



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**CARACTERIZACIÓN DE LAS NEURONAS DE LOS NÚCLEOS
INTRALAMINARES DEL TÁLAMO PARAFASCICULAR (Pf) Y
CENTRAL LATERAL (CL) EN ROEDORES**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Beatríz Sarahí Méndez Rodríguez

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Elvira Galarraga Palacio, Instituto de Fisiología
Celular**

Ciudad Universitaria, CD. MX. Agosto 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente proyecto de investigación se realizó en el laboratorio BL-101 del departamento de Neurociencia cognitiva en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en el programa de doctorado en ciencias biomédicas, bajo la dirección de la Dra. María Elvira Galarraga Palacio.

Fue desarrollado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; 251144 a EG) y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA UNAM; IN203020 a EG y IN202920 a JB).

AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Mi madre Beatríz Rodríguez Flores; mi padre José Méndez Mellado y mi hermano José Juan Méndez Rodríguez por su apoyo, compañía y ayuda en todo momento de mi vida académica.

A Mario Antonio Velasco Méndez, Marco Antonio Velasco Méndez, Concepción Méndez Mellado y Mario Antonio Velasco Suárez por su inmensurable apoyo y compañía durante la realización de esta etapa de mi vida académica.

A mi tutora, Dra. María Elvira Galarraga Palacio por formar parte de mi vida académica y enseñarme la maravilla del cerebro y sus neuronas.

Al Dr. Salvador L. Hernández López y al Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar por formar parte de mi comité tutorial y enriquecer la realización de este trabajo.

Al Dr. José Bargas Díaz por contribuir en mi crecimiento académico y su ayuda en las revisiones de este trabajo.

Al Biólogo Dagoberto Tapia Ramírez por compartir su conocimiento y su colaboración en el trabajo anatómico de este proyecto de investigación.

A la Dra. Ariadna Aparicio Juárez y Gabriela Xóchitl Ayala Méndez por su ayuda en el cuidado de los ratones transgénicos que utilicé en los experimentos de este trabajo.

Al Físico Juan Antonio Laville por su ayuda en los análisis matemáticos de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Rosa María Reyes Chaperó, Ariadna Aparicio Juárez, Alejandra Díaz Jiménez, Reyna Fabiola Chávez Matías y Mario Alberto Arias García por sus enseñanzas y los días llenos de conversaciones interesantes y divertidas.

Al jurado de tesis: Dra. Violeta Gisselle López Huerta, Dra. María Elvira Galarraga Palacio, Dr. Víctor Hugo de Lafuente Flores, Dr. Arturo Hernández Cruz y Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco por sus valiosos comentarios y observaciones en la revisión de este trabajo.

ÍNDICE	Página
RESUMEN -----	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	
1.1 TÁLAMO -----	2
1.2 NÚCLEOS INTRALAMINARES DEL TÁLAMO -----	3
1.2.1 FUNCIÓN DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL -----	3
1.2.2 AFERENTES A LOS NÚCLEOS Pf Y CL -----	4
1.2.3 GANGLIOS BASALES Y NÚCLEOS INTRALAMINARES Pf Y CL -----	5
1.2.4 NEURONAS DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL -----	5
1.2.5 CONEXIONES DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL EN EL ESTRIADO -----	8
1.2.5 COMUNICACIÓN INTRATALÁMICA DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL-----	8
CAPÍTULO II.	
2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN -----	10
2.2 OBJETIVO GENERAL -----	10
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES -----	10
2.4 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN -----	12
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	
3.1 PREPARACIÓN BIOLÓGICA -----	13
3.2 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS -----	13
3.3 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA -----	14
3.4 FARMACOLOGÍA -----	15
3.5 MICROSCOPIA CONFOCAL -----	16
3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS -----	16
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	
4.1 TRAZADO DE LA VÍA TÁLAMO-ESTRIATAL -----	17
4.2 MORFOLOGÍA DE LAS NEURONAS DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL -----	18

4.3 CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOÓGICAS DE LAS NEURONAS DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL -----	20
4.3.1 ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE ACCIÓN -----	20
4.3.2 PATRONES DE DISPARO -----	22
4.3.3 RELACIÓN CORRIENTE-VOLTAJE (I-V) -----	24
4.3.4 RELACIÓN CORRIENTE-FRECUENCIA DE DISPARO (I-F) -----	27
4.4 RESPUESTAS SINÁPTICAS EN LAS NEURONAS DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL POR ESTIMULACIÓN ORTODRÓMICA DE CAMPO -----	30
4.4.1 COMPONENTE INHIBITORIO DE LA RESPUESTA SINÁPTICA -----	31
4.4.2 COMPONENTE EXCITATORIO DE LA RESPUESTA SINÁPTICA -----	33
4.4.3 RESPUESTA SINÁPTICA EVOCADA OPTOGENÉTICAMENTE -----	36
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN -----	40
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES -----	44
CAPÍTULO VII. IMPORTANCIA FUNCIONAL -----	46
REFERENCIAS -----	47

RESUMEN

Los núcleos intralaminares del tálamo parafascicular (Pf) y central lateral (CL) en el roedor, son parte de las aferentes sensoriales más importantes a los ganglios basales; Las neuronas que integran ambos núcleos son de tipo glutamatérgico y reciben aferencias externas GABAérgicas y colinérgicas. Existen pocos trabajos sobre las propiedades electrofisiológicas y morfológicas de las neuronas de los núcleos Pf y CL, algunos resultados son contradictorios y se desconoce si las neuronas de estos núcleos se comunican sinápticamente entre sí. En el presente estudio realizamos registros electrofisiológicos *in vitro* en configuración de célula entera, en neuronas identificadas de la vía tálamo-estriatal, mediante trazados anterógrado y retrógrado en ratones silvestres y de la cepa transgénica VGlut2-Cre. El análisis de los potenciales de acción permitió determinar dos grupos de neuronas de acuerdo a los componentes que integran el postpotencial hiperpolarizante (PPH). Las neuronas que poseen un solo componente tienen un postpotencial hiperpolarizante rápido (PPH R) y de corta duración; en las que tienen dos componentes (PPH R+L) la duración es significativamente mayor. La frecuencia de disparo inicial es significativamente mayor en las neuronas con dos componentes en el PPH, además estas neuronas presentan una evidente adaptación respecto a las neuronas cuyo PPH es solo rápido. Durante los registros electrofisiológicos las neuronas se marcaron intracelularmente con biocitina para determinar la morfología del árbol dendrítico. La morfología de las neuronas registradas coincide con la descrita previamente para los núcleos intralaminares del tálamo: tipo arbusto y tipo difusa. La mayoría de las neuronas del núcleo intralaminar CL tienen un solo componente en el PPH, tienen menor resistencia y su morfología es tipo arbusto. En el núcleo Pf se encuentran los dos tipos de neuronas mezcladas con uno o dos PPH, y ambas morfologías. El 85% de las neuronas registradas a potenciales de mantenimiento hiperpolarizados presentaron potenciales de acción en forma de ráfaga debido a la activación de canales para calcio tipo T ($Ca_v3.1$) que se abate con el antagonista TTA-P2 y el 100% presentó disparo tónico a potenciales de mantenimiento despolarizados. Las neuronas de los núcleos Pf y CL tálamo-estriatales, respondieron sinápticamente en respuesta a estimulación eléctrica de campo en el núcleo contrario al de registro. La respuesta sináptica registrada en ambas neuronas mostró un pequeño componente GABAérgico ($GABA_A$, sensible a gabacina) proveniente de aferentes extrínsecas a los núcleos intralaminares registrados. Adicionalmente, las respuestas sinápticas mostraron un componente glutamatérgico (NMDA y AMPA) y la participación de una corriente intrínseca por activación de canales de calcio tipo T ($Ca_v3.1$). Los componentes de las respuestas no fueron significativamente distintos en las neuronas del Pf y CL. Así mismo, las respuestas sinápticas registradas en las neuronas de ambos núcleos intralaminares, obtenidas mediante estímulo eléctrico u optogenético en el núcleo contrario al de registro, fueron semejantes. Los resultados obtenidos muestran por primera vez, una comunicación sináptica entre ambos núcleos intralaminares de la vía tálamo-estriatal con implicaciones importantes para la integración funcional de esta vía.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 TÁLAMO

El cerebro está anatómicamente y funcionalmente regionalizado para su estudio y comprensión; entre las especies existen diferencias sutiles y a la vez homologías que permiten hasta cierto grado extrapolar los hallazgos logrados en alguna de estas regiones. Gran parte de la investigación en neurociencias se realiza en roedores, como es el caso de este trabajo en el que estudiamos las neuronas que forman parte de una subregión del tálamo.

El tálamo es una estructura cerebral vital que se localiza debajo de la corteza, es un complejo nuclear localizado en el diencefalo (Herrero et al., 2002; figura 1). Desde el punto de vista de la biología evolutiva, el tálamo es una de las estructuras cerebrales más antiguas; tiene importantes funciones, tales como el procesamiento sensorial y motor, atención, memoria, emoción y habla. Varios núcleos talámicos con redes nerviosas extensas envían señales a otras regiones cerebrales incluida la corteza (Engelborghs et al., 1998; Ide et al., 2015); por lo tanto, se entiende como un centro de relevo tanto para mecanismos sensoriales como motores (Herrero et al., 2002). Además, juega un rol importante en la atención selectiva de información visual y auditiva, que es un proceso consciente y también subconsciente (Tokoro et al., 2015).

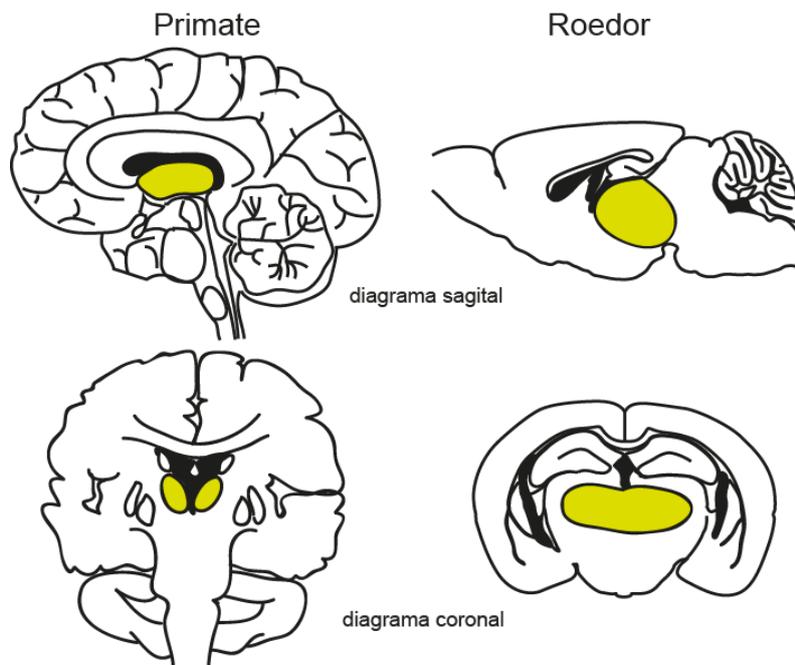


Figura 1. Localización anatómica del tálamo en primates y roedores.

1.2 NÚCLEOS INTRALAMINARES DEL TÁLAMO

Los núcleos intralaminares talámicos son un conjunto de subregiones dentro del tálamo que, en roedores comprenden los siguientes: central medial, paracentral, central lateral (CL), parafascicular (Pf) y centro mediano (Groenewegen y Berendse, 1994; Van der Werf et al., 2002). El núcleo Pf se localiza en el cerebro de ratón caudalmente mientras que el núcleo CL se halla más rostralmente (Van der Werf et al., 2002). En primates el complejo centro-medial-parafascicular (CM/Pf) es la estructura homóloga al núcleo Pf de los roedores (Jones, 1985; Groenewegen y Berendse, 1994; figura 2).

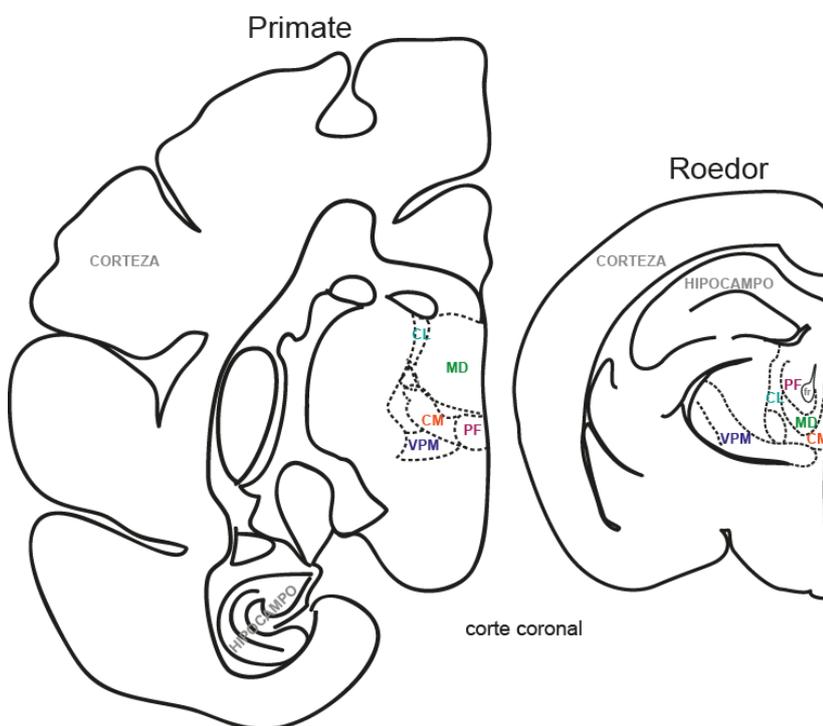


Figura 2. Diagrama coronal de la localización anatómica de los núcleos intralaminares en primates y roedores. CL, central lateral; MD, medial dorsal; CM, central medial; PF, parafascicular; VPM, ventral posterior medial y fr, fascículo retroflexus.

1.2.1 FUNCIÓN DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL

Los núcleos intralaminares proporcionan información sobre eventos sensoriales relevantes que procesan de las aferencias que reciben tanto del tallo cerebral y la región pontina como de otros núcleos subcorticales (Paré et al., 1988; Van der Werf et al., 2002; Kobayashi y Nakamura, 2003; Giber et al., 2015) al núcleo estriado, así como a sus blancos corticales (Saalmann, 2014). La vía tálamo-estriatal está involucrada en atención y posiblemente como una estrategia de cambio motor (Smeal et al., 2008) porque el proceso de aprendizaje contribuye a la apropiada selección y al cambio flexible del comportamiento mediado a través del núcleo estriado, una importante estructura

del circuito de los ganglios basales que, en su mayoría recibe aferencias provenientes de los núcleos intralaminares del tálamo, incluidos los núcleos CL y Pf en roedores y el complejo CM/Pf en primates (Graybiel et al., 1994; Matsumoto et al., 2001; Smith et al., 2011). Los núcleos intralaminares, a través de sus conexiones con los colículos superiores y los ganglios basales, proporcionan al estriado acceso a estímulos salientes importantes en el aprendizaje; además, las ventajas fisiológicas, como la transmisión rápida de información visual y la respuesta conductual adecuada, de este circuito subcortical sobre el circuito cortical a los ganglios basales explican como un evento sensorial impredecible puede rápidamente comandar el control atencional y motor que permite la supervivencia del individuo (Fisher y Reynolds, 2014). Utilizando técnicas moleculares para la eliminación selectiva de las neuronas tálamo-estriatales del CL y estimulación optogenética se ha demostrado que las neuronas del núcleo CL son esenciales para el desempeño en el aprendizaje estímulo-respuesta y para la flexibilidad conductual, incluyendo el recambio atencional y aprendizaje reverso de las respuestas aprendidas (Kato et al., 2018). Además, tanto el tálamo como la corteza envían información auditiva al estriado y ambas regiones llevan la información de la frecuencia sonora con similar fidelidad, sin embargo, el tálamo provee información complementaria acerca del tiempo preciso del evento acústico (Ponvert y Jaramillo, 2019), por ello, se ha hipotetizado que los núcleos intralaminares del tálamo juegan un rol importante en la activación cortical y se ha especulado como un importante substrato celular de la conciencia (Llinás et al., 1998), y la regulación de la conducta de alertamiento (Schiff, 2008).

1.2.2 AFERENTES A LOS NÚCLEOS Pf Y CL

Los núcleos intralaminares del tálamo, Pf y CL reciben información de las neuronas colinérgicas y no colinérgicas del tallo cerebral porque la organización del comportamiento requiere la coordinación rápida de la actividad de este y el cerebro anterior, es decir, probablemente sirven como un centro de mando en este circuito (Paré et al., 1988; Giber et al., 2015). Las neuronas de proyección del núcleo reticular mesencefálico también llevan información al núcleo Pf (Kroust et al., 2002); además, las fibras provenientes de la formación reticular pontina co-liberan glicina y ácido gamma aminobutírico (GABA) en los núcleos intralaminares del tálamo. La activación optogenética en los núcleos intralaminares de axones provenientes de la formación reticular pontina usando ratones experimentales en libre movimiento condujo a la detención del comportamiento y la interrupción transitoria de la actividad cortical que revela un sistema ascendente evolutivamente conservado que controla la actividad del cerebro anterior a través de una rápida y potente inhibición sináptica de los núcleos intralaminares (Giber et al., 2015). Un sistema aferente con características morfológicas comparables fue encontrado también en humanos (Kinney et al., 1994; Giber et al.,

2015). El núcleo reticular talámico (RT) e incluso núcleos de salida de los ganglios basales, tales como la sustancia nigra part reticulata (SNr) y el globo pálido (GP) proyectan contactos sinápticos GABAérgicos hacia las neuronas del núcleo Pf (Tsumori et al., 2002).

1.2.3 GANGLIOS BASALES Y NÚCLEOS INTRALAMINARES PF Y CL

Los ganglios basales son un conjunto de regiones cerebrales localizadas debajo de la corteza cerebral y cuya función es establecer los circuitos neuronales adecuados para los correctos movimientos, por ello están implicados en enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, en la que se sabe está implicada la vía tálamo-estriatal (Hornykiewicz y Kish, 1987) dado que la pérdida de dopamina causa cambios significativos en la actividad de los núcleos intralaminares además de las neuronas de los ganglios basales (Rodríguez-Sabate et al., 2014; Zhang et al., 2019). Para que los movimientos sean correctos el núcleo estriado, la región más grande de los ganglios basales recibe información de la corteza; aferentes identificadas por la expresión selectiva del transportador vesicular de glutamato tipo 1 (VGluT1), y el tálamo que expresan el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGluT2; Doig et al., 2010; Nelson y Kreitzer, 2014). Sin embargo, el núcleo Pf también se comunica con el núcleo subtalámico (STN); la estimulación optogenética bilateral de la vía Pf-STN en roedores parkinsonianos provoca el inicio de movimiento y genera locomoción, en contraste con la estimulación de la vía Pf-estriado que no tiene efecto, ello implica que independiente al estriado, el Pf puede influenciar a los núcleos de salida de los ganglios basales además de las regiones locomotoras del tallo cerebral a través del STN (Watson et al., 2021), mientras que las proyecciones tálamo estriatales influyen en funciones de alto orden, tales como la atención, la secuencia de acciones y el cambio conductual (Kato et al., 2018).

1.2.4 NEURONAS DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL

Las neuronas de los núcleos intralaminares del tálamo han sido estudiadas en roedores, gatos y primates. De acuerdo al neurotransmisor que liberan; los núcleos Pf y CL del tálamo están conformados por neuronas excitatorias glutamatérgicas que inervan tanto a los ganglios basales como a la corteza (Sugimoto y Hattori, 1983; Marini et al., 1996; Mendelbaum et al., 2019). Dentro de los núcleos intralaminares no hay interneuronas que expresen el neurotransmisor GABA en roedores. Sin embargo, en los cerebros de gatos y monos se han observado cuerpos celulares inmunoreactivos a GAD (enzima para la síntesis de GABA) o GABA en los núcleos: CL, central medial (CeM), centro mediano (CM) y Pf (Bentivoglio et al., 1991).

Se sabe mediante registros extracelulares que las neuronas del núcleo CL tienden a disparar en forma de ráfaga; sin embargo, las neuronas del núcleo Pf raramente presentan el intenso disparo en ráfaga típico de las neuronas del núcleo CL, figura 3A. La morfología del árbol dendrítico en las neuronas del núcleo CL es una profusa ramificación radial al soma, conformando la compacta apariencia de arbusto clásicamente atribuida a las neuronas talámicas de relevo (Jones, 1985). En contraste, las dendritas en las neuronas del núcleo Pf son más largas y poco ramificadas pero con una distribución espacial mayor respecto al soma, es decir, sus dendritas se extienden en mayor volumen (figura 3B; Lacey et al., 2007).

