



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**ESTUDIO DE LA PLASTICIDAD GABAÉRGICA ESTRIATAL EN UN MODELO
MURINO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctora en Ciencias Biomédicas

PRESENTA:

ELIZABETH NIETO MENDOZA ...

Directora de Tesis:

Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Ciudad Universitaria, CD. MX.

Abril 2017



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray por aceptarme en su laboratorio y compartir conmigo su tiempo y sus conocimientos. Así como por todo su apoyo, dedicación y paciencia.

A los miembros de mi comité tutorial: la Dra. Elvira Galarraga Palacio y al Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza por sus consejos y ayuda; especialmente a la Dra. Galarraga quien estuvo siempre al pendiente de mi formación, además de permitirme realizar experimentos de inmunohistoquímica en su laboratorio y facilitarnos la obtención de los ratones BAC D1-GFP de una producción que se encuentra en el IFC, UNAM y proviene del “Mutant Mouse Regional Resource Center U42OD010918” de la Universidad de Missouri.

Al Dr. Jorge Flores por su desinteresada contribución a mi preparación.

A mi amigo el Dr. James Horton por su ayuda en la traducción de algunos textos.

Al técnico académico Ernesto Mendoza Duarte por su apoyo en la realización de los experimentos y por brindarme su amistad.

A Dagoberto Tapia por capacitarme en la técnica de inmunohistoquímica.

A C. Ribera y Xochil Ayala por criar y reproducir a los a los ratones BAC D1-GFP que se encuentran en el IFC, UNAM.

Al CONACyT por otorgarme una beca para realizar mi doctorado, con número de registro 43008.

A DGAPA por otorgarme una beca del proyecto IN220811.

Y al COMECyT por la beca otorgada para la realización de la tesis.



DEDICATORIAS

A mis papas Jorge Nieto Lugo[†] y María del Refugio Mendoza Ramírez[†] por enseñarme a alcanzar mis sueños y por su inmenso amor que siempre me acompañara.

A mi hermana Gema Nieto Mendoza por ser mi amiga, mi cómplice y mi fuerza.

A mi esposo Gibrán Granados Paredes por ser mi compañero, amigo, el pilar y el amor de mi vida, siempre juntos.

A mis amigos Mundo, Rafa y Vic, por sus enseñanzas, apoyo y amistad.

A mi bebe Nadia Yaretzi por ser mi motivación diaria, mi vida es tuya bb.



RESUMEN

Con la administración de la toxina mitocondrial, el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), generamos daño en el núcleo estriado que imitó la histopatología de la enfermedad de Huntington (HD) y provocó diversos cambios en la transmisión y plasticidad en las sinapsis GABAérgicas del estriado, específicamente entre las interneuronas GABAérgicas estriatales y las neuronas espinosas medianas. Es así que en este trabajo demostramos que en condiciones normales y después de sometérselas a estimulación de alta frecuencia (100Hz) las sinapsis entre interneuronas GABAérgicas y neuronas espinosas medianas generan depresión a largo plazo (LTD) en el 50% de los registros obtenidos, cambiando a una potenciación a largo plazo (LTP) en el tejido estriatal proveniente de ratones en los que se indujo daño con el 3-NP.

Así mismo estudiamos el papel de la dopamina (DA) en la modulación tanto de las sinapsis GABAérgicas como de la plasticidad GABAérgica estriatal. Demostrando que la activación de los receptores a DA participa en la generación de plasticidad sináptica GABAérgica estriatal, como en las modificaciones que sufre esta plasticidad por la activación de los diferentes receptores a DA. Finalmente señalamos la importancia de los niveles de DA, pues cambios en su concentración, modifican la plasticidad obtenida; de tal forma que bajas concentraciones de DA generan la LTD mientras que a altas concentraciones favorecen la inducción de LTP, similar a la observada en nuestro modelo farmacológico de la HD.



ABSTRACT

The intraperitoneal injection of mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid (3-NP), produced damage in the striatum that mimics the histopathology of Huntington's disease (HD) and generated diverse changes in the transmission and plasticity of the GABAergic synapses in the striatum, specifically between striatal GABAergic interneurons and medium spiny neurons. Thus, in this work we show that under normal conditions and after an high frequency stimulation (100Hz) the synapses between GABAergic interneurons and medium spiny neurons generate a long-term depression (LTD) in 50% of the records obtained, changing to a long-term potentiation (LTP) in striatal tissue from mice damaged with 3-NP.

Additionally, we studied the role of dopamine (DA) in the modulation of GABAergic synapses and in the striatal GABAergic plasticity. Evinced that activation of DA receptors are involved in the generating striatal GABAergic synaptic plasticity and in the changes that this plasticity experienced by the activation of different DA receptors. And we observed the importance of DA levels, as changes in concentration modified the plasticity obtained; such that low concentrations of DA generate LTD while at high concentrations favor the induction of LTP, similar to those observed in our pharmacological model of HD.



ÍNDICE

TÍTULO	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	x
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1. Ganglios Basales	2
1.2. Estriado	4
1.3. Neuronas Espinosas Medianas (NEM)	4
1.4. Interneuronas	6
1.5. Receptores GABA	7
1.6. Plasticidad sináptica	7
1.7. Plasticidad en el estriado	8
1.8. Dopamina y su papel en el estriado	9
1.9. Enfermedad de Huntington	11
1.10. El 3-NP como modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington	12
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	15
5. METODOLOGÍA	16
5.1. Registros electrofisiológicos	16
5.1.1. Registro de célula completa (“whole cell”)	17
5.1.1.1. “Gap Free”	19
5.2. Inmunohistoquímica	20
5.3. Ratones BAC D1-GFP	20



6. RESULTADOS	21
6.1. Análisis de las corrientes inducidas por GABA en ratones control	21
6.1.1. Caracterización	21
6.1.1.1. Inmunohistoquímicas	21
6.1.1.2. Inhibición con Bicuculina	22
6.1.1.3. Potencial de inversión de cloro	23
6.1.2. Modulación dopaminérgica	24
6.1.2.1. Receptores a dopamina tipo D1	24
6.1.2.2. Receptores a dopamina tipo D2	26
6.1.2.3. Dopamina (200nM y 20µM)	30
6.1.3. Plasticidad sináptica	33
6.1.3.1. Registros control	33
6.1.3.2. Papel de los receptores a dopamina tipo D1	33
6.1.3.3. Papel de los receptores a dopamina tipo D2	36
6.1.3.4. Papel de la Dopamina (200nM y 20µM)	40
6.1.3.5. Vía dopaminérgica involucrada (Ratones BAC D1-GFP)	44
6.1.3.6. El papel de PKA (H89) y los canales de calcio tipo L (Nifedipina)	45
6.2. El 3-NP, modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington	47
6.2.1. Plasticidad sináptica	47
6.2.1.1. El papel de PKA	49
6.2.2. Otros cambios observados en el modelo de 3-NP	50
6.2.2.1. Inmunohistoquímica	50
6.2.2.2. La respuesta celular a la estimulación	51
6.2.2.3. Comparación de la curva corriente contra amplitud	51
6.2.2.4. Actividad espontánea	52
7. DISCUSIÓN	54
8. CONCLUSIONES	62
9. BIBLIOGRAFÍA	63
10. APÉNDICE	69
10.1. Artículo publicado	69



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Circuitos de los Ganglios Basales	3
Figura 2.	Gráficas muestra de una típica depresión y potenciación a largo plazo	8
Figura 3.	Esquema energético mitocondrial, estructuras del 3-NP y del ácido succínico	13
Figura 4.	Esquema del área de registro	18
Figura 5.	Curva intensidad contra amplitud	19
Figura 6.	Reconstrucción de una neurona espinosa mediana	21
Figura 7.	Trazos representativos de corrientes postsinápticas inhibitorias	22
Figura 8.	Gráficas para determinar el potencial de inversión de cloro experimental	23
Figura 9.	Efecto de la activación de los RD1	25
Figura 10.	Efecto de la inhibición de los RD1	27
Figura 11.	Efecto de la activación de los RD2	28
Figura 12.	Efecto de la inhibición de los RD2	29
Figura 13.	Efecto de la DA a 200nM	31
Figura 14.	Efecto de la DA a 20μM	32
Figura 15.	Plasticidad sináptica GABAérgica	34
Figura 16.	Efecto de la activación de los RD1 sobre la plasticidad sináptica GABAérgica	35
Figura 17.	Efecto de la inhibición de los RD1 sobre la plasticidad sináptica GABAérgica	37
Figura 18.	Efecto de la activación de los RD2 sobre la plasticidad sináptica GABAérgica	38
Figura 19.	Efecto de la inhibición de los RD2 sobre la plasticidad sináptica GABAérgica	39
Figura 20.	Efecto de la DA a 200nM sobre la plasticidad sináptica GABAérgica	41



Figura 21.	Efecto de la DA a 20 μ M sobre la plasticidad sináptica GABAérgica	42
Figura 22.	Efecto de la DA a 200nM y 20 μ M sobre la plasticidad sináptica GABAérgica en presencia de Sulpiride	43
Figura 23.	Imágenes de células registradas que generaron LTD o LTP en las sinapsis GABAérgica	44
Figura 24.	Efecto de PKA sobre la plasticidad sináptica	46
Figura 25.	Efecto de los canales de calcio tipo L sobre la plasticidad sináptica	47
Figura 26.	Plasticidad sináptica GABAérgica en ratones tratados con 3-NP	48
Figura 27.	Efecto de PKA sobre la plasticidad sináptica en ratones tratados con 3-NP	49
Figura 28.	Inmunohistoquímica a DAPI de NEM en rebanadas de ratones control y tratados con 3-NP	50
Figura 29.	Gráfica del porcentaje de células que responden a la estimulación en control y con 3-NP	51
Figura 30.	Curvas intensidad contra amplitud en control y con 3-NP	52
Figura 31.	Diferencias en la actividad sináptica espontánea entre ratones control y con daño por 3-NP	53
Figura 32.	Diferentes vías de señalización que pueden activar los receptores D2	56
Figura 33.	Mecanismo molecular presináptico de la plasticidad GABAérgica	58
Figura 34.	Diferentes tipos y porcentaje de plasticidad GABAérgica por la activación de los distintos tipos de receptores a DA	59



ABREVIATURAS

3-NP	Ácido 3-nitropropiónico
HD	Enfermedad de Huntington
DA	Dopamina
GB	Ganglios Basales
NE	Núcleo Estriado
GP	Globo Pálido
SNr	Sustancia <i>nigra pars reticulata</i>
SNc	Sustancia <i>nigra pars compacta</i>
STN	Núcleo Subtalámico
GABA	Ácido α -aminobutírico
NEM	Neuronas Espinosas Medianas
RD1	Receptores a Dopamina tipo D1
RD2	Receptores a Dopamina tipo D2
FS	Interneuronas Fast-Spiking
PV	Parvalbumina
RGABA	Receptores GABAérgicos
LTP	Potenciación a Largo Plazo
LTD	Depresión a Largo Plazo
SDH	Succinato Deshidrogenasa
STD	Depresión a Corto Plazo
GFP	Proteína Verde Fluorescente
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
APV	Ácido 2-amino-5-fosfonovalérico
IPSC	Corrientes Postsinápticas Inhibitorias
HFS	Estimulación de Alta Frecuencia
CTP	Constantes de Tiempo al Pico
CTD	Constantes de Tiempo de Decaimiento
PPR	Proporción del Pulso Pareado
PKA	Proteína Cinasa dependiente de AMPc
AC	Adenilato Ciclasa
PP2A	Proteína Fosfatasa 2A
endCa	Endocannabinoides



INTRODUCCIÓN

La dopamina es un importante neuromodulador involucrado tanto en procesos motores como cognitivos, en el estriado participa en la regulación de las sinapsis corticoestriatales y es indispensable en la generación de la plasticidad sináptica glutamatérgica (Calabresi et al., 1992a, Calabresi et al., 2007). Sin embargo la mayoría de las sinapsis del núcleo estriado son GABAérgicas, y aún es poco lo que se sabe del papel de la dopamina en esas sinapsis. Además se ha observado que un desequilibrio en los niveles de dopamina desencadena diferentes patologías, por ejemplo, en el estriado una disminución de dopamina conlleva a la enfermedad de Parkinson e incrementos en la concentración de dopamina se han observado en la enfermedad de Huntington (Chen et al., 2013). Es por ello que en este proyecto analizamos la modulación dopaminérgica tanto de las sinápsis inhibitorias del estriado, específicamente entre las interneuronas GABAérgicas y neuronas espinosas medianas, como de la plasticidad sináptica; para finalmente determinar las modificaciones que sufre la plasticidad GABAérgica en presencia del ácido 3-nitropropiónico, modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington.

En las sinápsis entre las interneuronas GABAérgicas y las neuronas espinosas medianas la modulación dopaminérgica dependió de la activación de los receptores a dopamina de tipo D2 y tuvo una respuesta diferencial dependiendo del tipo de receptor activado. Estas sinapsis generaron depresión a largo plazo dependiente de los receptores a dopamina tipo D2, de los canales de calcio tipo L y de la proteína cinasa dependiente de AMPc.

Adicionalmente, demostramos que en los ratones tratados con ácido 3-nitropropionico, modelo de la enfermedad de Huntington, se modifica la plasticidad sináptica: de depresión a largo plazo a potenciación a largo plazo. Así mismo, en altas concentraciones de dopamina también se obtiene potenciación a largo plazo, demostrando que cambios en la concentración de dopamina afectan el tipo de plasticidad. Finalmente pudimos revertir el tipo de plasticidad obtenida en los animales tratados con ácido 3-nitropropiónico bloqueando a la proteína cinasa dependiente de AMPc de manera posináptica.



1. ANTECEDENTES

El cerebro humano está encargado de todo lo que podemos hacer, saber y sentir. Sus complejos procesamientos aún no han sido completamente dilucidados, y su estudio requiere tanto del análisis de sus funciones en condiciones normales como patológicas. Una de las actividades fundamentales que controla el cerebro es el movimiento, en cuyos procesos están involucrados los ganglios basales.

1.1. Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB) son núcleos subcorticales derivados del telencéfalo y divididos en el área dorsal y la ventral (Heimer, 1975, Voorn et al., 2004). La parte dorsal está formada por el núcleo estriado (NE), el globo pálido (GP), la sustancia *nigra* (comprendiendo a la *pars reticulata* SNr y la *pars compacta* SNc) y el núcleo subtalámico (STN); mientras que la parte ventral está conformada por el estriado ventral o núcleo accumbens, el pálido ventral y el área ventral tegmental (Bolam et al., 2000, Carlson, 2006). El área dorsal juega un papel importante en el control del movimiento ya que se encargan de regular, corregir y afinar los comandos de la corteza, los cuales entran a los GB mediante el NE quien recibe aferentes de toda la corteza (incluyendo corteza motora, sensorial y de asociación) filtrando esta información mediante dos vías conocidas como la directa e indirecta. En la vía directa las neuronas de proyección del NE inervan a los núcleos de salida, el segmento interno del GP y la SNr, con ello se incrementa la actividad del tálamo quien cierra el circuito retroalimentando a la corteza y liberando a las neuronas motoras superiores de la inhibición tónica. Por el contrario la vía indirecta sirve para aumentar el nivel de inhibición tónica, mediante la proyección de una población de neuronas del estriado al segmento externo o lateral del GP, que llega al STN y de ahí a los núcleos de salida proyectando fuera de los ganglios basales y permitiendo que la vía indirecta inhiba la actividad de las neuronas motoras superiores (DeLong, 1990, Mink, 1996, Vitek y Giroux, 2000) (figura 1). Todo este circuito de información está representado desde cada área de la corteza proyectando a sitios específicos en el NE y provocando el movimiento de zonas concretas en éste,



manteniendo la separación de las fibras a lo largo de todo el trayecto de retorno hasta la corteza motora.

Se han descrito varios modelos de esta representación, desde el primero propuesto por Kemp y Powell que era una representación topográfica hasta los modelos de patrones longitudinales de Goldman-Rakic y el somatotópico de Künzle (Kemp, 1970, Kunzle, 1975, 1977, 1978, Selemon y Goldman-Rakic, 1985), sin embargo como el NE no tiene una organización laminar hace difícil el análisis de su funcionamiento (Gerfen, 1984, 1989, 1992).

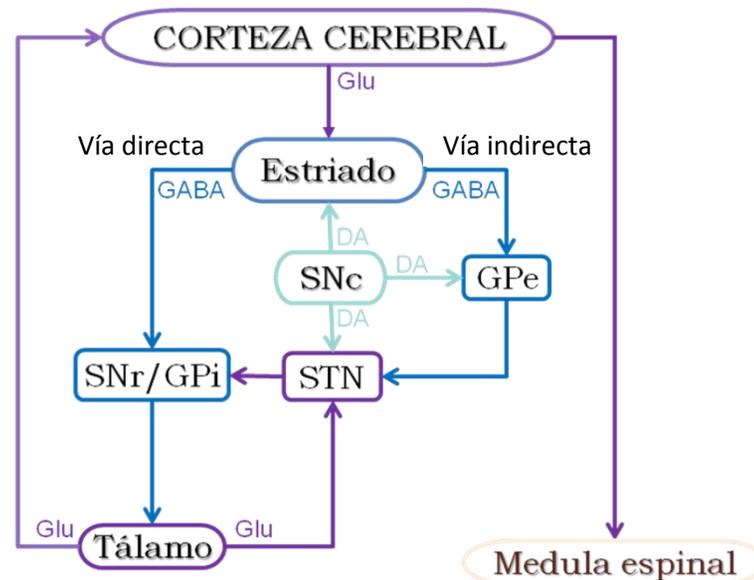


Figura 1. Circuitos de los ganglios basales. La vía directa inerva a los núcleos de salida, SNr/GPi, mientras que la vía indirecta inerva el GPe, este a su vez al STN y de ahí a los núcleos de salida. Vías que utilizan glutamato como neurotransmisor: en morado; ácido γ amino butírico: en azul y dopamina: en verde agua. (modificada de, Gubellini et al., 2004).

Debido a que los GB tienen muy pocas conexiones con el tronco del encéfalo, y carecen por completo de conexiones directas con la médula espinal; se ha pensado que están implicados en aspectos cognitivos superiores del control motor, como la planificación y ejecución de estrategias motoras complejas (Tisch et al., 2004). Para llevar a cabo toda esta comunicación tan específica los GB utilizan diferentes neurotransmisores, internamente el que predomina es el neurotransmisor inhibitorio llamado ácido γ -aminobutírico (GABA); ya que la mayoría de las neuronas del NE, el GP y la SNr son GABAérgicas. El glutamato, neurotransmisor excitatorio, es utilizado en la entrada y salida de información a los GB por neuronas de la corteza y el tálamo respectivamente; también el STN utiliza este neurotransmisor. Finalmente los



neuropéptidos, la DA (liberada por la SNc) y la acetilcolina (liberada por las interneuronas colinérgicas del estriado), entre otros, participan en la neuromodulación lenta actuando sobre los receptores acoplados a proteínas G (Graybiel, 1990).

A continuación se explica el funcionamiento del núcleo de entrada a los GB, el NE, que es donde se realizó este trabajo.

1.2. Estriado

El estriado en primates está formado por el núcleo caudado y el putamen, los cuales se encuentran divididos por la capsula interna; en los roedores estas estructuras están juntas y se denominan caudado-putamen. Debido a que derivan de la misma estructura prosencefálica están compuestos por los mismos tipos celulares. Los dos núcleos suponen los componentes aferentes de los ganglios basales, y juntos se denominan el neostriado o estriado. Éste es la masa celular subcortical más grande del encéfalo de los mamíferos y se ha descrito que en los seres humanos su volumen fresco es de aproximadamente 10cm^3 (Schroder et al., 1975).

La citoarquitectura del NE es homogénea y está compuesto por las neuronas espinosas medianas (NEM) (Gerfen, 1992). El resto de las neuronas del estriado son interneuronas GABAérgicas y colinérgicas.

1.3. Neuronas Espinosas Medianas (NEM)

Se ha estimado que las NEM comprenden entre un 80% y 97.7% de todas las neuronas estriatales, dependiendo de la especie y el método de conteo (Sten Grillner, 2006). Estas neuronas son neuronas de proyección por lo que sus axones salen del NE y van hacia otras áreas. Utilizan GABA como neurotransmisor, es decir son de carácter inhibitorio. Su soma mide entre 12 y $20\mu\text{m}$ y su árbol dendrítico abarca de 200 a $300\mu\text{m}$ de diámetro (Tepper et al., 1998).

A nivel funcional las NEM conforman las dos vías de proyección o salida del NE que se mencionaron anteriormente y en las cuales se abundara a continuación.



