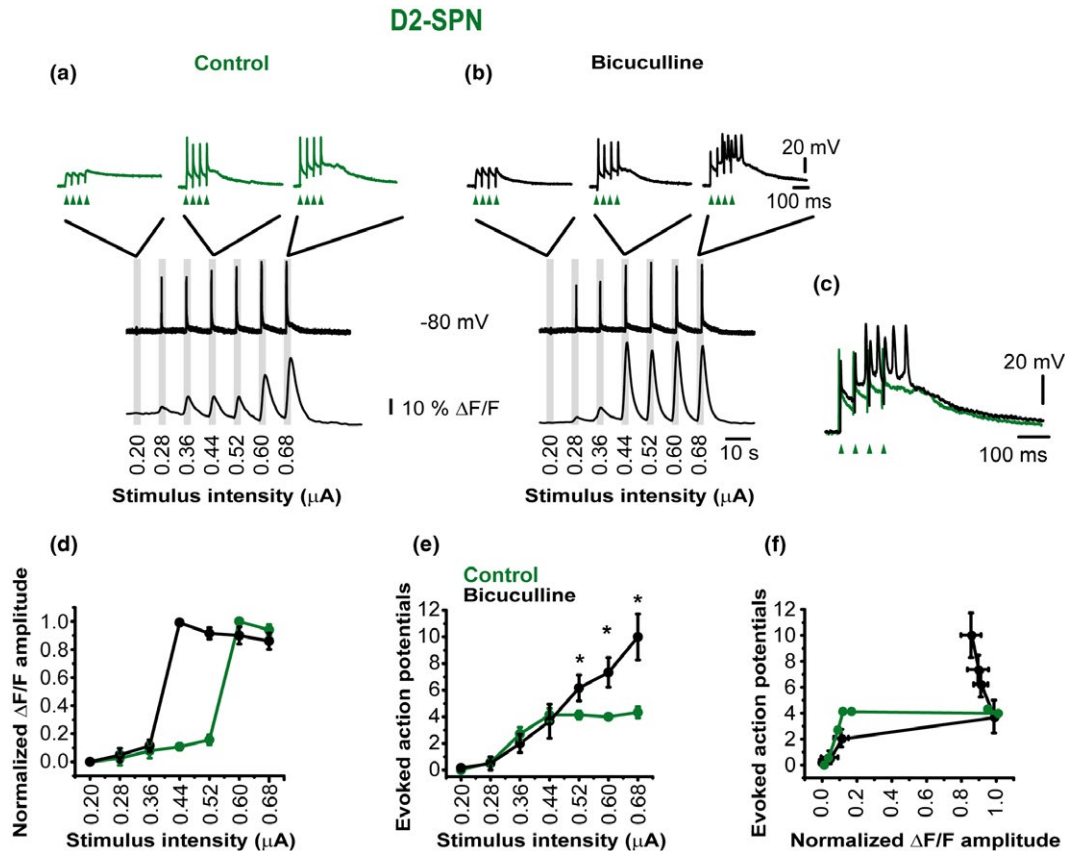


FIGURE 4 Inhibition blockade modifies the Intensity-Response plots of D2-SPNs. (a, b) Top rows show chosen orthodromic responses from second row at slower time scale. Third row shows intracellular Ca^{2+} transients ($\Delta\text{F}/\text{F}$) induced by orthodromic responses. Note that in both cases: control (left) and GABA_A-receptors blockade (right), Ca^{2+} does not increase gradually in proportion to stimulus strength, but suddenly jumps to saturation after certain stimulus intensity has been reached. Thereafter, Ca^{2+} response is barely changed by further increases in stimulus strength. (c) Superposition of the last two responses in control and after GABA_A-receptors blockade. Blockade of inhibition induces a larger depolarization and the firing of more evoked action potentials (eAPs) in D2-SPNs. (d) I-R plots of normalized Ca^{2+} transient amplitudes as a function of stimulus strength show that inhibition blockade facilitates the upsurge in Ca^{2+} entry now occurring with a weaker stimulus strength ($n = 6$ neurons in each sample). (e) After inhibition blockade the number of eAPs does not saturate as in the controls but keeps increasing as a function of stimulus strength (10 ± 1.73 action potentials after inhibition block; $n = 6$ neurons; three last points of the I-R plot were significant (*): $p = 0.026$; $p = 0.002$; $p = 0.045$; as compared to controls, Mann-Whitney tests). (f) Graph of the number of eAPs against intrasomatic Ca^{2+} transient: the limit in the number of eAPs at higher stimulus intensities is lost diverging from the controls (green), suggesting that inhibition limits the number of spikes fired by D2-SPNs

of synaptic intensity in D2-SPNs, until a given intensity is reached and a sudden jump to saturation occurs (Figure 2d; $n = 6$ neurons), in parallel with a maximum number of eAPs (Figure 2f; 4.33 ± 0.42 APs; $n = 14$ neurons; $p = 0.01$; Mann-Whitney test; comparing with D1-SPNs).

The experiments show that orthodromic firing of APs and corresponding Ca^{2+} entry reflect increases in synaptic strength in D1-SPNs, but not in D2-SPNs which keep firing the same number of APs (Figure 2b inset) even when synaptic responses increase. Stronger synaptic inputs only propagate regenerative potentials to the soma (Bargas, Galarraga, & Aceves, 1991) but do not increase the number of fast eAPs. These results suggest a difference in synaptic integration between D1-SPNs and D2-SPNs: Synaptic integration in D1-SPNs is gradual and cumulative, while it steps-up in D2-SPNs to remain constant even when stimulus intensity increases (Figure 2e inset).

3.2 | Role of inhibition on synaptic integration of SPNs

Top rows in Figure 3a,b show voltage responses evoked by the stereotyped train of synaptic potentials of increasing intensity (shown at bottom). The second row shows a complete set of these orthodromic responses at a slower time base to compare them with their accompanying somatic Ca^{2+} transients ($\Delta\text{F}/\text{F}$) in a representative D1-SPN. In control (Figure 3a) and 10 μM bicuculline (or gabazine)-treated neurons (Figure 3b), Ca^{2+} entry increases gradually in proportion to the stimulus intensity. The superposition of maximal responses (Figure 3c) attained in control and after inhibition blockade show similar number of eAPs. The control (red) has a depolarizing component blocked by bicuculline,