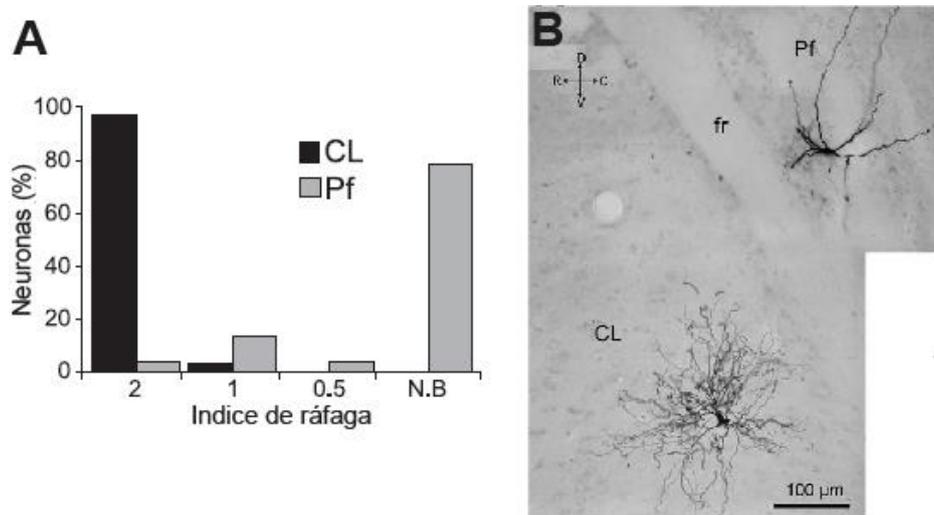


Figura 3. Disparo y morfología de neuronas en los núcleos parafascicular (Pf) y central lateral (CL).

Proporción de neuronas con disparo en forma de ráfaga y que no tuvieron disparo en forma de ráfaga (N.B) (A). Fotomicrografía de una neurona del núcleo CL y una neurona del núcleo Pf que fueron marcadas yuxtacelularmente con neurobiotina en el mismo animal (B).

fr, Fascicularis retroflexus. Tomada y modificada de Lacey et al., 2007.

Sin embargo, Beatty y colaboradores en 2009 estudiaron las características de las neuronas del segmento lateral del núcleo parafascicular (IPf) y registraron dos subtipos morfológicos: difuso y arbusto (figura 4A). Las neuronas difusas fueron el subtipo más común en el Pf y se caracterizan por tener pocas dendritas principales y un árbol dendrítico poco ramificado. Las neuronas tipo arbusto tienen bastantes dendritas principales de manera radial. En cuanto a las propiedades electrofisiológicas, el potencial de membrana en reposo para las neuronas difusas es -62 ± 7 mV y para las neuronas tipo arbusto es hiperpolarizado (-73 ± 7 mV); además, la resistencia de entrada que obtuvieron fue significativamente menor en las neuronas tipo arbusto (492 ± 234 M Ω) respecto a la registrada en las neuronas tipo difuso (1003 ± 529 M Ω). Estas neuronas presentan dos formas de disparo que depende del potencial de la membrana: para evocar una descarga en forma de

ráfaga, el potencial de membrana debe ser hiperpolarizado (~ -90 mV) y un pulso de corriente despolarizante produce una descarga de potenciales de acción a alta frecuencia; ahora bien, en potenciales de membrana despolarizados el mismo paso de corriente produce una descarga de potenciales de acción de manera tónica. Además, encontraron que la mayoría de las neuronas de tipo difuso no presenta disparo en ráfaga en contraste con las neuronas tipo arbusto (Beatty et al., 2009; figura 4B).

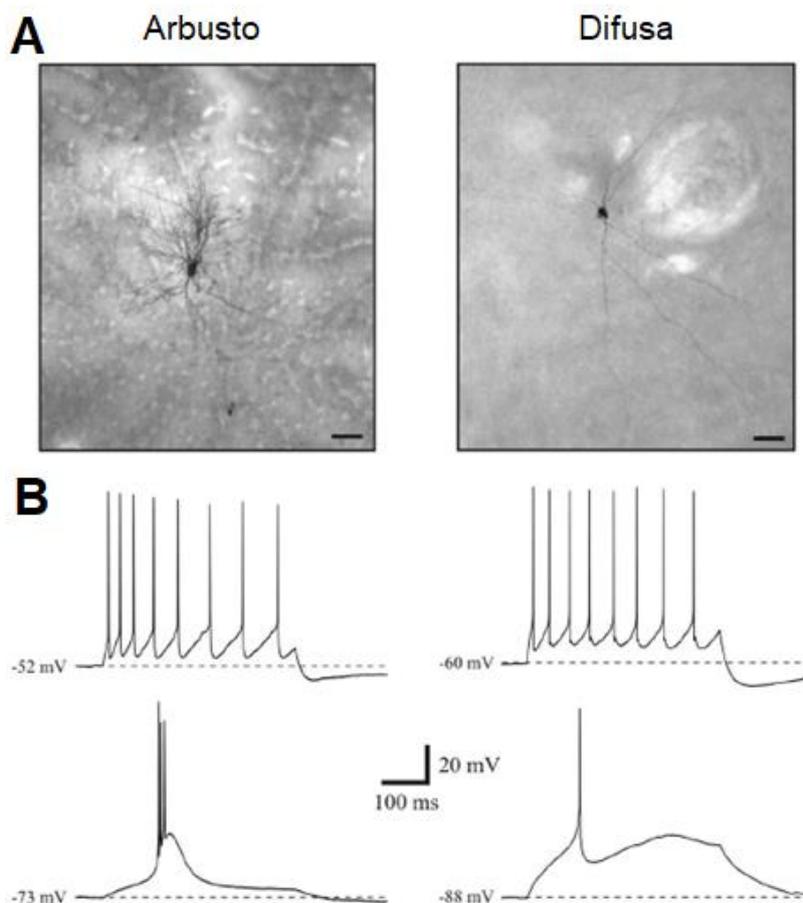


Figura 4. Distintos potenciales de acción característicos de los subtipos neuronales del IPf. Fotomicrografía de neuronas marcadas intracelularmente con biocitina, neurona tipo arbusto y difusa, izquierda y derecha respectivamente (A). Trazos de potenciales de acción voltaje dependientes en ambos tipos morfológicos. A potencial de membrana despolarizado, un pulso de corriente despolarizante evoca potenciales de acción de manera tónica (trazos superiores). En potencial de membrana relativamente hiperpolarizado el mismo pulso de corriente evoca potenciales de acción en forma de ráfaga en neuronas tipo arbusto (trazo inferior izquierdo) pero no en neuronas tipo difuso (trazo inferior derecho) (B). Calibración en A, 200 μ m. Tomada y modificada de Beatty et al., 2009.

Los posibles cambios debidos a la maduración neuronal postnatal en el núcleo Pf fueron estudiados en ratas Sprague-Dawley en rango de edad de 12-50 días postnatales. Clasificaron las neuronas respecto a la forma del postpotencial hiperpolarizante (PPH) de los potenciales de acción

generados espontáneamente o evocados en: tipo I con PPH lento y tipo II que exhibieron PPH rápido. La amplitud del PPH no fue significativamente distinta entre los dos tipos neuronales (14.4 ± 0.8 mV y 13.1 ± 0.7 mV, respectivamente). El umbral de disparo que registraron en las neuronas del núcleo Pf en general fue -42.7 ± 0.6 mV. La amplitud de los potenciales de acción fue 47.3 ± 0.9 mV, mientras que la duración a la amplitud media fue 0.93 ± 0.04 ms. 19% de las neuronas que registraron exhibieron potenciales lentos de bajo umbral (LTS, low-threshold-spiking) como respuesta de rebote y las neuronas tipo I tuvieron menor frecuencia de disparo respecto a las neuronas tipo II (Phelan et al., 2005).

1.2.5 CONEXIONES DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL EN EL ESTRIADO

La principal aferencia talámica al núcleo estriado se origina en los núcleos intralaminares (Macchi et al. 1984; Giménez-Amaya et al., 1995), en roedores, son el núcleo Pf localizado caudalmente y el núcleo CL que está rostral (Berendse y Groenewegen, 1990; Castle et al. 2005; Smith et al. 2009). Las neuronas de proyección del tálamo proveen de información sensorial importante a las neuronas espinosas medianas (Ichinohe et al., 2001; Raju et al., 2006; Zheng et al., 2021) del estriado y a las interneuronas colinérgicas (ChINs), las interneuronas de disparo rápido (FSIs, fast-spiking) y las interneuronas con LTS (Rudkin y Sadikot, 1999; Matsumoto et al., 2001; Smith et al., 2004; Arias-García et al., 2018; Villalba et al., 2019; Johansson y Silberberg, 2020).

Usando los ratones transgénicos BAC, que expresan la proteína reportera fluorescente verde (EGFP) en las neuronas con receptores dopaminérgicos D1 o D2, correspondientes a la vía de señalización directa e indirecta de los ganglios basales, respectivamente; e inmunomarcando el transportador vesicular de glutamato (VGluT) se dilucido que las neuronas espinosas medianas tanto de la vía directa como de la vía indirecta reciben entradas sinápticas convergentes de terminales presinápticas VGluT1 y VGluT2 (Doig et al., 2010; Huerta-Ocampo et al., 2014; Arias-García et al., 2018), originando respuestas postsinápticas similares, tanto en las neuronas espinosas medianas como en las interneuronas estriatales (Arias-García et al., 2018).

1.2.6 COMUNICACIÓN INTRATALÁMICA DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL

Las neuronas de proyección de los dos núcleos intralaminares de interés se comunican con otras regiones cerebrales recibiendo y enviando información. Sin embargo, Mendelbaum y colaboradores encontraron que las subregiones en las que dividieron al núcleo Pf (medial, central y lateral) no

están localmente interconectadas e inervan diferencialmente al estriado, lo que demuestra que en ratones, el núcleo Pf está formado por neuronas heterogéneas que están organizadas en circuitos independientes (Mendelbaum et al., 2019). Además, los axones de las neuronas de ambos núcleos no emiten colaterales locales dentro de los núcleos vecinos (Lacey et al., 2007).

Es importante esclarecer la posible comunicación sináptica entre las neuronas que conforman estos núcleos talámicos debido a que ambos reciben, procesan y a su vez envían información importante y necesaria a otras regiones del cerebro para el correcto comportamiento de los organismos.

CAPÍTULO II.

2.1 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.- ¿Existen diferencias en las propiedades electrofisiológicas y morfológicas de las neuronas que conforman los núcleos intralaminares del tálamo Pf y CL?

2.- ¿Existe comunicación sináptica intratalámica entre las neuronas del núcleo Pf y el núcleo CL?

2.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar si existen diferencias en las propiedades electrofisiológicas y/o morfológicas de las neuronas que conforman los núcleos intralaminares del tálamo Pf y CL en ratones adultos. Así como, conocer si existe comunicación sináptica entre estas neuronas que conforman estos núcleos talámicos.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

Pregunta 1

- Identificar mediante trazado anterógrado y retrógrado, las neuronas intralaminares tálamo-estriatales, utilizando ratones de la cepa transgénica VGluT2-Cre y silvestres.
- Determinar la morfología neuronal usando marcado intracelular con biocitina durante el registro electrofisiológico.
- Mediante registros electrofisiológicos en la modalidad de fijación de corriente analizar la trayectoria del potencial de acción durante el disparo a potenciales despolarizados de las neuronas del núcleo Pf y del núcleo CL.
- Clasificar las neuronas de acuerdo a la trayectoria de voltaje del post potencial hiperpolarizante (PPH) y sus componentes presentes.

- Determinar la frecuencia y adaptación de disparo ante pulsos despolarizantes de corriente.
- Medir la resistencia de membrana mediante curvas I/V, en dos potenciales de mantenimiento distintos.
- Estudiar los patrones de disparo generados a diferentes potenciales de mantenimiento (~ -80 mV y a ~ -60 mV).
- Estudiar la participación de corrientes de calcio tipo T (Ca_v3) en el disparo en ráfagas de potenciales de acción.

Pregunta 2

- Registrar las respuestas sinápticas en neuronas del núcleo Pf y el núcleo CL mediante estimulación eléctrica de campo en rebanadas horizontales de cerebro de ratón.
- Disecar los componentes inhibitorio (GABAérgico) y excitatorio (glutamatérgico) presentes en la respuesta sináptica utilizando antagonistas específicos.
- Estudiar la participación de la corriente de calcio tipo T (Ca_v3) en las respuestas sinápticas registradas.
- Analizar si existen diferencias en los parámetros de los potenciales sinápticos (amplitud, duración, etc.) en las neuronas de ambos núcleos intralaminares.
- Comprobar la especificidad de las respuestas sinápticas estimulando optogenéticamente ratones de la cepa transgénica VGluT2-Cre transfectados con el canal ChR2 y la proteína reportera eYFP en el núcleo CL y obtener registros de la respuesta sináptica en neuronas del núcleo Pf.
- Comparar los componentes de las respuestas sinápticas obtenidas mediante estimulación eléctrica de campo vs. las obtenidas con estimulación optogenética en el núcleo contrario al de registro.
- Demostrar mediante marcados retrógrados las fibras provenientes del núcleo central lateral en animales transfectados.

2.4 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

EL TÁLAMO Y LA CORTEZA SON LAS DOS ENTRADAS GLUTAMATÉRGICAS AL ESTRIADO QUE ACTIVAN LOS PROGRAMAS MOTORES DE LOS GANGLIOS BASALES. LA VÍA CORTICO-ESTRIATAL HA SIDO EXTENSAMENTE ESTUDIADA A DIFERENCIA DE LA VÍA TÁLAMO-ESTRIATAL DE LA CUAL SE DESCONOCE SU FUNCIONAMIENTO A NIVEL CELULAR Y SU IMPACTO SOBRE EL MICROCIRCUITO DEL ESTRIADO ASÍ COMO, SU PARTICIPACIÓN FISIOPATOLÓGICA.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 PREPARACIÓN BIOLÓGICA

En el presente proyecto de investigación se utilizó como modelo experimental roedores de la especie *Mus musculus* por las características morfológicas y fisiológicas homólogas a la especie *Homo sapiens*; además de las ventajas de reproducción y mantenimiento en bioterio, así como su rápido desarrollo.

Todos los ratones empleados se cuidaron y mantuvieron bajo lo establecido en la Guía del Instituto Nacional de la Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (siglas en inglés NIH, 2010) y lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 del cuidado y uso de Animales de Laboratorio en México y el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio UNAM (CICUAL EGP-41-14).

Se emplearon aproximadamente 250 ratones entre machos y hembras en edad adulta (30-45 días postnatal); de los cuales el 60% fueron de la cepa transgénica VGluT2-Cre (KSlc17a6tm2 (Cre) Lowl/J; Bradford B. Lowell, Beth Israel Deaconess Med Cntr (Harvard)) y el 40% de la cepa silvestre C57BL/6J. Fueron mantenidos en condiciones de 12 hrs luz/12 hrs oscuridad en habitaciones con temperatura y humedad controlada y teniendo alimento y agua *ad libitum*; se colocaron máximo 4 ratones por caja.

3.2 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Se realizaron registros de la actividad electrofisiológica con la técnica Patch Clamp en la modalidad de célula entera (Neher y Sakmann, 1992) de las neuronas que componen los núcleos Pf y CL del tálamo; para lo cual, se obtuvieron rebanadas de cerebro de los roedores arriba mencionados de 250-300 μm de espesor; en algunos experimentos se usaron rebanadas sagitales, sin embargo, el 90% se realizaron en rebanadas horizontales sin ángulo (figura 5).

Los ratones fueron anestesiados con la mezcla ketamina/xilacina (85 mg / 15 mg) inyectada intraperitonealmente, pasados de 2 a 3 minutos y verificando que no hubiera sensación en las extremidades; se abrió la caja torácica para tener acceso al corazón y se hizo perfusión intracardiaca con una solución rica en sacarosa (en mM) y a 4°C: 225 sucrosa, 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 28 NaHCO₃, 7 glucosa, 1 ácido ascórbico, and 3 piruvato (pH 7.4 con NaOH); y saturada con 95% O₂ y 5% CO₂ con el objetivo de preservar la viabilidad celular y obtener un cerebro libre de

células hemáticas que interfirieran en la visualización de los somas neuronales en el microscopio durante el registro electrofisiológico.

Las rebanadas se obtuvieron con ayuda de un vibratomo (Pelco, Ted Pella, Redding, CA, USA) y se mantuvieron durante todos los protocolos de registro en una solución semejante al líquido cefalorraquídeo en constante recambio (en mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 10 glucosa, 0.2 ácido ascórbico, y 0.2 thiourea (pH 7.4), saturada con 95% O₂ y 5% CO₂, 300 mOsmol/L; antes del registro se dejaron en esta solución salina durante 1 h para su equilibrio. Se usaron micropipetas de borosilicato con una resistencia de entre 3-6 MΩ en la punta; fueron llenadas con una solución semejante al citoplasma neuronal (en mM): 120 KMeSO₄, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, 1 CaCl₂, 0.2 Na₂ATP, 0.2 Na₃GTP y 1% de biocitina (para marcado intracelular), 290 mOsmol/L.

Los registros fueron obtenidos en la modalidad fijación de corriente y algunos en fijación de voltaje para comprobar los análisis de las curvas I/V. Se registraron trazos de los potenciales de acción generados por estímulos somáticos despolarizantes e hiperpolarizantes de 1000 ms de duración en potencial de membrana hiperpolarizado a -75 mV y despolarizado a -55 mV.

Para obtener la respuesta sináptica evocada se colocó un electrodo bipolar concéntrico de 25 o 50 μm de diámetro en la punta en el núcleo intralaminar de interés opuesto al de registro (CL-Pf). La estimulación de campo consistió en un solo pulso cuadrado de 0.1 ms e incrementando la intensidad a 20 Hz. La respuesta sináptica evocada optogenéticamente se obtuvo mediante pulsos de luz azul (473 nm) de 0.1 ms con un láser (CrystaLaser CL473-50-SO) posicionado en el núcleo intralaminar opuesto al de registro (CL-Pf) en rebanadas de cerebro de ratones VGluT2-Cre previamente transfectados con ChR2-eYFP. En algunos experimentos la estimulación se hizo con una lámpara de xenon pasando el haz a través de un filtro para luz azul (470 ± 20 nm). La respuesta se registró a -75 mV de mantenimiento en neuronas de ambos núcleos intralaminares.

3.3 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

En ratones de la cepa transgénica VGluT2-Cre y de la cepa silvestre C57BL/6J se realizaron cirugías cerebrales para el trazado retrógrado y anterógrado de la vía tálamo-estriatal, así como del canal de rodopsina II (ChR2) para obtener respuestas sinápticas evocadas optogenéticamente. Se utilizaron ratones de 21 días postnatales; fueron anestesiados con isoflurano, colocados en un estereotáxico para ratón y la superficie del cráneo fue expuesta con ayuda de un escalpelo. Para el trazado anterógrado de la vía tálamo-estriatal se inyectaron 50 nl de AVV1.EF1a.DIO.eYFP (Karl

Deisseroth, UNC), usando un nanoinyector (Drummond Scientific Company, USA) a una velocidad de 4.6 nl/5 s en el núcleo Pf (coordenadas respecto a bregma: anteroposterior, -2.2 mm; mediolateral, -0.7 mm; dorsoventral, -3.3 mm; ángulo 90°) o en el núcleo CL (coordenadas respecto a bregma: anteroposterior, -1.5 mm; mediolateral, -0.8 mm; dorsoventral, -3.0 mm; ángulo 90°). En el trazado retrógrado se inyectaron 2 µl de AAV pCAG-FLEX-tdTomato-WPRE.bGH (tdTomato) a 9.2 nl/5 s en el estriado dorsomedial (coordenadas respecto a bregma: anteroposterior, +0.5 mm; mediolateral, +1.5 mm; dorsoventral, -3.2 mm; ángulo 90°). En ratones VGluT2-Cre se transfeció AAV1.EF1a.DIO.hChR2 (H134R)-eYFP.WPRE.hGH (EF1a.DIOChR2-eYFP; Karl Deisseroth, UNC) en el núcleo Pf (coordenadas respecto a bregma: anteroposterior, -2.2 mm; mediolateral, -0.7 mm; dorsoventral, -3.3 mm; ángulo 90°) o en el núcleo CL (coordenadas respecto a bregma: anteroposterior, -1.5 mm; mediolateral, -0.8 mm; dorsoventral, -3.0 mm; ángulo 90°) a 4.6 nl/5 s. Para disminuir el error y evitar la pérdida en otras regiones cerebrales la pipeta de inyección fue puesta cuidadosamente en el sitio de interés y posterior a la inyección esperamos 10 minutos en el sitio antes de levantar la pipeta aproximadamente 200 µm y esperamos 3 minutos más para finalmente retirar lentamente la pipeta. Para evitar daño ocular se colocó solución salina o vaselina en los ojos; además, la temperatura corporal fue mantenida durante y posterior a la cirugía. Después de la cirugía los ratones fueron mantenidos en una cabina de bioseguridad para su recuperación. Los experimentos fueron realizados entre 20-25 días después de la transfección.