Las vías directa e indirecta del NE: La distribución de la información glutamatérgica que proviene de la corteza y el tálamo la distribuyen las NEM a través de la vía directa y la vía indirecta. En la vía directa las NEM inhiben a las neuronas de la SNr y el globo pálido interno (GPi) que se encuentran disparando todo el tiempo (de manera tónica) manteniendo al tálamo inhibido; por lo que las NEM de la vía directa al inhibir a la SNr y el GPi desinhiben a las neuronas del tálamo quienes al ser excitatorias estimulan a la corteza favoreciendo el movimiento (Albin et al., 1989, DeLong, 1990); por otro lado si se activa la vía indirecta las NEM inhiben a las neuronas del globo pálido externo (GPe) quienes a su vez se encuentran inhibiendo de manera tónica al STN, esta inhibición libera al STN quien al ser excitatorio incrementa la actividad de inhibición de los núcleos de salida (SNr y GPi) impidiendo que el tálamo lleve información a la corteza. Las NEM que van hacia las diferentes vías expresan diferentes receptores a DA y neuropéptidos. Las neuronas de la vía directa expresan receptores a DA de tipo D1 (RD1), sustancia P y dinorfina, mientras que las de la vía indirecta expresan receptores a DA de tipo D2 (RD2), receptores a adenosina A_{2A} y encefalinas (Gerfen et al., 1990, Kawaguchi et al., 1990, Surmeier et al., 1996). Sobre los receptores a DA se abundará con más detalle en la sección de DA.

Estas NEM son inhibidas por dos entradas GABAérgicas: la inhibición colateral axónica de otras NEM y la inhibición de las interneuronas GABAérgicas (Tepper et al., 2004). La red de inhibición colateral que forman las NEM con otras NEM permite la transmisión de la información de una NEM al inhibir la de su vecina, y es conocida como “feedback inhibition” (inhibición por retroalimentación). Sin embargo es una inhibición débil dirigida a las dendritas (Tepper et al., 2008).

Por otra parte las interneuronas GABAérgicas, llamadas Fast-Spiking (de disparo rápido), inhiben a las NEM debido a que inervan directamente el soma disparando de manera sincrónica en ráfagas gracias a sus uniones tipo gap, además tienen múltiples contactos sinápticos. Este tipo de inhibición se conoce como “feedforward inhibition” (inhibición por alimentación directa) (Tepper et al., 2008, Szydlowski et al., 2013).



1.4. Interneuronas

A pesar de la preponderancia de las neuronas principales del estriado, las NEM, las interneuronas estriatales son ricas en variedad y complejidad generando la red de inhibición y modulación de la frecuencia de disparo más importante de las células de proyección.

En las últimas décadas del siglo XX se comenzaron a identificar a los diferentes tipos de interneuronas estriatales, gracias al descubrimiento de los marcadores inmunocitoquímicos para su identificación. Las interneuronas se han clasificado basados en su morfología, neuroquímica y fisiología; identificando una población de interneuronas colinérgicas y distintos tipos de interneuronas GABAérgicas. Las interneuronas GABAérgicas mejor caracterizadas son las llamadas “Fast-Spiking” (de disparo rápido, FS, por sus siglas en ingles), este tipo de interneuronas colocalizan con la proteína de unión a calcio parvalbumina (PV). Son capaces de sostener una actividad mayor a los 200 Hz con poca o ninguna adaptación a la frecuencia de disparo, generan corrientes de amplitudes grandes, en ráfagas y con una tasa baja de fallo. Están electrotónicamente acopladas entre sí a través de uniones gap. Son ligeramente más grandes que las NEM, miden entre 10 y 25 μ m y se ha propuesto que son las responsables de la mayoría de la inhibición producida en las NEM (Kawaguchi et al., 1995, Tepper et al., 2004).

Existe otro tipo de interneuronas GABAérgicas que se identifican por la presencia de neuropéptido Y, somatostatina, sintasa del óxido nítrico y diaforasa NADPH. Miden entre 12 y 35 μ m; y son conocidas como PLTS por sus características electrofisiológicas: un bajo umbral de disparo (LTS: Low Threshold Ca^{2+} Spike) y un potencial de despolarización persistente en forma de meseta (P: Plateau) (Kawaguchi, 1993).

Otro tipo de interneuronas GABAérgicas que se han encontrado son las que colocalizan con la proteína de unión a calcio: calretinina, miden de 7 a 20 μ m y se han descrito al menos cuatro tipos morfológicamente distintos (Prensa et al., 1998).

En la actualidad, con las nuevas tecnologías se describen más interneuronas GABAérgicas estriatales, tales como: las interneuronas TH⁺, inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa y de las cuales se ha reportado la existencia de cuatro tipos



electrofisiológicamente distintos (Tepper et al., 2010); las CCK (colecistocinina) y las VIP (polipéptido intestinal vasoactivo) (Takagi et al., 1984, Tepper et al., 2010).

1.5. Receptores GABA

Las interneuronas GABAérgicas se comunican mediante la liberación de GABA y tienen como blanco a los receptores GABAérgicos (RGABA). Dichos receptores son de dos tipos farmacológicamente distintos los ionotrópicos y los metabotrópicos.

Los RGABA ionotrópicos, llamados GABA_A, están compuestos de cinco subunidades, las cuales conforman un canal que permite el paso de iones de cloro a través de la membrana plasmática. Hasta la fecha se conocen diecinueve subunidades del receptor GABA_A: α 1-6, β 1-4, γ 1-3, δ , ϵ , π y ρ 1-3 (Olsen y Sieghart, 2009) generando miles de posibles combinaciones, entre ellas, la mayoría de los receptores GABA_A están conformados por dos subunidades α , dos subunidades β y una γ con dos sitios de unión a GABA formados por la subunidad α y β (Olsen y Sieghart, 2008, 2009). Estos receptores se concentran en la membrana postsináptica de las sinapsis GABAérgicas y en menor proporción en la membrana extra sináptica.

Los RGABA metabotrópicos, denominados GABA_B, son heterodiméricos y están asociados a proteínas G_i/G_o que activan canales de potasio e inhiben canales de calcio, y se localizan en ambas membranas, pos y presináptica (Ulrich y Bettler, 2007).

Estos receptores GABA_A tienen mayor diversidad que los GABA_B además de tener la capacidad de cambiar su velocidad y su grado de expresión en las sinapsis, siendo estos factores importantes en la plasticidad sináptica (Thomas et al., 2005).

1.6. Plasticidad sináptica

Se ha mostrado de manera general, que la plasticidad sináptica es la capacidad que tienen las neuronas para modificar los circuitos neuronales, aumentando o disminuyendo la eficacia de la transmisión sináptica. Estos mecanismos pueden ocurrir mediante la potenciación o depresión de la actividad eléctrica neuronal. Dos modelos de plasticidad a largo plazo se han propuesto para explicar eventos de memoria y aprendizaje: la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Martin et al., 2000, Muller et al., 2000) (figura 2). La potenciación puede ser evocada



por estimulación de alta frecuencia mientras que la depresión es provocada por estimulación de baja frecuencia (Bliss y Lomo, 1973, Lynch et al., 1977).

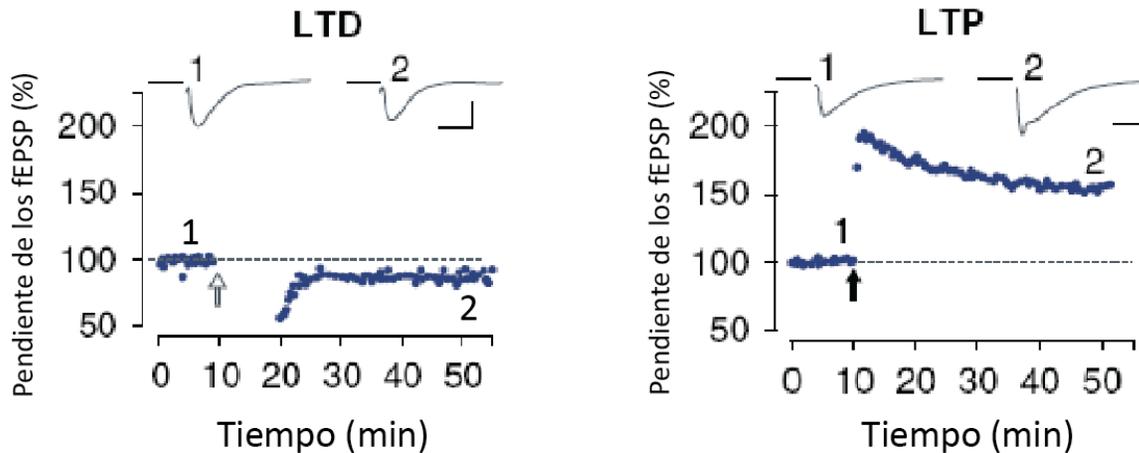


Figura 2. Gráficas de los cursos temporales de potenciales posinápticos excitatorios en registros de campo (fEPSP). A la izquierda se muestra una LTD típica después de una estimulación de baja frecuencia (5Hz por 3 minutos, flecha blanca), y los registros correspondientes antes (1) y después de la estimulación (2); los números representan el sitio del registro. A la derecha se muestra una LTP típica después de una estimulación de alta frecuencia (100Hz por 1 minutos, flecha negra), y los registros correspondientes antes (1) y después de la estimulación (2); los números representan el sitio del registro (modificada de Citri y Malenka, 2008).

Como se mencionó, el núcleo estriado está involucrado en la ejecución de programas motores aprendidos por lo que la integración de las señales sinápticas pueden generar plasticidad, de hecho ya se ha reportado plasticidad sináptica en el estriado y a continuación se abundará en el tema.

1.7. Plasticidad en el estriado

En el estriado se han realizado estudios sobre los fenómenos de plasticidad sináptica y en particular se han enfocado a la descripción de los fenómenos plásticos entre la conexión cortical y las NEM (conexión glutamatérgica corticoestriatal). Estas investigaciones han mostrado que se puede generar LTP y LTD en dichas sinapsis, (Calabresi et al., 1996) dependiendo del tipo de estimulación que se realice (Fino et al., 2005).

Se sabe que con una estimulación de alta frecuencia se puede generar LTD dependiente de la despolarización de la membrana, la activación de receptores metabotrópicos glutamatérgicos y la coactivación de los receptores a dopamina tipo D1 y D2. Mientras que para inducir la LTP se requiere el desbloqueo de los receptores NMDA que es logrado con el uso de medios libres de Mg^{2+} (Calabresi et al., 1992b).

Sin embargo, a pesar de que se sabe que la mayoría de las sinapsis del núcleo estriado son GABAérgicas, se ha descrito poco acerca de la presencia de plasticidad GABAérgica, la cual parecen tener un papel importante en los procesos intrínsecos del núcleo estriado (Adermark et al., 2009, Rueda-Orozco et al., 2009).

1.8. Dopamina y su papel el estriado

La DA es una catecolamina, involucrada en diferentes funciones importantes del cerebro (movimiento, atención y aprendizaje), y los efectos reforzantes de las drogas. Existen varios sistemas de neuronas dopaminérgicas que participan en dichas funciones, dos de los más importantes se originan en el mesencéfalo (nigroestriatal y el mesolímbico). En el sistema nigroestriatal las neuronas dopaminérgicas se encuentran en la sustancia *nigra pars compacta* y proyectan sus axones hacia el núcleo estriado involucrando en el control de movimiento; mientras que en el sistema mesolímbico las neuronas dopaminérgicas se localizan en el área ventral tegmental, de donde los axones que proyectan al núcleo accumbens, la amígdala y el hipocampo están involucrados en efectos reforzadores y los que proyectan hacia la corteza prefrontal (sistema mesolímbico cortical) participan en la formación de memoria a corto plazo, planificación y estrategias para la resolución de problemas (Gerfen, 1992, Carlson, 2004).

La diversidad de las acciones fisiológicas de la DA es mediada por al menos cinco distintos subtipos de receptores, todos ellos son metabotrópicos y acoplados a proteínas G. Los receptores a DA de la familia D1 son dos: los D_1 y D_5 , ambos acoplados a la proteína G_s y activan a la adenilato ciclasa; por otro lado los receptores a DA de la familia D2 son tres: los D_2 , D_3 y D_4 , estos se acoplan a la proteína G_i o G_o e inhiben a la adenilato ciclasa.

El estriado recibe una entrada densa dopaminérgica que constituye, el 21% del total de sus terminales axónicas contactando a las dendritas y el tallo de las espinas. Esta



entrada dopaminérgica es esencial en el estriado pues en ausencia de ella el circuito de los GB no funciona (Mc Geer, 1993).

En el estriado los receptores dopaminérgicos están distribuidos de la siguiente manera: las NEM de la vía directa expresan los receptores D₁ (90%), D₃ (50%) y D₄ (10%) y las NEM de la vía indirecta expresan los RD₂ (90%), RD₁ (10%), RD₃ (10%), RD₄ (10%) y RD₅ (10%) y las interneuronas GABAérgicas - PV (+) - expresan los RD₅ (70%) (tabla 1).

Distribución de los receptores a Dopamina

Tipo de receptor a DA	RD1	RD2			RD1
Subtipo	RD ₁	RD ₂	RD ₃	RD ₄	RD ₅
NEM vía directa	90%		50%	10%	
NEM vía indirecta	10%	90%	10%	10%	10%
Interneurona GABA (FS)					70%

Tabla 1. Distribución de los receptores a DA de las NEM de la vía directa y las de la vía indirecta, así como las interneuronas GABAérgicas (FS) (modificado de Tritsch y Sabatini, 2012).

La gran entrada dopaminérgica junto con una alta heterogeneidad de receptores dopaminérgicos sugiere que los microcircuitos estriatales están modulados por la DA a diferentes niveles y donde el sistema es co-activado por D1 y D2 generando una interacción que lleva a un efecto sinérgico de ambos receptores.

Cuando las NEM mueren, todos estos circuitos son modificados desencadenando diversas patologías, una de ellas es la enfermedad de Huntington.



1.9. Enfermedad de Huntington

El Huntington es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria, la cual puede producir alteraciones cognitivas, psiquiátricas y motoras; es progresiva y termina con la muerte de quien la padece (Hernández-Echeagaray, 2010). Fue descrita en 1872 por George Huntington como un desorden progresivo, combinando corea con trastornos del comportamiento y demencia (Huntington, 1872). La corea es el movimiento involuntario más característico de la enfermedad, significa “baile” en griego y consiste en movimientos bruscos, irregulares, constantes, rápidos y breves, que afectan al azar los miembros, la cara o la musculatura axial del tronco. A nivel mundial su incidencia es de 10 por cada 100000 habitantes y generalmente se presentan los síntomas en la 4 década de vida llevando a los pacientes a la muerte en un promedio de 10 a 20 años (Weiner, 1989).

Esta enfermedad se desencadena por una mutación genética en el brazo corto del cromosoma 4 (Martin, 1982), la cual afecta a una proteína de función desconocida llamada huntingtina (*htt*). El defecto se debe a una expansión de tripletes CAG (que codifica para glutamina) por lo que se obtiene una proteína poliglutaminada.

En la secuencia original existen entre 6 y 35 repeticiones de CAGs, mientras que en la condición de enfermedad, este número se eleva de 40 hasta más de 100 repeticiones. Este cambio es suficiente para que la huntingtina poliglutaminada desencadene la degeneración de las NEM del NE (Alexi et al., 2000), causando daños primero en la vía indirecta relacionada con la inhibición del movimiento, y la degeneración en la vía directa asociada a la facilitación del movimiento; para desencadenar la muerte de ésta población neuronal (Hernández-Echeagaray, 2004).

Además se ha observado que en la HD hay un incremento en la concentración de DA (Chen et al., 2013), lo cual contribuye en la neurotoxicidad de las NEM, por la alta concentración de DA (Jakel y Maragos, 2000).

Para el estudio de la HD se han desarrollado diferentes modelos animales, que van desde los modelos farmacológicos hasta la generación de ratones transgénicos. Uno de



los más importantes por su alta similitud a la patología y porque involuntariamente se ha visto su efecto en humanos, es el modelo farmacológico del ácido 3-nitropropiónico.

1.10. El Ácido 3-Nitropropiónico como modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington

El ácido 3-Nitropropiónico (3-NP) es una micotoxina presente en la caña de azúcar, que en el año de 1972 produjo una intoxicación aguda en seres humanos. Las personas intoxicadas presentaban alteraciones neuropatológicas semejantes a las presentes en pacientes con HD. Por ejemplo, en los individuos intoxicados con 3-NP, se detectó una necrosis bilateral selectiva del putamen, lo cual también se ha observado en enfermos de Huntington. Se ha descrito que los cerebros *post mortem* de pacientes con Huntington exhiben alteraciones en los complejos mitocondriales del estriado, lo que sugiere que en la HD existe un déficit de energía celular que parece desencadenar la patología (Brouillet et al., 1999). En este sentido se sabe que una de las funciones de la huntingtina normal es proteger del daño apoptótico mitocondrial (Rigamonti et al., 2000, Rigamonti et al., 2001), mientras que la huntingtina poliglutaminada no lo hace, por lo que se generan defectos mitocondriales y daño oxidativo (Pérez-Severiano et al., 2000) llevando a un desabasto energético similar al de nuestro modelo farmacológico del 3-NP, por lo que es un estupendo modelo que imita a la HD. En el caso del 3-NP el déficit energético se produce porque se bloquea de manera irreversible a la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), en el complejo II mitocondrial. El bloqueo es posible debido a que el 3-NP tiene una estructura molecular muy similar a la del ácido succínico, sustrato endógeno de la SDH (figura 3).



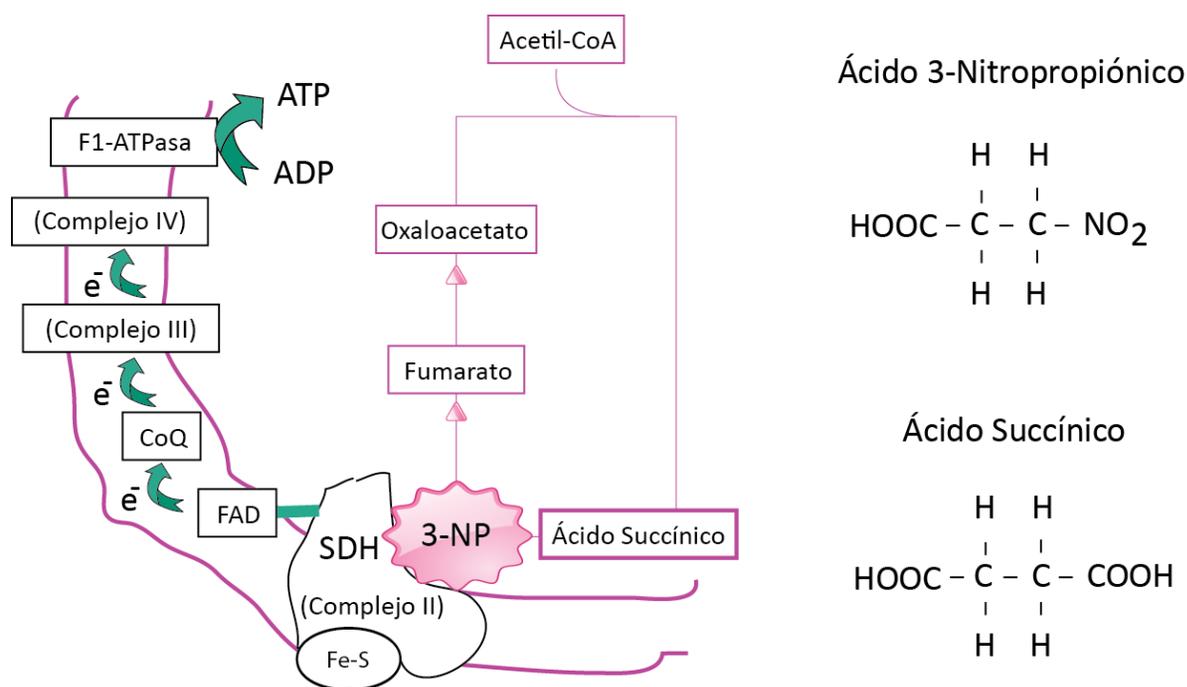


Figura 3. A la izquierda: esquema que ejemplifica como el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) inhibe a la succinato deshidrogenasa (SDH) provocando un déficit energético; a la derecha estructura molecular del 3-NP y del ácido succínico, sustrato de la SDH (modificado de Brouillet et al., 1999).

Cuando el 3-NP inhibe el complejo II mitocondrial, se bloquea parte del transporte de electrones y se provoca la disminución en la síntesis de ATP. Este déficit energético produce la despolarización de la membrana celular por un mal funcionamiento de las ATPasas de Na^+/K^+ . Estas alteraciones mitocondriales también favorecen la formación de radicales libres y por lo tanto de daño celular (Nasr et al., 2003, Rodríguez et al., 2010).

Cuando existe daño neuronal se generan diversos cambios que muchas veces son compensatorios y tratan de ajustar al sistema. Entre ellos se encuentran los cambios en la plasticidad sináptica.

2. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que el estriado está involucrado en la ejecución de programas motores previamente adquiridos y presenta plasticidad sináptica en las sinapsis provenientes de la corteza, sinapsis glutamatérgicas corticoestriatales. Adicionalmente se ha demostrado que la DA modula tanto la transmisión sináptica como la plasticidad sináptica corticoestriatal (Calabresi et al., 2009, Bromberg-Martin et al., 2010, Nishi et al., 2011, Willis et al., 2012).