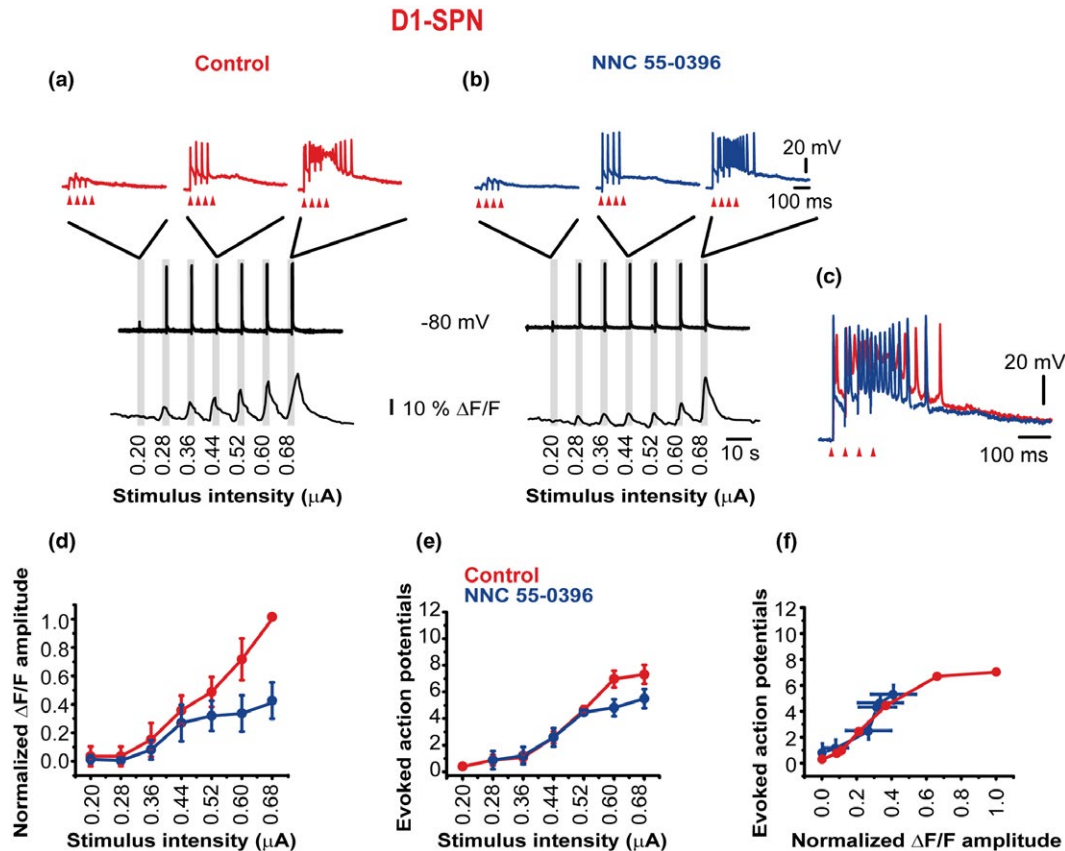


FIGURE 5 Contribution of Ca_v3 channels to synaptic integration in D1-SPNs. (a) Ca^{2+} entry gradually increases in D1-SPNs as stimulus intensity is enhanced; see larger responses and number of evoked action potentials (eAPs) due to increases in stimulus strength. (b) Blockade of Ca_v3 channels with the selective antagonist 10 μM NNC 55-0396 (NNC) reduce both synaptic induced depolarizations and intracellular Ca^{2+} transients. (c) Superposition of maximal synaptic responses in both conditions. (d) Increases in somatic Ca^{2+} entry tend to decrease after Ca_v3 channels blockade ($n = 9$ neurons in control and $n = 6$ neurons during NNC). (e) eAPs as a function of stimulus strength do not change significantly after Ca_v3 channels blockade and their gradual increase with synaptic strength is maintained (5.17 ± 0.70 maximal number of action potentials during NNC; $n = 6$ neurons; $p = 0.12$; Mann-Whitney test vs. controls). (f) A graph of the number of eAPs vs. intrasomatic Ca^{2+} transients reveals that the number of eAPs is only slightly reduced in spite of less Ca^{2+} entry in these conditions

revealing the prolonged GABAergic depolarization, characteristic of D1-SPNs (Flores-Barrera et al., 2010). Intensity-Response (I-R) plots of normalized Ca^{2+} transients amplitudes as a function of stimulus strength shows that inhibition blockade does not change the gradual Ca^{2+} increments of D1-SPNs (Figure 3d, $n = 9$ neurons in each sample). eAPs as a function of stimulus intensity also increase gradually in both cases and the maximum number of spikes fired at the highest stimulus strength does not significantly change with respect to the controls (Figure 3e): 8.56 ± 0.84 APs; $n = 9$ neurons; for the inhibition blocked sample; $p = 0.08$; Mann-Whitney test). When the number of eAPs is plotted against Ca^{2+} transient amplitudes (Figure 3f; mean \pm SEMs for both variables; black trace) it is observed that inhibition does not change the gradual and parallel increase in both variables in D1-SPNs.

A different picture was revealed in D2-SPNs. As before, top rows of Figure 4a,b show chosen orthodromic responses from the set of responses in the second row at slower time scale. Intrasomatic Ca^{2+} transients ($\Delta F/F$) accompanying these responses are shown in the third row. In the control (Figure 4a) and during GABA_A-receptors blockade (Figure 4b), Ca^{2+} does not increase gradually in proportion to stimulus strength, but suddenly jumps to saturation after certain intensity has been reached.

After this intensity is reached, both Ca^{2+} response and number of eAPs barely change by further increases in synaptic strength. Superposition of the last voltage responses in control and after GABA_A-receptors blockade (Figure 4c) shows that inhibition block induces a larger depolarization and the firing of more eAPs in D2-SPNs (Flores-Barrera et al., 2010). I-R plots of normalized Ca^{2+} transient amplitudes as a function of stimulus strength show that inhibition antagonism facilitates the sudden boost of Ca^{2+} entry in D2-SPNs, which now happens with weaker stimulus strengths (Figure 4d; $n = 6$ neurons in each sample). Accordingly, inhibition blockade abolishes the saturating behavior of the number of evoked eAPs. Now, they keep increasing as a function of stimulus strength: see last three points in Figure 4e (controls vs. inhibitory block *): 4.14 ± 0.31 vs. 6.17 ± 0.98 ; $p = 0.026$; 4.0 ± 0.17 vs. 7.33 ± 1.12 ; $p = 0.002$ and 4.33 ± 0.42 vs. 10 ± 1.73 ; $p = 0.045$; $n = 6$ neurons