3.4 FARMACOLOGÍA

Para demostrar la participación de algunas corrientes tanto en la generación de potenciales de acción ante estimulación somática como en la estimulación dendrítica para obtener respuestas sinápticas evocadas se utilizaron los siguientes fármacos (Tocris Biosciences, Minneapolis, MN, USA) poniéndolos en el baño durante los registros electrofisiológicos: antagonistas selectivos de canales para calcio tipo T Ca_v3.1, NNC 55-0396 diclorhidrato (10 µM) y TTA-P2 (Alomone Labs, Israel; 1 µM), el antagonista de canales para potasio, 4-aminopiridina (Sigma-Aldrich, USA; 30-120 µM, 4-AP); el antagonista GABAérgico SR 95531 hidrobromuro (gabacina, 10 µM) para quitar el posible componente inhibitorio en la respuesta sináptica evocada; y los antagonistas ionotrópicos glutamatérgicos: APV (500 µM) y CNQX (10 µM) que bloquean los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropionato), respectivamente.

3.5 MICROSCOPIA CONFOCAL

Se obtuvieron y analizaron microfotografías de los trazados de la vía tálamo-estriatal, así como de las neuronas marcadas intracelularmente con biocitina adquiridas con un microscopio confocal de excitación doble fotón Zeiss LSM710 (Zeiss, Germany). Posterior al registro electrofisiológico, las rebanadas fueron fijadas durante la noche en paraformaldehído al 4% y ácido pícrico saturado al 1% en amortiguador de fosfato 0.1 M (PBS; Ph 7.4) a 4°C. Después de lavar las rebanadas fueron embebidas en agar al 6% para reseccionarlas a 50 µm con ayuda de un microvibratomo. Las neuronas marcadas con biocitina fueron visualizadas después de incubarlas en streptavidina conjugada con Cy3 o Cy5 (1:200, Invitrogen) en PBS conteniendo 0.3% Tritón X-100 durante la noche a 4°C. Las rebanadas fueron montadas en medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron en una resolución de 1024 x 1024 píxeles y exportadas en archivos formato .TIFF.

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los registros electrofisiológicos fueron adquiridos y guardados en una PC mediante el programa IM-PATCH© (<http://impatch.ifc.unam.mx/>). Los datos fueron exportados para su análisis y representación gráfica en los programas comerciales: Origin7 (Microcal, Northampton, MA); MatLab (Natick, MA); GraphPad Prism 5 (San Jose CA) y Systat 11 (San Jose, CA). Los valores estadísticos son presentados como el promedio \pm s.e.m; las muestras independientes fueron evaluadas con la prueba no paramétrica U Mann-Whitney.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 TRAZADO DE LA VÍA TÁLAMO-ESTRIATAL

Para asegurar que los registros electrofisiológicos correspondieron a neuronas de los núcleos intralaminares del tálamo que proyectan al núcleo estriado se hizo trazado anterógrado y retrógrado de la vía tálamo-estriatal (ver Capítulo 3, cirugía estereotáxica). Se obtuvieron microfotografías en forma de mapa y acercamientos de ambos trazados. Después del trazado anterógrado se visualizó la expresión de la proteína reportera fluorescente eYFP y pudimos observar neuronas marcadas dentro de los núcleos intralaminares, así como fibras positivas a eYFP en el estriado (figura 5A). El trazado retrógrado se realizó con la expresión de tdTomato inyectado en el estriado dorsal que permitió identificar neuronas marcadas en los núcleos Pf y CL después del transporte retrógrado del virus (figura 5B, derecha). Además, en algunos experimentos identificamos las neuronas de la vía tálamo-estriatal mediante doble marcado inyectando intracelularmente biocitina durante el registro electrofisiológico (figura 5B, derecha arriba).

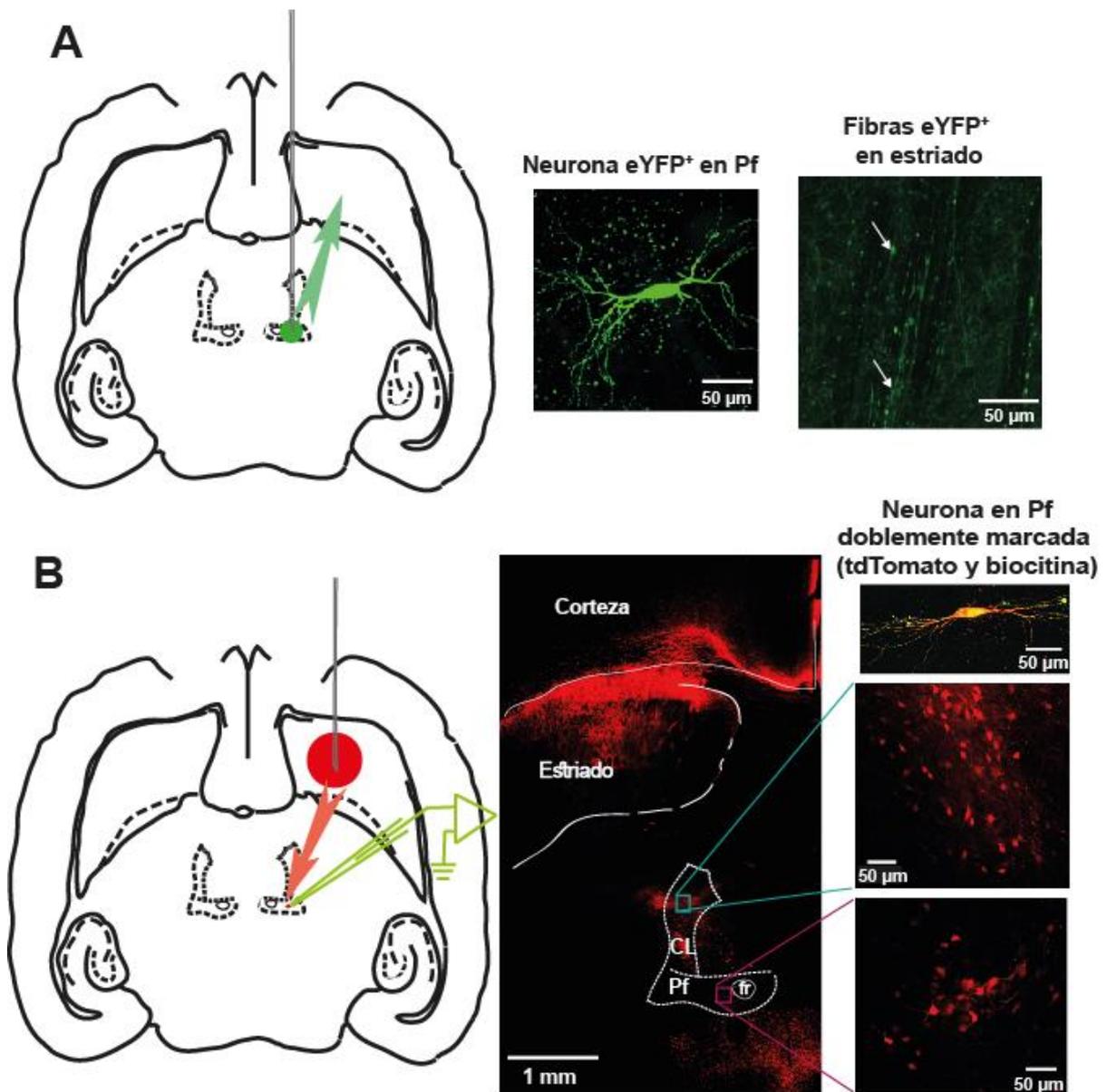


Figura 5. Trazado de la vía tálamo-estriatal.

Esquema en rebanada horizontal del procedimiento para el trazado anterógrado de la vía tálamo-estriatal (izquierda). Neurona eYFP⁺ localizada en el núcleo Pf, y fibras aferentes al estriado (derecha) **(A)**. Esquema del trazado retrógrado de la vía tálamo-estriatal (izquierda). Fotografía confocal de una rebanada horizontal (300 μ m) que muestra el transporte retrógrado y expresión de tdTomato en las neuronas de los núcleos Pf y CL (derecha). Neurona tdTomato⁺ y llenada con biocitina durante el registro electrofisiológico (derecha, arriba) **(B)**.

4.2 MORFOLOGÍA DE LAS NEURONAS DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL

Se marcaron intracelularmente 33 neuronas con biocitina para determinar la morfología del árbol dendrítico; 18 neuronas fueron registradas en el núcleo Pf y 15 en el núcleo CL. Se confirmaron

los dos tipos de morfologías previamente reportadas en los núcleos intralaminares (Phelan et al., 2005; Lacey et al. 2007; Beatty et al. 2009). Es decir, neuronas de tipo difuso caracterizadas por tener pocas ramificaciones dendríticas en forma bipolar (figura 6 B y E) y neuronas de tipo arbusto con múltiples ramificaciones dendríticas radiales al soma (figura 6 A, C y D).

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que el núcleo CL está constituido en su mayoría por neuronas de tipo arbusto (80%, n=12), mientras que, en el núcleo Pf se encuentran ambas morfologías en número equiparable.

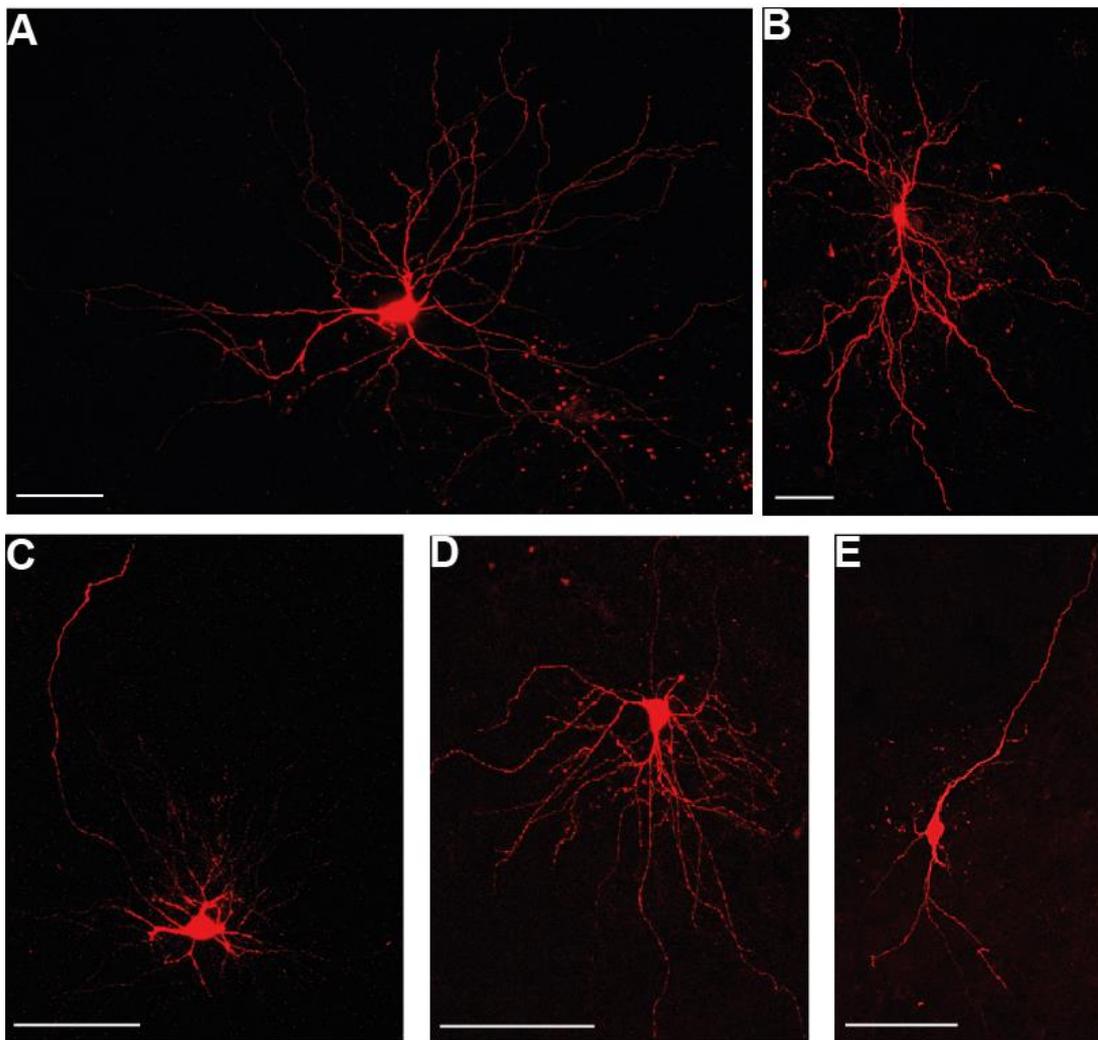


Figura 6. Morfología de las neuronas de los núcleos Pf y CL.

Neuronas marcadas intracelularmente con biocitina durante el registro electrofisiológico y localizadas en ambos núcleos intralaminares del tálamo. Neuronas de morfología dendrítica difusa (B y E) y con árbol dendrítico de tipo arbusto (A, C y D).

4.3 CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS DE LOS NÚCLEOS

Pf Y CL

4.3.1 ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE ACCIÓN

Se registró la actividad electrofisiológica de 229 neuronas tálamo-estriatales, de las cuales 116 se localizaron en el núcleo Pf y 113 en el núcleo CL. Las neuronas fueron categorizadas respecto a sus perfiles electrofisiológicos, que son claramente distintos en los ratones adultos utilizados en este trabajo. La principal diferencia es la forma del postpotencial hiperpolarizante (PPH) de los potenciales de acción obtenidos espontáneamente o evocados por estimulación somática (ver figura 7 A y B).

El PPH que tienen las neuronas de los núcleos Pf o CL puede ser simple, es decir, rápido (R) y de corta duración (registros en verde); o bien, estar constituido por dos componentes, uno rápido seguido por un componente lento (R+L), lo que genera que su duración sea significativamente mayor (registros en violeta). El PPH R+L tuvo una duración a la amplitud media de 209 ± 24.8 ms y cuya amplitud máxima fue de 10 ± 0.7 mV, estas neuronas fueron registradas tanto en el Pf (n=52) como en el CL (n=14) en rebanadas de cerebro de distintos ratones. La duración a la amplitud media del PPH R fue de 67 ± 7.7 ms con una amplitud máxima de 9.4 ± 0.5 mV; estas células fueron registradas también en ambos núcleos intralaminares (Pf=53; CL=88). El análisis estadístico demostró diferencia significativa en la duración a la amplitud media ($p < 0.0001$; prueba U Mann-Whitney; n PPH R+L=23; n PPH R=27; figura 7 E), sin embargo, la amplitud máxima no fue diferente. En cuanto la morfología, identificamos n=14 neuronas marcadas intracelularmente con biocitina de árbol dendrítico difuso y PPH R+L de las cuales n=13 se localizaban en el Pf y n=1 en el CL; además, n=19 neuronas tipo arbusto presentaron PPH R de las cuales n=8 se registraron dentro del CL y n=11 en el Pf (figura 7 A y B). El umbral de disparo no fue significativamente diferente: -42.7 ± 1.9 mV en las neuronas con PPH R+L y -43.3 ± 1.6 mV para las neuronas con PPH R. La amplitud de los potenciales de acción fue 47 ± 2.5 mV y 57 ± 2.5 mV en las neuronas con PPH R+L y con PPH R, respectivamente; el análisis estadístico demostró diferencia significativa en esta característica ($p = 0.02$; prueba U Mann-Whitney; n PPH R+L= 23, n PPH R= 27). La duración de los potenciales de acción a la amplitud media obtenida fue 1.82 ± 0.1 ms en las neuronas con PPH R+L y 1.77 ± 0.07 ms en las neuronas con PPH R resultando no significativamente distinta entre los dos tipos neuronales ($p = 0.1$; prueba U Mann-Whitney; n PPH R+L= 23, n PPH R= 27).

Además de los análisis estadísticos obtuvimos la comparación gráfica de las trayectorias de los potenciales de acción registrados en las neuronas de ambos núcleos intralaminares de interés (Pf y

CL) después de categorizarlas por los valores numéricos obtenidos en la duración del PPH (figura 7 F). El cambio del voltaje respecto al tiempo (dv/dt) en la despolarización del potencial de acción de las neuronas con PPH R+L fue 93 ± 6.14 mV/ms, mientras que para las neuronas con PPH R fue 64 ± 4.15 mV/ms; la dv/dt de repolarización fue -53.6 ± 4.12 mV/ms y -42.5 ± 4.46 mV/ms, respectivamente; el análisis estadístico mostró diferencia significativa en la despolarización ($p = 0.02$; prueba U Mann-Whitney; n PPH R+L= 23, n PPH R= 27) y la repolarización ($p < 0.0001$; prueba U Mann-Whitney; n PPH R+L= 23, n PPH R= 27).

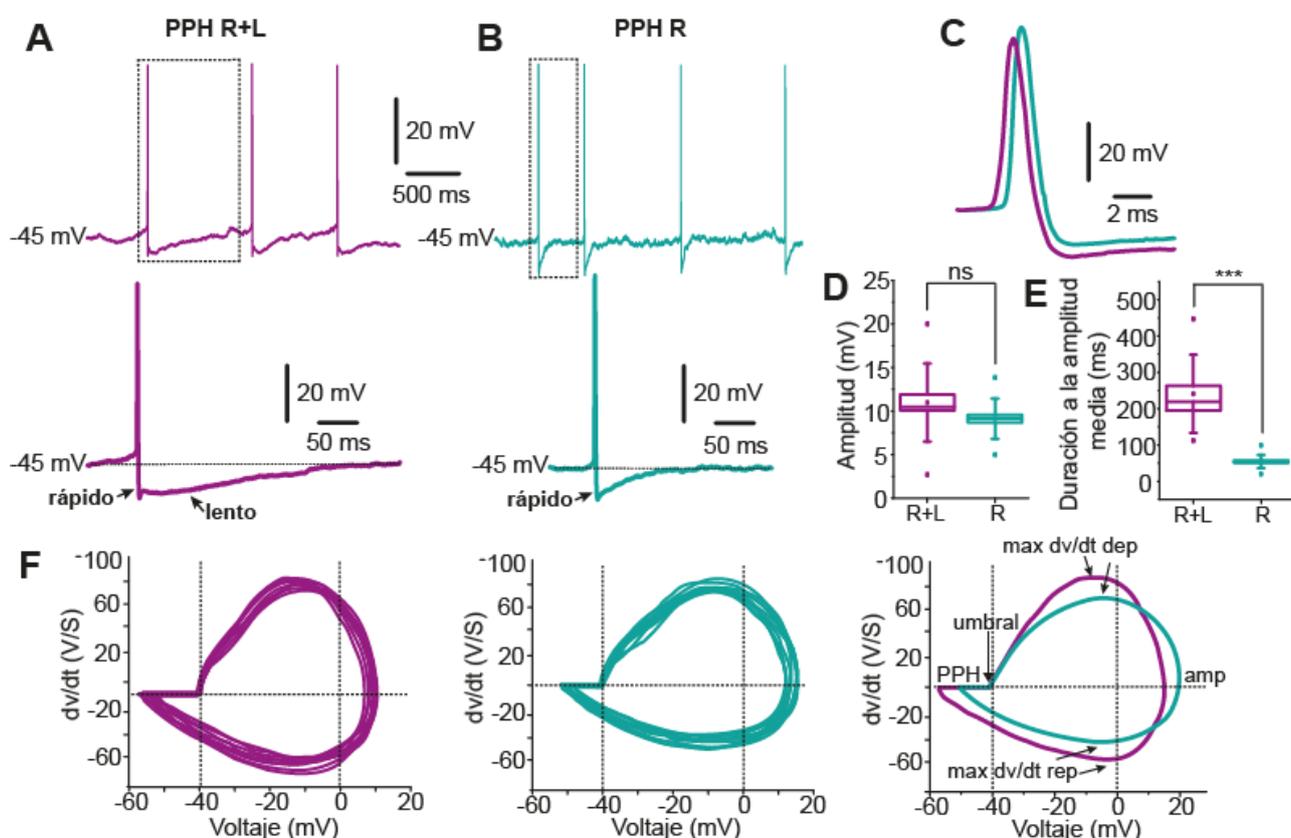


Figura 7. Potencial de acción y PPH en las neuronas del Pf y CL.

Disparo de una neurona de los núcleos intralaminares en potencial de membrana de -45 mV (arriba). Trazo representativo de la forma del PPH con dos componentes, rápido y lento (abajo) **(A)**. Potenciales de acción de una neurona a -45 mV de los núcleos intralaminares Pf y CL con PPH constituido solo por el componente rápido (arriba) y trazo de un potencial de acción representativo con esta forma de PPH (abajo) **(B)**. Sobreposición de los potenciales de acción de las dos formas de PPH **(C)**. Gráfica del análisis estadístico comparativo de la amplitud del PPH **(D)**. Análisis estadístico comparativo de la duración a la amplitud media del PPH **(E)**. Gráficas espacio-fase, promedio de dv/dt en función del V de varios potenciales de acción de neuronas con PPH R+L (izquierda). Promedio de dv/dt en función del V de diferentes potenciales de acción de neuronas con PPH R (centro). Sobreposición del promedio de los gráficos espacio-fase de ambos tipos de neuronas que demuestran diferencias en la dv/dt de despolarización y repolarización (derecha) **(F)**.