Así la activación de los RD1 incrementa las corrientes iónicas inducidas por glutamato, mientras que la activación de los RD2 las atenúa (Cepeda et al., 1993, Hernández-Echeagaray et al., 2004). La LTD depende de los RD1 y de los RD2, mientras que la LTP depende de los RD1 (Calabresi et al., 1992a, Calabresi et al., 2007). Incluso se ha propuesto que la LTD corticoestriatal se genera solo por las NEM de la vía indirecta (las que tienen receptores a dopamina de la familia D2) (Kreitzer y Malenka, 2007), aunque esto aún está en debate.

Sin embargo, a pesar de que se sabe que la mayoría de las sinapsis del núcleo estriado son GABAérgicas, no se conoce con precisión los fenómenos de plasticidad que ocurren en estas sinapsis (Kawaguchi et al., 1995, Sten Grillner, 2006). Tanto las sinapsis de interneuronas GABAérgicas con NEM como las sinapsis de NEM con otras NEM son de carácter GABAérgico (Kita, 1993) y están moduladas por DA. La activación de los D1R reduce las corrientes inducidas por GABA en NEM (Hernández-Echeagaray et al., 2007), mientras que la activación de los D2R disminuye la liberación de GABA (Guzman et al., 2003). También se ha descrito que la estimulación de alta y baja frecuencia induce depresión a corto plazo (STD) en ambos tipos de sinapsis GABAérgicas (Koos et al., 2004, Gustafson et al., 2006). Dicha plasticidad incrementa con agonistas a RD1 en sinapsis NEM-NEM mientras que disminuye con agonistas a RD2; por su parte en las sinapsis de interneuronas-NEM no se ha observado ningún cambio en la STD por la presencia de agonistas de RD1 ni de RD2 (Tecuatpetla et al., 2007). No obstante, la plasticidad a largo plazo de estas sinapsis GABAérgicas apenas se ha comenzado a estudiar (Rueda-Orozco et al., 2009), y se desconoce el papel de la DA en ella o si se altera en caso de daño neuronal como lo que se ha visto en las sinapsis glutamatérgicas del estriado (Cepeda et al., 2007, Di Filippo et al., 2007).



En este proyecto nos enfocamos en el análisis de la modulación dopaminérgica tanto de las sinapsis inhibitorias del estriado, específicamente entre las interneuronas GABAérgicas y las NEM, como de su plasticidad sináptica; para determinar si esta plasticidad se modifica cuando hay un daño neuronal en el estriado, en este caso causado por el desabasto energético producido por el 3-NP, modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington.

3. HIPÓTESIS

Si la plasticidad en las sinapsis GABAérgicas estriatales está modulada por dopamina, cuyos niveles se modifican en la enfermedad de Huntington, ésta sufrirá modificaciones cuando haya daños en el núcleo estriado como los que se observan en la enfermedad de Huntington.

4. OBJETIVOS

General

Determinar si las sinapsis GABAérgicas del estriado presentan plasticidad sináptica y si estas sinapsis y su plasticidad están moduladas por DA. Así mismo determinar si la plasticidad es modificada en un modelo farmacológico de la HD.

Específicos

- ☆ Estudiar la modulación dopaminérgica en las sinapsis entre interneuronas GABAérgicas y NEM
- ☆ Determinar si existe plasticidad GABAérgica en el estriado, analizando las sinapsis entre interneuronas y NEM.
- ☆ Evaluar si la dopamina modula esta plasticidad GABAérgica.
- ☆ Determinar si ésta plasticidad GABAérgica del estriado, sufre modificaciones en condiciones de daño por el modelo farmacológico de la HD.



5. METODOLOGÍA

5.1. Registros electrofisiológicos

Los experimentos se realizaron con ratones C57-BL/6 de 30 a 35 días, mantenidos a temperatura ambiente con agua y comida *ad libitum* y bajo un ciclo normal de luz-obscuridad de 12 por 12 horas. Los animales se asignaron a dos grupos; Control y Tratado con 3-NP; fueron inyectados intraperitonealmente con el vehículo y con 3-NP respectivamente. Las inyecciones se realizaron una vez al día durante 5 días en una dosis de 15mg/kg de peso por día y posteriormente se dejaron descansar dos días antes de cada experimento electrofisiológico (ver Rodríguez et al. 2010). También fueron utilizados ratones BACD1- GFP para la identificación de las NEM de la vía directa, ya que estos ratones tienen a la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) acoplada al promotor de los receptores a dopamina tipo D1 y por lo tanto es posible su identificación visual. Los animales fueron anestesiados y decapitados para extraer rápidamente el cerebro, el cual se colocó en una solución ringer que imita el líquido cerebroespinal y que contenía (en mM): NaHCO_3 26, NaH_2PO_4 1.25, NaCl 130, KCl 3, MgCl_2 5, Glucosa 10, CaCl_2 1 y que estaba continuamente burbujeada con una mezcla de gas 95% O_2 y 5% CO_2 . Posteriormente se obtuvieron rebanadas sagitales del cerebro de 300 μm en un Vibratomo (Pelco 102, modelo 1000 plus) y se dejaron reposar una hora a temperatura ambiente en una solución que contenía (en mM): NaHCO_3 26, NaH_2PO_4 1.25, NaCl 130, KCl 3, MgCl_2 2, Glucosa 10, CaCl_2 2, burbujeada con 95% O_2 y 5% CO_2 .

Para realizar los registros electrofisiológicos, las rebanadas fueron sumergidas en una cámara con perfusión continua de 2mL/minuto, donde las células se visualizaron con un microscopio Olympus (BX51WI, Alemania) con objetivo de inmersión, una cámara Hitachi CCD y un filtro infrarrojo.



Los electrodos para estos registros se obtuvieron de capilares de borosilicato (World Precision Instruments, Inc.) a los cuales se les dio la forma y la apertura apropiada en un estirador de pipetas Sutter (Instrumento. Co.), modelo P-97. Posteriormente se llenaron con una solución interna que contenía (en mM): KH_2PO_4 72, KCl 36, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2, HEPES 10, EGTA 1.1, Na_2ATP 0.2, Na_3GTP 0.2 y QX-314 5 para bloquear las corrientes de acción. En algunos registros también se agregó biocitina al 0.5 % para poder visualizar la célula registrada posteriormente. El pH fue de 7.2 y la osmolaridad de 275 mOsm/L.

5.1.1. Registro de célula completa (“whole cell”)

Para llevar a cabo los registros de célula completa se utilizó la técnica de patch clamp con fijación de voltaje. La respuesta sináptica GABAérgica de las NEM se indujo estimulando a las interneuronas GABAérgicas del estriado en presencia de los antagonistas glutamatérgicos: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) y ácido 2-amino-5-fosfonovalérico (APV), en el baño durante todo el experimento. Con ello se obtuvieron sólo corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) de las NEM.

Se realizó una estimulación de campo dentro del estriado, según lo descrito previamente (Guzman et al., 2003, Tecuapetla et al., 2005), para estimular principalmente a las interneuronas GABAérgicas, ya que como se ha mencionado, dentro del estriado podemos encontrar dos tipos de sinapsis GABAérgicas sobre las espinosas medianas: aquellas provenientes de las colaterales axónicas y las de interneuronas con NEM. En este trabajo nos enfocamos en el análisis de las sinapsis que provienen principalmente de las interneuronas GABAérgicas (figura 4).



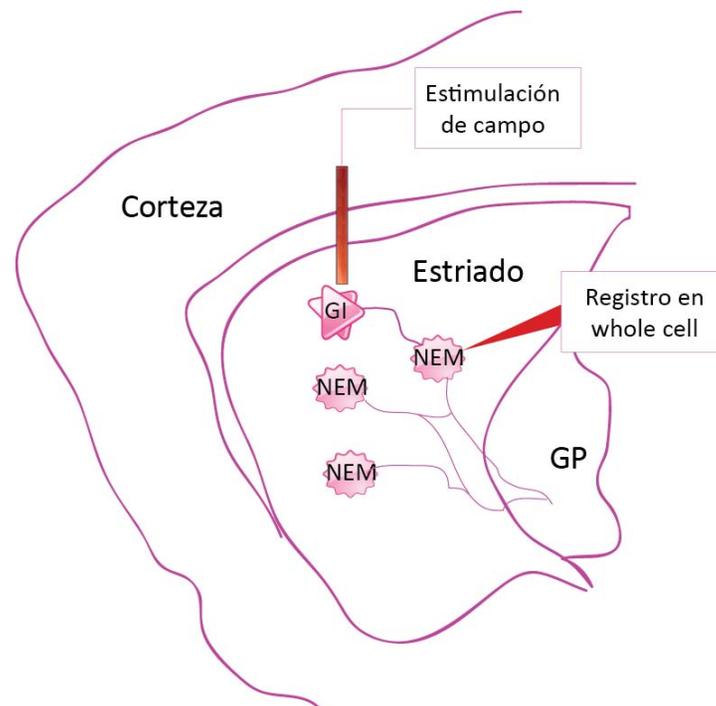


Figura 4. Esquema del área de registro, realizando estimulación de campo dentro del estriado, para estimular principalmente a las interneuronas GABAérgica, y registrando en una NEM.

La estimulación para obtener las corrientes, se realizó a una frecuencia de 0.1 Hz con intensidad variable. Para determinar la intensidad estimulación adecuada que nos permitió observar cualquier cambio en las corrientes sinápticas, se realizó una curva intensidad de estimulación contra amplitud de corriente evocada antes de cada experimento. En esta gráfica se determinó la intensidad media, es decir, la intensidad de estimulación en la cual se evoca la mitad de la amplitud máxima de corriente para cada experimento (figura 5). Por lo que al estimular en esta intensidad media pudimos observar tanto incrementos como decrementos en la amplitud de las corrientes sinápticas. El potencial de mantenimiento fue de -70mV.

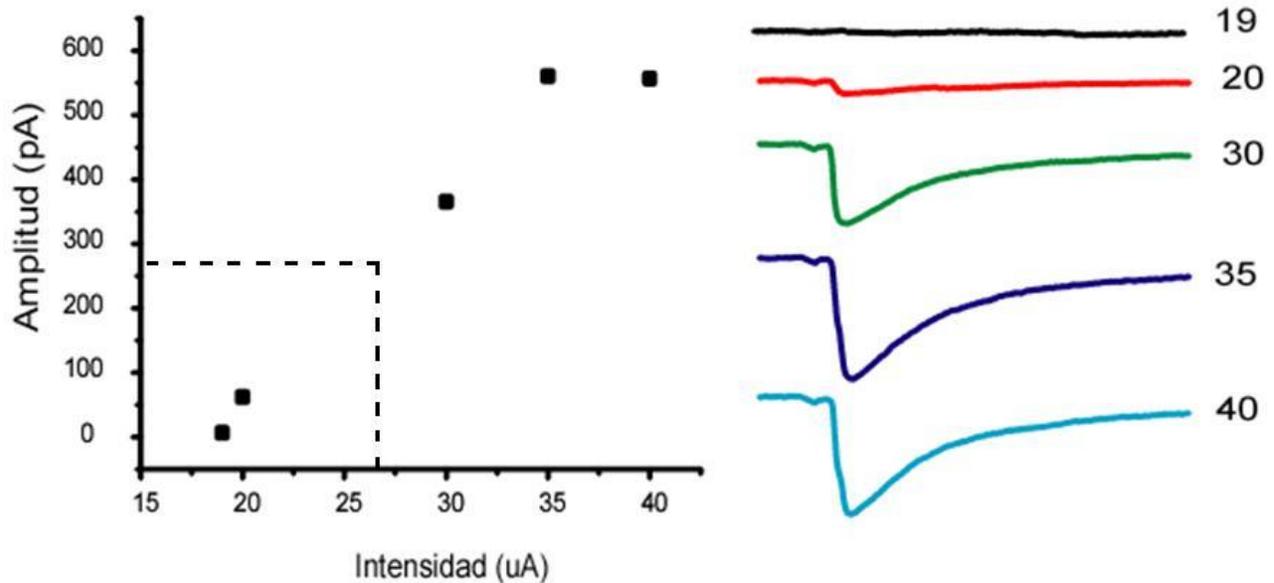


Figura 5: Curva intensidad contra amplitud, donde podemos observar la intensidad de estimulación media (línea punteada), en este ejemplo fue de 26 μA . A la derecha se muestran los trazos obtenidos para distintas intensidades de estimulación (de 19 a 40 μA).

Los registros se realizaron en las NEM y se grabaron las corrientes control durante 10 minutos antes de agregar el modulador en el baño o dar el protocolo de plasticidad. En la modulación utilizamos agonistas y antagonistas dopaminérgicos, además de la DA en dos diferentes concentraciones; y para la plasticidad sináptica después de probar diferentes protocolos, de alta y baja frecuencia (que son los que se han empleado en la literatura para la plasticidad GABAérgica, Adermark et al., 2009, Rueda-Orozco et al., 2009), determinamos que el mejor protocolo para inducir la plasticidad estriatal, en nuestras condiciones experimentales, fue el de estimulación de alta frecuencia (HFS) que consistió en 3 trenes, de 3 segundos, con una frecuencia de 100Hz y un intervalo de 10 segundos entre cada tren; y por lo tanto este último fue el que se empleó en los experimentos de plasticidad.

5.1.1.1. “Gap Free”

En los registros de Gap Free (libre variación) solo se grabó la actividad GABAérgica espontánea de las NEM, sin estimulación, en presencia de los antagonistas glutamatérgicos (CNQX y APV). Estos registros nos permitieron determinar cambios a nivel presináptico o postsináptico dependiendo si el cambio fue en la frecuencia de disparo o en la amplitud de las corrientes respectivamente.

5.2. Inmunohistoquímica

Los registros fueron hechos en una rebanada de tejido, infundido con biocitina en la pipeta de registro y una vez terminado el experimento se guardó en paraformaldehído al 30% durante 24 horas, transcurrido el tiempo se lavó la rebanada con PBS y se cortó en rebanadas de 50µm incubándolas con avidina-cy3 para posteriormente visualizarlas en un microscopio de fluorescencia y encontrar la célula registrada.

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con una cámara Hamamatsu (Orca C4742-95, Japón) acoplada al sistema de adquisición de imagen Olympus Cell M (luz de excitación 450-490nm; luz de emisión 502-538nm). Las rebanadas fueron cubiertas con Vectashield para su reconstrucción tridimensional. La imagen final fue obtenida con un microscopio de fluorescencia confocal (Olympus FV-1000) y adquirida con el software Olympus Fluo View 3.1.

5.3. Ratones BAC D1-GFP

Los ratones BAC D1-GFP nos fueron facilitados de una producción del “Mutant Mouse Regional Resource Center U42OD010918” de la Universidad de Missouri, que se encuentra en el IFC, UNAM. Estos ratones BAC D1-GFP tienen acoplada la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) en el promotor de los RD1, lo cual nos permitió identificar tanto a las NEM de la vía directa: las células fluorescentes, como a las NEM de la vía indirecta: aquellas células sin fluorescencia.



6. RESULTADOS

6.1. Análisis de las corrientes inducidas por GABA en ratones control

6.1.1. Caracterización

6.1.1.1. *Inmunohistoquímicas*

Las NEM fueron visualizadas mediante la inmunohistoquímica de las rebanadas de cerebro registradas, en ellas se pudo identificar la morfología de dichas neuronas (figura 6).

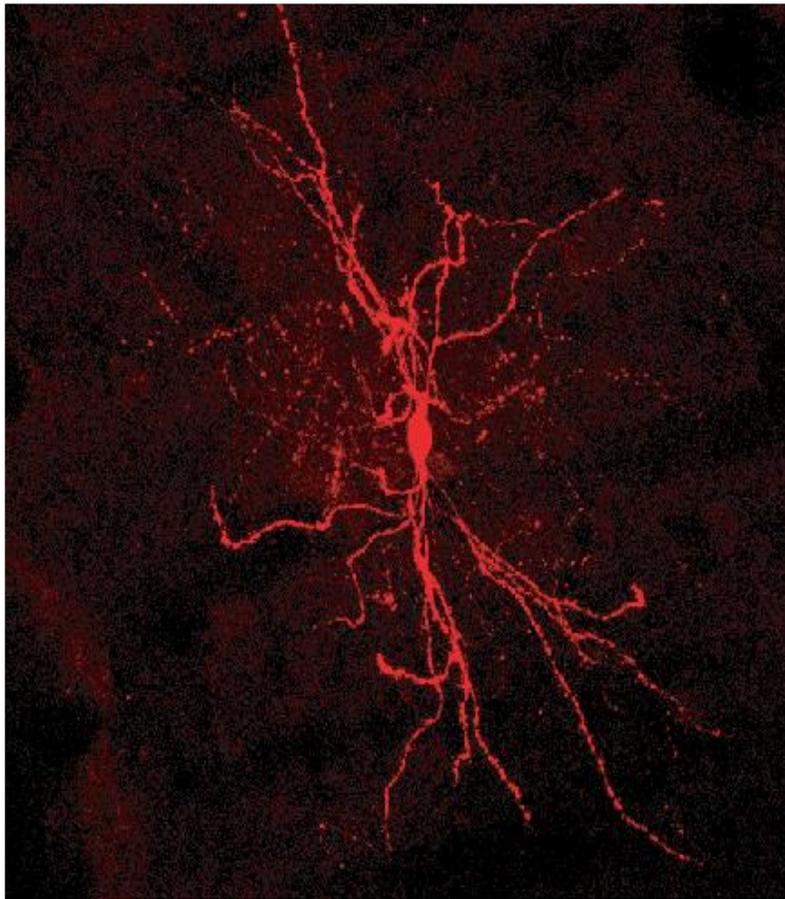


Figura 6. Reconstrucción de una NEM, la cual fue llenada con biocitina durante el registro y posteriormente se reveló con avidina-cy3.

6.1.1.2. Inhibición con Bicuculina

Como se mencionó, al estimular dentro del estriado evocamos corrientes sinápticas entre interneuronas y NEM, éstas sinapsis son de carácter GABAérgico por lo que son evocadas en presencia de los inhibidores glutamatérgicos: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) y ácido 2-amino-5-fosfonovalérico (APV). Y para caracterizarlas utilizamos Bicuculina, un inhibidor de los receptores GABA_A. En la figura 7 mostramos que en presencia de la Bicuculina son eliminadas las corrientes, dejando clara su naturaleza inhibitoria.

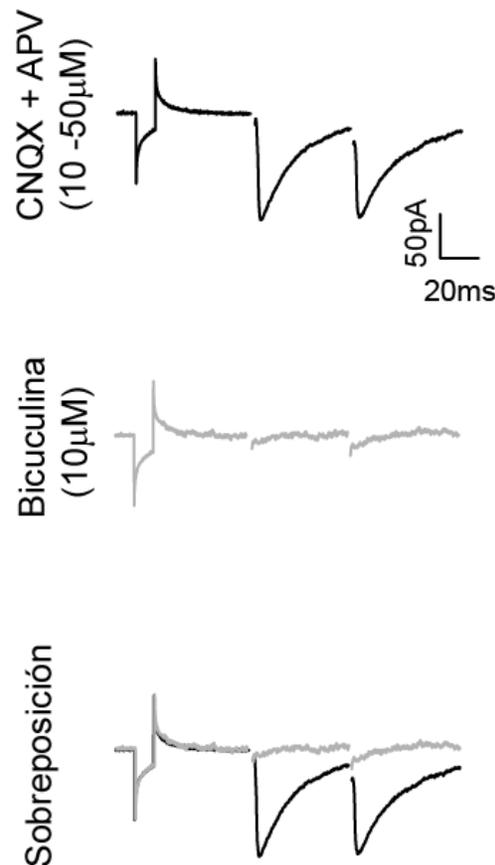


Figura 7. Trazos representativos de corrientes postsinápticas inhibitorias, inducidas por la activación de los receptores GABA_A. Registro de una NEM en presencia de CNQX (10µM) y APV (50µM), con Bicuculina (10µM) y la sobreposición de los trazos.

6.1.1.3. Potencial de inversión de cloro

Uno de los puntos importantes a considerar cuando se realizan registros electrofisiológicos es la determinación del potencial de registro, ya que para fijarlo se debe considerar el potencial de reposo de la célula y el poder generar corrientes de suficiente tamaño para ser medidas. El tamaño de estas corrientes está determinado por la fuerza electromotriz, que proviene de que tan lejos este el potencial de registro del potencial de inversión de la corriente que deseamos medir, en este caso corrientes de cloro (anión que atraviesa los receptores GABA_A y responsable de las corrientes inhibitorias). Debido a que las NEM tienen un potencial de reposo muy cercano al potencial de inversión del cloro en las condiciones fisiológicas, decidimos modificar la concentración de cloro en la solución interna para incrementar la fuerza electromotriz (Guzman et al., 2003). Incrementando la concentración de cloro se determinó el nuevo potencial de inversión, en la figura 8 se indica la gráfica del potencial impuesto contra la corriente generada, de donde se obtiene el nuevo potencial de inversión del cloro experimental (el potencial de inversión es aquel en el cual la corriente es cero, es decir el flujo de corriente neto es cero y a partir de ahí la corriente cambia de sentido).