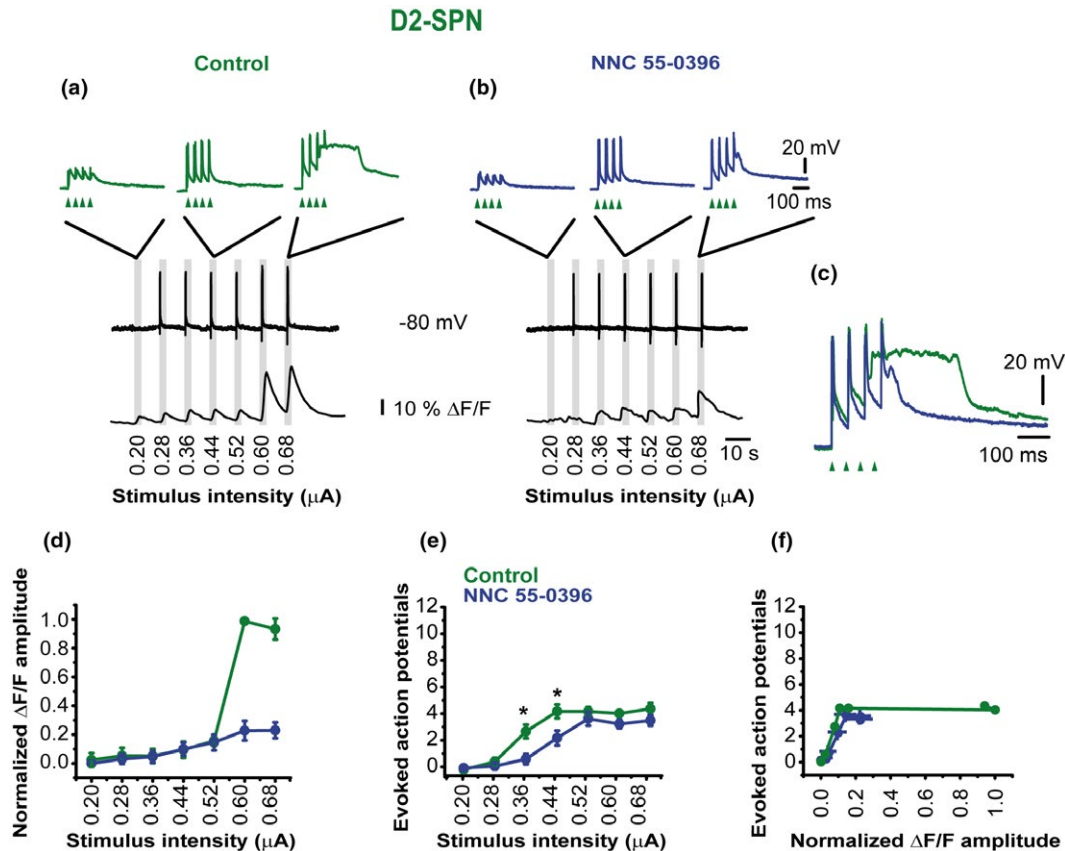


FIGURE 6 Contribution of Ca_v3 channels to synaptic integration in D2-SPNs. (a) Similarly to experiments in Figures 1c and 4a, Ca^{2+} entry remains almost constant as synaptic strength is enhanced in D2-SPNs, until a critical intensity of stimulus is reached and a sudden Ca^{2+} rise occurs, further increases in stimulus strength do not increase Ca^{2+} entry as though the response is saturated. Voltage responses at the strongest stimulus strengths frequently show propagated Ca^{2+} potentials. (b) Blockade of Ca_v3 channels with NNC decreases synaptic responses and intracellular Ca^{2+} transients, and most importantly, the upsurge in Ca^{2+} entry is abolished. (c) Superposition of maximal synaptic responses before and after NNC. (d) After NNC, increases in Ca^{2+} entry become gradual and brisk increases are abolished ($n = 6$ in control and $n = 8$ in NNC). (e) During NNC evoked action potentials (eAPs) as a function of stimulus strength rise less abruptly as compared to controls. The maximal number of action potentials is preserved. (f) Graphing the number of eAPs against somatic Ca^{2+} transients shows that the maximum number of eAPs is reached with less depolarization and Ca^{2+} entry

with inhibition block (Mann–Whitney tests). When the number of eAPs is graphed against the amplitude of the Ca^{2+} transients (Figure 4f) it is seen that inhibition is one of the forces that limit the number of eAPs in D2-SPNs, affecting the synaptic integration of D1-SPNs and D2-SPNs differentially. This inhibitory action adds to the reported action of Ca^{2+} -activated K^+ -currents (Arias-García et al., 2013).

3.3 | Actions of Ca_v3 channels in the synaptic integration of SPNs

As in the previous Figures, top row shows voltage responses increasing as a function of stimulus strength (Figure 5a,b), these responses are amplifications of responses in the second row shown at a slower time base to be compared with the Ca^{2+} transients recorded simultaneously (third row). Figure 5a shows the control and Figure 5b illustrate similar responses obtained in the presence of 10 μM NNC 55-0396 (NNC), a very selective antagonist of $Ca_v3.2$ calcium channels and Ca_v3 channels in general. Blockade of Ca_v3 channels reduced both the magnitude of the synaptic responses and of Ca^{2+} transients. Figure 5c shows a superimposition of the maximal responses before and after Ca_v3 channel blockade. The I–R plots of intracellular Ca^{2+} transients shows divergence: blockade of Ca_v3 channels decreases the gradual increase in Ca^{2+} entry as compared to the controls (Figure 5d; $n = 9$ neurons in control and $n = 6$ neurons during NNC). eAPs increase gradually with synaptic strength and maximal frequencies attained were not significantly different to the controls (Figure 5e; 5.17 ± 0.70 APs; $n = 6$ neurons, during NNC, $p = 0.12$ vs. controls; Mann–Whitney tests). If eAPs are plotted against somatic Ca^{2+} transients (Figure 5f) it is seen that almost the same number of eAPs is reached although Ca^{2+} entry is reduced.

In the case of D2-SPNs synaptic responses, their eAPs and induced intracellular Ca^{2+} transients also decrease after Ca_v3 blockade (Figure 6a–e). However, there is an important qualitative change: the sudden rise in Ca^{2+} entry was virtually abolished implying Ca_v3 channels

in its generation, independently of the posterior activation of Ca_v1 and $\text{Ca}_v2.2$ channels to generate propagating Ca^{2+} potentials to the soma at higher stimulation intensities (Higley & Sabatini, 2008). Similar results were obtained with another selective Ca_v3 channels antagonist: 10 μM TTA-A2 ($n = 2$). Increases in Ca^{2+} entry became gradual (Figure 6d; $n = 6$ neurons in control and $n = 8$ neurons in NNC). Firing of eAPs increased less steeply (two points during rise were significantly more modest than the controls (*): 2.71 ± 0.49 control vs. 0.75 ± 0.37 in NNC; $p = 0.016$ and 4.14 ± 0.49 in control vs. 2.25 ± 0.53 during NNC; $p = 0.026$; $n = 8$ neurons during NNC; Mann–Whitney tests). When the number of eAPs is plotted against the magnitude of somatic Ca^{2+} transients (Figure 6f), eAPs keep their tendency to reach a maximum (3.5 ± 0.38 during NNC; $p = 0.24$; Mann–Whitney test vs. controls) in spite of the loss of the sudden rise in Ca^{2+} entry, suggesting that this rise does not contribute to the number of eAPs fired but is a reflection of propagated Ca^{2+} potentials. Because Ca_v3 channels are involved in the steep rise in eAPs and the jump to saturation in Ca^{2+} entry present in D2-SPNs but not in D1-SPNs, a difference in Ca_v3 channels contribution between these neuron classes should be made evident even if these channels play a role in both neuron classes.

3.4 | Differences in Ca_v3 channels contribution during suprathreshold synaptic responses in SPNs

As shown above, inhibition limits the number of eAPs fired in D2-SPNs but not in D1-SPNs, while the blockade of Ca_v3 channels decrease the steep rise in eAPs fired in D2-SPNs, not present in D1-SPNs. To observe how these two factors interact suprathreshold synaptic responses after a single cortical stimulus were then evoked in D1-SPNs (Figure 7a,b) and D2-SPNs (Figure 7c,d) and the actions of inhibition and Ca_v3 channels contribution were blocked in sequence. As previously described (Flores-Barrera et al., 2010), Figure 7a shows the action of 10 μM bicuculline (or gabazine) in D1-SPNs: control is the red trace and GABA_A-receptor blockade is represented by the black trace. The crossing between both traces (red and black) revealed a reversal potential for inhibition of about -65 mV (Bracci & Panzeri, 2006; Flores-Barrera et al., 2009; Jiang & North, 1991; Kita, 1996; Misgeld et al., 1982). A digital subtraction of both traces is shown at bottom showing a biphasic result. With respect to firing threshold, inhibition blockade first depolarizes the beginning of the response; thereafter, it blocks a depolarizing inhibitory component that prolongs the synaptic depolarization by hundreds of milliseconds. In these suprathreshold responses (0.1 ms, ~ 0.7 μA) inhibition blockade *decreased* half-width of D1-SPNs responses by suppressing this late GABAergic depolarization (Figure 7e). After antagonizing GABA_A-receptors, Ca_v3 channels were blocked with 10 μM NNC (Figure 7b blue trace). This treatment slightly changed the suprathreshold response of D1-SPNs. A digital subtraction of the NNC-sensitive component revealed a depolarizing contribution of Ca_v3 channels in D1-SPNs responses as seen from the soma (Figure 7b).