4.3.2 PATRONES DE DISPARO

Se obtuvieron registros del disparo neuronal en respuesta a un escalón de corriente despolarizante en neuronas de ambos núcleos intralaminares a diferentes potenciales de mantenimiento en la misma neurona registrada. A potenciales de membrana despolarizados (-50 mV y -60 mV) y potenciales hiperpolarizados (-70 mV y -80 mV). Como se muestra en la figura 8, a potenciales de membrana de -70 mV y -80 mV, tanto las neuronas que presentan PPH R+L como las neuronas con PPH R responden con disparos en forma de ráfaga (figura 8, últimos registros en cada columna). Mientras que, a potenciales de membrana de -60 mV y -50 mV ambos tipos neuronales tienen disparo de potenciales de acción en forma tónica (figura 8, primeros registros).

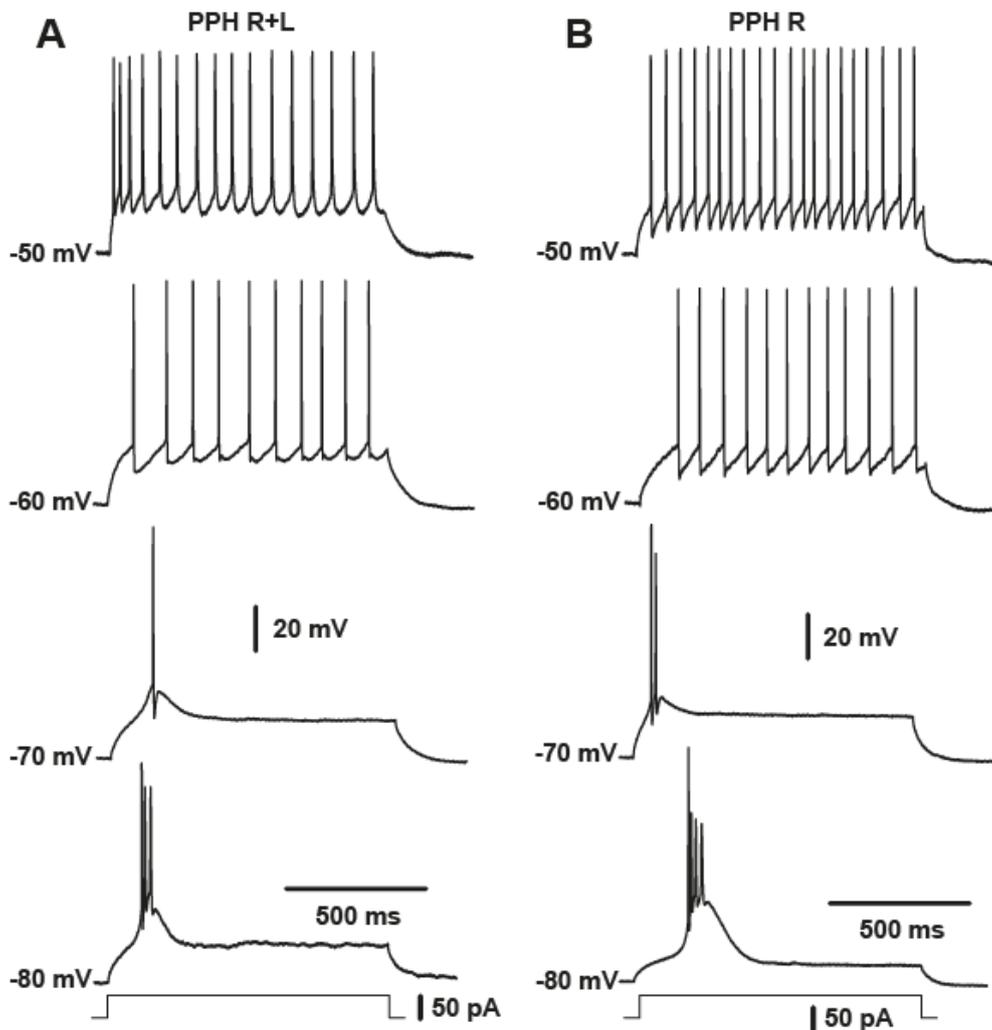


Figura 8. Patrones de disparo de las neuronas del Pf y CL a diferentes potenciales de mantenimiento.

Disparo de una neurona representativa de los núcleos intralaminares con PPH R+L en potencial de membrana hiperpolarizado (-80 y -70 mV) y despolarizado (-60 y -50 mV) **(A)** y de una neurona representativa con PPH R a los mismos potenciales de membrana **(B)**.

La mayoría de las neuronas registradas (85%), presentaron disparo en ráfaga y potenciales lentos de bajo umbral (LTS, low threshold spike en inglés) generados por los mismos canales y que se activan en potenciales de membrana hiperpolarizados (-75 mV) ante la estimulación somática con escalones despolarizantes de corriente, y como rebote ante escalones hiperpolarizantes. Tanto en las neuronas con PPH R+L como en las que expresaron PPH R fue abatido por el antagonista para los canales de calcio $Ca_v3.1$, TTA-P2 (1 μ M; figura 9). Sin embargo, n=36 neuronas con PPH R+L no expresaron LTS o disparo en ráfaga y el bloqueo de los canales de potasio con el antagonista 4-AP no reveló su expresión posiblemente enmascarada en estas neuronas (Figura 10).

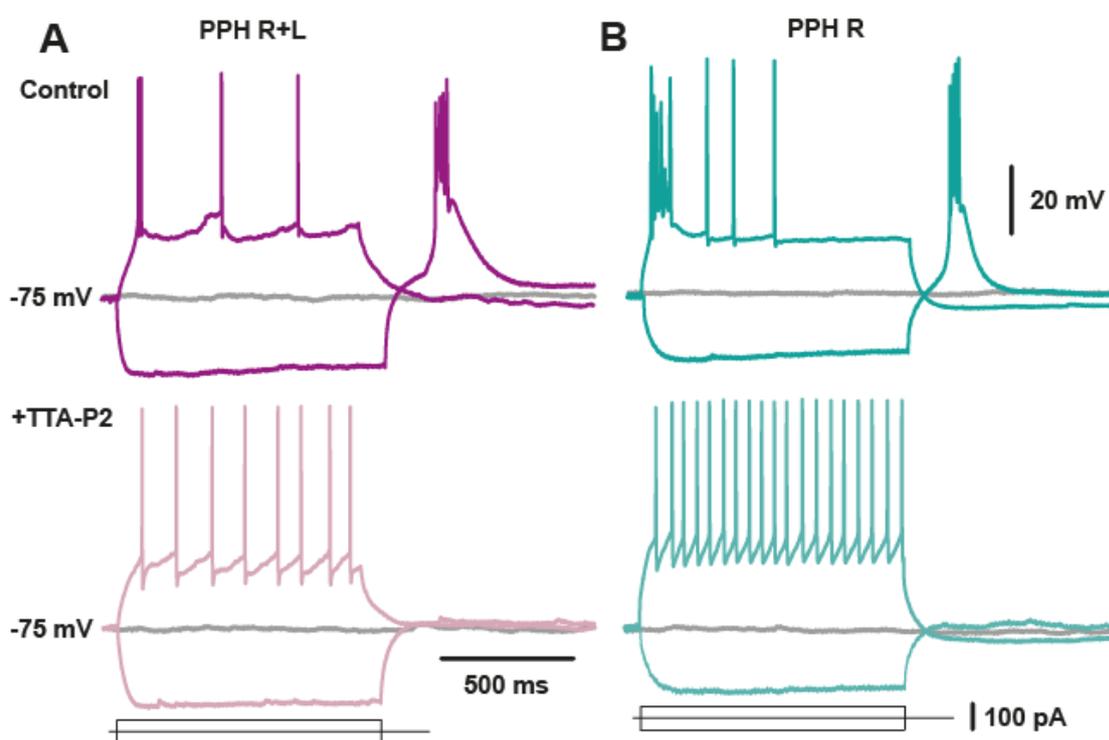


Figura 9. Bloqueo de los canales de calcio $Ca_v3.1$.

Trazos del disparo de una neurona representativa con PPH R+L en potencial de membrana hiperpolarizado (-75 mV) en condición control (arriba) y añadiendo el fármaco TTA-P2 [1 μ M] (abajo) (A). Potenciales de acción de una neurona representativa con PPH R a -75 mV generados por estimulación somática, en condición control (arriba) y bloqueando los canales para $Ca_v3.1$ (abajo) (B).

En la figura 10 A y B se muestran los trenes de potenciales de acción en forma tónica ante un escalón de corriente despolarizante, registrados en neuronas con PPH R+L que no expresaron LTS o disparo en ráfaga incluso ante escalones de corriente hiperpolarizantes en potencial de membrana de -75 mV. En C se muestra la actividad de la misma neurona en A y ante los mismos estímulos de corriente somáticos después de poner en el baño el antagonista de los canales de potasio 4-AP a una concentración 30 μ M. En D la misma neurona que en B después de poner el

antagonista 4-AP a una concentración de 120 μM . El efecto del antagonista de los canales de potasio no permitió la expresión de la corriente de calcio por los canales $\text{Ca}_v3.1$ que genera LTS o disparo en ráfaga, registrada en otras neuronas de los núcleos intralaminares Pf y CL; sólo modificó la duración de los potenciales de acción y potenció la actividad sináptica que reciben estas neuronas.

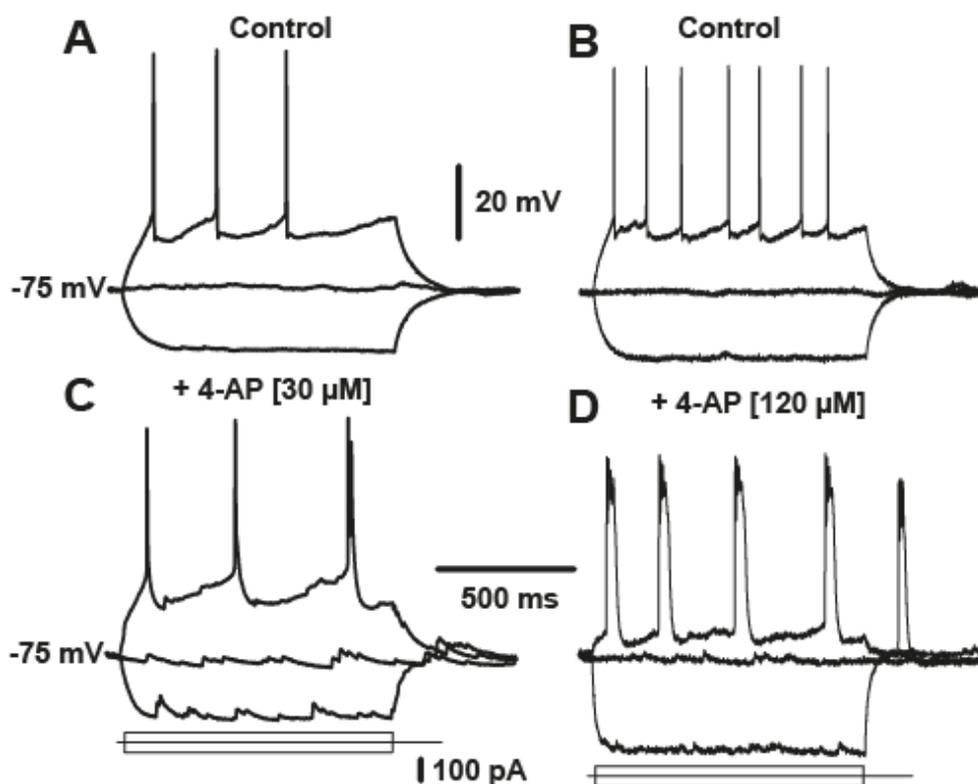


Figura 10. Disparo en neuronas con PPH R+L sin expresión de LTS o disparo en ráfaga. Potenciales de acción de neuronas con PPH R+L que no expresaron LTS o disparo en ráfaga (**A y B**). Trazos de la neurona en A y ante los mismos estímulos después del efecto del fármaco 4-AP [30 μM] (**C**). Disparo de la misma neurona en B ante los mismos estímulos posterior al efecto de 4-AP [120 μM] (**D**).

4.3.3 RELACIÓN CORRIENTE-VOLTAJE (I-V)

Se realizaron curvas de voltaje en función de la corriente inyectada en el soma con pasos despolarizantes e hiperpolarizantes alternados a dos potenciales de membrana diferentes: -75 mV y -55 mV con el objetivo de verificar si la resistencia de entrada de la membrana (R_N) es diferente entre las neuronas con PPH R+L y PPH R (Figura 11 A y B); además, determinar si la resistencia

se modifica a diferentes potenciales de mantenimiento (por la posible participación de diferente corrientes activadas).

Para las neuronas con PPH R+L, la R_N a -55 mV fue de 638 ± 40.4 M Ω y de 771 ± 87.4 M Ω a -75 mV; para las neuronas con PPH R, la R_N fue 356 ± 23.8 M Ω y 340 ± 25.1 M Ω a -55 mV y -75 mV, respectivamente. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las neuronas con PPH R+L y PPH R ($p < 0.0001$; prueba U Mann-Whitney; PPH R+L $n=37$; PPH R $n=20$), pero no fue significativamente diferente entre los dos potenciales de membrana en el mismo tipo de neuronas (figura 11 C).

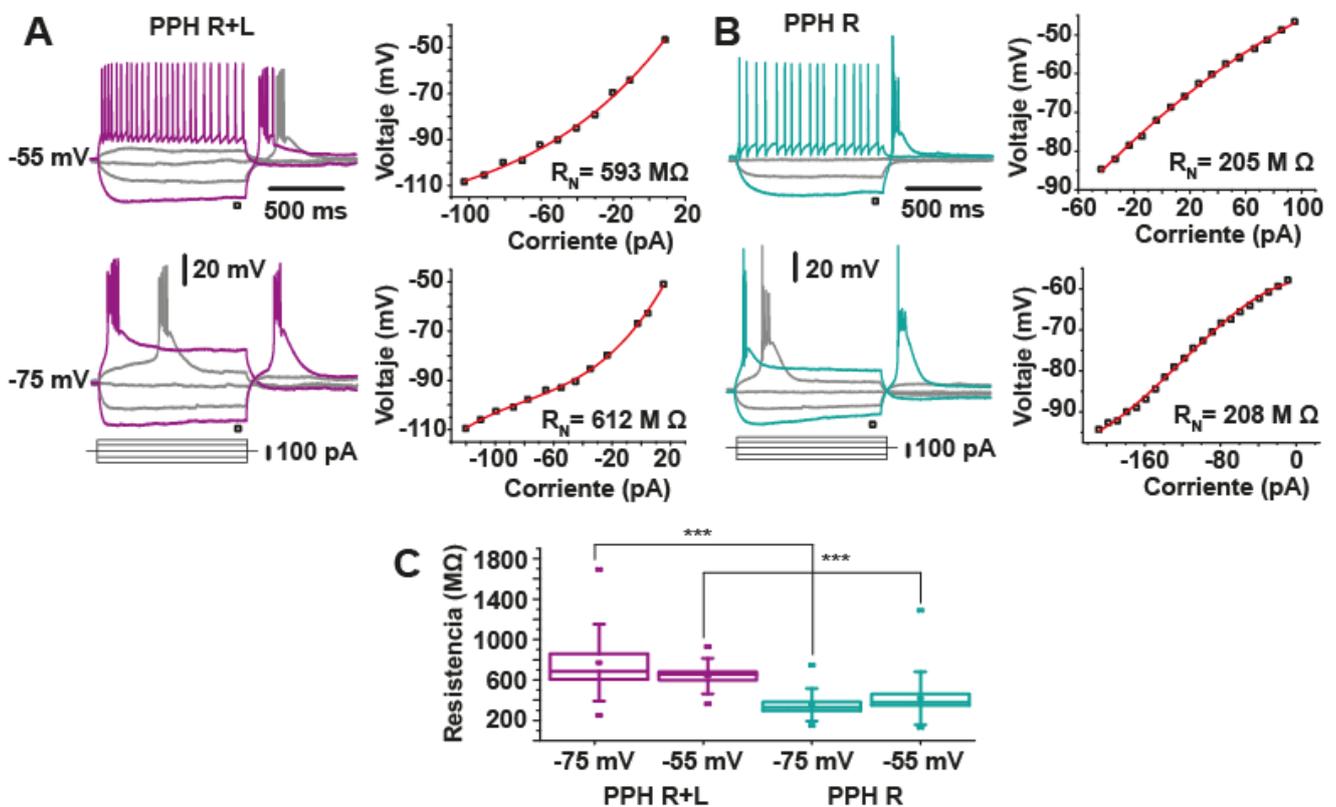


Figura 11. Resistencia de membrana a -75 mV y -55 mV.

Disparo ante estímulos somáticos despolarizantes e hiperpolarizantes en una neurona representativa con PPH R+L en potencial de membrana despolarizado y su respectiva curva I/V (arriba). Disparo de la misma neurona en potencial de membrana hiperpolarizado (abajo) (A). Trazos del disparo generado por estímulos somático crecientes de corriente en una neurona con PPH R a -55 mV; a la izquierda su curva I/V (arriba). Disparo de la misma neurona a -55 mV (abajo) (B). Comparación de la resistencia entre ambos tipos neuronales y respecto el potencial de membrana (C).

*** $p=0.0001$

Tanto las neuronas con PPH R+L como las neuronas con PPH R registradas en ambos núcleos intralaminares Pf y CL disparan potenciales de acción únicos (de forma tónica) cuando el potencial de membrana es -55 mV. Además, en ambos tipos neuronales observamos potenciales de acción

en forma de ráfaga o LTS, generados por la activación de canales $Ca_v3.1$ (ver figura 9) durante los registros a potencial de membrana de -75 mV en respuesta a los pasos de corriente despolarizantes (LTS “on”) y como rebote en respuesta a los pasos de corrientes hiperpolarizantes (LTS “off”) en los dos potenciales de membrana (figura 11 A y B).

La amplitud del LTS “on” fue 21 ± 2 mV y 21 ± 1.5 mV, en las neuronas con PPH R+L y PPH R respectivamente; con una duración a la amplitud media de 200 ± 29 ms y 148 ± 23 ms. En los LTS “off” las amplitudes fueron 29 ± 2.4 mV y 30 ± 2 mV, mientras que la duración a la amplitud media fue 163 ± 14.9 ms y 163 ± 15 ms, en las neuronas con PPH R+L y PPH R respectivamente. Esta característica entre las neuronas con PPH R+L y PPH R, resultó similar tanto en LTS “on” como en LTS “off” (figura 12).

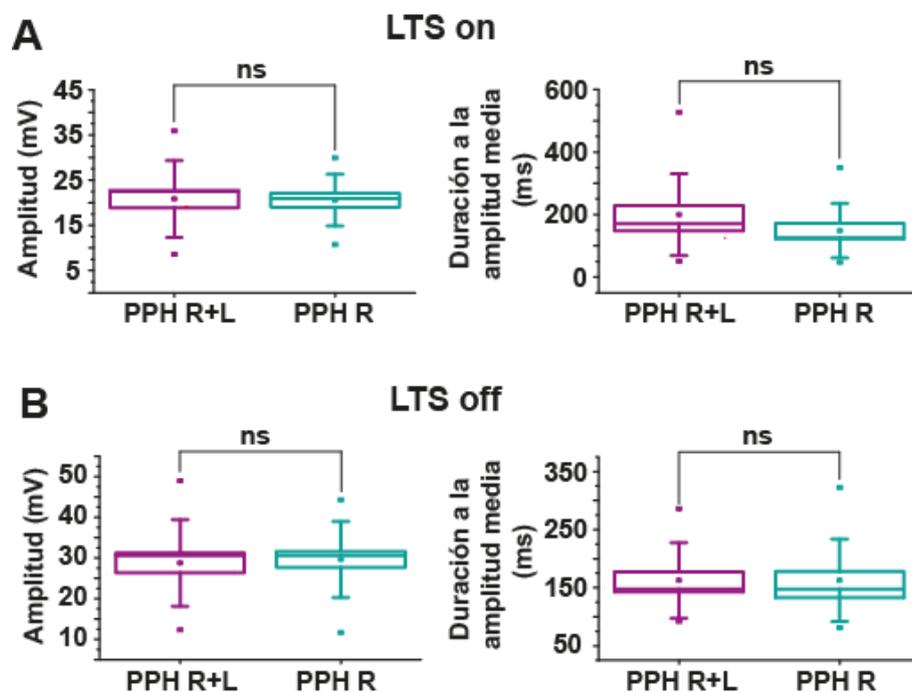


Figura 12. Características del potencial lento de bajo umbral (LTS).