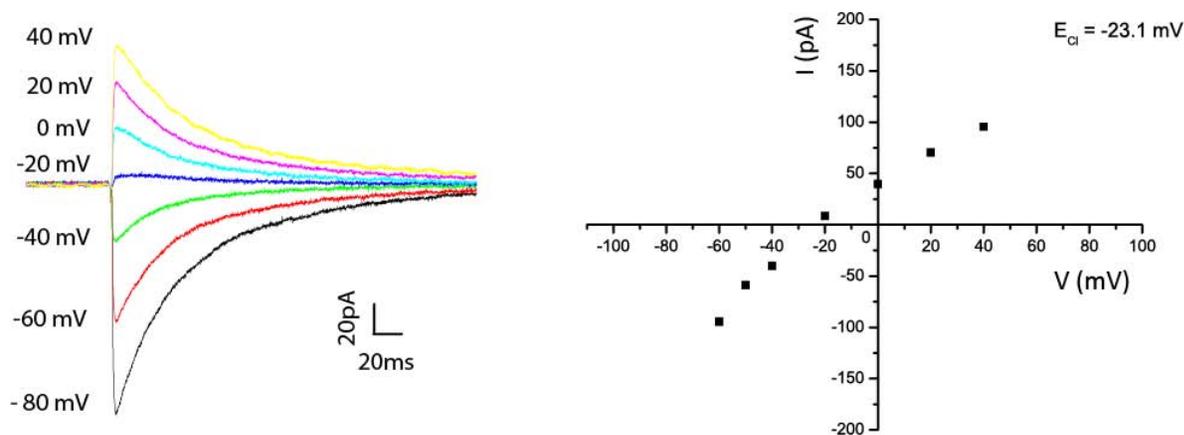


Figura 8. Derecha: Trazos representativos de las corrientes obtenidas a los diferentes potenciales impuestos (mostrados a la derecha de cada trazo). Izquierda: Gráfica de las corrientes contra el potencial impuesto, de donde se obtiene el potencial de inversión experimental de corrientes inhibitorias de cloro ($E_{Cl} = -23.1$ mV).

Este nuevo potencial de inversión de cloro nos permitió hacer registros al potencial de reposo de la célula, donde es más estable.

6.1.2. Modulación Dopaminérgica

Para determinar el papel que ejerce la DA en las sinapsis entre interneuronas GABAérgicas y NEM, se analizó la influencia de agonistas y antagonistas de DA sobre las corrientes postsinápticas Inhibitorias (IPSC). En el estriado se expresan tanto receptores a DA de tipo D1 como D2, por lo que utilizamos SKF81297 y Quinelorane como agonistas de dichos receptores respectivamente; y SCH23390 y Sulpiride como antagonistas también de los RD1 y RD2 respectivamente. Adicionalmente analizamos el efecto de dos diferentes concentraciones de DA en estas corrientes.

6.1.2.1. Receptores a dopamina tipo D1

Se obtuvieron los registros en whole cell y posteriormente se agregó el agonista de los RD1 (SKF81297, 10 μ M) generando una respuesta diferencial, en el 37.5% de los registros se obtuvo un incremento en las IPSC, en el 50% un decremento y el 12.5 % no cambio la amplitud de las IPSC (figura 9D). El incremento observado fue del 74% respecto a la amplitud de las corrientes control (Control 100.248 \pm 0.599 vs SKF 174.361 \pm 6.546, $t_2=2.791$, $p=0.049$), mientras que la disminución tan solo fue del 27% (Control 100.519 \pm 0.880 vs SKF 73.694 \pm 4.499 $t_3=5.851$, $p=0.001$, figura 9A-C).

Para determinar si el efecto modulador se debió a un mecanismo pre o postsináptico se realizó el análisis de pulso pareado, el cual consiste en dar dos estímulos cercanos en el tiempo y medir la proporción de las amplitudes respuesta, si esta proporción cambia estamos frente a un mecanismo pre sináptico; así mismo analizamos las constantes de tiempo al pico (CTP) y de decaimiento (CTD), donde cambios en ellas nos indicarían cambios en el mecanismos postsinápticos.

En los registros donde incrementaron las IPSC no se obtuvo un cambio significativo, ni en la proporción del pulso pareado (PPR), ni en las constantes de tiempo (PPR: $t_2=0.301$, $p=0.778$, CTP: $t_2=-0.246$, $p=0.818$, CTD: $t_2=1.677$, $p=0.169$) (figura 9E). En aquellos registros donde se encontró un decremento de las IPSC se obtuvo una disminución en la PPR que si bien no fue significativa, la prueba estadística mostró una mayor acercamiento a los límites de la significancia (PPR: $t_3=2.324$, $p=0.059$) (figura 9F). En las constantes de tiempo no se obtuvo ningún cambio (CTP: $t_3=-0.287$, $p=0.784$, CTD: $t_3=-0.340$, $p=0.746$) (figura 9F). Estos resultados indicarían un posible mecanismo presináptico detrás del efecto modulador del agonista a los RD1.



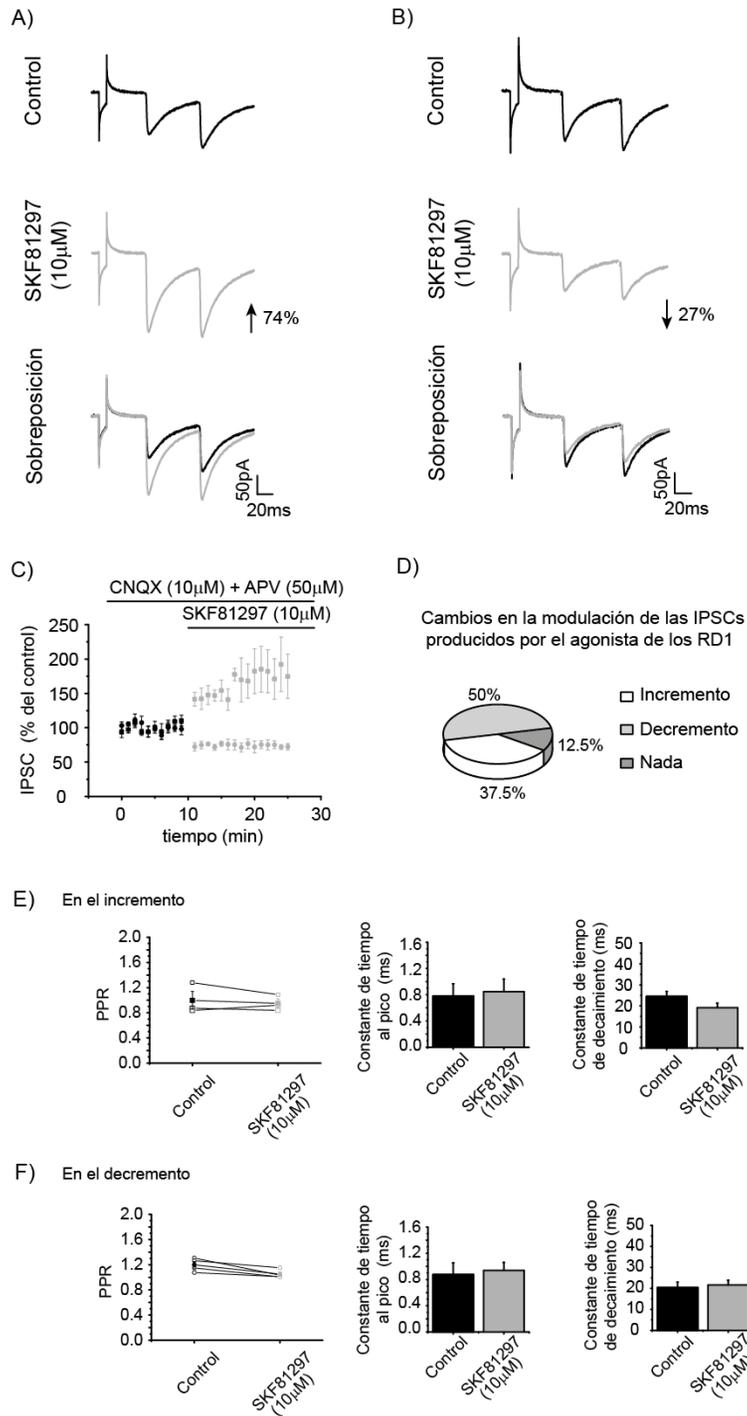


Figura 9. Efecto de la activación de los RD1. Trazos representativos del incremento (A) y decremento de las IPSC (B) en presencia del agonista de los RD1 (SKF81297, 10 μ M); y sus cursos temporales (C). Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. D) Cambios en % de la modulación de las IPSC por el agonista de los RD1. E) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo (PPR) de las IPSC que incrementaron y las constantes al pico y de decaimiento de las corrientes inhibitorias en el control y en presencia de SKF81297. F) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo (PPR) de las IPSC que decrementaron y las constantes al pico y de decaimiento de estas corrientes en el control y en presencia del agonista RD1. Número de células (n) que incrementaron las IPSC=3, n que decrementaron las IPSC=4 y n que no cambio=1.



Por otro lado en presencia del antagonista de los RD1 se generó un incremento en las IPSC del 54% (Control 101.465 ± 0.816 , vs SCH 155.553 ± 15.191 ; $t_4 = -3.555$, $p = 0.007$) en el 71.4% de las células registradas (figura 10A-C), un 14.3% decremento la amplitud de las corrientes y en el otro 14.3% no cambia la amplitud de la corriente. En el análisis de PPR y las constantes de tiempo no se observó ningún cambio significativo (PPR: $t_4 = 1.59$, $p = 0.151$, CTP: $t_4 = -0.189$, $p = 0.855$, CTD: $t_4 = 0.722$, $p = 0.491$) (figura 10D-E).

6.1.2.2. Receptores a dopamina tipo D2

Se registraron las IPSC en presencia y ausencia del agonista de los RD2 (Quinelorane, $10\mu\text{M}$). Este agonista indujo un incremento en la amplitud de las corrientes en el 27.3% de los registros realizados y un decremento en el 54.5%, el otro 18.2% no presentó ningún cambio (figura 11C). El incremento en la amplitud de las IPSC fue del 57% respecto a la amplitud de las corrientes control, sin embargo no alcanzó una diferencia significativa. En los experimentos donde se observó decremento en las IPSC éste fue de 41% (Control 100.11 ± 0.26 vs Quinelorane 58.69 ± 3.046 $t_5 = 13.246$, $p = 0.00004$) (figura 11 A-B) y ni la proporción del pulso pareado ni las constantes de tiempo generaron cambio significativo (PPR: $t_5 = -0.325$, $p = 0.377$, CTP: $t_5 = -1.199$, $p = 0.132$, CTD: $t_5 = -0.794$, $p = 0.225$) (figura 11 D-E).



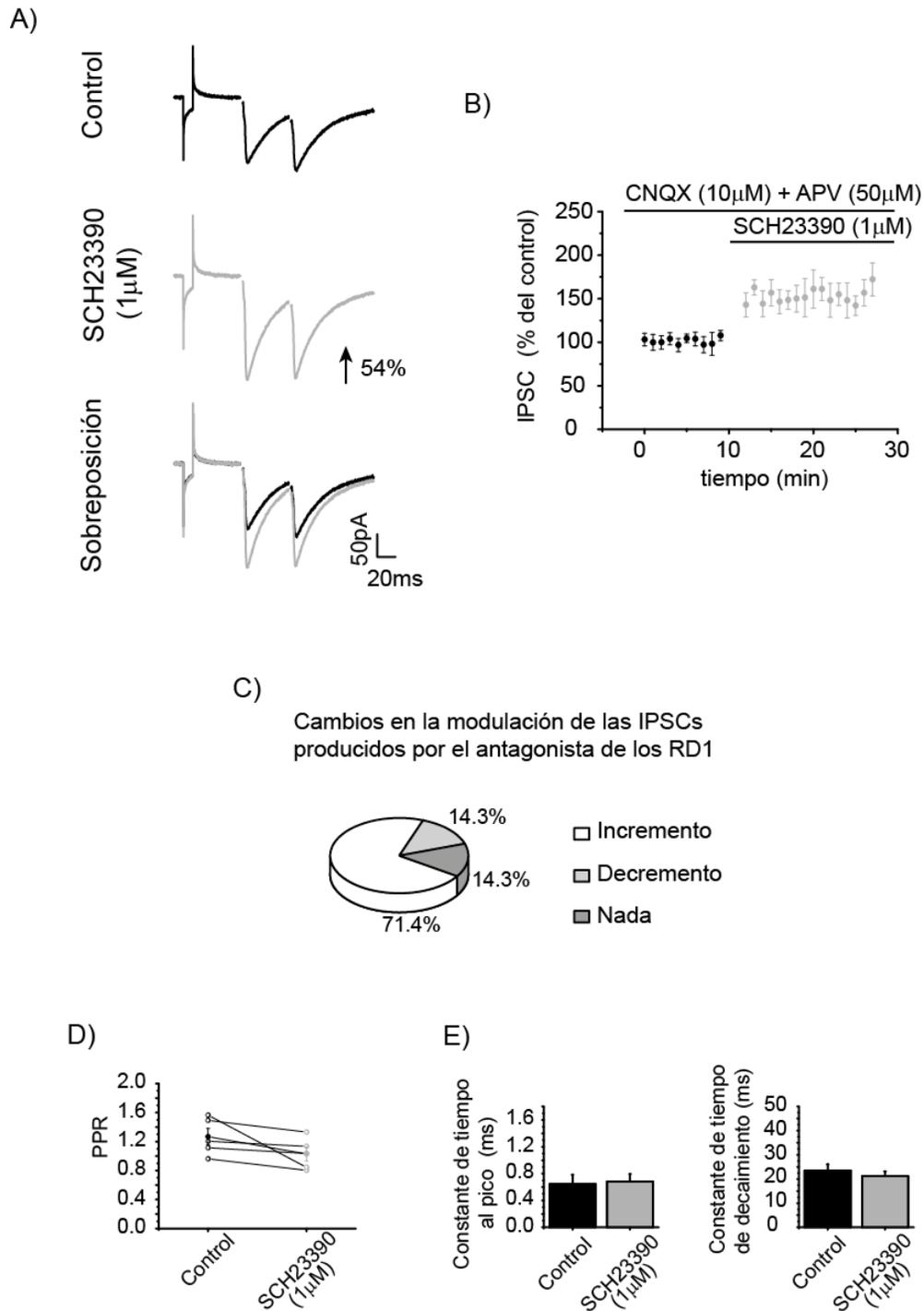


Figura 10. Efecto de la inhibición de los RD1. Trazos representativos de IPCP en ausencia y presencia de SCH23390 1µM (A) y su curso temporal (B). Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % de la modulación de las IPSC por el antagonista de los RD1. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en el control y en presencia del antagonista de RD1. E) Constantes al pico y de decaimiento de las corrientes inhibitorias en el control y en presencia de SCH23390. n que incrementaron las IPSC=5, n que decrementaron las IPSC=1 y n que no cambio=1.



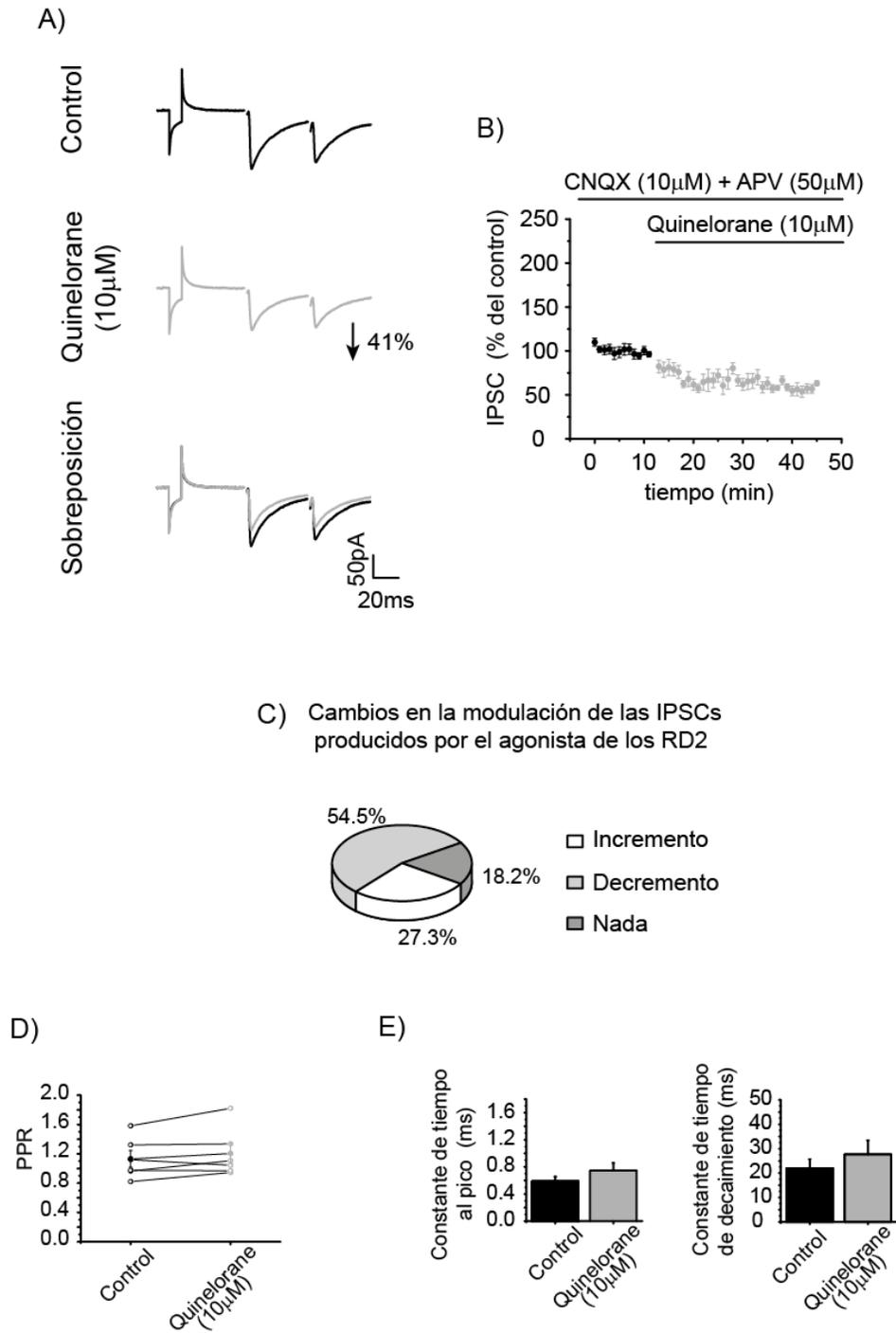


Figura 11. Efecto de la activación de los RD2. Trazos representativos de IPSC en ausencia y presencia del Quinelorane 10µM (A) y su curso temporal (B). Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % de la modulación de las IPSC por el agonista de los RD2. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo (PPR) en el control y en presencia del agonista de RD2. E) Constantes al pico y de decaimiento de las corrientes inhibitorias en el control y en presencia de Quinelorane. n que incrementaron las IPSC=3, n que decrementaron las IPSC=6 y n que no cambio=2.



El Sulpiride, antagonista de los RD2 ($1\mu\text{M}$) no moduló las corrientes sinápticas inhibitorias del NE ($t_4=-0.725$, $p=0.245$) (figura 12A-C), por tanto tampoco hubo cambios en la PPR ($t_4=-0.336$, $p=0.373$) (figura 12D).