Blockade of GABA_A receptors in suprathreshold D2-SPNs responses always induced a depolarization and enhanced firing. Inhibitory block *increased, not decreased*, response half-width in D2-SPNs (Flores-Barrera et al., 2010) showing a contrasting difference with D1-SPNs (cf., Figure 7e,f). Digital subtraction of the bicuculline sensitive component reveals only a hyperpolarizing inhibition with respect to AP threshold, not a biphasic component, since the rapid decay of the D2-SPN response substitutes the prolonged late depolarization seen in D1-SPNs (Figure 7c compare with Figure 7a). Convergence of responses with and without bicuculline also surrounded -65 mV in most D2-SPNs. During GABA_A-receptors blockade, Ca_v3 channels were subsequently blocked and a substantial reduction in the half-width of the orthodromic synaptic response due to the suppression of the NNC-sensitive depolarization could be appreciated (Figure 7d,f). Digital subtraction of the NNC-sensitive component disclosed a hidden depolarizing component resembling a low-threshold spike, as seen from the soma (Plotkin et al., 2011). This NNC-sensitive depolarization explains the great depolarization induced by bicuculline on control responses (Figure 7c,f). Results from samples of both classes of SPNs are summarized in the graphs (Figure 7e–g). Tukey box plots in Figure 7e show that inhibitory block always *reduced* the half-width of D1-SPNs responses ($p < 0.001$, Mann–Whitney test with post hoc Holm–Sidak adjustments with $\alpha = 0.01$ for pairwise comparisons, $n = 18$ neurons in control, $n = 12$ neurons after inhibitory block, and $n = 7$ neurons with NNC, global Kruskal–Wallis ANOVA $p < 0.001$). Subsequent action of 10 μM NNC was not significant with respect to the GABA_A-receptors blockade (Figure 7e; $p = 0.37$, Mann–Whitney test with post hoc Holm–Sidak adjustments with $\alpha = 0.01$).

In contrast, inhibitory blockade depolarized and significantly *enhanced, not reduced*, synaptic responses half-widths in D2-SPNs as compared to the controls (Figure 7f; $p < 0.001$ comparing half-widths; Mann–Whitney test with post hoc Holm–Sidak adjustments with $\alpha = 0.01$ for pairwise comparisons, $n = 17$ neurons in control, $n = 13$ neurons in inhibitory block; global Kruskal–Wallis ANOVA: $p < 0.001$) revealing a substantial difference between both neuron classes. A posterior addition of NNC during bicuculline actions in D2-SPNs now decreased synaptic half-widths in D2-SPNs (Figure 7f; $p = 0.025$, Mann–Whitney test with post hoc Holm–Sidak adjustments with $\alpha = 0.05$ for pairwise comparisons, $n = 6$ neurons in NNC). A digital subtraction disclosed an NNC-sensitive depolarization that resembles a low-threshold spike (also see inset in Figure 3b in Flores-Barrera, Vizcarra-Chacón, Bargas, Tapia, & Galarraga, 2011), suggesting a larger contribution of Ca_v3 channels in the synaptic response of D2-SPNs. Finally, we compared samples of digital subtractions of NNC-sensitive components (Ca_v3 channels) after inhibition blockade (during bicuculline) in both neuron classes. There were significant differences between D1-SPNs and D2-SPNs (Figure 7g; $p = 0.004$; Mann–Whitney test; $n = 6$ neurons in each sample), suggesting a larger contribution of Ca_v3 channels in D2-SPNs.

It was concluded that besides Ca_v1 and $\text{Ca}_v2.2$ channels (Flores-Barrera et al., 2011; Higley & Sabatini, 2008), the larger amplitude of the potentials generated by Ca_v3 channels activated by cortical synapses in the dendrites of D2-SPNs are a part of the differences between orthodromic responses of D1- and D2-SPNs, no matter the rodent strain used.

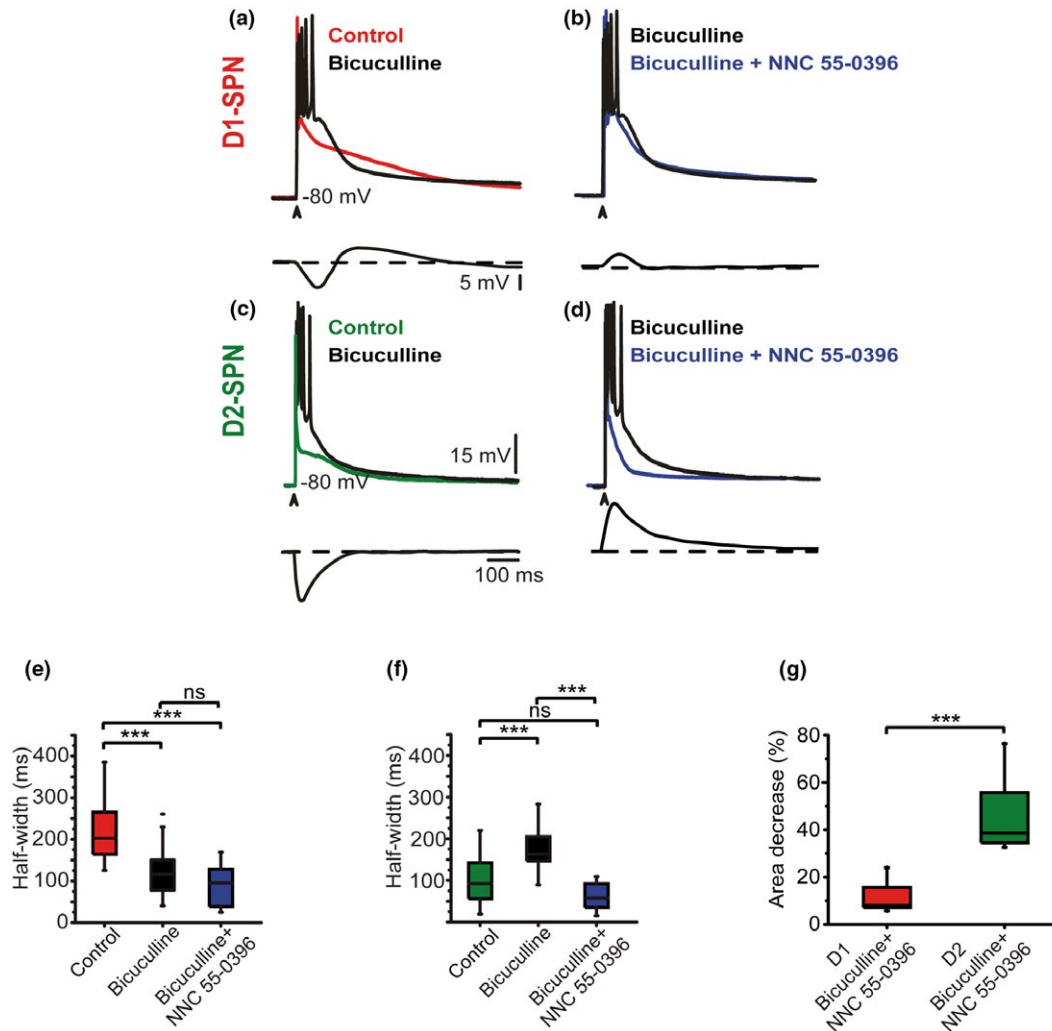


FIGURE 7 Difference in Ca_v3 channels contribution during suprathreshold responses in SPNs. Top traces are suprathreshold corticostriatal synaptic responses before and after treatments. Bottom traces are digital subtractions between the traces on top. (a) Blockade of GABA_A receptors with bicuculline depolarizes and increases firing at the beginning of the response in D1-SPNs but blocks a depolarizing inhibitory component later in time. Digital subtraction of the bicuculline sensitive component shows first a hyperpolarizing and then a depolarizing inhibition with respect to firing threshold. (b) When Ca_v3 channels are blocked with NNC after bicuculline action, digital subtraction reveals a small depolarizing NNC-sensitive component in D1-SPNs responses as seen at the soma. (c) Blockade of GABA_A receptors in orthodromic D2-SPNs responses induces a depolarization with enhanced firing. Digital subtraction of blocked inhibitory component indicates a hyperpolarizing inhibition with respect to firing threshold. (d) Blockade of Ca_v3 channels after bicuculline action in D2-SPNs: digital subtraction unveils a great depolarization generated by Ca_v3 channels, resembling a low-threshold spike. (e) Summary of treatments in a sample of D1-SPNs measuring responses half-widths. Bicuculline significantly reduced the half-width of D1-SPNs responses with respect to the controls ($p < 0.001$, Mann-Whitney test with post hoc Holm-Sidak adjustment for pairwise comparisons, $n = 18$ neurons in control and $n = 12$ neurons in inhibitory block). Subsequent NNC addition did not produce significant effects ($p = 0.37$, Mann-Whitney test with post hoc Holm-Sidak adjustments, $n = 7$ neurons). (f) In contrast, GABA_A blockade increased not decreased half-width significantly in D2-SPNs responses ($p < 0.001$ comparing half-widths; Mann-Whitney test with post hoc Holm-Sidak, $n = 17$ neurons in control, $n = 13$ neurons in inhibitory block). Posterior addition of NNC now decreases half-width significantly ($p = 0.025$, Mann-Whitney test with post hoc Holm-Sidak adjustments, $n = 6$ neurons in NNC). (g) Comparison of NNC-sensitive component amplitudes in both cell classes as obtained with digital subtraction after blocking inhibition: a significant difference in Ca_v3 channels contribution is obtained ($p = 0.004$; Mann-Whitney test; $n = 6$ neurons in each sample)