Análisis comparativo entre neuronas con PPH R+L y PPH R de la amplitud máxima del LTS generado por la activación de los canales $Ca_v3.1$ provocada por estímulos somáticos despolarizantes (on; derecha) y duración a la amplitud media (izquierda) **(A)**. Gráficas del análisis comparativo entre neuronas con PPH R+L y PPH R de la amplitud máxima del LTS generado por la activación de los canales $Ca_v3.1$ como respuesta de rebote provocada por estímulos somáticos hiperpolarizantes (off; derecha) y duración a la amplitud media (izquierda) **(B)**. ns; sin diferencia significativa.

4.3.4 RELACIÓN CORRIENTE-FRECUENCIA DE DISPARO (I-F)

Nos preguntamos si las dos formas del PPH que presentan las neuronas tálamo-estriatales registradas en el Pf y CL tienen impacto en la generación repetitiva de potenciales de acción ante un estímulo de corriente de intensidad creciente (figura 13 A y B); para probarlo construimos gráficos de la relación intensidad de la corriente vs frecuencia de disparo de potenciales de acción (I/F). Registramos y medimos la frecuencia de disparo durante el total del pulso de corriente (1000 ms) en función al incremento de pasos de corriente despolarizantes (10-100 pA) a potencial de membrana de -60 mV (frecuencia media). La frecuencia inicial ($f=1/\text{primer intervalo inter-espigas}$) fue 57.4 ± 4.6 Hz en las neuronas con PPH R+L y 44.5 ± 2.3 Hz en las neuronas con PPH R; el análisis estadístico mostró diferencia significativa ($p = 0.02$; prueba U Mann-Whitney; n PPH R+L= 20, n PPH R= 36). La frecuencia final ($f=1/\text{último intervalo inter-espigas}$) fue 25.9 ± 1.3 Hz y 34.3 ± 1 Hz en las neuronas con PPH R+L y PPH R, respectivamente; resultando significativamente distintas ($p<0.0001$; prueba U Mann-Whitney; n PPH R+L= 20, n PPH R= 36). La frecuencia promedio medida en la duración total del estímulo fue de 22.6 ± 0.6 Hz y 34.8 ± 0.6 Hz, respectivamente ($p<0.0001$; figura 13 C).

En la figura 13 A y B se muestran los trenes de potenciales de acción generados por intensidades crecientes de corriente en potencial de membrana de -60 mV característicos de las neuronas con las dos formas de PPH; así como, las gráficas que muestran el comportamiento de las frecuencias inicial, media y final debido a los mismos escalones de corriente. En el panel C se muestra el análisis estadístico comparativo y las diferencias entre las neuronas con PPH R+L y PPH R de los valores obtenidos y escritos arriba para la frecuencia inicial, media y final representadas en gráficas.

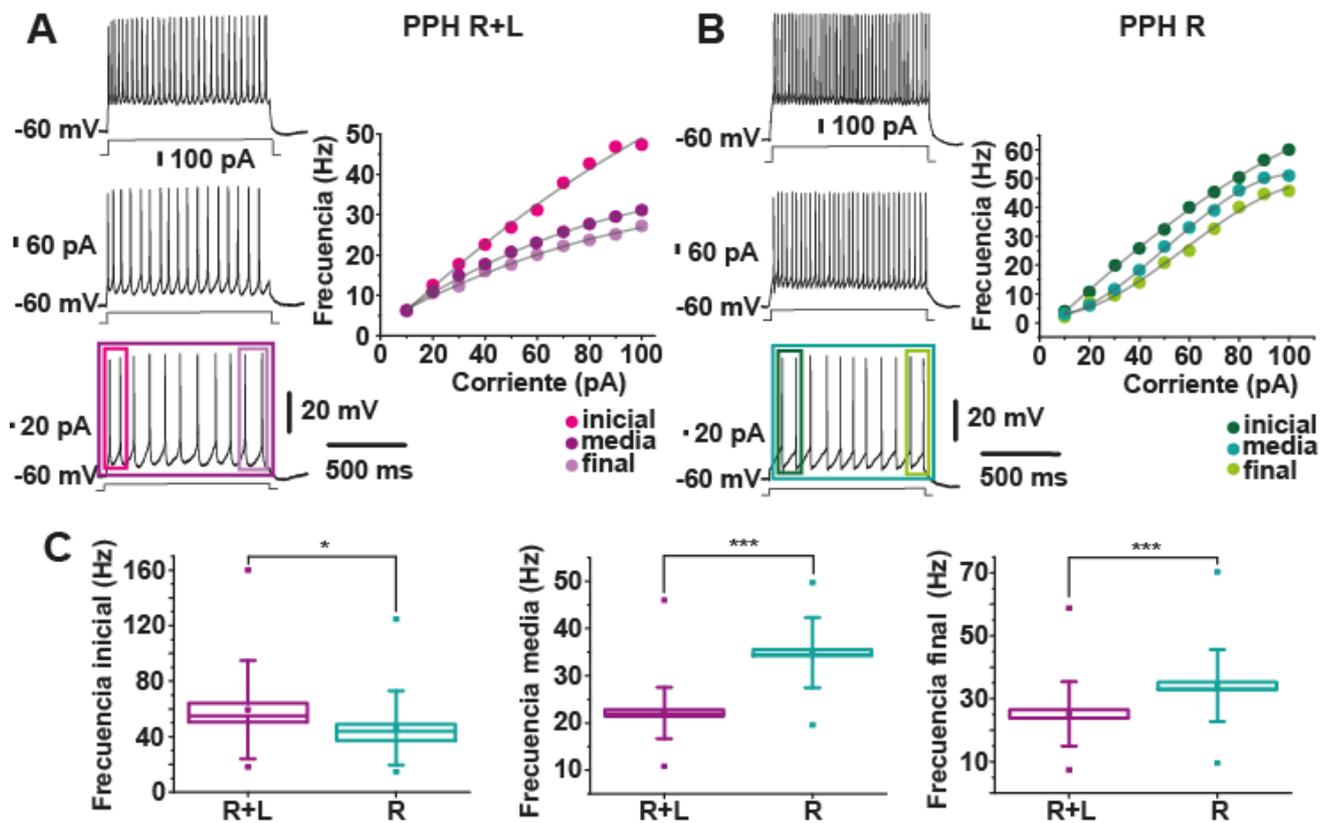


Figura 13. Frecuencia de disparo.

Trazos de los potenciales de acción generados por estímulos despolarizantes crecientes de corriente en una neurona representativa con PPH R+L (izquierda). Curvas I/F inicial, promedio y final (derecha) **(A)**. Trazos de los potenciales de acción generados por estímulos despolarizantes crecientes de corriente en una neurona representativa con PPH R (izquierda). Curvas I/F inicial, promedio y final (derecha) **(B)**. Gráficas del análisis estadístico comparativo de las frecuencias: inicial, media y final entre las neuronas con PPH R+L y con PPH R **(C)**.

*p=0.02; *** <0.0001

Las neuronas con PPH R+L tienen una frecuencia de disparo inicial más alta respecto las neuronas con PPH R; sin embargo, estas últimas mantienen altas frecuencias durante todo el estímulo lo que sugiere que las neuronas con PPH R+L tienen una respuesta más vigorosa que se adapta rápidamente, mientras que las neuronas con PPH R tienen una respuesta más sostenida (figura 14 A y C). Para corroborar lo anterior obtuvimos las curvas de adaptación de la frecuencia respecto del tiempo usando trenes largos de potenciales de acción evocados por un paso de corriente despolarizante a potencial de membrana de -60 mV. Los ajustes para los puntos de las curvas de adaptación demostraron que las neuronas con PPH R+L (n=7) tienen dos constantes de tiempo: una rápida ($\tau_f=36 \pm 6.3$ ms) y una lenta ($\tau_s=1439 \pm 275$ ms); las neuronas con PPH R (n=10) solo demostraron una constante de tiempo lenta ($\tau_s=1244 \pm 273$ ms; ver figura 14 B y D).

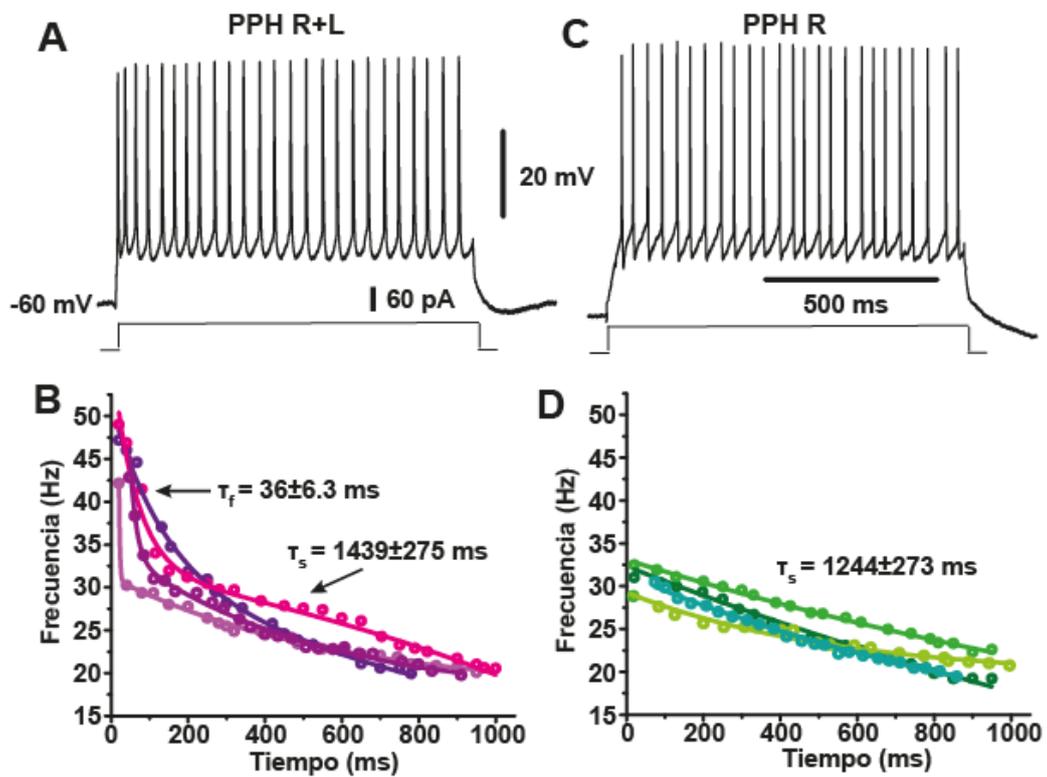


Figura 14. Curvas de adaptación de la frecuencia de disparo.

Trazo de las potenciales de acción generados por un estímulo despolarizante de 60 pA en una neurona con PPH R+L a -60 mV (A). Curvas de adaptación obtenidas en diferentes neuronas con PPH R+L (B). Disparo generado por un estímulo despolarizante de 60 pA en una neurona con PPH R a -60 mV (C). Curvas de adaptación obtenidas en diferentes neuronas con PPH R (D).

La tabla 1 resume los valores obtenidos de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas registradas en los núcleos intralaminares Pf y CL del tálamo. Se muestra el análisis estadístico comparativo de los dos tipos de neuronas en las que se clasificaron de acuerdo a la forma del PPH (PPH R+L y PPH R).

Tabla 1. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas registradas en los núcleos intralaminares del tálamo Pf y CL en ratones adultos silvestres C57BL/6J y de la cepa transgénica VGluT2-Cre.

Propiedades electrofisiológicas		PPH R+L (media ± S.E.M.)	PPH R (media ± S.E.M.)
Potencial de acción PPH R+L (n= 23) PPH R (n= 27)	umbral (mV)	-42.7 ± 1.9	-43.3 ± 1.6
	amplitud (mV)	47 ± 2.5	57±2.5 *
	duración a la amplitud media (ms)	1.82 ± 0.1	1.77±0.07
	dV/dt máxima depolarización (mV/ms)	93 ± 6.14	64 ± 4.15 ***
	dV/dt máxima repolarización (mV/ms)	-53.6 ± 4.12	-42.5 ± 4.46 *
PPH PPH R+L (n= 66) PPH R (n= 141)	amplitud (mV)	10±0.7	9.4±0.5
	duración a la amplitud media (ms)	209±24.8	67±7.7 ***
Frecuencia de disparo PPH R+L (n= 20) PPH R (n= 36)	inicial (Hz)	57.4 ± 4.6	44.5 ± 2.3 *
	media (Hz)	22.6 ± 0.6	34.8 ± 0.6 ***
	final (Hz)	25.9 ± 1.3	34.3± 1 ***
	constante de tiempo de adaptación rápida (ms)	36 ± 6.3	-----
	constante de tiempo de adaptación lenta (ms)	1339 ± 275	1244 ± 273
Resistencia (R_n) PPH R+L (n= 37) PPH R (n= 20)	en -75 mV (MΩ)	771 ± 87.4	340 ± 25.1 ***
	en -55 Mv (MΩ)	638 ± 40.4	356 ± 23.8 ***
LTS PPH R+L (n= 30) PPH R (n=125)	amplitud en "on" (mV)	21 ± 2	21 ± 1.5
	duración a la amplitud media en "on" (ms)	200 ± 29	148 ± 23
	amplitud en "off" (mV)	29 ± 2.4	30 ± 2
	duración a la amplitud media en "off" (ms)	163 ±14.9	163 ± 15

* P=0.02; *** P<0.0001

4.4 RESPUESTAS SINÁPTICAS EN LAS NEURONAS DE LOS NÚCLEOS Pf Y CL POR ESTIMULACIÓN ORTODRÓMICA DE CAMPO

Se realizaron registros en rebanadas horizontales de 300 µm de espesor de las respuestas sinápticas evocadas por estimulación de campo, a diferentes intensidades, por medio de un electrodo concéntrico de 25 o 50 µm de diámetro en neuronas de ambos núcleos intralaminares (figura 15 A). Registramos la respuesta subumbral y supraumbral de las neuronas del núcleo Pf al estimular el núcleo CL y viceversa (figura 15 B). Se midió la duración máxima, la duración a la amplitud media, la amplitud máxima y el área bajo la respuesta sináptica. La duración máxima de la respuesta registrada en las neuronas del Pf fue 342.3 ± 54.3 ms y en las neuronas del CL fue 284.9

± 16.7 ms; la duración a la amplitud media fue 149.5 ± 24.9 ms y 101.8 ± 6.4 ms, respectivamente; la amplitud máxima fue 31 ± 1.3 en las neuronas del Pf y 28.5 ± 1.4 mV en las neuronas del CL; el área bajo la respuesta sináptica fue 4269 ± 507.1 mV·ms y 3572 ± 281.7 mV·ms, respectivamente. El análisis estadístico demostró que las respuestas sinápticas evocadas en ambos núcleos son similares ($p=0.3$; prueba U Mann-Whitney; n Pf= 24, n CL= 29; figura 15 C). Además, nótese que entre las respuestas subumbrales (flechas) y las respuestas supraumbrales hay ausencia de potenciales sinápticos, pasando en forma repentina a las respuestas máximas (figura 15 B).

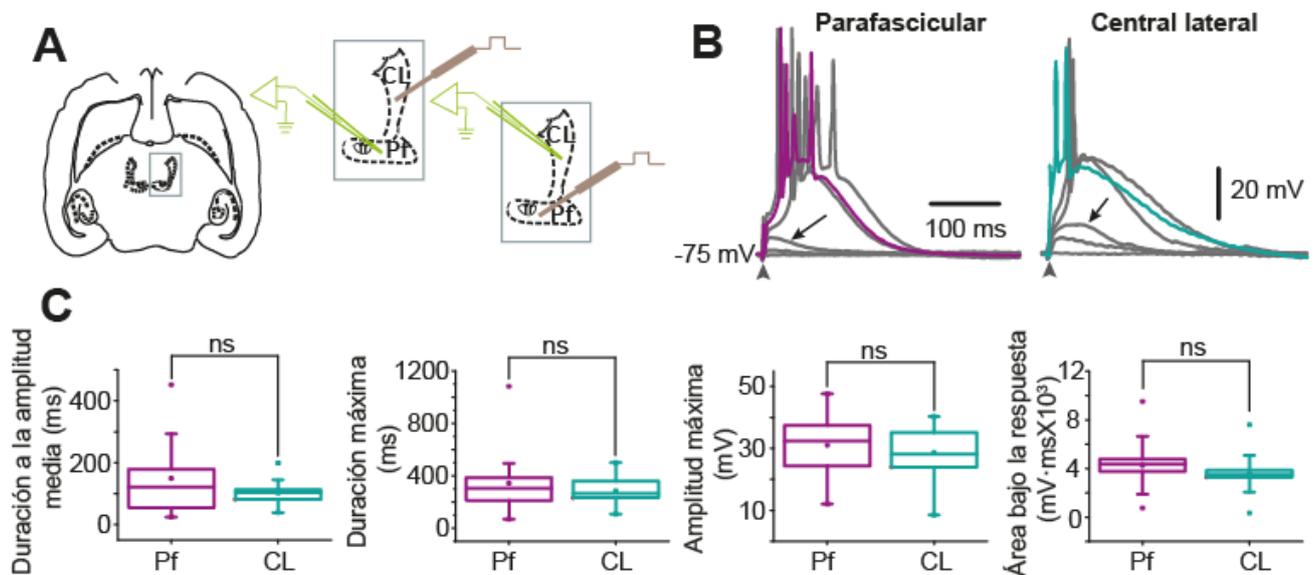


Figura 15. Respuesta sináptica excitatoria evocada eléctricamente.

Diagrama de rebanada horizontal a 90° de cerebro de ratón (izquierda); diagrama de los experimentos para obtener las respuestas sinápticas evocadas eléctricamente en neuronas del Pf y CL (derecha) (A). Trazos de las respuestas sinápticas subumbral (flecha) y supraumbral registradas a -75 mV en las neuronas de ambos núcleos intralaminares, estimulando eléctricamente el contrario (B). Graficas del análisis estadístico para los valores obtenidos en la medición de la duración a la amplitud media, duración máxima, amplitud máxima y área bajo la respuesta (C).

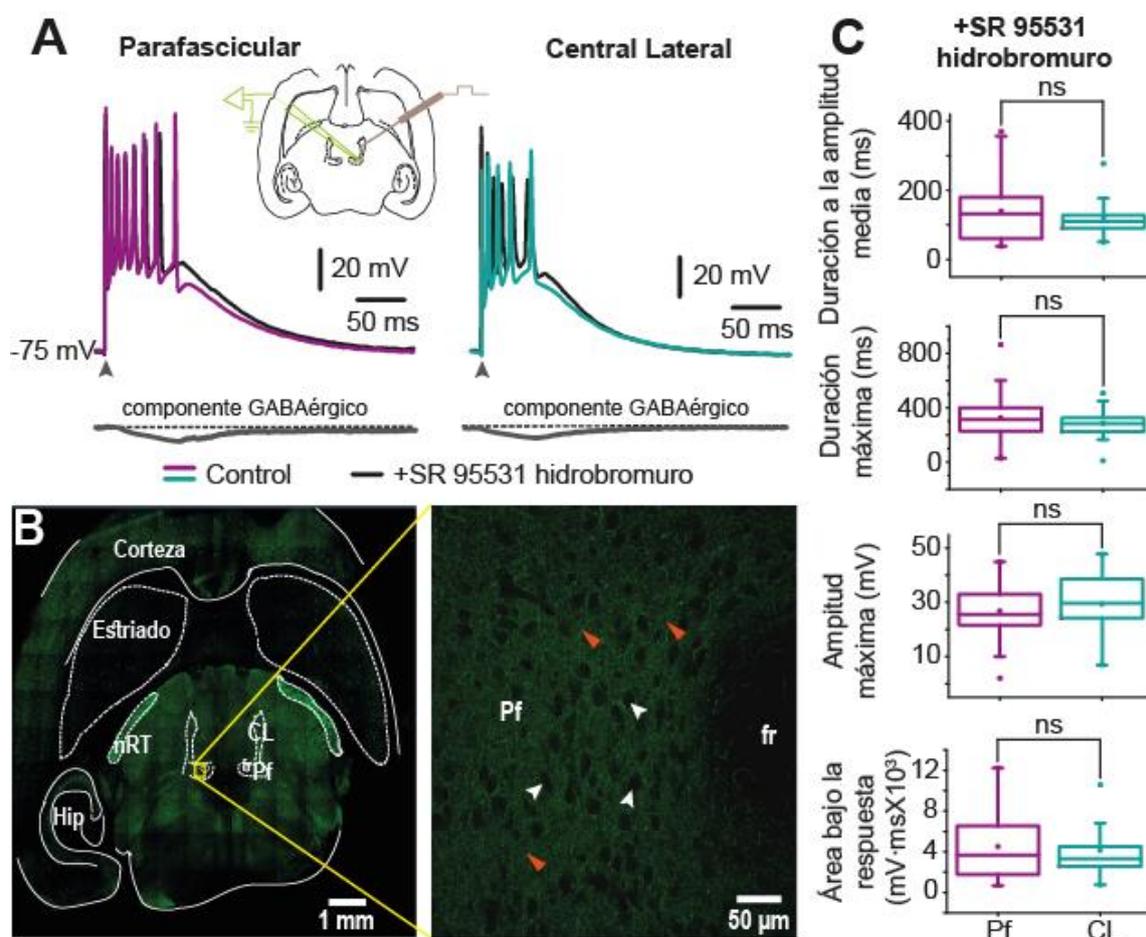
4.4.1 COMPONENTE INHIBITORIO DE LA RESPUESTA SINÁPTICA

El componente inhibitorio activado durante la respuesta sináptica registrada en las neuronas tálamo-estriatales, es de origen externo, debido a la ausencia de interneuronas GABAérgicas en estos núcleos, como puede observarse en la inmunocitoquímica contra parvalbúmina en la figura 16 B, (flechas blancas). Los núcleos Pf y CL reciben información de otras regiones del cerebro

mediante aferencias inhibitorias GABAérgicas, entre ellas las porciones externa e interna del GP y la SNr (Kinney et al., 1994; Krout et al., 2002; Giber et al., 2015).