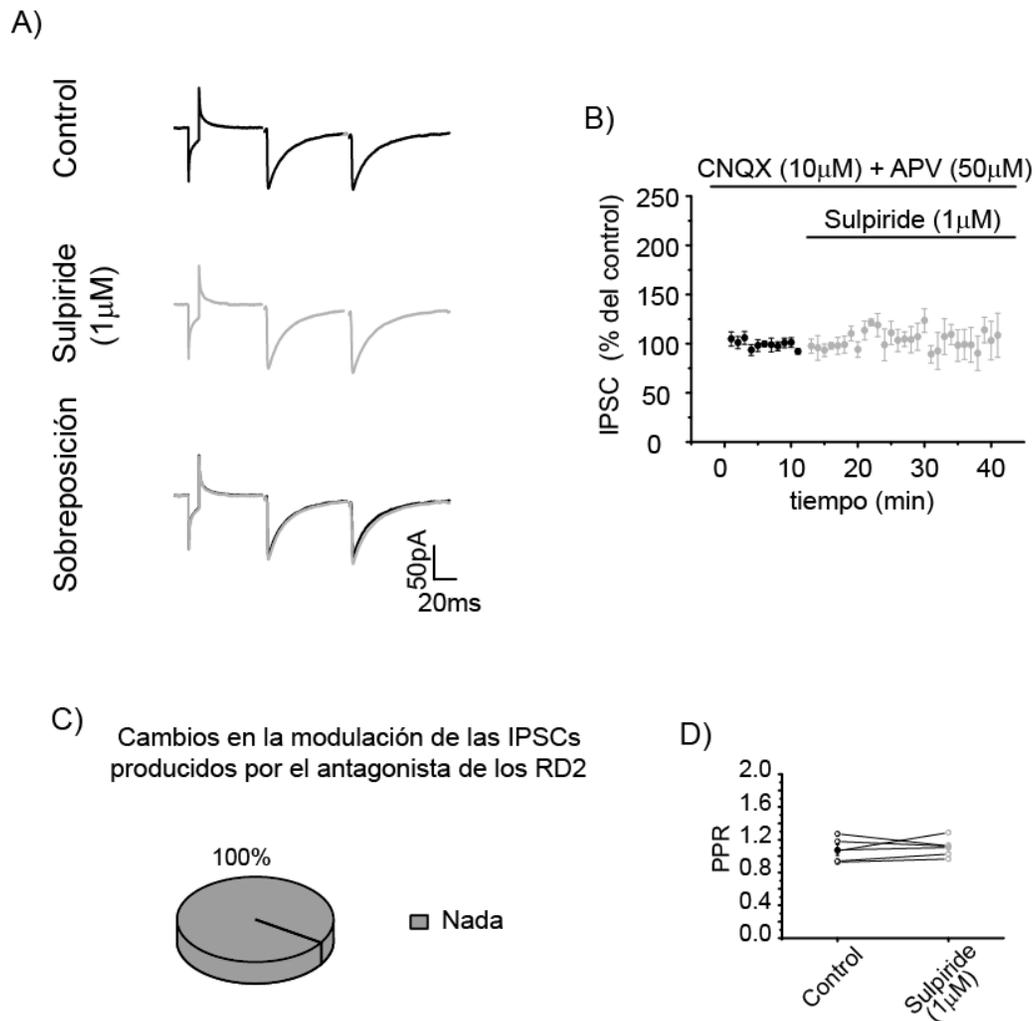


Figura 12. Efecto de la inhibición de los RD2. Trazos representativos de IPSC en ausencia y presencia de Sulpiride $1\mu\text{M}$ (A) y su curso temporal (B). Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % de la modulación de las IPSC por el antagonista de los RD2. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo (PPR) en el control y en presencia del antagonista de RD2. n que no cambio=5.

6.1.2.3. Dopamina (200nM y 20μM)

Para completar el estudio de la modulación Dopaminérgica también se evaluó el efecto de la DA sobre la transmisión GABAérgica, a dos diferentes concentraciones: 200nM y 20μM.

Nosotros encontramos que a bajas concentraciones de DA (200nM) la amplitud de las IPSC decreció en un 54.5% comparadas con el control ($t_2=5.968$, $p=0.027$) (figura 13A-B). Este decremento fue observado en el 42.9% de los registros (figura 13C), los cuales no presentaron cambios significativos ni en la PPR ni en las constantes de tiempo (figura 13D-E). En el restante 57.1% de los registros no se observó ningún cambio en la amplitud de las corrientes.

En concentraciones altas de DA (20μM) el 53.8% de los registros no generó modulación y el 38.5% produjo un decremento en la amplitud de las corrientes, disminuyéndolas un 39.9% respecto al control ($t_4=3.150$, $p=0.0345$) (figura 14A-C). La PPR no exhibe ningún cambio significativo ($t_4=1.171$, $p=0.307$) (figura 14D), además la constante al pico incremento significativamente en un 28% comparada con el control ($t_4=3.393$, $p=0.0275$) (figura 14E) y la constante de decaimiento permanece igual ($t_4=1.928$, $p=0.12$). Estos datos sugieren que la modulación de DA a altas concentraciones (20μM), sobre la transmisión GABAérgica, se da a través de un mecanismo postsináptico.



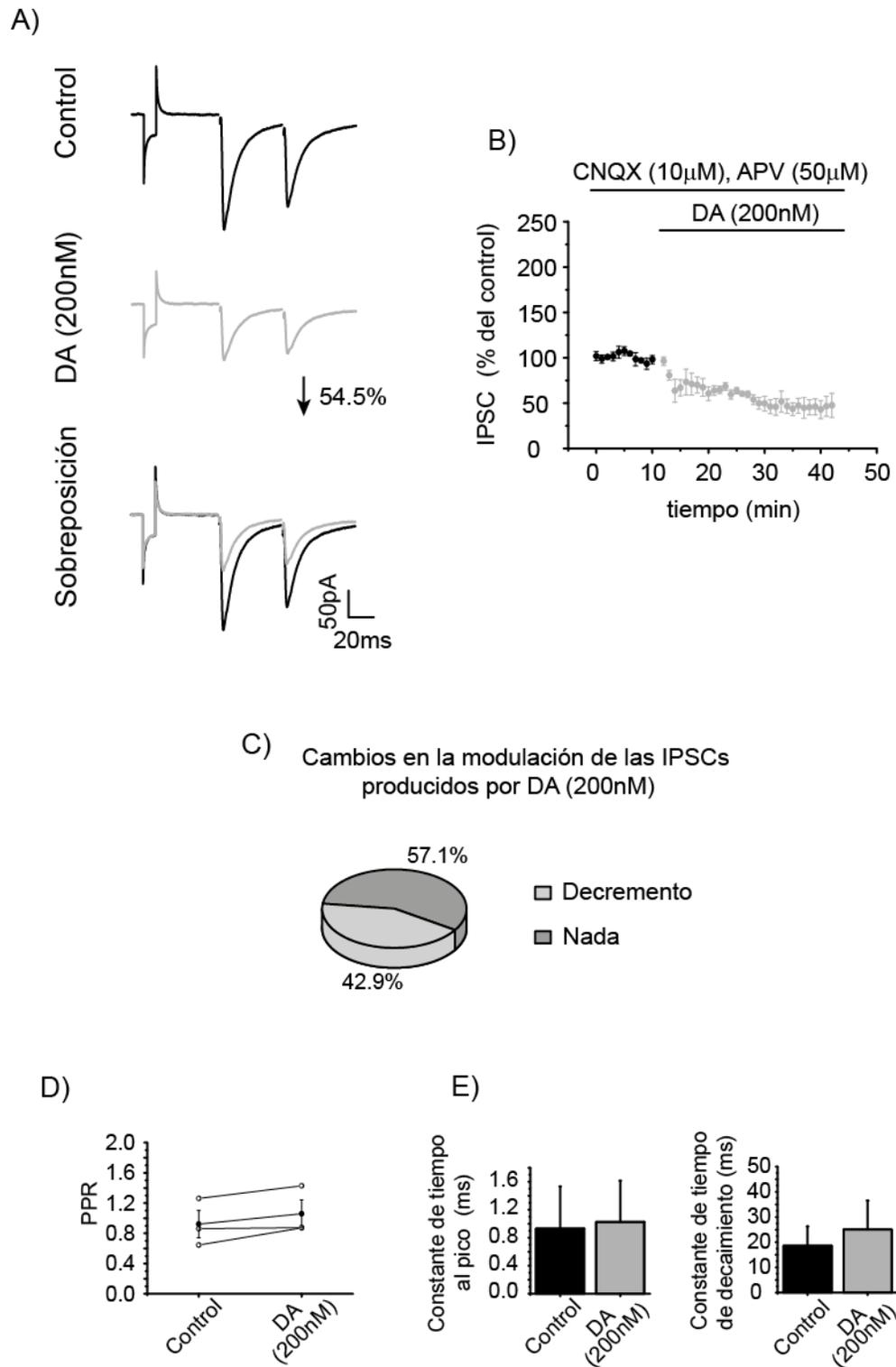


Figura 13. Efecto de la DA 200nM. Trazos representativos de IPSC en ausencia y presencia de DA (200nM) (A) y su curso temporal (B). Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % de la modulación de las IPSC por la DA 200nM. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo (PPR) en el control y en presencia de la DA. E) Constantes al pico y de decaimiento de las corrientes inhibitorias en el control y en presencia de DA a 200nM. n que decremantan las IPSC=3 y n que no cambio=4.



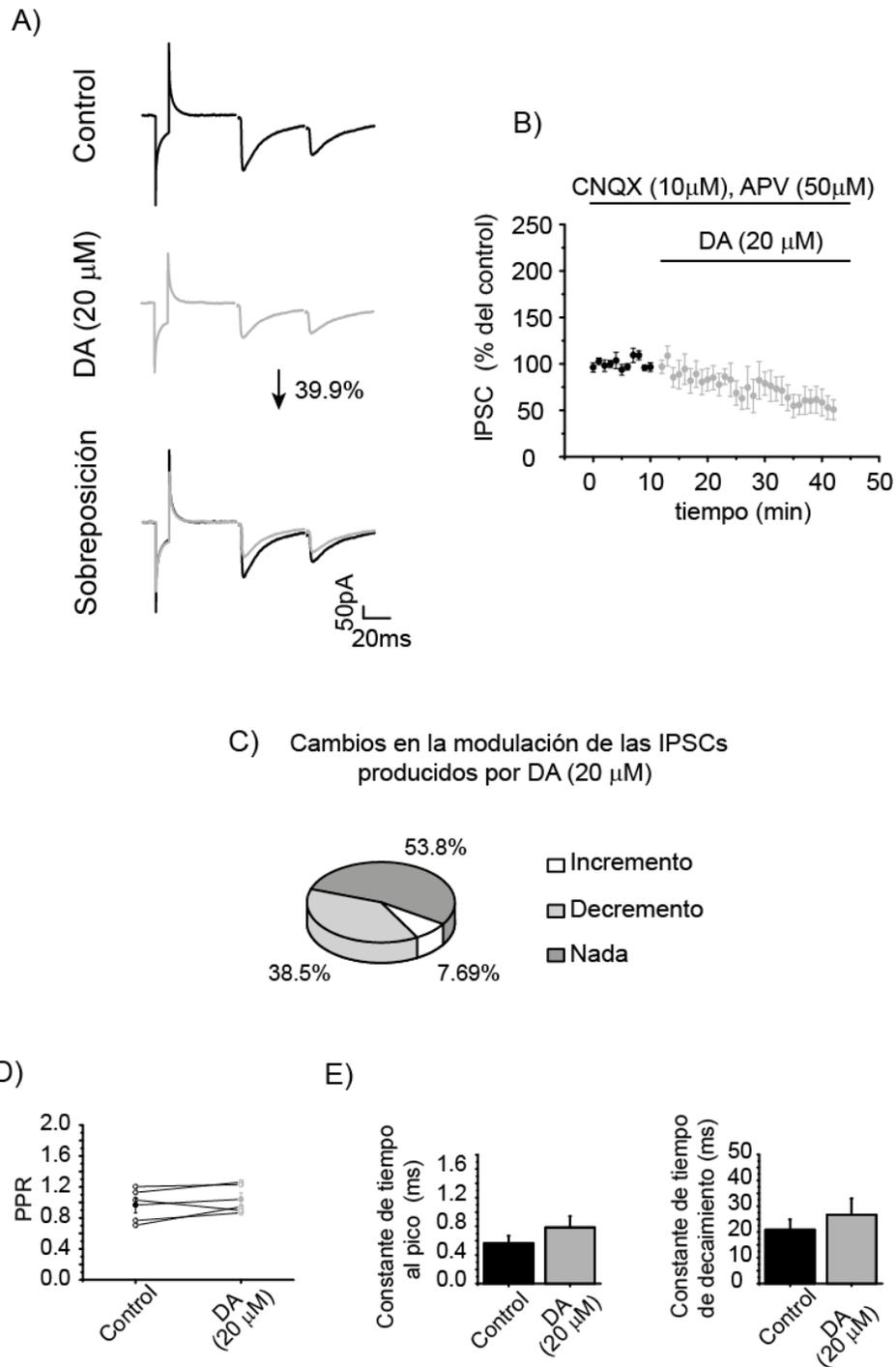


Figura 14. Efecto de la DA 20 μ M. A) Trazos representativos de IPSC en ausencia y presencia de DA (20 μ M). B) Curso temporal de la amplitud de las IPSC en presencia y ausencia de DA. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % de la modulación de las IPSC por la DA 20 μ M. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo (PPR) en el control y en presencia de la DA. E) Constantes al pico y de decaimiento de las corrientes inhibitorias en el control y en presencia de DA a 20 μ M. n que incrementaron las IPSC=1, n que decrementaron las IPSC=5 y n que no cambio=7.

6.1.3. Plasticidad sináptica

6.1.3.1. Registros control

En la figura 15A se presentan los trazos de las IPSC antes y después de la estimulación de alta frecuencia, como se puede observar después de la HFS disminuyó la amplitud de las corrientes por más de 30 minutos, generando así una depresión a largo plazo (LTD) (figura 15B).

La LTD observada se indujo en el 50% de las células registradas mostrando una disminución del 49% respecto al control ($t_6=5.919$, $p<0.001$). En el 42.9% de los registros no se observó ningún cambio en la amplitud de la corriente después de la HFS y solo en un 7.14% se presentó un incremento en la amplitud después de la HFS que duró más de 30 minutos generando potenciación a largo plazo (LTP) (figura 15C). En estos registros la PPR pre y pos HFS no presento cambios significativos ($t_6=-0.787$, $p=0.454$; figura 15D). Así mismo, en las constantes de tiempo no hubo ningún cambio significativo entre la constante de tiempo al pico antes y después de la HFS ($t_6=-1.235$, $p=0.245$), ni tampoco en la constante de decaimiento ($t_6=36$, $p=0.699$; figura 15E); por lo que no podemos concluir si el mecanismo de la LTD es pre o postsináptico.

Una vez mostrado que las sinapsis inhibitorias presentan plasticidad sináptica, en su forma de LTD, se procedió a analizar si la plasticidad era modulada por los receptores a DA. Para lo cual se utilizaron tanto agonistas como antagonistas de los distintos tipos de receptores.

6.1.3.2. Papel de los receptores a dopamina tipo D1

En presencia del SKF81297, agonista de los RD1, se obtuvo LTD después de la estimulación de alta frecuencia. Interesantemente esta LTD se generó en todos los registros realizados, siendo esta del 35% ($t_6=77$, $p<0.001$; figura 16A-C).

El análisis de la constante al pico y de decaimiento, no presentaron ningún cambio significativo (CTP: $t_6=-0.711$, $p=0.490$, CTD: $t_6=-0.943$, $p=0.364$; figura 16D). En el PPR se puede ver una tendencia a incrementar después del tren de estimulación (figura 16E), sin embargo este incremento no fue significativo ($t_6=-1.184$, $p=0.259$).



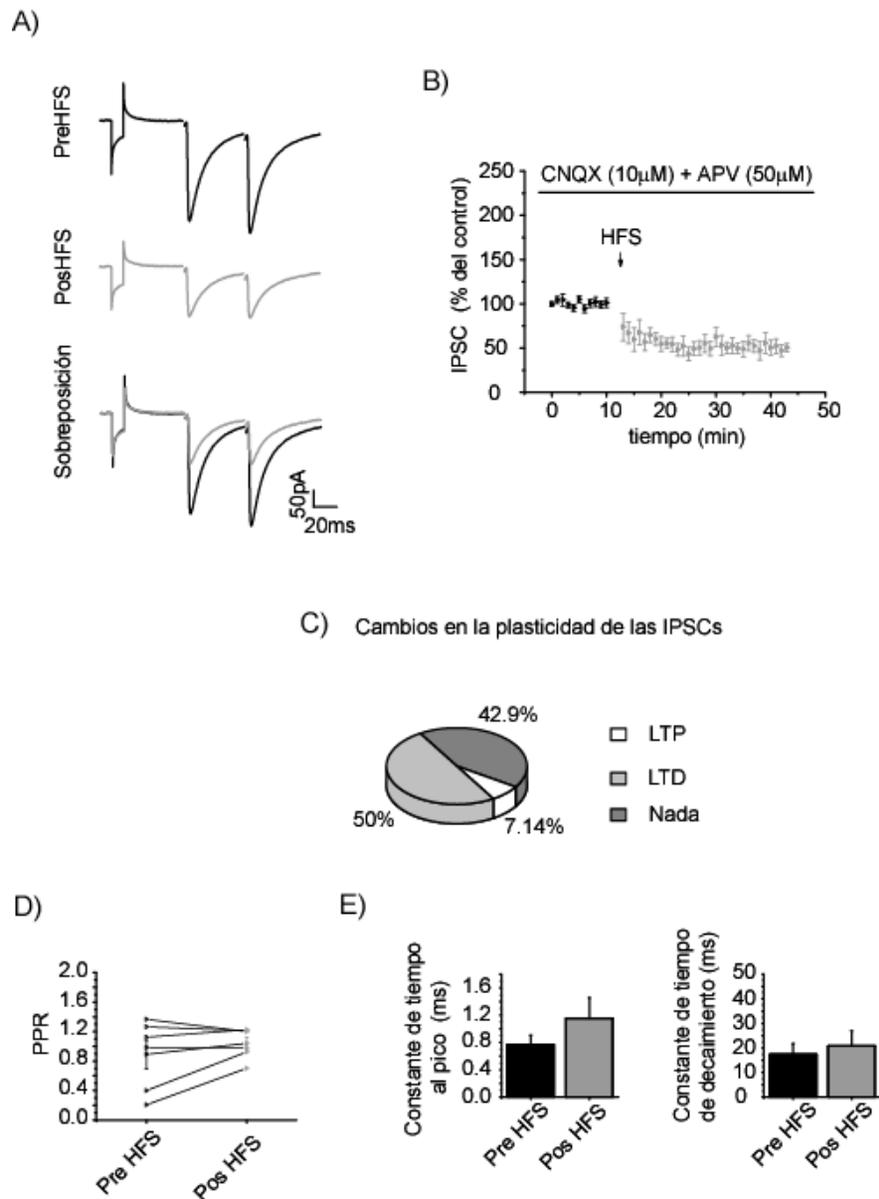


Figura 15. Plasticidad sináptica GABAérgica. A) Trazos representativos de IPSC antes y después de una estimulación de alta frecuencia (HFS: Estimulación de alta frecuencia, 3 trenes de 3s a 100Hz con intervalo de 10s). B) Curso temporal de la amplitud de las IPSC antes y después de una HFS. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. Como se puede notar la corriente inhibitoria disminuye después de la HFS generando una LTD. C) Cambios en % del tipo de plasticidad que generan las IPSC después de una HFS. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en el control y después de la HFS. E) Constante al pico y de decaimiento de las corrientes antes y después de la estimulación. n con LTP=1, n con LTD=7 y n que no cambio=6.

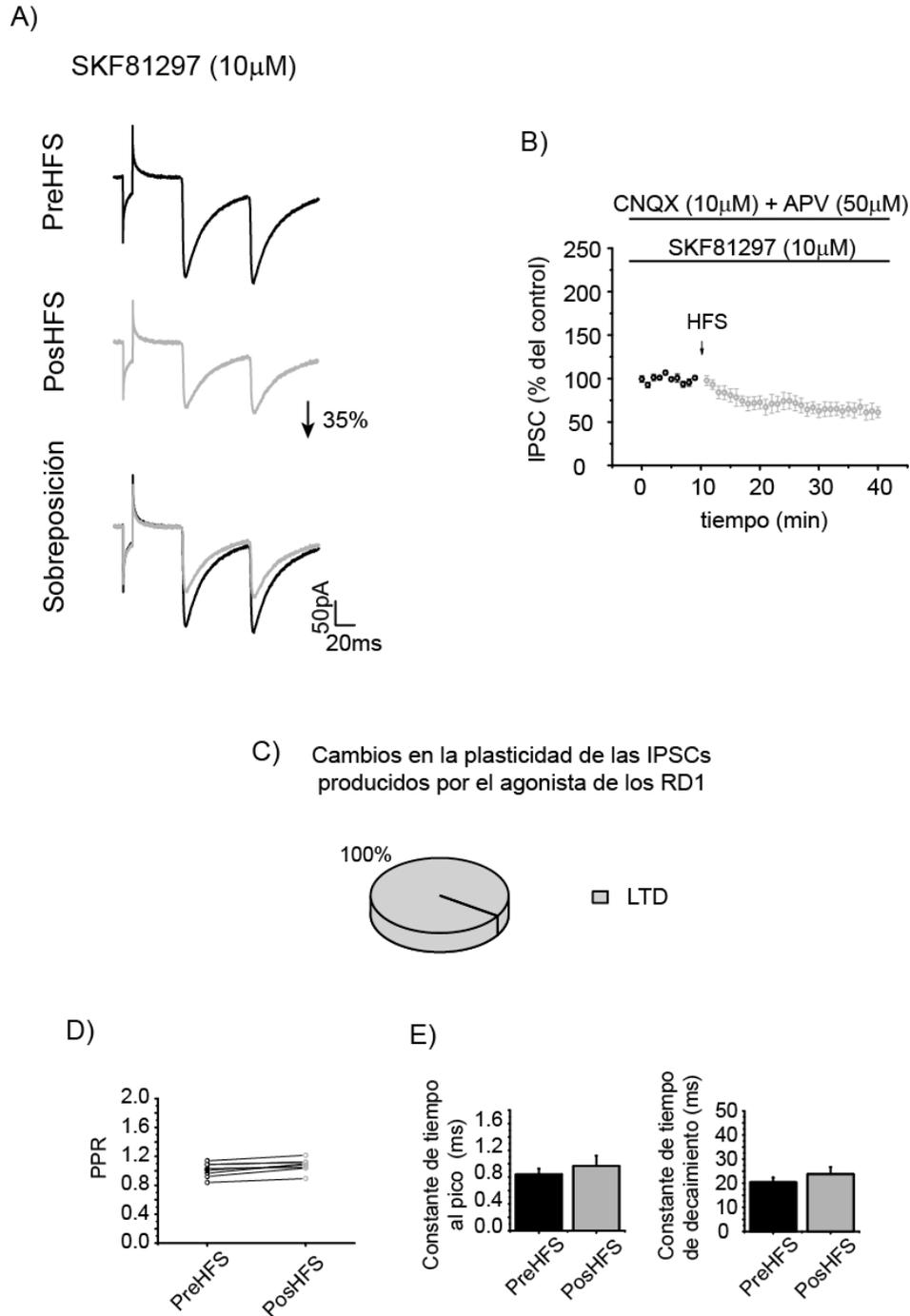


Figura 16. Efecto de la activación de los RD1 sobre la plasticidad sináptica. A) Trazos representativos de IPSC en presencia del agonista de los RD1 (SKF81297) antes y después de una estimulación de alta frecuencia (HFS: Estimulación de alta frecuencia, 3 trenes de 3s a 100Hz con intervalo de 10s). B) Curso temporal de la amplitud de las IPSC en presencia de SKF81297 antes y después de una HFS. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % del tipo de plasticidad que generan las IPSC en presencia del agonista de los RD1. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en presencia del SKF81297 y después de la HFS. E) Constantes de tiempo de las corrientes, constante al pico y de decaimiento, en presencia de SKF81297 antes y después de la estimulación de la HFS. n con LTD=7.