3.5 | Ca_v3 channels can be detected in subthreshold synaptic potentials

Previously, we have reported that half-widths and areas under synaptic responses are significantly different when subthreshold synaptic potentials are compared (Flores-Barrera et al., 2010) in these neuron classes. Therefore, we wanted to see whether the action of Ca_v3 channels can be revealed in subthreshold synaptic potentials recorded at the soma even though what reaches the soma is only the voltage response as a result of dendritic operations at the site of the synapse generation. Figure 8a shows that the effects of $10 \mu\text{M}$ NNC can be detected on

the subthreshold corticostriatal responses of D1-SPNs (red is control vs. Ca_v3 blockade in blue). However, by measuring the area under the synaptic potential in a sample of cells we could not detect significant differences due to the variance of the responses (Figure 8b; $p = 0.47$; $n = 7$ neurons; Wilcoxon test).

Similar experiments were done with the subthreshold corticostriatal responses in D2-SPNs: green (control) and blue (after Ca_v3 blockade; Figure 8c). In this case, statistically significant differences in the sample were detected (Figure 8d; $p = 0.004$; $n = 8$ neurons; Wilcoxon test) and the action of Ca_v3 channels could be detected at the soma, suggesting that even subthreshold synaptic potentials reveal the influence of these channels in D2-SPNs.

3.6 | Effect of Ca_v3 channels blockade in the input-output curves of subthreshold synaptic potentials

Figure 9 shows corticostriatal synaptic responses evoking a single AP in a representative D1-SPN (Figure 9a) and D2-SPN (Figure 9d), blue traces are responses after NNC and digital subtractions at bottom show that both neuron classes have an NNC-sensitive component (corroborating results shown with Ca^{2+} imaging in Figures 5 and 6). The decrease in mean (\pm SEM) maximal areas under responses were from 9783 ± 172 mV ms in the controls to 7616 ± 345 mV ms after Ca_v3 channels blockade in D1-SPNs (Mann-Whitney test; $n_1 = 10$, $n_2 = 7$; $p = 0.04$) and from 8394 ± 264 mV ms in controls to 4811 ± 114 mV ms after Ca_v3 channels blockade in D2-SPNs (Mann-Whitney test; $n_1 = 12$, $n_2 = 6$; $p = 0.02$), confirming that Ca_v3 current contributes to synaptic depolarizations generated in the dendrites of both D1-SPNs and D2-SPNs. Complete input-output curves of increasing subthreshold responses evoked with different stimulation intensities until reaching the maximal responses are shown in Figure 9b,e (see Material and Methods and Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013). The graphed variable for input-output curves was the area under synaptic responses evoked at different intensities (Figure 9b for D1-SPNs and Figure 9e for D2-SPNs). Blue curves were obtained in the presence of $10 \mu\text{M}$ NNC. In all cases, input-output curves could be fitted to sigmoid functions implying that, qualitatively, and when APs are not being fired, synaptic responses in both neuron classes reach the soma as cumulative processes, suggesting that differences seen in eAPs and Ca^{2+} entry between these neuron classes are associated with eAPs firing and not with the underlying synaptic events per se, which only reflect the voltage reaching the soma (see also: Figure 5 in Vizcarra-Chacón et al., 2013; Pérez-Ramírez et al., 2015). These results show that ionic entry including Ca^{2+} due to the ionotropic glutamate receptor activation induce gradual and cumulative increasing depolarizations reaching the soma in both neuron classes and could not explain the differences in eAPs firing between them when they are stimulated with the same stereotyped train of stimuli.

In D1-SPNs, the slope factor of the sigmoid function was significantly larger when compared with Ca_v3 channels blockade. It changed from $k: 3.71 \pm 0.09$ in the controls to 4.28 ± 0.24 after the blockade (two-sample t -test; $n_1 = 10$, $n_2 = 7$; $p = 0.02$). However, the intensity to obtain a half amplitude response $ih: 1.08 \pm 0.02$ and 1.06 ± 0.03 was not significantly different after the blockade (two-sample t -test; $n_1 = 10$, $n_2 = 7$; $p = 0.59$). In the case, of D2-SPNs k was significantly smaller after Ca_v3 channels blockade: 3.89 ± 0.09 in controls and 3.25 ± 0.05 after Ca_v3 blockade (two-sample t -test; $n_1 = 12$, $n_2 = 6$; $p = 0.0002$). However, ih was 1.13 ± 0.02 in controls and 1.18 ± 0.02 after blockade (two-sample t -test; $n_1 = 12$, $n_2 = 6$; $p = 0.22$). Since the stimulus needed to attain the half maximal synaptic responses (ih) did not change significantly, and it

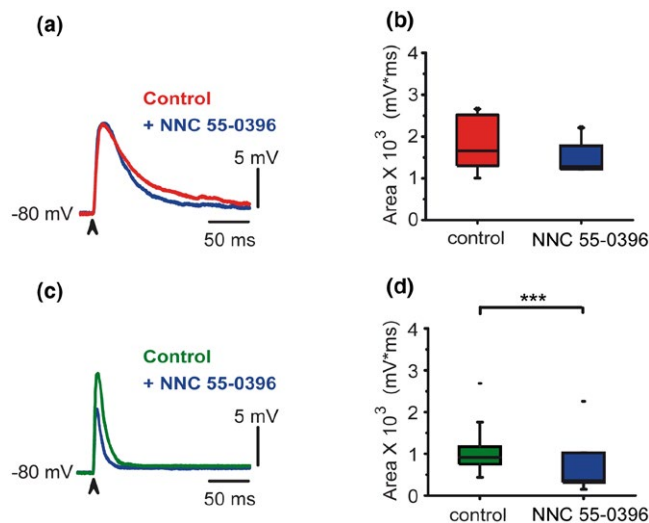


FIGURE 8 Ca_v3 channels contribution can be detected in subthreshold synaptic potentials. (a) Action of $10 \mu\text{M}$ NNC on the subthreshold corticostriatal responses in a D1-SPN: red is control and blue is the trace after Ca_v3 blockade. (b) Addition of NNC does not change significantly the area under the response of subthreshold synaptic responses in a sample of D1-SPNs ($p = 0.47$; $n = 7$ neurons; Wilcoxon test). (c) Effect of NNC on the subthreshold corticostriatal responses in a D2-SPN: green is control and blue is the trace after Ca_v3 blockade. (d) Differences in area under the synaptic response become significant with respect to the controls ($p = 0.004$; $n = 8$ neurons; Wilcoxon test)