El componente GABAérgico en ambos tipos de neuronas estudiadas es similar, y de alrededor del 10% en la respuesta; como se observa en la figura 16 A, donde se muestra la resta digital del área de las respuestas sinápticas en control (colores) vs en presencia del bloqueador de GABA SR 95531 hidrobromuro (negro).

La respuesta sináptica registrada debida a la activación de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos AMPA y NMDA en presencia del bloqueador de GABA fueron, en las neuronas del núcleo Pf: duración a la amplitud media, 140.2 ± 14.4 ms; duración máxima, 324.3 ± 26.9 ms; amplitud máxima, 26.8 ± 1.5 mV; y área bajo la respuesta, 4505 ± 474.2 mV·ms. Para las neuronas del núcleo CL los valores fueron: duración a la amplitud media, 122.3 ± 10.3 ms; duración máxima, 283.6 ± 18.1 ms; amplitud máxima, 29.2 ± 1.7 mV; y área bajo la respuesta, 4120 ± 482.7 mV·ms. Las respuestas sinápticas son semejantes en las neuronas del Pf y CL respecto al análisis estadístico comparativo ($p=0.3$; prueba U Mann-Whitney; n Pf= 35, n CL= 29; figura 16 A y C).



Pie de figura en la siguiente página.

Figura 16. Componente GABAérgico externo en la respuesta sináptica evocada eléctricamente. Sobre posición de trazos control y en presencia de +SR 95531 hidrobromuro en neurona representativa del Pf (izquierda) y neurona del CL (derecha). Abajo, resta digital del componente inhibitorio **(A)**. Fotografía confocal de la expresión inmunocitoquímica de la proteína parvalbúmina (PV) en rebanada horizontal y acercamiento de las fibras externas PV⁺ dentro del núcleo Pf, derecha (flechas rojas) y la ausencia de somas positivos (flechas blancas) **(B)**. Graficas del análisis estadístico comparativo de la duración a la amplitud media, la duración máxima, la amplitud máxima y el área bajo la respuesta sináptica entre la respuesta obtenida en las neuronas del Pf (violeta) y las neuronas del CL (verde) **(C)**. nRT, núcleo reticular talámico; Hip, hipocampo; fr, fascículo retroflexus; Pf, parafascicular; CL, central lateral.

4.4.2 COMPONENTE EXCITATORIO DE LA RESPUESTA SINÁPTICA

Debido a que la respuesta sináptica supraumbral registrada en las neuronas de ambos núcleos intralaminares mostró disparo en forma de ráfaga y a que, en la estimulación somática con pasos crecientes de corriente despolarizante e hiperpolarizante hallamos que esta forma de disparo es debida a la activación de los canales de calcio de bajo umbral de activación (Ca_v3.1 o tipo T), pusimos en el baño el antagonista TTA-P2 (1 μM) para estudiar si la respuesta sináptica tiene un componente intrínseco debido también a la activación de estos canales (figura 17 A y B). La duración a la amplitud media obtenida en las neuronas del núcleo Pf sin el componente intrínseco de calcio fue 74.7 ± 10.1 ms; en las neuronas del núcleo CL fue 66.2 ± 8.4 ms. La duración máxima en las neuronas del núcleo Pf fue 227.3 ± 20.9 ms y 187.6 ± 19.1 ms en las neuronas del núcleo CL. La amplitud máxima fue 19.2 ± 1.5 mV en las neuronas del núcleo Pf y 17.5 ± 1.8 mV en el núcleo CL. El área bajo la respuesta sináptica fue 1767 ± 251.9 mV·ms y 1361 ± 215.7 mV·ms, en el núcleo Pf y CL, respectivamente. El componente intrínseco por la activación de los canales para calcio tipo T es semejante en las respuestas obtenidas en las neuronas de ambos núcleos intralaminares ($p=0.3$; prueba U Mann-Whitney; n Pf= 17, n CL= 17; figura 17 E).

En la figura 17 se muestra la respuesta sináptica supraumbral evocada eléctricamente (puntas de flecha), seguida del tren de potenciales de acción por la estimulación somática con un pulso cuadrado despolarizante de corriente de 1000 ms de duración. Los paneles A y B muestran sobrepuestos los trazos de la respuesta control (colores) y después del bloqueo de los canales Ca_v3.1 (negro) con el antagonista TTA-P2 (1 μM) a potencial de membrana de -75 mV; nótese que los potenciales de acción en forma de ráfaga se abaten tanto en la respuesta ortodrómica como en la respuesta somática en las neuronas de ambos núcleos intralaminares. En C y D se muestra la sobreposición de trazos ante las mismas intensidades de estimulación ortodrómica y somática que en A y B posterior al bloqueo de los canales Ca_v3.1 (negro) y después de poner en el baño los antagonistas CNQX (10 μM) y APV (500 μM; gris) que bloquean los receptores glutamatérgicos

AMPA y NMDA, respectivamente. La respuesta por el pulso cuadrado de corriente somático no se modificó; sin embargo, la respuesta sináptica se abatió. En E se muestran los gráficos del análisis estadístico comparativo de la duración a la amplitud media, la duración máxima, la amplitud máxima y el área bajo la respuesta sináptica obtenidos posterior al bloqueo de los canales $Ca_v3.1$ que son iguales entre las neuronas del núcleo Pf y el núcleo CL.

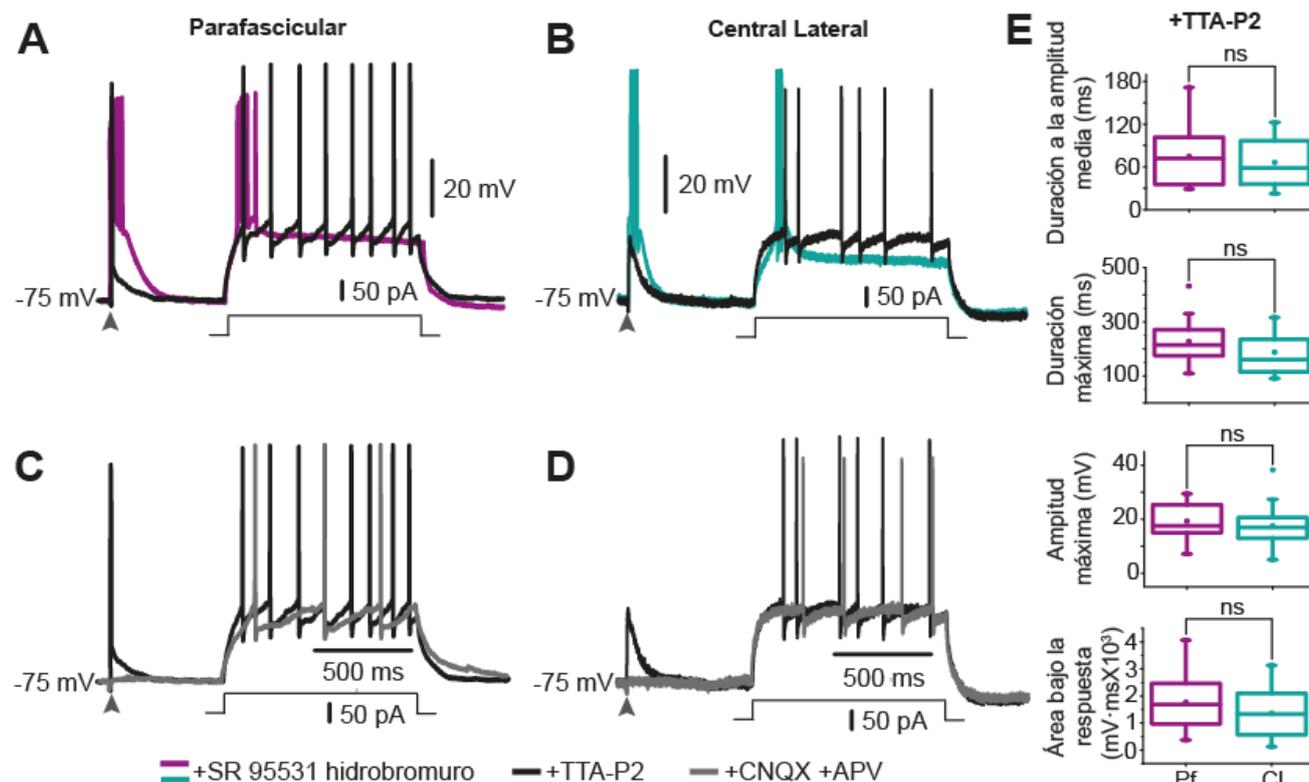


Figura 17. Componente intrínseco de calcio ($Ca_v3.1$) en la respuesta sináptica evocada eléctricamente. Sobrelape de trazos de la respuesta sináptica y ante estímulo somático en condición control (violeta) y +TTA-P2 (negro) en neurona representativa del Pf (A). Sobrelape de trazos de la respuesta sináptica y ante estímulo somático en condición control (verde) y +TTA-P2 (negro) en neurona representativa del CL (B). Sobrelape de trazos de la respuesta sináptica y ante estímulo somático sin el componente de calcio (+TTA-P2; negro) y +CNQX+APV (gris) en neurona representativa del Pf (C). Sobrelape de trazos de la respuesta sináptica y ante estímulo somático sin el componente de calcio (+TTA-P2; negro) y +CNQX+APV (gris) en neurona representativa del CL (D). Gráficas del análisis estadístico comparativo de la duración a la amplitud media, duración máxima, amplitud máxima y área bajo la respuesta sináptica entre las neuronas del Pf y CL, después de poner TTA-P2 en el baño (E).

Se sabe que las neuronas de los dos núcleos intralaminares son glutamatérgicas (Sugimoto y Hattori, 1983; Marini et al., 1996; Mendelbaum et al., 2019) por lo que; la respuesta excitatoria fue corroborada poniendo en el baño los fármacos CNQX (10 μ M) y APV (500 μ M), antagonistas de los receptores ionotrópicos AMPA y NMDA, respectivamente (figura 17 C y D; figura 18).

Con el objeto de estudiar el componente excitatorio de la respuesta sináptica, se bloqueó el componente inhibitorio con el antagonista SR 95531 hidrobromuro (10 μM).

Usamos los antagonistas ionotrópicos de los receptores a glutamato CNQX (10 μM) y APV (500 μM). En el 97% de las neuronas registradas en ambos núcleos intralaminares se abolió completamente la respuesta sináptica sin afectar el disparo ante estímulos somáticos (figura 17 C y D, trazos grises). Los valores obtenidos en la duración a la amplitud media fue 10.2 ± 5 ms y 6.2 ± 6.2 ms en las neuronas del núcleo Pf y el núcleo CL, respectivamente; la duración máxima fue 25.4 ± 11.7 ms en las neuronas del núcleo Pf y 14.7 ± 14.7 ms en las neuronas del núcleo CL; la amplitud máxima fue 6.4 ± 3.1 mV y 1.5 ± 1.5 mV, respectivamente y el área bajo la respuesta sináptica fue 321.6 ± 171.7 mV·ms en las neuronas del núcleo Pf y 174.5 ± 174.5 mV·ms en las neuronas del núcleo CL. El análisis comparativo entre las neuronas de ambos núcleos mostró semejanza en las respuestas ($p=0.3$; prueba U Mann-Whitney; n Pf= 17, n CL= 17).

En la figura 18 A y B se muestran los trazos de las respuestas sinápticas evocadas eléctricamente en condiciones control (colores), después del bloqueo de los canales $\text{Ca}_v3.1$ (TTA-P2, negro) y después del bloqueo de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA (CNQX+APV, gris) en las neuronas registradas en el núcleo Pf y CL, respectivamente. En las gráficas C-J se muestra el análisis estadístico del cambio en la duración a la amplitud media, la duración máxima, amplitud máxima y área bajo la respuesta sináptica por el efecto del antagonista SR 95531 hidrobromuro (10 μM) que bloquea el componente externo inhibitorio; el efecto del bloqueador de los canales $\text{Ca}_v3.1$ (TTA-P2, 1 μM), que abate el componente intrínseco de calcio y el bloqueo de los receptores glutamatérgicos con los antagonistas CNQX y APV (10 μM y 500 μM , respectivamente).

El análisis estadístico de la disección de los componentes que integran la respuesta sináptica evocada eléctricamente en las neuronas registradas tanto en el núcleo Pf como en el núcleo CL, no mostró diferencias significativas en los valores obtenidos en la duración a la amplitud media, la duración máxima, la amplitud máxima y el área bajo la respuesta sináptica comparando el control vs en presencia de bloqueador GABAérgico (figura 18, cajas de colores C, D, E, F, G, H, I y J). Pero hubo diferencias significativas en presencia de TTA-P2 y de los bloqueadores glutamatérgicos CNQX y APV (figura 18, cajas negras y grises C, D, E, F, G, H, I y J).

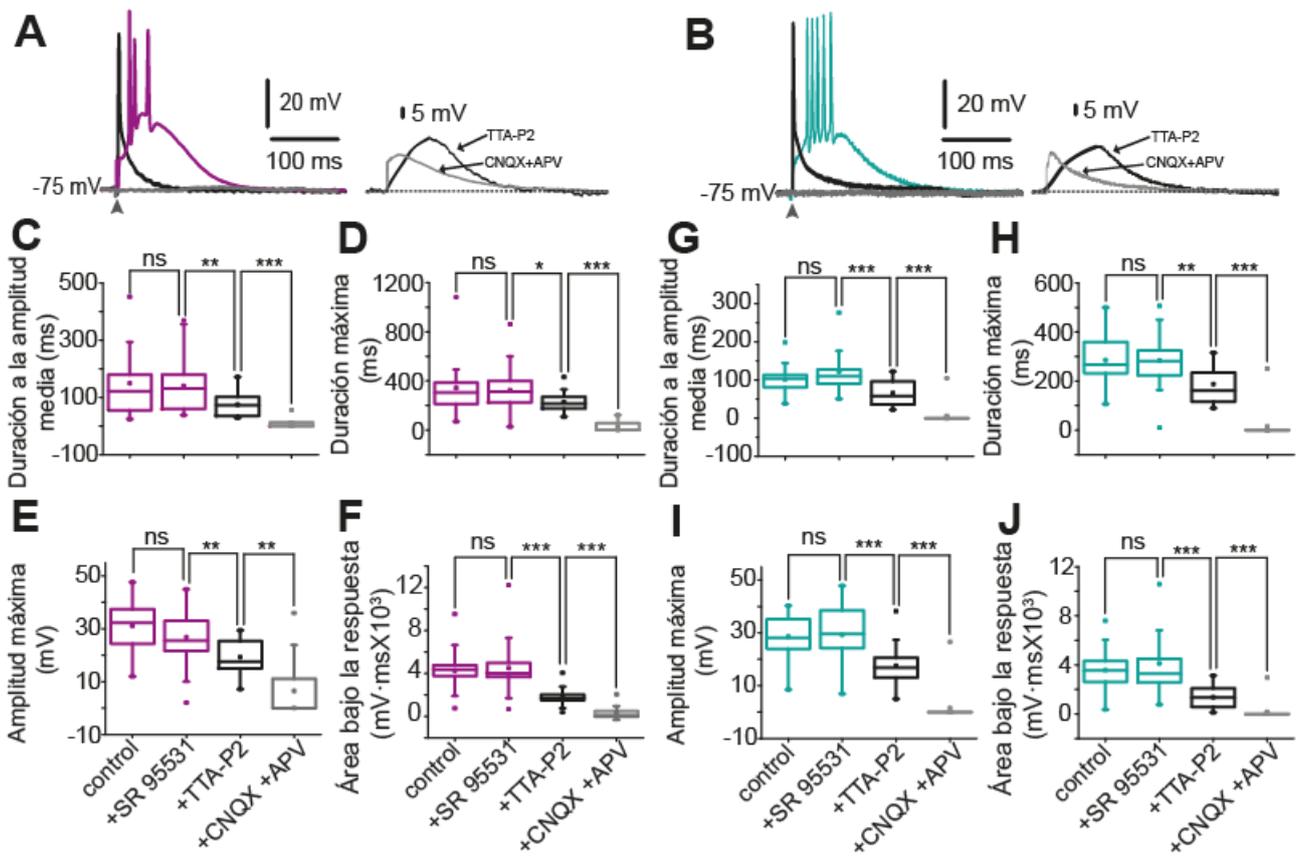


Figura 18. Disección de los componentes en la respuesta sináptica de las neuronas del Pf y CL evocada eléctricamente.

Trazos sobrepuestos de la respuesta sináptica en una neurona representativa del Pf sin componente GABAérgico (+SR 95531 hidrobromuro; violeta); aboliendo el componente intrínseco de calcio (+TTA-P2; negro) y +CNQX y +APV (gris). Restas digitales de los componentes, derecha (A). Trazos sobrepuestos de la respuesta sináptica en una neurona representativa del Pf sin componente GABAérgico (+SR 95531 hidrobromuro; verde); aboliendo el componente intrínseco de calcio (+TTA-P2; negro) y +CNQX y +APV (gris). Restas digitales de los componentes, derecha (B). Gráficas de los valores de la duración a la amplitud media; duración máxima; amplitud máxima y área bajo la respuesta, obtenidos en la disección de los componentes que conforman la respuesta sináptica en las neuronas del Pf (C-F). Gráficas de los valores de la duración a la amplitud media; duración máxima; amplitud máxima y área bajo la respuesta, obtenidos en la disección de los componentes que conforman la respuesta sináptica en las neuronas del CL (G-J).

4.4.3 RESPUESTA SINÁPTICA EVOCADA POR ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA

Finalmente, registramos la respuesta sináptica evocada mediante estimulación optogenética. Utilizando ratones de la cepa transgénica VGluT2-Cre y transfectando el virus adenoasociado en el núcleo CL y registrando neuronas en el núcleo Pf, y viceversa.

Encontramos que la respuesta por estimulación con luz es semejante a la obtenida por estimulación eléctrica (figuras 19 y 20).

La figura 19 muestra en A, el esquema del protocolo de registro y los trazos subumbrales y supraumbrales obtenidos a -75 mV, de la respuesta electrofisiológica evocada optogenéticamente en una neurona del núcleo Pf que expresó ChR2-eYFP en un ratón VGlut2-Cre. En B se muestran los trazos de las respuestas cuando se varió la duración del estímulo, con el objetivo de demostrar que las respuestas sinápticas que se registraron corresponden a la estimulación de fibras de neuronas ChR2-eYFP⁺. En C se muestran las fotografías confocales de la neurona registrada y marcada intracelularmente con biocitina durante el registro y que expresó ChR2-eYFP en su membrana celular.

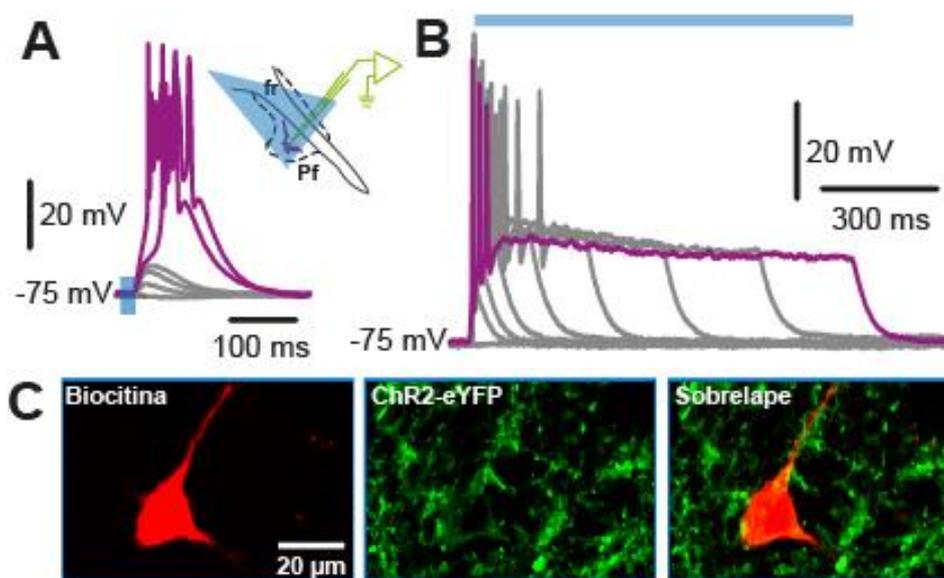


Figura 19. Fotoestimulación sináptica de neurona en el núcleo Pf que expresa ChR2-eYFP. Trazos de la respuesta sináptica evocada optogenéticamente en una neurona del Pf ChR2-eYFP⁺; esquema del protocolo experimental, derecha (A). Respuesta incrementando el tiempo de la fotoestimulación (B). Fotografías confocales de la neurona marcada intracelularmente con biocitina, izquierda; la misma neurona ChR2-eYFP⁺, centro; y el sobrelape del doble marcado, derecha (C).