Continuando con el análisis modulador de la plasticidad de las sinapsis GABAérgicas, agregamos el antagonista de los RD1 (SCH23390) y después de la HFS se observó una LTD en el 77.8% de los registros, ésta depresión fue del 40% respecto al control ($t_6=10.042$, $p<0.001$; figura 17A-C). No se presentó ningún cambio significativo en las constantes de tiempo ni en la PPR (CTP: $t_6=-0.556$, $p=0.589$, CTD: $t_6=-0.897$, $p=0.387$, PPR: $t_6=0.392$, $p=0.702$; figura 17D, E).

6.1.3.3. Papel de los receptores a dopamina tipo D2

En presencia del agonista de los RD2 y después de la HFS se obtuvo una respuesta diferencial, en el 50% de los registros se observó LTD, el 28.6% presentó LTP y un 21.4% no generó ningún cambio en la amplitud de las IPSC después del tren (figura 18C). El incremento de la LTP fue del 57% respecto a la amplitud de las corrientes pre HFS ($t_3=-5.685$, $p=0.0024$; datos no mostrados) mientras que el decremento observado en la LTD fue del 45.06% ($t_6=5.838$, $p=0.001$; figura 18A-B). Los experimentos que generaron LTP muestran una disminución significativa en la PPR ($t_3=2.398$, $p=0.0373$) y no muestran ningún cambio en las constantes de tiempo (CTP: $t_3=8$, $p=0.400$, CTD: $t_3=1.133$, $p=0.160$) por lo que la LTP generada en presencia de Quinelorane tiene un mecanismo presináptico. Por otra parte la LTD que se generó no presentó cambios ni en la PPR ni en las constantes de tiempo (PPR: $t_6=12$, $p=0.700$, CTP: $t_6=-0.733$, $p=0.252$, CTD: $t_6=0.239$, $p=0.411$; figura 18D-E).

Por su parte en presencia del antagonista a los RD2 (Sulpiride) a $1\mu\text{M}$, ya casi no se genera LTD. La amplitud de las IPSC disminuyen tan solo un 27.8% después de la estimulación de alta frecuencia, en todos los registros ($t_7=4.933$, $p=0.00169$; figura 19A-C). Ni la PPR ni las constantes de tiempo generaron cambios (figura 19D-E). Fue necesario incrementar la concentración de Sulpiride a $10\mu\text{M}$ para abolir completamente la LTD ($t_4=-1.182$ $p=0.303$; figura 19F-G). Esto demuestra que la activación de los RD2 es muy importante para la inducción de la LTD en las sinapsis GABAérgicas del estriado, pues si bloquean los RD2 se pierde la LTD.



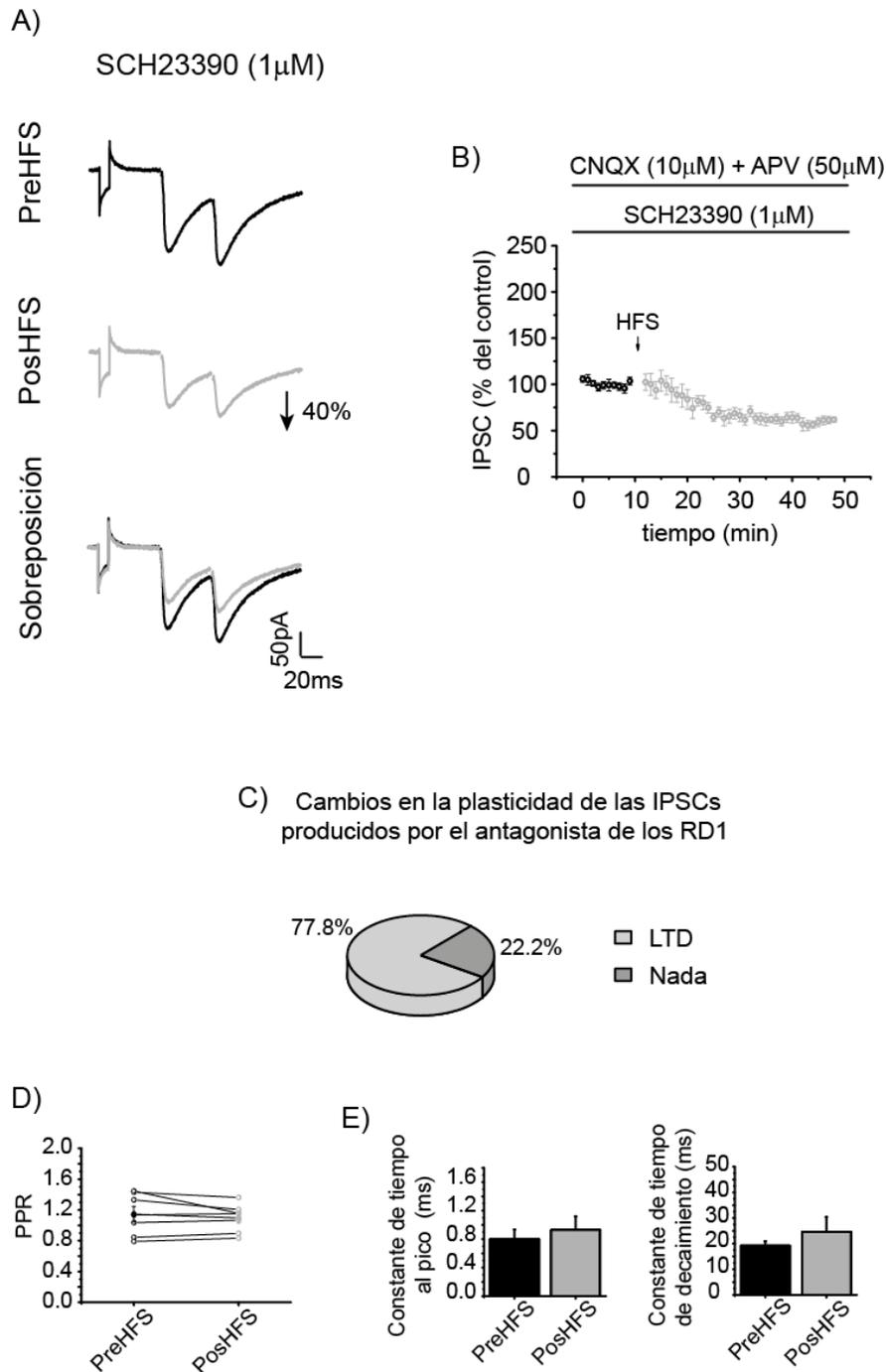


Figura 17. Efecto de la inhibición de los RD1 sobre la plasticidad sináptica. A) Trazos representativos de IPSC en presencia del antagonista de los RD1 (SCH23390) antes y después de una HFS (HFS: Estimulación de alta frecuencia, 3 trenes de 3s a 100Hz con intervalo de 10s). B) Curso temporal de la amplitud de las IPSC en presencia de SCH23390 antes y después de una HFS. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % del tipo de plasticidad que generan las IPSC en presencia del antagonista de los RD1. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en presencia del SCH23390 y después de la HFS. E) Constante al pico y de decaimiento en presencia de SCH23390 antes y después de la estimulación de la HFS. n con LTD=7 y n que no cambio=2.



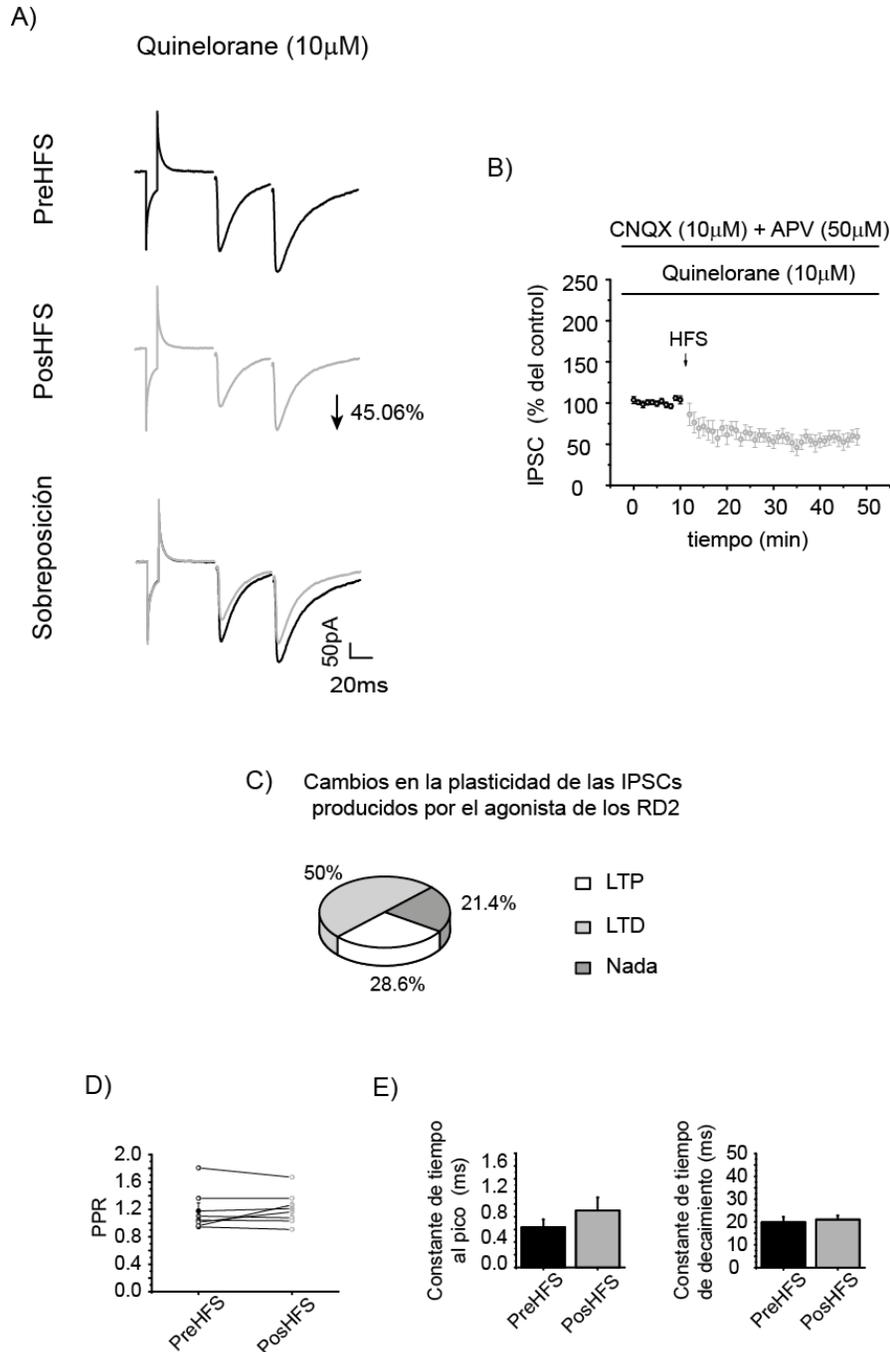


Figura 18. Efecto de la activación de los RD2 sobre la plasticidad sináptica. A) Trazos representativos de IPSC en presencia del agonista de los RD2 (Quinelorane) antes y después de una estimulación de alta frecuencia (HFS: Estimulación de alta frecuencia, 3 trenes de 3s a 100Hz con intervalo de 10s). B) Curso temporal de la amplitud de las IPSC en presencia de Quinelorane antes y después de una HFS. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % del tipo de plasticidad que generan las IPSC en presencia del agonista de los RD2. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en presencia de Quinelorane y después de la HFS. E) Constante al pico y de decaimiento en presencia de Quinelorane antes y después de la estimulación de alta frecuencia. n con LTP=4, n con LTD=7 y n que no cambio=3.



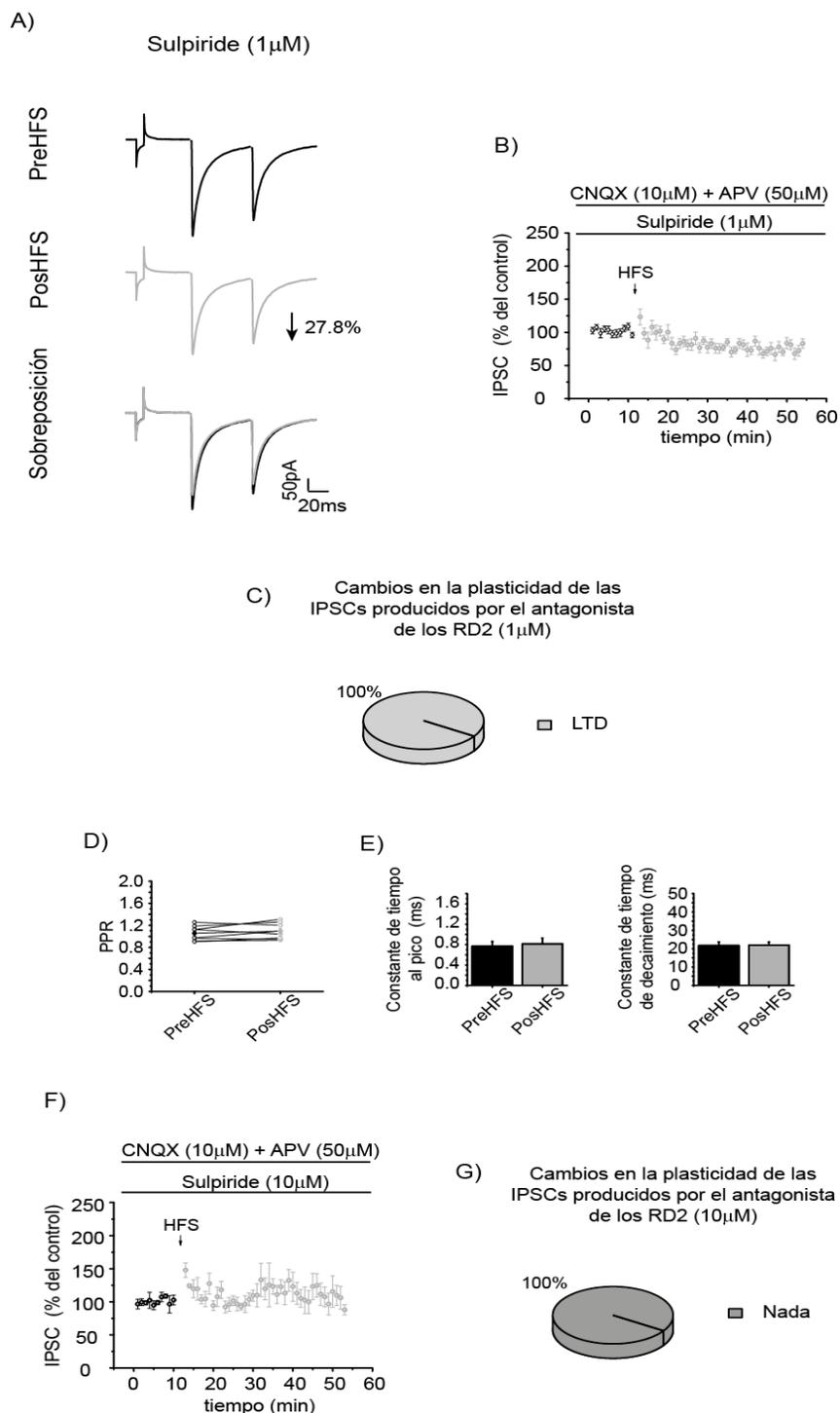


Figura 19. Efecto de inhibición de los RD2 sobre la plasticidad sináptica a diferentes concentraciones. Trazos representativos de las IPSC en presencia del antagonista de los RD2 (Sulpiride, 1 μ M) antes y después de una HFS (A) y su curso temporal (B). Los datos expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % del tipo de plasticidad que generan las IPSC en presencia del antagonista de los RD2. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en presencia del Sulpiride 1 μ M y después de la HFS. E) Constante al pico y de decaimiento en presencia de Sulpiride antes y después de la HFS. n con LTD=8. F) Curso temporal de la amplitud de las IPSC en presencia de Sulpiride 10 μ M antes y después de una HFS. G) Cambios en % del tipo de plasticidad que generan las IPSC en presencia del antagonista de los RD2 10 μ M. Como se puede apreciar a esta concentración de Sulpiride (10 μ M) ya no se genera la LTD y por lo tanto la activación de estos receptores es indispensable para la generación de la LTD. n que no cambio=5.



6.1.3.4. *Papel de la dopamina (200nM y 20μM)*

Se evaluó el papel de la DA en la plasticidad GABAérgica utilizando dos concentraciones: 200nM y 20μM. A 200nM la estimulación de alta frecuencia genera LTD en el 60% de los registros (figura 20A-C). En esta LTD las corrientes disminuyeron un 73.11% comparadas con las corrientes antes de la HFS ($t_2=10.255$, $p=0.00938$). La DA a esta concentración no genera cambios en la PPR ni en la cinética de la corriente (figura 20D-E). En el 20% de los registros se generó LTP y en el otro 20% no se presentó plasticidad (figura 20C).

Por otro lado la concentración alta de DA (20μM) induce un incremento significativo en la amplitud de las IPSC, después de la estimulación de alta frecuencia ($t_5=1.826$, $p=0.125$; figura 21A-B). El 50% de los registros generó esta LTP, el 25% generó LTD y el otro 25% no produjo cambios en la amplitud de las corrientes después de la HFS (figura 21C). En la LTP el incremento fue del 32% comparado con la amplitud de la corriente antes de la HFS. La PPR no cambió y las constantes de tiempo tampoco (figura 21D-E).