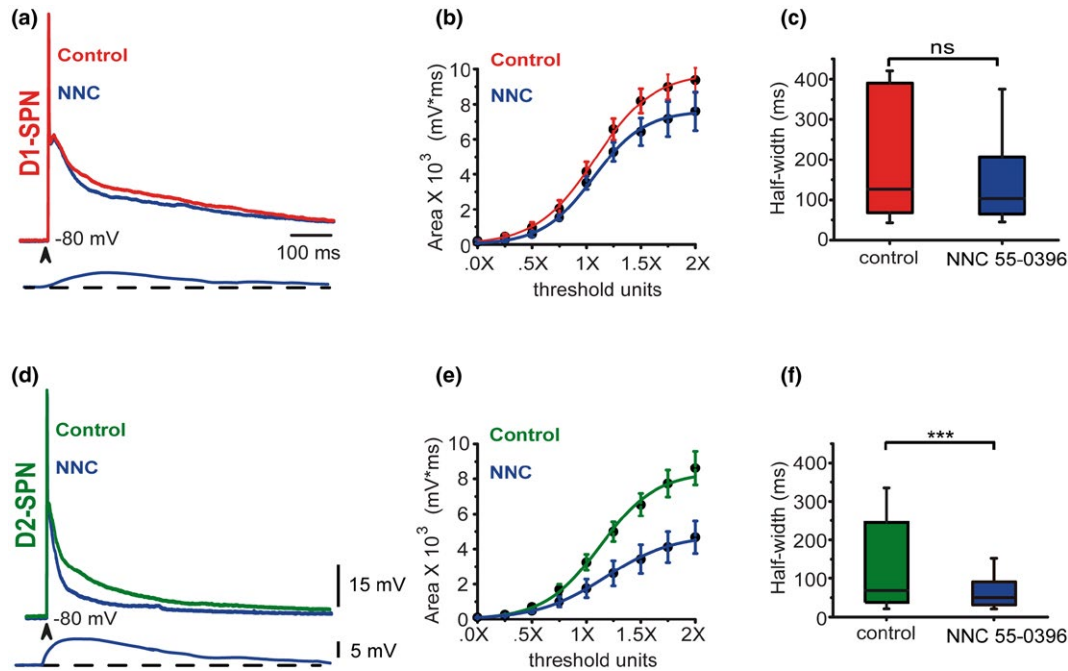


FIGURE 9 Input-output curves of subthreshold depolarizations: action of Ca_v3 channels blockade. (a) Intensity of synaptic stimuli was increased until one action potential was evoked. Action of $10 \mu\text{M}$ NNC 55-0396 (NNC), a selective Ca_v3 channels antagonist in a D1-SPN. At bottom, digital subtraction shows Ca_v3 current contribution to synaptic depolarization. (b) Mean \pm SEM of the areas under synaptic responses as a function of stimulus strength: Input-output plots fitted to sigmoid functions normalized to threshold units. (c) Differences in half-width in D1-SPNs responses were not significant ($p = 0.057$) after Ca_v3 blockade. (d) Action of NNC on the corticostriatal response of a D2-SPN. At bottom: digital subtraction shows Ca_v3 current contribution to depolarization. (e) Mean \pm SEM of input-output plots in D2-SPNs. (f) Differences in half-width in D2-SPNs responses was statistically significant ($**p = 0.022$; Mann-Whitney tests with post hoc Holm-Sidak adjustments)

is the parameter better linked with how many presynaptic afferents are being recruited by the same stimulus intensity, the results suggest that changes occurring in the amplitudes of the responses as a function of stimulus strength are of postsynaptic origin. Parameter k better reflects the rate of synapse recruitment. It was only decreased in D2-SPNs after the Ca_v3 depolarizing component was suppressed.

Finally, differences between responses of D1-SPNs and D2-SPNs were also measured using half-widths of the maximal responses (durations at half the amplitude of the responses; Figure 9c,f for D1-SPNs and D2-SPNs, respectively). For D1-SPNs (Figure 9c) the change was not significant from 247 ± 35 to 152 ± 43 ms (Mann-Whitney test; $n_1 = 10$, $n_2 = 7$; $p = 0.057$). For D2-SPNs (Figure 9f) the change was from 159 ± 27 to 89 ± 28 ms after Ca_v3 channels blockade (Mann-Whitney test $n_1 = 12$, $n_2 = 10$; $p = 0.022$; Figure 9f), suggesting again that Ca_v3 channels more importantly affect synaptic responses in D2-SPNs.

4 | DISCUSSION

4.1 | Contribution of Ca_v3 channels in D1- and D2-SPNs

The question that guided the present research was: If we deliver the same stereotyped stimulus to D1-SPNs and D2-SPNs would we obtain the same number of eAPs and corresponding somatic Ca^{2+} entry in both cell classes? The main finding was: D1-SPNs and D2-SPNs process the same synaptic inputs differently: they fire a different number of eAPs for the same stimulus, and therefore, corresponding Ca^{2+} entry to their soma areas exhibited a different dynamics. A stereotyped stimulus (four synaptic potentials at 20 Hz with intensities varying from 0.2 to $0.68 \mu\text{A}$ with all other variables remaining constant including stimulating electrodes and membrane potential) was needed to see a biophysical difference that we think may be important avoiding confounds such as varying synaptic duration and membrane potentials shifts.

The differences in processing synaptic inputs include: D1-SPNs increase the number of evoked APs as a function of stimulus strength and the magnitudes of synaptic responses. In contrast, D2-SPNs attain a maximum number of eAPs with weaker stimulus strengths and this number remains constant in spite of increasing stimulus intensity. As a consequence, Ca^{2+} entry to the soma is gradual and cumulative as the number of fired eAPs in D1-SPNs. Because synapses from the cortex are distributed on SPNs dendrites in *en passant* form (Cowan & Wilson, 1994), Ca^{2+} entry and fired eAPs can be inferred to be proportional to synaptic inputs activation in D1-SPNs, resembling a rate code (Gerstner et al., 1997). On the contrary, constancy of eAPs fired in D2-SPNs makes Ca^{2+} entry into the soma to increase slowly, making D2-SPNs

monitors of the minimum synaptic input necessary to fire at maximum. Neurons that attain a maximum firing with weak stimulus are common during a sparse code in coincidence detectors cells. These neurons have two characteristics: firing occurs on top of inactivating potentials and inhibition limits the number of spikes fired (Poo & Isaacson, 2009). Both characteristics were found in D2-SPNs neurons.

However, when stimulus intensity is forced up in D2-SPNs, two phenomena occur in parallel: first, regenerative Ca^{2+} potentials propagate toward the somatic area; and second, there is a sudden increase in Ca^{2+} entry that saturates, since further stimulus do not change it. Most probably, regenerative Ca^{2+} events do not propagate toward the axon, therefore, these potentials can be seen as another way to limit the number of APs fired by D2-SPNs. These phenomena are not present in D1-SPNs. Other ways to limit the number of APs fired are synaptic inhibition (shown here) and fast activation of outward current through Ca^{2+} -dependent K^+ -channels (see Arias-García et al., 2013). D1-SPNs exhibit a slower activation of Ca^{2+} -dependent K^+ -channels (Arias-García et al., 2013).

What would be the inactivating potential that may contribute to limit the duration, and therefore the number of eAPs fired, by the synaptic inputs in D2-SPNs? Different sources of Ca^{2+} affect synaptic responses in SPNs at the dendritic level.

Ca_v1 channels are discarded since the current they generate is slowly inactivating and the resulting potential lasts during the whole response in both cell classes (Flores-Barrera et al., 2011). Ca^{2+} entry through ionotropic glutamate receptors is also discarded since the depolarization they produce increase gradually as a function of stimulus strength in both cell classes (Vizcarra-Chacón et al., 2013) and could not explain their differences in eAPs fired or somatic Ca^{2+} dynamics. However, Ca_v3 channels appear as a good candidate since they inactivate fast (Perez-Reyes, 2003; Senatore, Guan, & Spafford, 2014) and have been demonstrated in dendritic spines of SPNs (Carter & Sabatini, 2004; Higley & Sabatini, 2008). In contrast, these channels are not present to any significant extent in the soma and proximal dendritic membrane of SPNs (Bargas et al., 1994).