En la figura 20 A1 se muestra la fotografía confocal de la localización de la transfección del virus adenoasociado ChR2-eYFP en el núcleo CL en una rebanada horizontal (90°) del cerebro de un ratón de la cepa transgénica VGlut2-Cre; en A2 se muestra un acercamiento de la expresión de la proteína fluorescente reportera eYFP dentro del núcleo CL para estimular optogenéticamente las posibles conexiones sinápticas con el núcleo Pf. En la figura 20 B se muestra el procedimiento experimental de registro para obtener las respuestas sinápticas mediante estimulación optogenética. En C se muestra la disección de los componentes que integran la respuesta sináptica obtenida en una neurona del núcleo CL al estimular optogenéticamente las fibras ChR2-eYFP⁺ del núcleo Pf; los registros se obtuvieron en potencial de membrana de -75 mV, el trazo verde es la

respuesta supraumbrales en condición control; el componente intrínseco de calcio se abatió usando el antagonista TTA-P2 (1 μ M, negro) y finalmente se utilizaron los antagonistas de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA (CNQX, 10 μ M y APV, 500 μ M; gris) para ocluir completamente la respuesta corroborando que las neuronas de estos núcleos intralaminares son glutamatérgicas y la respuesta sináptica registrada se debió a la activación optogenética de los canales de rodopsina II (ChR2) expresados en la membrana de las neuronas del núcleo Pf que se comunican con la neurona registrada en el núcleo CL. En la figura 20 D y E se muestran las respuestas sinápticas obtenidas en ambos núcleos intralaminares por la estimulación optogenética en ratones que expresaron ChR2-eYFP en el núcleo contrario al de registro. En F y G se muestra la sobreposición de las respuestas sinápticas supraumbrales representativas, obtenidas mediante estimulación optogenética (azul) y con estimulación eléctrica (gris) en el núcleo Pf y CL, respectivamente.

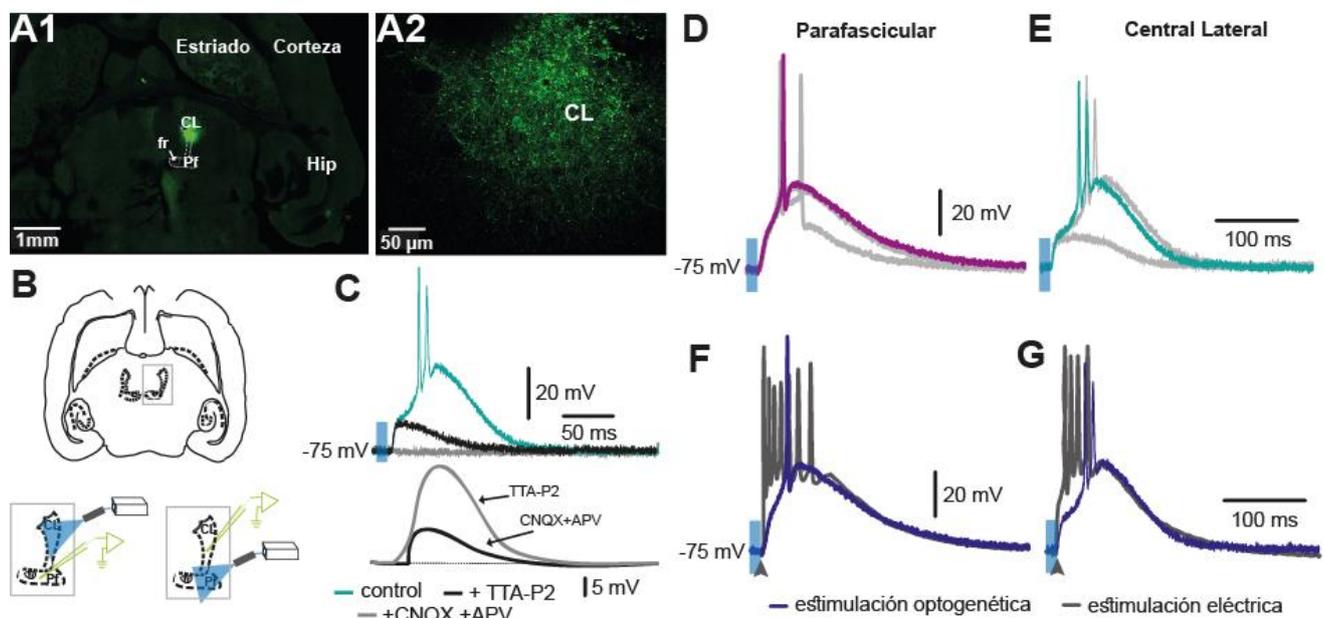


Figura 20. Respuesta sináptica evocada optogenéticamente.

Fotografía confocal de la expresión de ChR2-eYFP en rebana horizontal del cerebro de ratón VGLUT2-Cre trasfectado en el núcleo CL (A1). Fotografía confocal de la expresión de ChR2-eYFP en las neuronas del núcleo CL (A2). Esquema del diseño experimental para registrar la respuesta sináptica mediante estimulación con luz (B). Trazos de la disección de los componentes en la respuesta obtenida por estimulación optogenética y resta digital usando el antagonista de $Ca_v3.1$, TTA-P2 y CNQX+APV que abolen la respuesta glutamatérgica (C). Familia de trazos de la respuesta sináptica obtenida mediante estimulación optogenética en neurona representativa del Pf (D). Familia de trazos de la respuesta sináptica obtenida mediante estimulación optogenética en neurona representativa del CL (E). Sobrelape de trazos de la respuesta sináptica optogenética (azul) y con estimulación eléctrica (gris) en neurona del Pf (F). Sobrelape de trazos de la respuesta sináptica optogenética (azul) y con estimulación eléctrica (gris) en neurona del CL (G).

La tabla 2 resume los valores obtenidos de la duración media, duración máxima, amplitud máxima y el área bajo la respuesta sináptica en las neuronas registradas en ambos núcleos intralaminares debida a la estimulación eléctrica y optogenética del núcleo contrario al de registro; así como los valores y comparación estadística de la disección farmacológica de la corriente inhibitoria por la estimulación eléctrica de las fibras GABAérgicas externas a los núcleos intralaminares y la participación de la corriente intrínseca debida a la activación de los canales $Ca_v3.1$.

Tabla 2. Propiedades electrofisiológicas y disección de la participación de la corriente inhibitoria (+SR 95531) e intrínseca de calcio (+TTA-P2) de las respuestas sinápticas registradas en neuronas de los núcleos intralaminares del tálamo.

Parafascicular	+SR 95531			
	Control (n=24)	hidrobromuro (n=35)	+TTA-P2 (n=17)	+CNQX +APV (n=17)
Duración a la amplitud media (ms)	149.5 ± 24.9	140.2 ± 14.4	74.7 ± 10.1**	10.2 ± 5***
Máxima duración (ms)	342.3 ± 54.3	324.3 ± 26.9	227.3 ± 20.9*	25.4 ± 11.7***
Máxima amplitud (mV)	31 ± 1.3	26.8 ± 1.5	19.2 ± 1.5**	6.4 ± 3.1**
Área bajo la respuesta sináptica (mV·ms)	4269 ± 507.1	4505 ± 474.2	1767 ± 251.9***	321.6 ± 171.7***
Central Lateral	(n=28)	(n=29)	(n=17)	(n=17)
Duración a la amplitud media (ms)	101.8 ± 6.4	122.3 ± 10.3	66.2 ± 8.4***	6.2 ± 6.2***
Máxima duración (ms)	284.9 ± 16.7	283.6 ± 18.1	187.6 ± 19.1**	14.7 ± 14.7***
Máxima amplitud (mV)	28.5 ± 1.4	29.2 ± 1.7	17.5 ± 1.8***	1.5 ± 1.5***
Área bajo la respuesta sináptica (mV·ms)	3572 ± 281.7	4120 ± 482.7	1361 ± 215.7***	174.5 ± 174.5***

* p=0.013, ** p=0.002, *** p<0.0001

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Identificamos a las neuronas de la vía tálamo-estriatal mediante la transfección del virus adenoasociado tdTomato en el estriado y el virus ChR2-eYFP en los núcleos intralaminares para el trazado retrógrado y anterógrado respectivamente, lo cual nos permitió asegurar que los registros obtenidos pertenecen a neuronas de esta vía (ver Figura 5). La identificación de las neuronas registradas electrofisiológicamente se hizo por medio de marcado intracelular de biocitina durante el registro. Las morfologías del árbol dendrítico halladas en las neuronas que integran ambos núcleos intralaminares coinciden con las descritas previamente: neuronas tipo difusas y tipo arbusto (Phelan et al., 2005; Lacey et al. 2007; Beatty et al. 2009); sin embargo, las dos morfologías se observaron en ambos núcleos, aunque con evidente mayoría de tipo arbusto en el núcleo CL mientras que, en el núcleo Pf encontramos que ambas morfologías neuronales se registraron en la misma proporción (Figura 6).

Cada neurona expresa diferentes canales iónicos a lo largo de su membrana somato-dendrítica, que determinan sus propiedades intrínsecas de membrana. En este trabajo, identificamos dos perfiles electrofisiológicos en las neuronas que conforman los núcleos intralaminares del tálamo Pf y CL en ratones adultos (30-45 días postnatal) de la cepa transgénica VGluT2-Cre y silvestres (C57BL/6J). Las diferencias entre las neuronas tálamo-estriatales registradas fueron los componentes que forman el PPH del potencial de acción, la frecuencia de disparo y su adaptación, la R_N y la capacidad para tener LTS o disparo en ráfaga (ver tabla 1). Estas diferencias en las neuronas de los núcleos intralaminares estudiadas y su relación con los ganglios basales las hacen blancos probables para neuromodulación en la enfermedad de Parkinson y otros desordenes motores (Halliday, 2009; Sadikot and Rymar, 2009; Smith et al., 2009; Assous and Tepper, 2019; Tanimura et al., 2019).

La actividad electrofisiológica registrada en las neuronas del núcleo Pf es coincidente con lo reportado por Phelan y colaboradores en 2005 respecto a los componentes del PPH del potencial de acción durante el desarrollo (en neuronas de neonatos y jóvenes), sin embargo nosotros obtuvimos estas diferencias en neuronas de ratones adultos

El PPH de algunas neuronas registradas tanto en el núcleo Pf como del núcleo CL estuvo constituido solo por un componente rápido (PPH R), en otras neuronas se observó un PPH de dos componentes, uno rápido seguido de uno lento (PPH R+L; ver Figura 7). El PPH R+L se presentó en n=66 neuronas, de las cuales n=52 se localizaban en el núcleo Pf y n=14 en el CL; n=14 de estas neuronas identificadas con marcado intracelular con biocitina tuvieron morfología de tipo difusa de las cuales n=13 se registraron dentro del núcleo Pf y n=1 en el núcleo CL. Se obtuvieron

registros de $n=141$ neuronas con PPH R en ambos núcleos intralaminares, $n=53$ en el núcleo Pf y $n=88$ en el núcleo CL, de las cuales $n=19$ neuronas se identificaron con morfología del árbol dendrítico de tipo arbusto ($n=11$ en Pf y $n=8$ en CL). Esto nos permite concluir que las neuronas con PPH R+L son más probablemente de morfología difusa, mientras que las neuronas con PPH R son de morfología arbusto (Deschênes et al., 1996; Parent y Parent, 2005; Phelan et al, 2005; Lacey et al, 2007; Beatty et al, 2009; Hyde et al, 2013). Además, cerca de la mitad de las neuronas en el Pf tienen PPH R+L y la mitad PPH R. En contraste, la mayoría de las neuronas en el CL tienen PPH R. Dadas las propiedades intrínsecas de membrana asociadas con la expresión de la forma del PPH, estas dos clases de neuronas podrían tener funciones distintas y complementarias en el circuito tálamo-estriatal correlacionadas con las diferentes morfologías del árbol dendrítico y proyecciones axonales. Las diferencias en la forma del PPH implican la participación de distintas corrientes iónicas; entre las cuales pueden estar involucrados diferentes canales de calcio implicados en la activación de canales de potasio dependientes de calcio que generalmente participan en la generación del PPH (Pineda et al., 1999; Vilchis et al., 2000; Pérez-Garci et al., 2003).

También encontramos diferencias significativas en la generación de potenciales de acción durante el disparo espontáneo. Las neuronas con PPH R+L tienen potenciales de acción con menor amplitud, sin embargo, tienen tasas más rápidas de despolarización y repolarización, sugiriendo la participación de diferentes corrientes iónicas. Entonces, un análisis de los potenciales de acción generados espontáneamente y el PPH podría categorizar a las neuronas tálamo-estriatales en dos clases funcionales, en ratones adultos (Figura 7).

En múltiples neuronas del sistema nervioso central se ha relacionado la presencia de distintos componentes en el PPH con la frecuencia de disparo que pueden seguir y con la posibilidad de generar adaptación de la misma (ver Figuras 13 y 14).

Las neuronas con PPH R+L presentan adaptación en la frecuencia de disparo mostrando dos constantes de tiempo, una rápida y una lenta, esto se debe a que, responden vigorosamente al inicio del estímulo y posteriormente se adapta rápidamente disminuyendo su disparo, manteniéndolo a baja frecuencia. Estas neuronas también tienen una alta resistencia de entrada; lo que en conjunto hace que respondan rápidamente porque son neuronas fácilmente excitables que integran y codifican las distintas modalidades de información sensorial que reciben (Zhang et al., 2010; Ha et al., 2016). Por lo tanto, son apropiadas para activarse ante estímulos salientes inesperados (Matsumoto et al., 2001).

Las neuronas que tienen PPH R adaptan su frecuencia de disparo con una constante de tiempo lenta. Estas neuronas tienden a mantener la frecuencia durante la duración de todo el estímulo, por lo que tienen disparo espontáneo y su comportamiento puede ser modificado en presencia de un estímulo; similar a lo que sucede en las neuronas de la substantia nigra pars reticulata (Cáceres-Chávez et al., 2018), núcleo de salida de los ganglios basales y que interesantemente es una

aferente de los núcleos Pf y CL (Mengual et al., 1999; Sidibé et al., 2002). Además, estas neuronas también tienen una baja resistencia de entrada. Por ello, son más capaces de mantener la atención y el estado vigilante en un ambiente que cambia, otra función relacionada a la vía tálamo-estriatal (Matsumoto et al., 2001; Smith et al., 2011).

Lo anterior implica que, las neuronas tálamo-estriatales de los núcleos intralaminares pueden ser separadas en dos clases funcionales debido a sus propiedades intrínsecas, lo que concuerda con su papel dual en el proceso atencional (Minamoto y Kimura, 2002).

Ahora bien, las neuronas tálamo-corticales de relevo pueden generar potenciales de acción en dos modos distintos: disparo en ráfaga (Hernández-Cruz y Pape, 1989) y potenciales únicos de forma tónica. El disparo en ráfaga son las espigas sobre los potenciales lentos de bajo umbral (LTS), las cuales son generadas por canales de calcio Ca_v3 (Jahnsen y Llinás, 1984a; 1984b;). Sin embargo, la expresión de disparo en ráfaga o LTS en las neuronas tálamo-estriatales ha estado en discusión (Deschênes et al., 1995; Deschênes et al., 1996; Parent y Parent, 2005; Phelan et al., 2005; Lacey et al., 2007; Beatty et al., 2009; Kanyshkova et al., 2011). Aunque, se ha visto que los canales Ca_v3 median la actividad en forma de ráfaga en el tálamo (Hernández-Cruz y Pape, 1989). En este trabajo mostramos en ratones adultos, la presencia de espigas LTS en las neuronas tálamo-estriatales registradas en los núcleos Pf y CL que expresaron ambos tipos de PPH (ver Figuras 8 y 9). Sin embargo, el 11% de las neuronas con PPH R no tuvo LTS o disparo en ráfaga, esto es, la mayoría exhibió esta forma de disparo. Estas neuronas han sido descritas como más similares a las neuronas tálamo-corticales de relevo (Lacey et al., 2007; Beatty et al., 2009; Hyde et al., 2013). Sí como se planteó arriba, estas neuronas se encargan del estado de alerta, entonces, deberían ser más propensas a entrar en los ritmos de baja frecuencia que aparecen durante las ondas lentas de sueño. El 55% de las neuronas con PPH R+L no expresó LTS o disparo en ráfaga. Estas neuronas podrían ser por lo tanto más parecidas a las registradas en otras especies y las descritas en el Pf (Smith et al., 2011). El bloqueo de los canales de potasio con el antagonista 4-AP no reveló la expresión de LTS posiblemente enmascarada en estas neuronas (ver Figura 10).

Hay evidencia de que estas clases de neuronas influyen en distintas regiones del estriado con una distribución topográfica independiente y paralela de canales que llevan diferente información de regiones límbicas, asociativas y sensoriomotoras (Sadikot et al., 1990; Giménez-Amaya et al., 2000; Sadikot y Rymar, 2009). La lesión de los núcleos intralaminares es una causa de coma (Edlow et al., 2013). Además, se sabe que las neuronas tálamo-estriatales interrumpen una secuencia de acciones para adaptar el comportamiento ante cambios repentinos generando una secuencia de acciones diferente (Smith et al., 2011). Esto es esencial para la supervivencia y en cierta medida, estas interrupciones y los cambios de acción pueden ser rápidos y no afectar a la corteza, ya que los colículos superiores y la formación reticular tienen conexión directa con los núcleos intralaminares del tálamo (Isa et al., 2020).

Las neuronas de los núcleos intralaminares Pf y CL forman parte de complejos circuitos comunicándose con varias regiones cerebrales para el correcto comportamiento del individuo. Sin embargo, la conexión intratalámica que posiblemente existe entre las neuronas de los núcleos intralaminares ha sido poco estudiada. Los registros electrofisiológicos obtenidos de las respuestas sinápticas evocadas eléctricamente y optogenéticamente sugieren que las neuronas del núcleo Pf se comunican con las neuronas que conforman el núcleo CL y viceversa, aunque, se sabe que los axones de las neuronas de los núcleos intralaminares no emiten colaterales locales dentro de los núcleos vecinos (Lacey et al., 2007), y que las subregiones, medial, central y lateral del núcleo Pf no están localmente interconectadas, demostrando que está constituido por neuronas heterogéneas que están organizadas en circuitos independientes (Mendelbaum et al., 2019).

Las respuestas evocadas eléctricamente tuvieron un componente inhibitorio externo a los núcleos intralaminares (ver Figura 16). Las neuronas de estos núcleos son glutamatérgicas y reciben aferencias sinápticas GABAérgicas de la formación reticular pontina, el núcleo reticular talámico y los núcleos de salida de los ganglios basales (Kinney et al., 1994; Tsumori et al., 2002; Giber et al., 2015). Las respuesta registrada fueron excitatorias debidas a la activación de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA ya que fueron eliminadas por bloqueadores de estos receptores (ver Figuras 17 y 18; tabla 2) y también expresaron un componente intrínseco causado por la activación de canales de calcio $Ca_v3.1$ (Figuras 17 y 18; tabla 2) que es activado en potenciales de membrana de bajo umbral y genera espigas en forma de ráfaga (Jahnsen y Llinás, 1984a; 1984b; Hernández-Cruz y Pape, 1989; Chen et al., 2017). Durante la estimulación gradual de las respuestas sinápticas, los registros obtenidos al incrementar la intensidad y pasar de respuestas subumbrales a respuestas supraumbrales en condición control se observa un salto (ver Figura 15, flechas), lo cual puede ser explicado por la activación de canales de calcio tipo T localizados en las dendritas (Chen et al., 2017). Alternativamente, permite hipotetizar que, en estas respuestas está involucrada la participación de autoreceptores presinápticos de kainato que son activados por la liberación de glutamato, resultando en un incremento de la liberación de glutamato e incrementando la amplitud de la respuesta sináptica (Vignes y Collingridge, 1997; Braga et al., 2004; Smeal et al., 2008). Las respuestas sinápticas obtenidas con estímulo optogenético y eléctrico en las neuronas del núcleo Pf y el núcleo CL son semejantes en condición control y en los porcentajes de participación de las corrientes que las integran (ver Figuras 19 y 20).