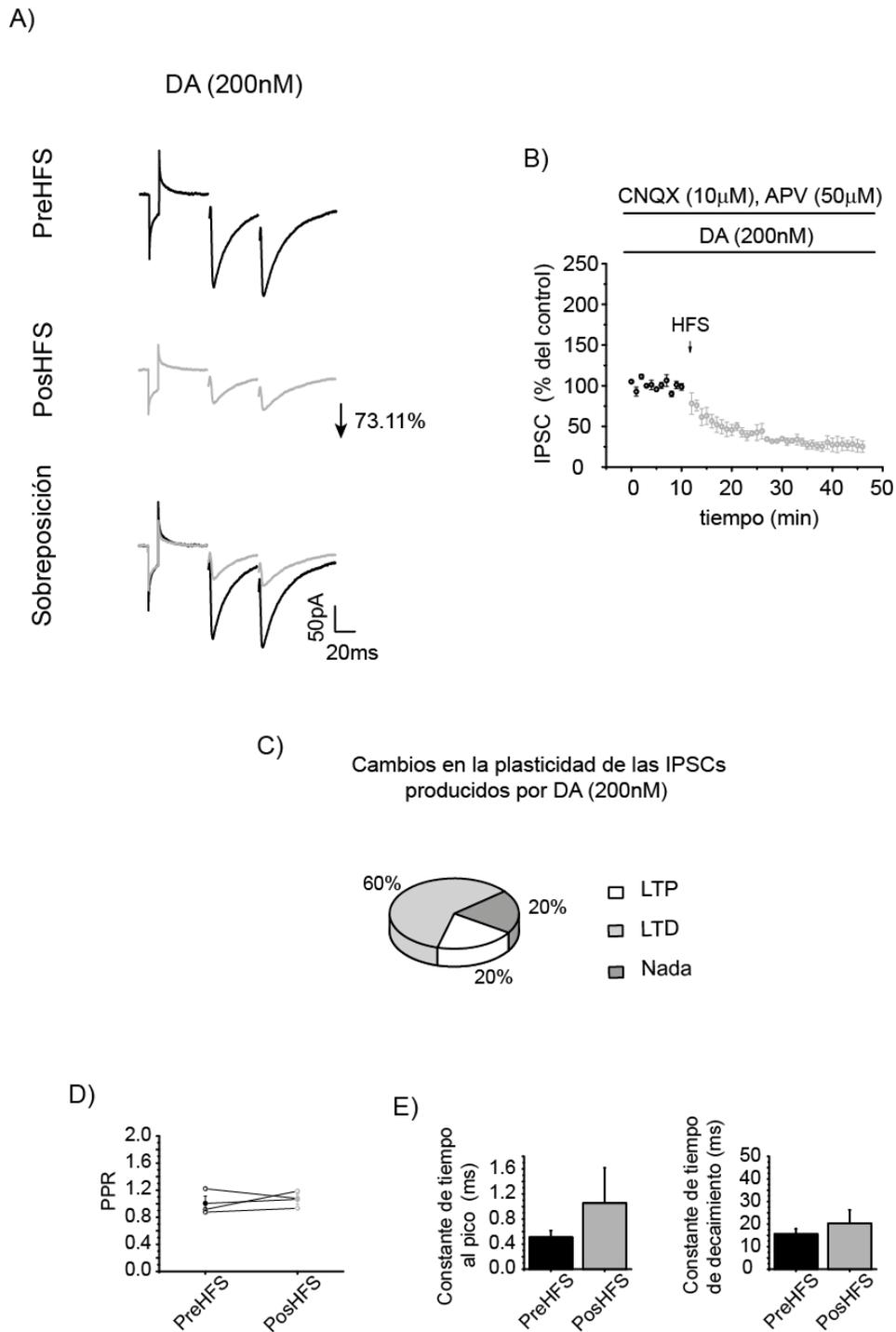


Figura 20. Efecto de la DA 200nM sobre la plasticidad sináptica. A) Trazos representativos de IPSC en presencia de DA 200nM antes y después de una estimulación de alta frecuencia (HFS: Estimulación de alta frecuencia, 3 trenes de 3s a 100Hz con intervalo de 10s). B) Curso temporal de la amplitud de las IPSC en presencia de DA antes y después de una HFS. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % del tipo de plasticidad que generan las IPSC en presencia de DA 200nM. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en presencia de DA y después de la HFS. E) Constante al pico y de decaimiento en presencia de DA 200nM antes y después de la estimulación de alta frecuencia. n con LTP=1, n con LTD=3 y n que no cambio=1.



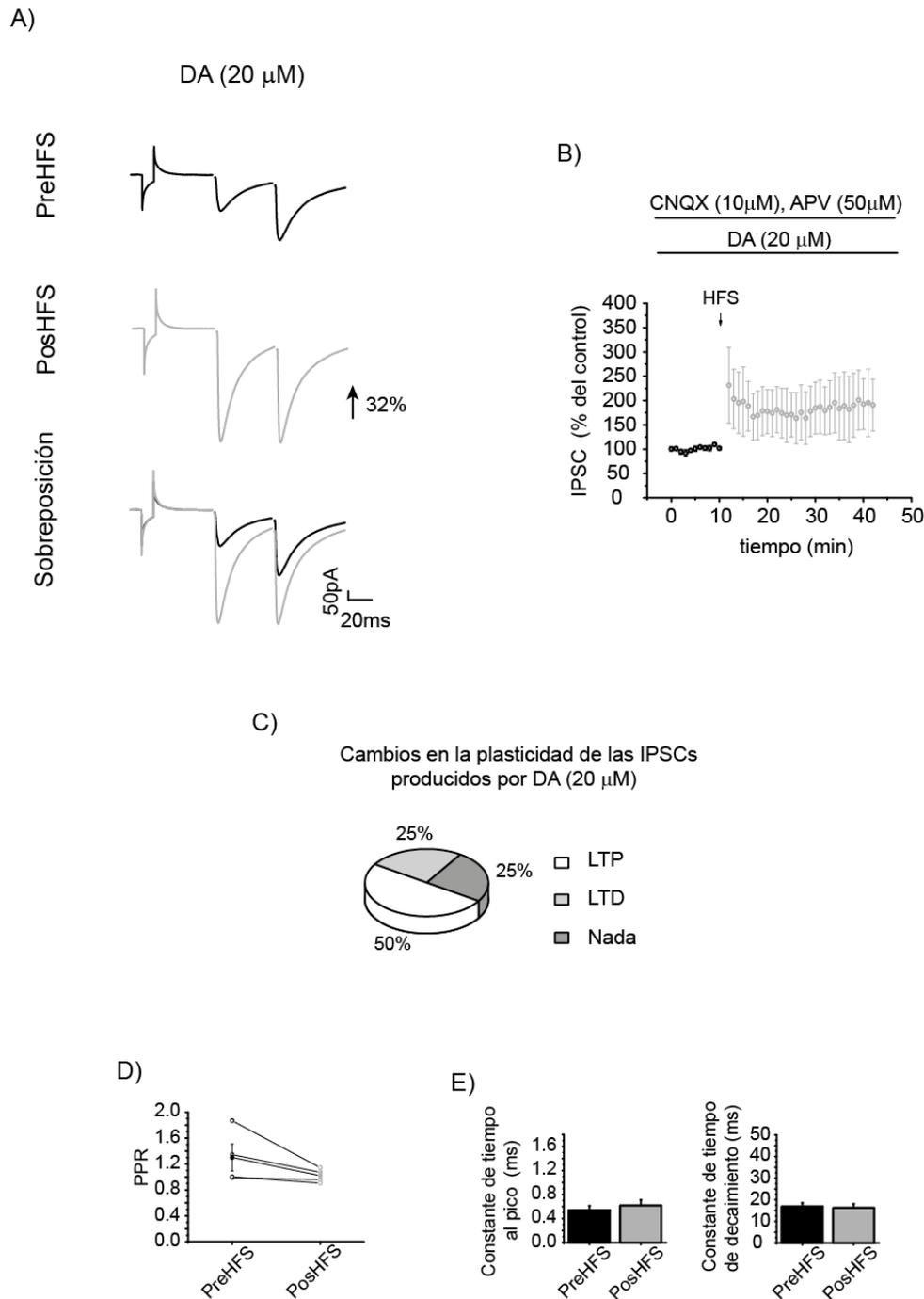


Figura 21. Efecto de la DA 20 μ M sobre la plasticidad sináptica. Trazos representativos de las IPSC en presencia de DA antes y después de una HFS (A) y su curso temporal (B). Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Cambios en % del tipo de plasticidad que generan las IPSC en presencia de DA 20 μ M. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en presencia de DA y después de la HFS. E) Constante al pico y de decaimiento en presencia de DA 20 μ M antes y después de la estimulación de alta frecuencia. n con LTP=6, n con LTD=3 y n que no cambio=3.



Como se observa, el Sulpiride previene la generación de LTD, pues la activación de los RD2 es necesaria para su generación. En el caso de la LTD obtenida a baja concentración de DA (200nM), también es prevenida en presencia de Sulpiride (figura 22A-B); por su parte la LTP generada en presencia de DA a alta concentración (20 μ M) no se ve modificada en presencia de Sulpiride (figura 22B-D). Indicando que la DA a bajas concentraciones genera la LTD por el mismo mecanismo que depende de la activación de los RD2; mientras que a altas concentraciones se genera una LTP que no depende de los RD2. En ninguno de los dos casos se observó cambios en la PPR (figura 22C).

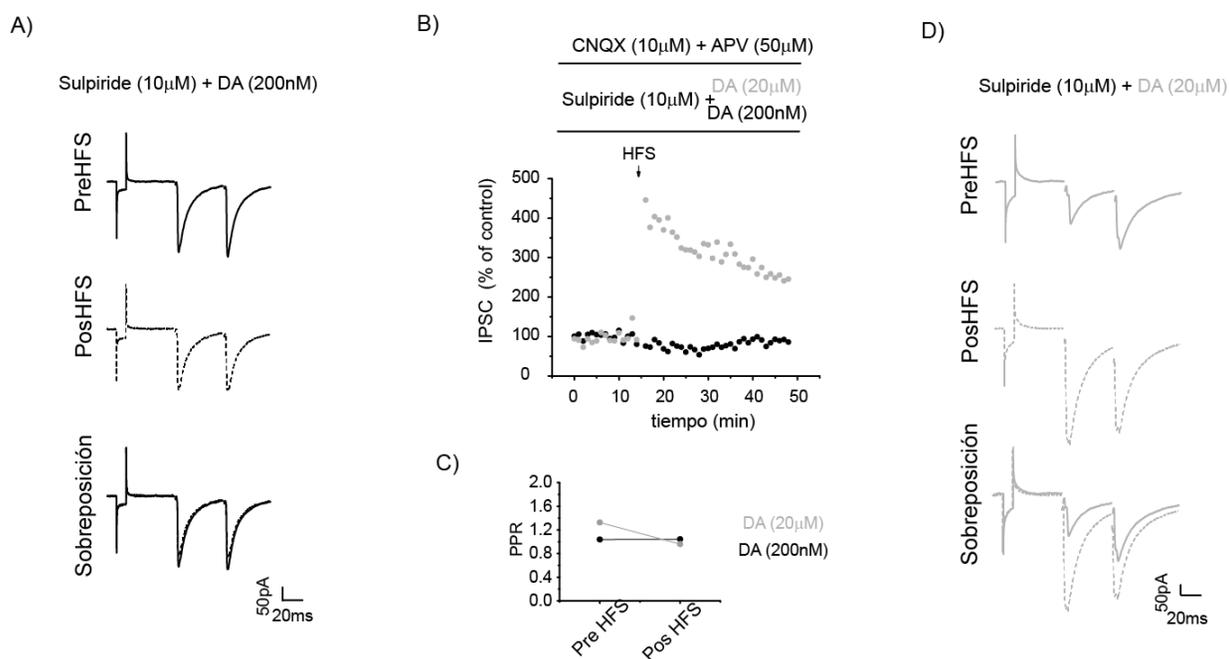


Figura 22. Efecto de la DA 200nM y 20 μ M sobre la plasticidad sináptica en presencia de Sulpiride. Trazos representativos de IPSC en presencia de DA 200nM y Sulpiride antes y después de una HFS (A) y de DA 20 μ M y Sulpiride antes y después de la HFS (D); Sus cursos temporales (B) puntos negros: DA 200nM y Sulpiride, puntos grises: DA 20 μ M y Sulpiride. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en presencia de Sulpiride y DA 200nM (puntos negros) ó Sulpiride y DA 20 μ M (puntos grises) antes y después de la HFS.

6.1.3.5. Vía dopaminérgica involucrada (Ratones BAC D1-GFP)

Como observamos en nuestros resultados los dos tipos de NEM generan LTD, pues se puede generar en el 100% de nuestros registros, sin embargo la LTP la obtuvimos máximo en el 50% de los registros y con altas concentraciones de DA, entonces nos preguntamos si solo un tipo de NEM genera este tipo de plasticidad.

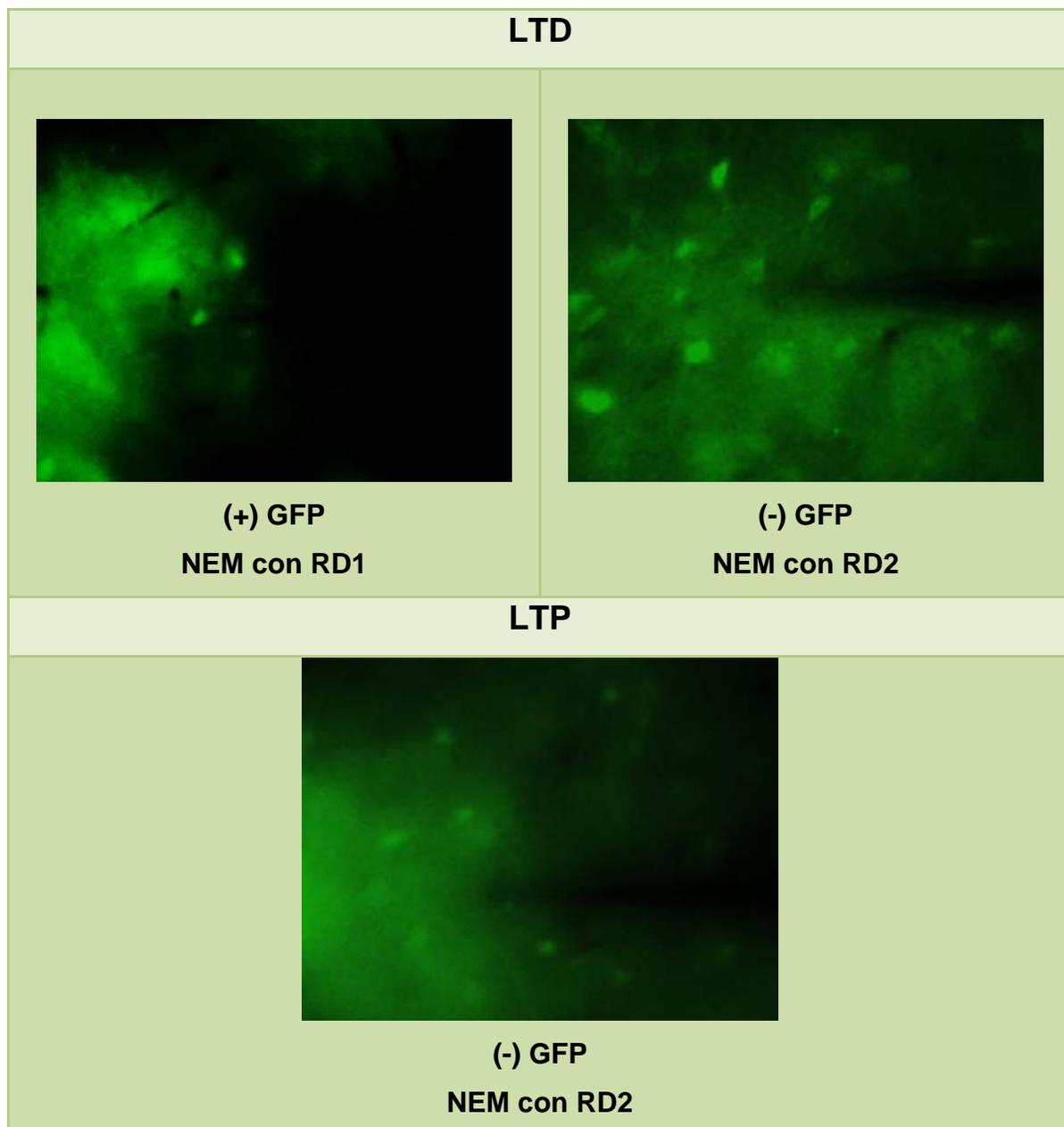


Figura 23. Imágenes de células registradas que generaron LTD ó LTP en las sinapsis GABAérgicas. Se puede observar que la LTD fue generada tanto en NEM que expresaban GFP-D1 como las que no la expresaban, mientras que la LTP solo se observó en las NEM que no expresaban GFP-D1. Nota que la fluorescencia se observa en la punta del electrodo, las células donde no se ve la fluorescencia fueron consideradas como NEM que expresan RD2.

Con ratones BAC D1-GFP identificamos el tipo de plasticidad que se genera en los diferentes tipos de NEMs. De los registros realizados en estos ratones, 4/13 no generaron plasticidad, 6/13 generaron LTD y 3/13 LTP. Los que generaron LTD fueron: tres positivos a BAC D1-GFP y tres negativos; y de los que generaron LTP los tres fueron negativos a BAC D1-GFP (figura 23).

6.1.3.6. El papel de PKA (H89) y los canales de calcio tipo L (Nifedipina)

En un esfuerzo por elucidar cual sería la vía de señalización río abajo de los receptores a DA para la generación de LTD GABAérgico, bloqueamos a la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) con H-89 y a los canales de calcio tipo L con Nifedipina los cuales se han visto involucrados en la LTD estriatal glutamatérgica.

El H89, inhibidor de PKA, se colocó dentro de la solución interna del electrodo de registro y se obtuvieron las IPSC antes y después de la estimulación de alta frecuencia. La figura 24 muestra como en presencia de H89 la LTD no se genera, las corrientes inhibitorias permanecen iguales antes y después de la estimulación de alta frecuencia ($t_4 = -0.0617$, $P = 0.954$). La activación de PKA también es indispensable en la generación de la LTD GABAérgica estriatal. Porque es la vía que se activa tras la activación de D1.



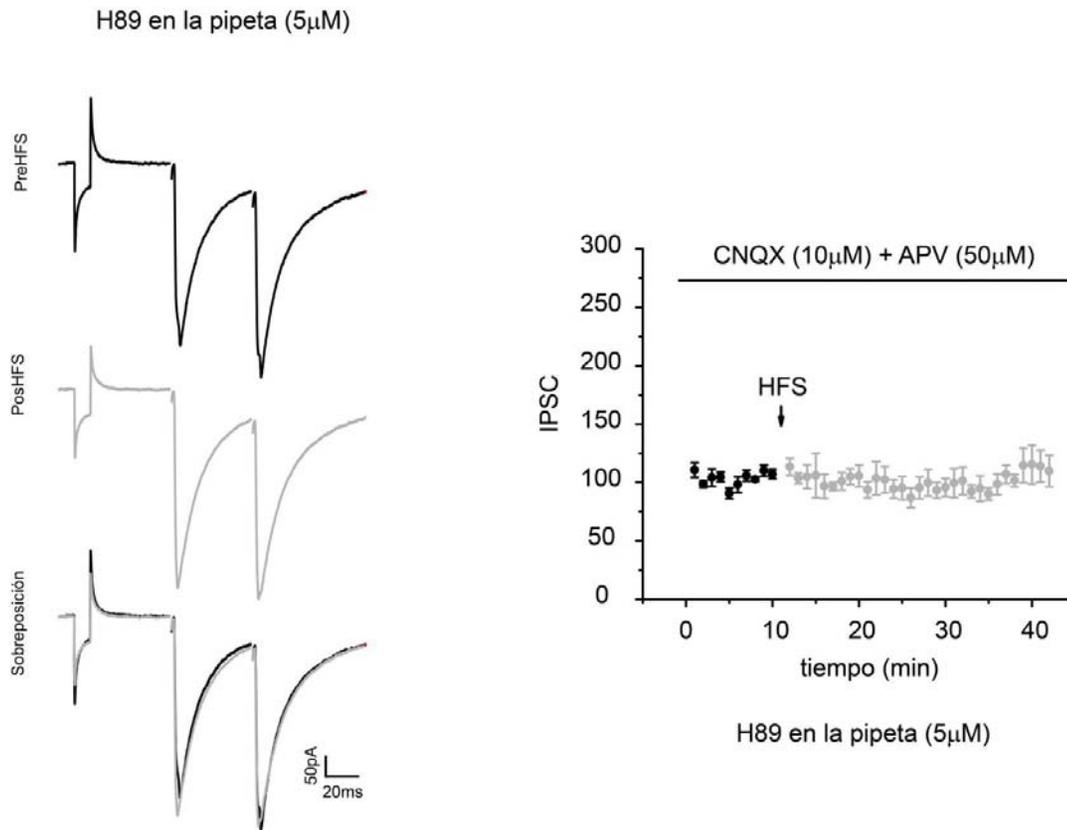


Figura 24. Efecto de PKA sobre la plasticidad sináptica. Izquierda: Trazos representativos de las IPSC con H89 (inhibidor de PKA) dentro de la pipeta, antes y después de una estimulación de alta frecuencia (HFS: Estimulación de alta frecuencia, 3 trenes de 3s a 100Hz con intervalo de 10s). Derecha: Curso temporal de la amplitud de las IPSC en presencia del H89 antes y después de una HFS. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. n=5.

La Nifedipina, inhibidor de los canales de calcio tipo L, se puso en el baño, se grabó un control y posteriormente se dio la estimulación de alta frecuencia. Observamos que las IPSC ya no decrementaron, perdiéndose la LTD ($t_4 = -1.186$, $P = 0.301$; figura 25).