Evidences described in this work that support Ca_v3 channels generating an inactivating potential that contributes importantly to synaptic depolarization in D2-SPNs are: (a) The steep rise in somatic Ca^{2+} entry at high stimulation intensities is abolished together with propagated Ca^{2+} potentials when Ca_v3 channels are blocked with the very selective antagonist NNC. This steep rise in Ca^{2+} entry is absent in D1-SPNs and constitutes a main difference in the way Ca^{2+} enters the soma area in both cell classes. Propagated Ca^{2+} potentials to the soma may not be due to Ca_v3 channels but triggered by them at the dendrites (Flores-Barrera et al., 2011). (b) In parallel with this phenomenon, the sudden rise to a maximum of fired eAPs in D2-SPNs during increasing stimulus strength is significantly depressed when Ca_v3 channels are blocked, suggesting that Ca_v3 channels contribute to this behavior. Ca^{2+} entry is also depressed in D1-SPNs when Ca_v3 channels are blocked, not so the cumulative firing of eAPs, proportional to stimulus intensity, suggesting that Ca_v3 channels do not contribute significantly to this behavior. (c) The blockade of GABAergic inhibition was different in D1-SPNs as compared to D2-SPNs: it *decreased* responses half-width in D1-SPNs and *increased* responses half-width in D2-SPNs (Figure 7e,f). The reason for this contrasting behavior was that inhibition block generated a significantly stronger depolarization in D2-SPNs (Figure 7g). This stronger depolarization was shown to be a low-threshold spike present in D2-SPNs and absent in D1-SPNs (cf. Figure 7b,d). This low-threshold spike was abolished by blocking Ca_v3 channels as in other cells expressing them. It is known that these channels are present in the dendrites of D2-SPNs (Carter & Sabatini, 2004). Here, we show their influence when the synaptic responses reach the soma and APs are generated. In fact, if APs are generated by current injections at the soma, D2-SPNs firing is cumulative and gradual, being a function of stimulus intensity, as in D1-SPNs, supporting that the particular behavior of these cells during cortical stimulation is due to dendritic processing. Before the use of transgenic animals, it had been observed that SPNs disclose two different behaviors when they are hyperpolarized during suprathreshold synaptic responses: one shows a plateau depolarization and the other shows a low-threshold spike (Bargas et al., 1991). (d) Blockage of Ca_v3 channels significantly depress subthreshold synaptic potentials in D2-SPNs, not so in D1-SPNs. This depression occurs during the whole input-output sigmoid function of subthreshold synaptic responses in both neuronal classes. However, upon reaching the maximal responses (RMAX see Material and methods) only the half-width of D2-SPNs responses was significantly affected. The fact that input-output functions in both neuron classes were sigmoid and cumulative confirms that it is not the gradual increase in synaptic responses reaching the soma what causes the differences in firing, but the active component added by Ca_v3 channels in D2-SPNs is necessary.

Being that said, blockade of Ca_v3 channels was not enough to avoid reaching a maximum for the firing of D2-SPNs. Blockade of synaptic inhibition was necessary to abolish this maximum so that D2-SPNs kept increasing the number of eAPs as a function of synaptic strength. This is another characteristic of neurons acting as coincidence detectors (Perez-Orive et al., 2002; Poo & Isaacson, 2009). Inhibition blockade also shifts the jump in Ca^{2+} entry toward weaker stimulus in D2-SPNs. These properties suggest that interneurons controlling dendritic inhibition are crucial in the indirect pathway.

Evidence above showing differential contributions of Ca_v3 channels in the synaptic responses between D1-SPNs and D2-SPNs, do not exclude other possible intrinsic or extrinsic differences that require further investigation.

4.2 | Consequences of different Ca_v3 channels expression on synaptic integration

In summary, the selective antagonist of Ca_v3 channels, NNC 55-0396 (10 μM ; NNC) did not change the nature of the gradual response of D1-SPNs. In contrast, the same antagonist destroyed the jumping behavior of Ca^{2+} entry in D2-SPNs at strong stimulus strengths, and at the same

time, slowed the rise in eAPs firing toward its maximum at weaker stimulus strengths. However, it does not increase the maximum number of eAPs fired. Importantly, inhibition together with Ca^{2+} -dependent K^+ -currents activation (Arias-García et al., 2013) have the role of limiting the number of eAPs fired in D2-SPNs. Because GABAergic inhibition has the same reversal potential in both neuron classes (Bracci & Panzeri, 2006; Flores-Barrera et al., 2009; Jiang & North, 1991; Kita, 1996; Misgeld et al., 1982), the apparent differences in inhibition between SPNs (Flores-Barrera et al., 2011) appear to be due, at least in part, to differences in Ca_v3 channels. Finally, propagating Ca^{2+} potentials toward the soma may also act to limit the number of eAPs fired by D2-SPNs.

When active, striatal neurons form neuronal ensembles that alternate their activity (Carrillo-Reid et al., 2009). These ensembles are conformed by groups of neurons, each one in charge of a motor act (Klaus et al., 2017). If in addition, some neurons in the circuit have a limited time window for firing, these neurons may work as coincidence detectors (Poo & Isaacson, 2009). Indeed, D2-SPNs fire during action initiation or termination (Cui et al., 2013). In contrast, D1-SPNs fire according to movement execution. Therefore, the different encoding properties described here may underlie the different roles of D1-SPNs and D2-SPNs during behavior. A gradual rate code in D1-SPNs agrees with the fact that movement during action should respond to demand (Cui et al., 2013; Parker et al., 2018). In contrast, when an unexpected operation occurs (Ding, Guzman, Peterson, Goldberg, & Surmeier, 2010) a need to suddenly initiate or stop an action may better use a coincidence detector. These differences suggest variation in cortical connections to the elements of neuronal ensembles depending on what area of the cortex is being transiently activated during behavior (Choi, Holly, Davatolhag, Beier, & Fuccillo, 2018).

Many neuronal ensembles dissolve during Parkinsonism leaving a highly recurrent ensemble (Aparicio-Juárez et al., 2017; Jáidar et al., 2010; Pérez-Ortega et al., 2016), perhaps, mainly composed of D2-SPNs (Parker et al., 2018). In addition, lateral inhibition is greatly lost during this condition (López-Huerta et al., 2013; Taverna, Ilijic, & Surmeier, 2008). These phenomena may explain synchronous states and the difficulty in initiating or stopping movements in Parkinson's disease.