Las neuronas que constituyen estos núcleos talámicos son importantes en la integración funcional de la vía tálamo-estriatal; la conexión sináptica entre las neuronas del núcleo Pf y CL quizás permite el correcto procesamiento tiempo-espacial de la información que reciben y lleva al comportamiento adecuado para la supervivencia del individuo.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- 1.- La morfología del árbol dendrítico de las neuronas registradas electrofisiológicamente coincide con la descrita previamente para los núcleos intralaminares del tálamo: tipo arbusto y tipo difusa; ambas morfologías se localizaron en el núcleo Pf y el núcleo CL.**
- 2.- El análisis de los potenciales de acción permitió determinar dos grupos de neuronas de acuerdo a los componentes que integran el postpotencial hiperpolarizante (PPH). Las neuronas que poseen un solo componente tienen un PPH rápido y de corta duración, en las que tienen dos componentes la duración es significativamente mayor.**
- 3.- La frecuencia de disparo inicial es significativamente mayor en las neuronas con dos componentes en el PPH, además estas neuronas presentan una evidente adaptación respecto a las neuronas cuyo PPH es solo rápido.**
- 4.- El 85% de las neuronas registradas a potenciales de mantenimiento hiperpolarizados presentaron potenciales de acción en forma de ráfaga debido a la activación de canales para calcio tipo T (Cav3.1) que se abate con el antagonista TTA-P2 y el 100% presentó disparo tónico a potenciales de mantenimiento despolarizados.**
- 5.- La resistencia de membrana es significativamente menor en las neuronas que tienen solo el postpotencial rápido y no varía significativamente respecto al potencial de mantenimiento de la neurona.**
- 6.- La mayoría de las neuronas del núcleo intralaminar CL tienen un solo componente en el PPH, tienen menor resistencia y su morfología es tipo arbusto. En el núcleo Pf se encuentran los dos tipos de neuronas mezcladas con uno o dos PPH, y ambas morfologías.**
- 7.- Las neuronas de los núcleos Pf y CL tálamo-estriatales, responden sinápticamente en respuesta a estimulación eléctrica de campo en el núcleo contrario al de registro.**
- 8.- La respuesta sináptica registrada en ambas neuronas mostró un pequeño componente GABAérgico (sensible a SR 95531 hidrobromuro o gabacina) proveniente de aferentes extrínsecas a los núcleos intralaminares registrados.**

9.- La respuesta sináptica obtenida con estimulación eléctrica de campo y optogenética tiene un componente glutamatérgico (NMDA y AMPA) y la participación de una corriente intrínseca por activación de canales para calcio tipo T (Cav3.1).

10.- Los componentes (GABAérgico, glutamatérgico y por activación de canales de calcio tipo T) de las respuestas sinápticas obtenidas en las neuronas del núcleo Pf y CL no son significativamente distintas.

11.- Las respuestas sinápticas registradas en las neuronas de ambos núcleos intralaminares, obtenidas mediante estímulo eléctrico u optogenético en el núcleo contrario al de registro, son semejantes.

12.- Se sugiere la existencia de comunicación sináptica entre ambos núcleos intralaminares de la vía tálamo-estriatal que no ha sido reportada previamente e implica importancia para la integración funcional de esta vía.

CAPÍTULO VII. IMPORTANCIA FUNCIONAL

Las neuronas de los núcleos Pf y CL procesan información auditiva, visual, gustativa, oral mecanosensorial y somatosensorial de su conexión con las regiones cerebrales que la reciben primero (Sadikot et al, 1990; Giménez-Amaya et al., 2000; Lai et al., 2000; Sadikot y Rymar, 2009; Iwai et al., 2015) y participan en el procesamiento de eventos sensoriales que llevan a la atención y el estado de alerta, particularmente en el contexto de eventos no predecible o eventos contrarios a las predicciones (Minamoto y Kimura, 2002; Kimura et al., 2004; Smith et al., 2011). El estriado es la región de los ganglios basales que a su vez, se entera de la información procesada por las neuronas de ambos núcleos intralaminares para ejecutar un circuito motor adecuado que permita la supervivencia del individuo (Lai et al., 2000; Kimura et al., 2004; Smith et al., 2011; Iwai et al., 2015; Isa et al. 2020).

La degeneración de las neuronas tálamo-estriatales en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson provoca cambios en la organización sináptica de este circuito (Villalba et al., 2019), por lo que los resultados experimentales obtenidos *in vitro* y presentados en este trabajo como evidencia de la posible comunicación sináptica entre las neuronas de los núcleos intralaminares Pf y CL, así como las características electrofisiológicas de las neuronas que conforman estos mismos núcleos talámicos son importantes para comprender mejor el funcionamiento de la vía tálamo-estriatal en condiciones sanas, pero que al mismo tiempo pueden contribuir al mejor entendimiento de lo que sucede en condiciones patológicas para plantear mejores tratamientos.

REFERENCIAS

- Arias-García M. A., Tapia D., Laville J. A., Calderón V. M., Ramiro-Cortés Y., Bargas J. and Galarraga E. (2018). Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Struct Funct.* 223(3): 1229-1253.
- Assous M, and Tepper J. M. (2019). Cortical and thalamic inputs exert cell type-specific feedforward inhibition on striatal GABAergic interneurons. *J Neuro Res.* 97(12):1491–1502.
- Beatty J. A., Sylwestrak E. L. and Cox C. L. (2009). Two distinct populations of projection neurons in the rat lateral parafascicular thalamic nucleus and their cholinergic responsiveness. *Neuroscience.* 162(1): 155–173.
- Bentivoglio M., Spreafico R., Minciacchi D. and Macchi G. (1991). GABAergic interneurons and neuropil of the intralaminar thalamus: an immunohistochemical study in the rat and the cat, with notes in the monkey. *Exp Brain Res.* 87(1):85-95.
- Berendse H. W. and Groenewegen H. J. (1990). Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J Comp Neurol.* 299(2): 187–228.
- Braga M. F. M., Aroniadou-Anderjaska V. and Li H. (2004). The physiological role of kainate receptors in the amygdala. *Mol Neurobiol.* 30(1):127–141.
- Cáceres-Chávez V. A., Hernández-Martínez R., Pérez-Ortega J., Herrera-Valdez M. A., Aceves J. J., Galarraga E. and Bargas J. (2018). Acute dopamine receptor blockade in substantia nigra pars reticulata: a possible model for drug-induced Parkinsonism. *J. Neurophysiol.* 120(6):2922–2938.
- Castle M., Aymerich M. S., Sanchez-Escobar C., Gonzalo N., Obeso J. A. and Lanciego J. L. (2005). Thalamic innervation of the direct and indirect basal ganglia pathways in the rat: Ipsi- and contralateral projections. *J Comp Neurol* 483(2):143–153.
- Chen E., Paré J. F., Wichmann T. and Smith Y. (2017). Sub-synaptic localization of Cav3.1 T-Type calcium channels in the thalamus of normal and parkinsonian monkeys. *Brain Struct Funct.* 222(2): 735–748.
- Deschênes M., Bourassa J., and Parent A. (1995). Two different types of thalamic fibers innervate the rat striatum. *Brain Research.* 701(1):288-292.
- Deschênes M., Bourassa J., and Parent A. (1996). Striatal and cortical projections of single neurons from the central lateral thalamic nucleus in the rat. *Neuroscience.* 72(3):679-687.
- Doig N. M., Moss J. and Bolam J. P. (2010). Cortical and Thalamic Innervation of Direct and Indirect Pathway Medium-Sized Spiny Neurons in Mouse Striatum. *J. Neurosci.* 30(44):14610-14618.
- Edlow B. L., Haynes R. L., Takahashi E., Klein J. P., Cummings P., Benner T., Greer D. M., Greenberg S. M., Wu O., Kinney H. C. and Folkerth R. D. (2013) Disconnection of the ascending arousal system in traumatic coma. *J Neuropathol Exp Neurol* 72(6):505–523.
- Engelborghs S., Mariën P., Martin J. J. and De Deyn P. P. (1998). Functional anatomy, vascularisation and pathology of the human thalamus. *Acta Neurol Belg.* 98(3):252-265.
- Fisher S. D. and Reynolds J. N. J. (2014). The intralaminar thalamus—an expressway linking visual stimuli to circuits determining agency and action selection. *Front. Behav. Neurosci.* 8(115):1-7.
- Giber K. et al. (2015). A subcortical inhibitory signal for behavioral arrest in the thalamus. *Nature neurosci.* 18(4):562-568.

- Giménez-Amaya J. M., McFarland N. R., de las Heras S. and Haber S. N. (1995). Organization of the thalamic projections to the ventral striatum in the primate. *J. Comp. Neurol.* 354(1):127-149.
- Giménez-Amaya J. M., de las Heras S., Errol E., Mengual E. and Lanciego J. L. (2000) Considerations on the thalamostriatal system with some functional implications. *Histol Histopathol* 15(1):1285–1292.
- Graybiel A. M., Aosaki T., Flaherty A. W. and Kimura M. (1994). The basal ganglia and adaptative motor control. *Science* 265 (5180):1826-1831.
- Groenewegen H. J. and Berendse H. W. (1994). The specificity of the nonspecific midline and intralaminar thalamic nuclei. *Neuroscience.* 17(2):52-57.
- Ha, G., Lee, J., Kwak, H. et al. (2016). The Ca²⁺-activated chloride channel anoctamin-2 mediates spike-frequency adaptation and regulates sensory transmission in thalamocortical neurons. *Nat. Commun.* 7(1):13791.
- Halliday G. M. (2009). Thalamic changes in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 15S3 (1):152–155.
- Hernández-Cruz A. and Pape H. C. (1989). Identification of two calcium currents in acutely dissociated neurons from the rat lateral geniculate nucleus. *J. Neurophysiol.* 61(6):1270-1283.
- Herrero M. T., Barcia C. and Navarro J. M. (2002). Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst.* 18(8):386-404.
- Hornykiewicz O. and Kish S. J. (1987). Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol.*, 45(1):19–34.
- Huerta-Ocampo I., Mena-Segovia J. and Bolam J. P. (2014). Convergence of cortical and thalamic input to direct and indirect pathway medium spiny neurons in the striatum. *Brain Struct Funct.* 219(5):1787–1800.
- Hyde J., Kezunovic N. Urbano F. J. and Garcia-Rill E. (2013). Visualization of fast calcium oscillations in the parafascicular nucleus. *Eur. J. Physiol.* 465(1):1327–1340.
- Ichinohe N., Iwatsuki H. and Shoumura K. (2001). Intra-striatal targets of projection fibers from the central lateral nucleus of the rat thalamus. *Neurosci Lett.* 302(2-3):105-108.
- Ide S., Kakeda S. and Korogi Y. (2015). Anatomy of the Thalamus. *Brain Nerve.* 67(12):1459-1469.
- Isa K., Sooksawate T., Kobayashi K., Kobayashi K., Redgrave P. and Isa T. (2020). Dissecting the tectal output channels for orienting and defense responses. *eNeuro.* 7 (5): ENEURO.0271-20.2020.
- Iwai H., Kuramoto E., Yamanaka A., Sonomura T., Uemura M. and Goto T. (2015). Ascending parabrachio-thalamo-striatal pathways: potential circuits for integration of gustatory and oral motor functions. *Neuroscience.* 294(1):1-13.
- Jahnsen H. and Llinas R. (1984a). Voltage-dependent burst-to-tonic switching of thalamic cell activity: an in vitro study. *Arch Italiens Biol.* 122(1):73-82.
- Jahnsen H. and Llinas R. (1984b). Ionic basis for the electroresponsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro. *J Physiol.* 349(1):227–247.
- Johansson Y. and Silberberg G. (2020). The functional organization of cortical and thalamic inputs onto five types of striatal neurons is determined by source and target cell identities. *Cell Report.* 30(4):1178-1194.

Jones E. G. *The Thalamus*. New York: Plenum Press; 1985.

Kanyshkova T., Broicher T., Meuth S. G., Pape H.-C. and Budde T. (2011). A-type K⁺ currents in intralaminar thalamocortical relay neurons. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 461(5):545–556.

Kato S. et al. (2018). Action selection and flexible switching controlled by the intralaminar thalamic neurons. *Cell*. 22(0):2370-2382

Kinney H. C., Korein J., Panigrahy A., Dikkes P. and Goode R. (1994). Neuropathological findings in the brain of Karen Ann Quinlan. The role of the thalamus in the persistent vegetative state. *N. Engl. J. Med.* 330(21):1469-1475.

Kimura M., Minamoto T., Matsumoto N. and Hori Y. (2004). Monitoring and switching of cortico-basal ganglia loop functions by the thalamo-striatal system. *Neurosci Res.* 48(4):355-360.

Kobayashi S. and Nakamura Y. (2003). Synaptic organization of the rat parafascicular nucleus, with special reference to its afferents from the superior colliculus and the pedunculo-pontine tegmental nucleus. *Brain Res.* 980(1):80-91.

Krout K. E. Belzer R. E. and Loewy A. D. (2002). Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurology.* 101(1):448-453.

Lacey C. J., Bolam J. P. and Magill P. J. (2007). Novel and distinct operational principles of intralaminar thalamic neurons and their striatal projections. *J. Neurosci.* 27(16):4374-4384.

Lai H., Tsumori T., Shiroyama T. Yokota S., Nakano K. and Yasui Y. (2000). Morphological evidence for a vestibulo-thalamo-striatal pathway via the parafascicular nucleus in the rat. *Brain Res.* 872(1-2):208-214.

Llinás R., Ribary U., Contreras D. and Pedroarena C. (1998). The neuronal basis for consciousness. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 353(1377):1841–1849.

Macchi G., Bentivoglio M., Molinari M. and Minciacchi D. (1984). The thalamo-caudate versus thalamo-cortical projections as studied in the cat with fluorescent retrograde double labeling. *Exp Brain Res* 54(2): 225–239.

Marini G., Pianca L. and Tredici G. (1996). Thalamocortical projection from the parafascicular nucleus to layer V pyramidal cells in frontal and cingulate areas of the rat. *Neurosci Lett.* 203 (2):81–84.

Matsumoto N., Minamimoto T., Graybiel A. M. and Kimura M. (2001). Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events. *J. Neurophysiol.* 85(2):960-976.

Mendelbaum et al. (2019). Distinct Cortical-Thalamic-Striatal Circuits through the Parafascicular Nucleus. *Neuron.* 102(3):636-652.

Mengual E., de las Heras S., Erro E., Lanciego J. L. and Giménez-Amaya J. M. (1999). Thalamic interaction between the input and output systems of the basal ganglia. 16(1):187-200.

Minamimoto T. and Kimura M. (2002). Participation of the thalamic CM-Pf complex in attentional orienting. *J Neurophysiol.* 87(6):3090–3101.

Neher E. and Sakmann B.(1992). The Patch Clamp Technique. *Sci Am.* 266(3):44-51.

Nelson A. B. and Kreitzer A. C. (2014). Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. *Annu Rev Neurosci.* 37(1):117-35.

- Paré D., Smith Y., Parent A. and Steriade M. (1988). Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei. *Neuroscience*. 25(1):69-86.
- Parent M. and Parent A. (2005). Single-axon tracing and three-dimensional reconstruction of centre-médian-parafascicular thalamic neurons in primates. *J. Comp. Neurology*. 481(1):127-144.
- Pérez-Garci E., Bargas J. and Galarraga E. (2003). The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *NeuroReport* 14(9):1253–1256.
- Phelan K.D., Mahler H. R., Deere T., Cross C. B. Good C. and García-Rill E. (2005). Postnatal maturational properties of rat parafascicular thalamic neurons recorded *in vitro*. *Thalamus Relat. Syst.* 3(2):89-113.
- Pineda J. C., Galarraga E. and Foehring R. C. (1999.) Different source of Ca²⁺ for the slow after-hyperpolarization (sAHP) generation in completely adapting and repetitive firing neocortical pyramidal neurons. *NeuroReport* 10(9):1951–1956.
- Ponvert N. D. and Jaramillo S. (2019). Auditory thalamostriatal and corticostriatal pathways convey complementary information about sound features. *J. Neurosci.* 39(2):271–280.
- Raju D. V., Shah D. J., Wright T. M., Hall R. A. and Smith Y. (2006). Differential Synaptology of vGluT2-containing thalamostriatal afferents between the patch and matrix compartments in rats. *J. Comp. Neurol.* 499(2):231–243.
- Rodriguez-Sabate C., Llanos C., Morales I., Garcia-Alvarez R., Sabate Magdalena and Rodriguez M. (2014). The Functional Connectivity of Intralaminar Thalamic Nuclei in the Human Basal Ganglia. *Hum Brain Mapp.* 36(4):1335-1347.
- Rudkin T. M. and Sadikot A. F. (1999). Thalamic input to parvalbumin immunoreactive gabaergic interneurons: organization in normal striatum and effect of neonatal decortication. *Neuroscience* 88(4):1165–1175.
- Saalman Y. B. (2014). Intralaminar and medial thalamic influence on cortical synchrony, information transmission and cognition. *Front. Syst. Neurosci.* 8(83):1-8.
- Sadikot A. F., Parent A. and Francois C. (1990) The centre median and parafascicular thalamic nuclei project respectively to the sensorimotor and associative-limbic striatal territories in the squirrel monkey. *Brain Res* 510(1):161–165.
- Sadikot A. F. and Rymar V. V. (2009). The primate centromedian–parafascicular complex: Anatomical organization with a note on neuromodulation. *Brain Res. Bull.* 78(1):122–130.
- Schiff N. D. (2008). Central thalamic contributions to arousal regulation and neurological disorders of consciousness. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1129(1):105–118.
- Sidibé M., Paré J. F. and Smith Y. (2002) Nigral and pallidal inputs to functionally segregated thalamostriatal neurons in the centromedian/parafascicular intralaminar nuclear complex in monkey. *J Comp Neurol.* 447(3):286–299.
- Smeal R. M., Keefe K. A. and Wilcox K. S. (2008). Differences in excitatory transmission between thalamic and cortical afferents to single spiny efferent neurons of rat dorsal striatum. *Eur. J. Neurosci.* 28(10):2041–2052.
- Smith Y., Raju D. V., Paré J. F. and Sidibé M. (2004). The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci.* 27(9):520–527.

- Smith Y., Raju D., Nanda B., Pare J. F., Galvan A. and Wichmann T. (2009). The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Res Bull.* 78(2-3):60–68.
- Smith Y., Surmeier D. J., Redgrave P. and Kimura M. (2011). Thalamic Contributions to Basal Ganglia-Related Behavioral Switching and Reinforcement. *J. Neurosci.* 31(45):16102-16106.
- Sugimoto T, Hattori T. (1983) .Confirmation of thalamosubthalamic projections by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.* 267(2):335–339.
- Tanimura A., Du Y., Kondapalli J., Wokosin D.L., Surmeier D.J. (2019).Cholinergic interneurons amplify thalamostriatal excitation of striatal indirect pathway neurons in Parkinson’s disease models. *Neuron* 101(3):444-458.e6.
- Tokoro K., Sato H., Yamamoto M. and Nagai Yoshiko (2015). Thalamus and Attention. *Bain Nerve.* 67(12):1471-1480.
- Tsumori T., Yokota S., Ono K. and Yasui Y. (2002). Synaptic organization of GABAergic projections from the substantia nigra pars reticulata and the reticular thalamic nucleus to the parafascicular thalamic nucleus in the rat. *Brain Res.* 957(2):231-241.
- Van der Werf Y. D., Witter M. P. and Groenewegen H. J. (2002). The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Research Reviews.* 39(1):107–140.
- Vignes M.and Collingridge G. L. (1997). The synaptic activation of kainate receptors. *Nature.* 388(6638):179-182.
- Vilchis C., Bargas J., Ayala G .X., Galván E. and Galarraga E. (2000). Ca^{2+} channels that activate Ca^{2+} -dependent K^{+} currents in neostriatal neurons. *Neuroscience.* 95(3):745–752.
- Villalba R. M., Pare J-F., Lee S., Lee S. and Smith Y. (2019). Thalamic degeneration in MPTP-treated Parkinsonian monkeys: impact upon glutamatergic innervation of striatal cholinergic interneurons. *Brain Struct Funct.* 224(9):3321-3338.
- Watson G. D. R., Hughes R. N., Petter E. A., Fallon I. P., Kim N., Ulloa Severino F. P. and Yin H. H. (2021). Thalamic projections to the subthalamic nucleus contribute to movement initiation and rescue of parkinsonian symptoms. *Sci Adv.* 7(6):eabe9192.
- Zhang L., Kolaj M. and Renaud L. P. (2010). Ca^{2+} -dependent and Na^{+} -dependent K^{+} conductances contribute to a slow AHP in thalamic paraventricular nucleus neurons: a novel target for orexin receptors. *J. Neurophysiol.* 104(4):2052-2062.
- Zhang H. et al. (2019). Altered local field potential relationship between the parafascicular thalamic nucleus and dorsal dtriatum in hemiparkinsonian rats. *Neurosci. Bull.* 35(2):315–324.
- Zheng X. et al. (2021). Morphological study of the cortical and thalamic glutamatergic synaptic inputs of striatal parvalbumin interneurons in rats. *Neurochem Res.*