5 | CONCLUSION

A stereotyped synaptic stimulus revealed differences in the encoding properties of D1- and D2-SPNs. D1-SPNs fire APs and increase somatic Ca^{2+} entry gradually, as a function of stimulus strength. In contrast, D2-SPNs reach a maximum number of APs with low stimulus intensities and with a minimum change in somatic Ca^{2+} entry. D2-SPNs sense minimal stimulus with maximal firing. However, if synaptic strength reaches a certain value, the number of spikes does not increase, but instead, propagated Ca^{2+} potentials and a jump in Ca^{2+} entry ensue. This D2-SPNs behavior is abolished when Ca_v3 channels are blocked. Subtraction of blocked component discloses a low-threshold spike in D2-SPNs not seen in D1-SPNs as observed from the soma. Fast synaptic inhibition does not change encoding properties of D1-SPNs, in contrast, it makes D2-SPNs to enhance the maximum number of APs fired and the jump in Ca^{2+} with lower stimulus intensities. We conclude that differences in Ca_v3 channels contribution help to confer different properties to SPNs classes. Besides responses to dopamine, these different encoding properties may underlie the different roles these neurons have in basal ganglia circuits.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Antonio Laville, Gabriela X. Ayala and Ariadna Aparicio-Juarez for technical support and advice and to Dr. Claudia Rivera for animal care. This work was supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT, 251144 to EG and Frontera 57 to JB) and from Dirección General de Asuntos del Personal académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM IN201517 to EG and IN 201417 to JB). In addition García-Vilchis B. had a CONACyT doctoral fellowship and a DGAPA fellowship. Some data in this work are part of her doctoral dissertation in the programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Suárez P also had a DGAPA fellowship.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ORCID

José Bargas  <http://orcid.org/0000-0002-8205-8163>

Elvira Galarraga  <http://orcid.org/0000-0002-1769-1245>

REFERENCES

- Ade, K. K., Janssen, M. J., Ortinski, P. I., & Vicini, S. (2008). Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *Journal Neuroscience*, 28(5), 1185–1197. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3908-07.2008>
- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., & Bargas, J. (2017). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.13806>
- Arias-García, M. A., Tapia, D., Flores-Barrera, E., Pérez-Ortega, J. E., Bargas, J., & Galarraga, E. (2013). Duration differences of corticostriatal responses in striatal projection neurons depend on calcium activated potassium currents. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7, 63. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00063>
- Arias-García, M. A., Tapia, D., Laville, J. A., Calderón, V. M., Ramiro-Cortés, Y., Bargas, J., & Galarraga, E. (2018). Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Structure and Function*, 223(3), 1229–1253. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1536-6>
- Bargas, J., Galarraga, E., & Aceves, J. (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Research*, 539(1), 159–163. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90700-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90700-6)
- Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y., & Surmeier, D. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *Journal of Neuroscience*, 14(11 Pt 1), 6667–6686. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-11-06667.1994>
- Bracci, E., & Panzeri, S. (2006). Excitatory GABAergic effects in striatal projection neurons. *Journal of Neurophysiology*, 95(2), 1285–1290. <https://doi.org/10.1152/jn.00598.2005>
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., DruckerColin, R., & Bargas, J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *Journal of Neurophysiology*, 99(3), 1435–1450. <https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernández, A., Vergara, R., Galarraga, E., & Bargas, J. (2009). Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *Journal of Neurophysiology*, 102(2), 682–690. <https://doi.org/10.1152/jn.00134.2009>
- Carter, A. G., & Sabatini, B. L. (2004). State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron*, 44(3), 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.013>
- Choi, K., Holly, E. N., Davatolhag, M. F., Beier, K. T., & Fuccillo, M. V. (2018). Integrated anatomical and physiological mapping of striatal afferent projections. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.13829>
- Cowan, R. L., & Wilson, C. J. (1994). Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *Journal of Neurophysiol*, 71(1), 17–32. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.1.17>
- Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., & Costa, R. M. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, 494(7436), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11846>
- Czubayko, U., & Plen, D. (2002). Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proceedings of National Academy of Science*, 99(24), 15764–15769. <https://doi.org/10.1073/pnas.242428599>
- Day, M., Wokosin, D., Plotkin, J. L., Tian, X., & Surmeier, D. J. (2008). Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11603–11614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1840-08.2008>
- Ding, J. B., Guzman, J. N., Peterson, J. D., Goldberg, J. A., & Surmeier, D. J. (2010). Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron*, 67, 294–307. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.017>
- Flores-Barrera, E., Laville, A., Plata, V., Tapia, D., Bargas, J., & Galarraga, E. (2009). Inhibitory contribution to suprathreshold corticostriatal responses: An experimental and modeling study. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(5), 719–731. <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9394-2>
- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B. J., Bargas, J., Tapia, D., & Galarraga, E. (2011). Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 15. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00015>
- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B. J., Tapia, D., Bargas, J., & Galarraga, E. (2010). Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 15. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00015>
- Gerstner, W., Kreiter, A. K., Markram, H., & Herz, A. V. (1997). Neural codes: Firing rates and beyond. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 12740–12741. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12740>
- Glantz, S. A. (2012). *Primer of biostatistics* (7th ed.). New York, NY: McGraw-Hill.
- Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2008). Calcium signaling in dendrites and spines: Practical and functional considerations. *Neuron*, 59(6), 902–913. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.020>
- Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2010). Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nature Neuroscience*, 13(8), 958–966. <https://doi.org/10.1038/nn.2592>
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., & Hernández-Cruz, A. (2010). Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: Entrainment into a dominant network state. *Journal of Neuroscience*, 30(34), 11326–11336. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1380-10.2010>
- Jiang, Z. G., & North, R. A. (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro. *Journal of Physiology*, 443, 533–553
- Kita, H. (1996). Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neuroscience*, 70(4), 925–940. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00410-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00410-6)
- Klaus, A., Martins, G. J., Paixao, V. B., Zhou, P., Paninski, L., & Costa, R. M. (2017). The spatiotemporal organization of the striatum encodes action space. *Neuron*, 96(4), 949. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.031>
- López-Huerta, V. G., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Fiordelisio, T., Drucker-Colin, R., & Bargas, J. (2013). The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of Parkinsonism. *Journal of Neuroscience*, 33(11), 4964–4975. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4721-12.2013>
- Misgeld, U., Wagner, A., & Ohno, T. (1982). Depolarizing IPSPs and depolarization by GABA of rat neostriatum cells in vitro. *Experimental Brain Research*, 45(1–2), 108–114. <https://doi.org/10.1007/BF00235769>
- Parker, J. G., Marshall, J. D., Ahanonu, B., Wu, W. Y., Kim, T. H., Grewe, B. F., ... Schnitzer, M. J. (2018). Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. *Nature*, 557(7704), 177–182. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0090-6>
- Perez-Orive, J., Mazor, O., Turner, G. C., Cassenaer, S., Wilson, R. I., & Laurent, G. (2002). Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science*, 297(5580), 359–365. <https://doi.org/10.1126/science.1070502>

- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., ... Bargas, J. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuit. *Neurobiology of Disease*, 91, 347–361. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.023>
- Pérez-Ramírez, M. B., Laville, A., Tapia, D., Duhne, M., Lara-González, E., Bargas, J., & Galarraga, E. (2015). KV7 channels regulate firing during synaptic integration in GABAergic striatal neurons. *Neural Plasticity*, 2015, 472676. <https://doi.org/10.1155/2015/472676>
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83(1), 117–161. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2002>
- Plotkin, J. L., Day, M., & Surmeier, D. J. (2011). Synaptically driven state transitions in distal dendrites of striatal spiny neurons. *Nature Neuroscience*, 14(7), 881–888. <https://doi.org/10.1038/nn.2848>
- Poo, C., & Isaacson, J. S. (2009). Odor representations in olfactory cortex: "Sparse" coding, global inhibition, and oscillations. *Neuron*, 62(6), 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.022>
- Senatore, A., Guan, W., & Spafford, J. D. (2014). Cav3 T-type channels: Regulators for gating, membrane expression, and cation selectivity. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 466(4), 645–660. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1449-7>
- Taverna, S., Ilijic, E., & Surmeier, D. J. (2008). Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 28(21), 5504–5512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5493-07.2008>
- Vizcarra-Chacón, B. J., Arias-García, M. A., Pérez-Ramírez, M. B., Flores-Barrera, E., Tapia, D., Drucker-Colin, R., ... Galarraga, E. (2013). Contribution of different classes of glutamate receptors in the corticostriatal polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neuroscience*, 14, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-60>

How to cite this article: García-Vilchis B, Suárez P, Serrano-Reyes M, et al. Differences in synaptic integration between direct and indirect striatal projection neurons: Role of Ca_v3 channels. *Synapse*. 2018;e22079. <https://doi.org/10.1002/syn.22079>