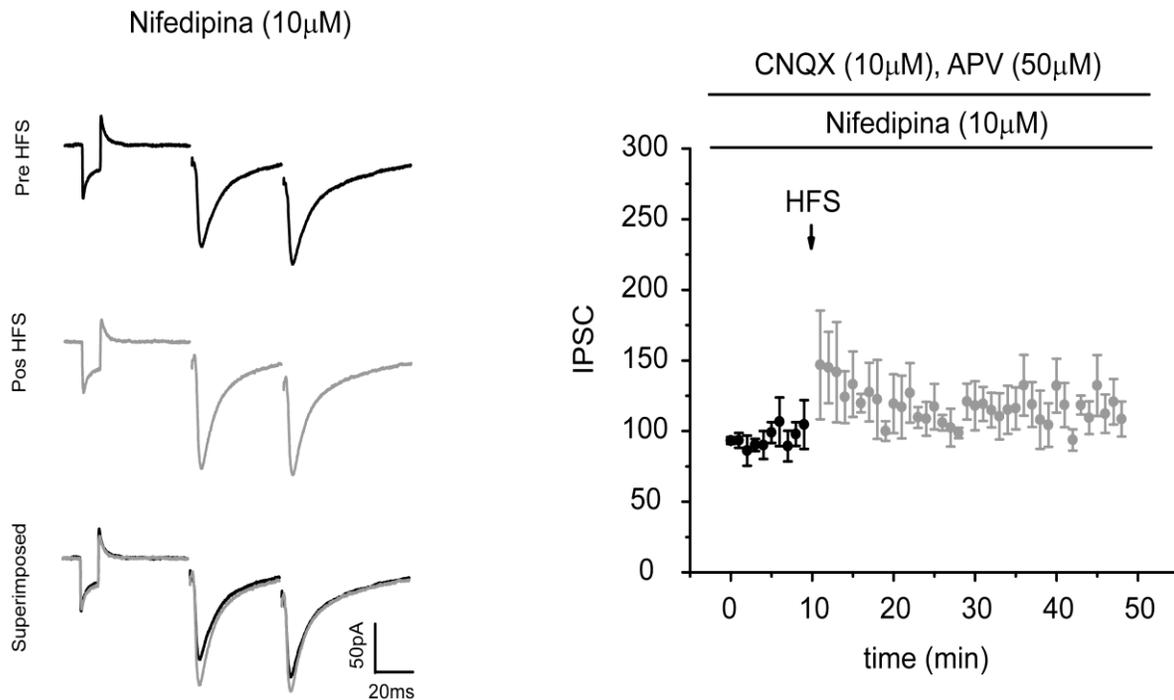


Figura 25. Efecto de los canales de calcio tipo L sobre la plasticidad sináptica. Izquierda: Trazos representativos de las IPSC en presencia de Nifedipina (inhibidor de los canales de calcio tipo L) antes y después de una estimulación de alta frecuencia (HFS: Estimulación de alta frecuencia, 3 trenes de 3s a 100Hz con intervalo de 10s). Derecha: Curso temporal de la amplitud de las IPSC en presencia de Nifedipina antes y después de una HFS. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. n=5.

6.2. El 3-NP, modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington

6.2.1. Plasticidad sináptica

Como podemos observar en la figura 26, la misma estimulación de alta frecuencia que generaba LTD en ratones control, ahora en registros de rebanadas obtenidas de animales tratados con 3-NP se genera una potenciación a largo plazo (LTP) en el 25% de las células registradas ($t_4 = -4.565$; $p = 0.0103$).

Plasticidad sináptica en sinapsis GABAérgicas de ratones tratados con 3-NP

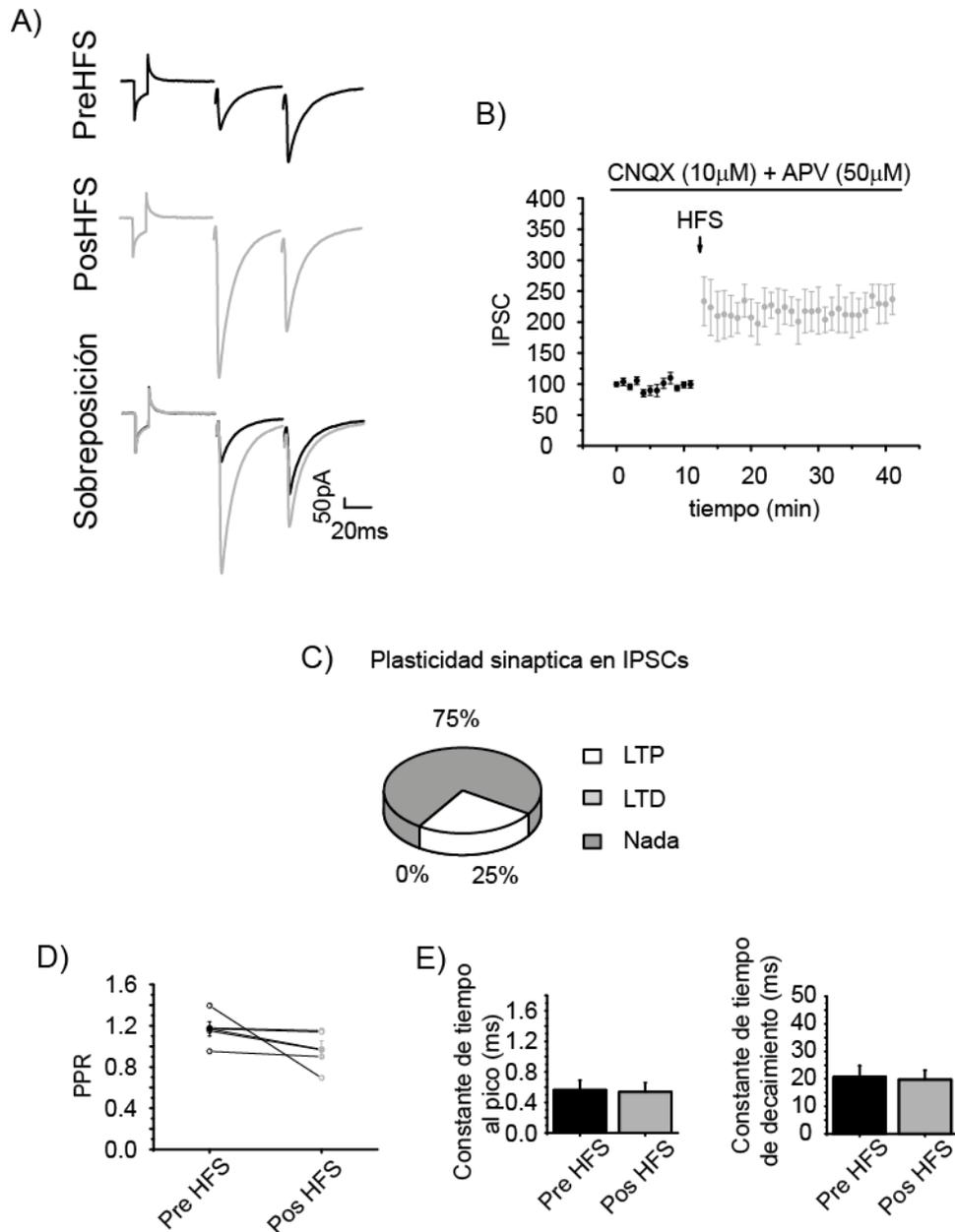


Figura 26. Plasticidad sináptica GABAérgica en ratones tratados con 3-NP. A) Trazos representativos de IPSC antes y después de una estimulación de alta frecuencia (HFS: Estimulación de alta frecuencia, 3 trenes de 3s a 100Hz con intervalo de 10s). B) Curso temporal de la amplitud de las IPSC antes y después de una HFS. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. Como se puede observar ahora la corriente inhibitoria incrementan después de la HFS generando una LTP. C) Cambios en % del tipo de plasticidad que generan las IPSC después de una HFS. D) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en el control y después de la HFS. E) Constante al pico y de decaimiento de las corrientes antes y después de la estimulación. n con LTP=5 y n que no cambio=15.

6.2.1.1. El papel de la PKA

En estas células de ratones tratados con 3-NP también se analizó el papel de PKA, proteína que es bloqueada río abajo por los RD2. Nosotros bloqueamos a PKA introduciendo H89 dentro de la pipeta de registro, con lo que se abolió la LTP observada en nuestro modelo de degeneración, favoreciendo la LTD similar a lo obtenido en los animales control ($t_2 = 6.52$; $p = 0.020$; figura 27).

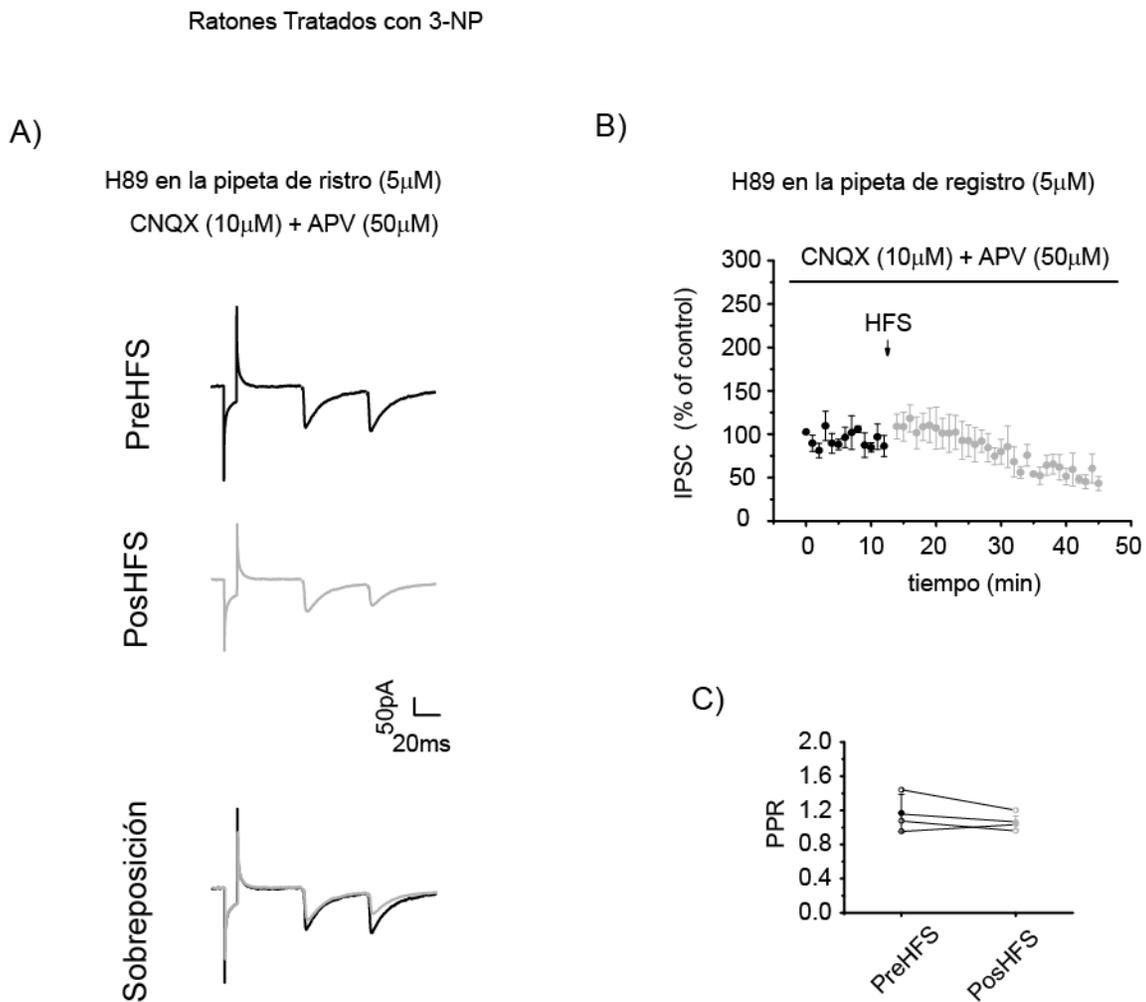


Figura 27. Efecto de PKA sobre la plasticidad sináptica en ratones tratados con 3-NP. A) Trazos representativos de las IPSC con H89 (inhibidor de PKA) dentro de la pipeta, antes y después de una estimulación de alta frecuencia (HFS: Estimulación de alta frecuencia, 3 trenes de 3s a 100Hz con intervalo de 10s). B) Curso temporal de la amplitud de las IPSC en presencia del H89 antes y después de una HFS. Los datos están expresados en % de cambio con respecto al control. C) Proporción de la amplitud de la IPSC del primer pico respecto al segundo en el control y después de la HFS. $n=3$.

6.2.2. Otros cambios observados en el modelo de 3-NP

6.2.2.1. Inmunohistoquímica

Se ha descrito que en la enfermedad de Huntington hay una pérdida de NEM debido al daño que sufre el núcleo estriado, para corroborar este daño en nuestro modelo farmacológico del 3-NP realizamos inmunohistoquímicas a DAPI, un marcador de núcleos, para marcar las NEM del estriado tanto en rebanadas de ratones control como de ratones tratados con 3-NP (figura 28). Observando una disminución significativa en el número de células en las rebanadas de los ratones tratados con 3-NP comparadas con las células de los ratones control.

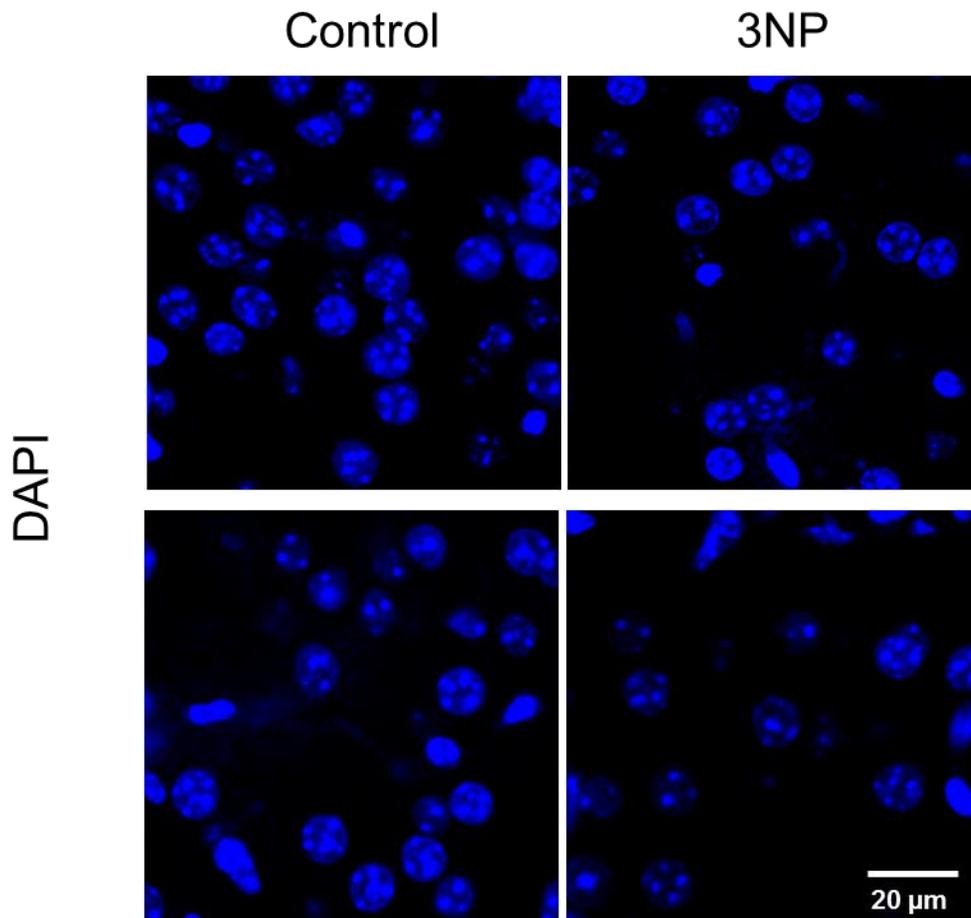


Figura 28. Inmunohistoquímica a DAPI de NEM en rebanadas de ratones control (izquierda) y de ratones tratados con 3-NP (derecha). DAPI marcador de núcleos en azul.

6.2.2.2. La respuesta celular a la estimulación

En las células de ratones tratados con 3-NP solo el 35% presentó una respuesta sináptica inhibitoria a la estimulación, el otro 65% no generó corrientes inhibitorias aún a estimulaciones altas. Lo cual nos muestra el daño producido por el 3-NP pues en ratones control el 75% de las células generaban corrientes inhibitorias, posiblemente debido a la perdida de conexiones sinápticas subyacentes a la perdida de NEM y a la disminución del árbol dendrítico de las NEM que quedan después del tratamiento con 3-NP (figura 29).

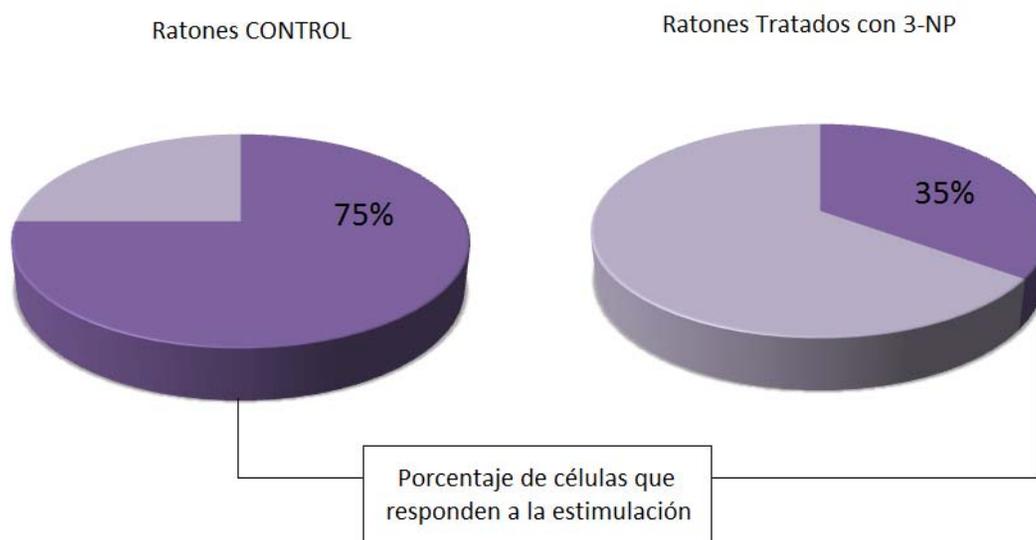


Figura 29. Grafica del porcentaje de células que responden a la estimulación y generan corrientes inhibitorias en animales control y en animales tratados con 3-NP.

6.2.2.3. Comparación de la curva corriente contra amplitud

Por otro lado, comparando las curvas de intensidad-amplitud en registros del grupo tratado con 3-NP contra los del grupo control, se observó que las células de ratones tratados con 3-NP generan corrientes más grandes que el control a la misma estimulación (figura 30).

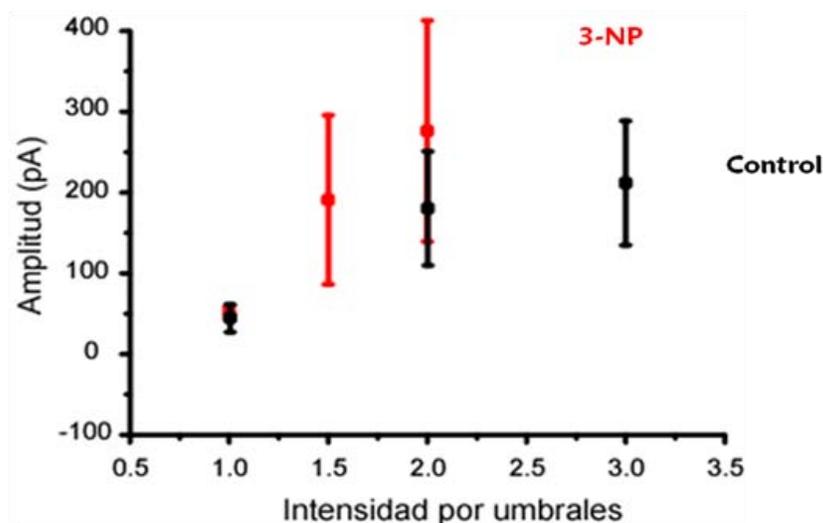


Figura 30. Curvas intensidad contra amplitud de los registros del grupo control (negro) y la de los registros del grupo tratado con 3-NP (rojo). La intensidad está dada por umbrales, en donde el umbral 1 es la estimulación en la cual se vio la primera y más pequeña corriente inhibitoria (n control=4, n de 3-NP=2).

6.2.2.4. Actividad espontánea

Se realizó un análisis de la actividad sináptica espontánea en ratones control y ratones con daño por el 3-NP, con el fin de observar si había algún cambio en las corrientes espontaneas debidas al daño. Dicha actividad fue monitoreada en presencia de los antagonistas glutamatérgicos (CNQX y APV) asegurándonos de solo observar la actividad espontanea inhibitoria (figura 31 arriba). Se realizaron tres experimentos en células de animales control y tres en células de ratones tratados con 3-NP, de los cuales obtuvimos el intervalo inter evento y las amplitudes de las corrientes espontaneas durante tres minutos. Con estos datos realizamos las gráficas de amplitud y frecuencia acumulada para cada experimento, y se hizo el promedio de las amplitudes y los intervalos inter evento cada 5% de la población (Graficas, figura 31).

El decremento significativo del intervalo inter evento ($z_{19} = 1.42302$; $p = 0.03354$) en los registros de ratones tratados con 3-NP respecto a los ratones control, indica un incremento en la frecuencia de aparición de las corrientes espontáneas, es decir modificaciones a nivel pre sináptico. En las amplitudes no se observó ningún cambio significativo ($z_{19} = 1.1068$; $p = 0.17453$).

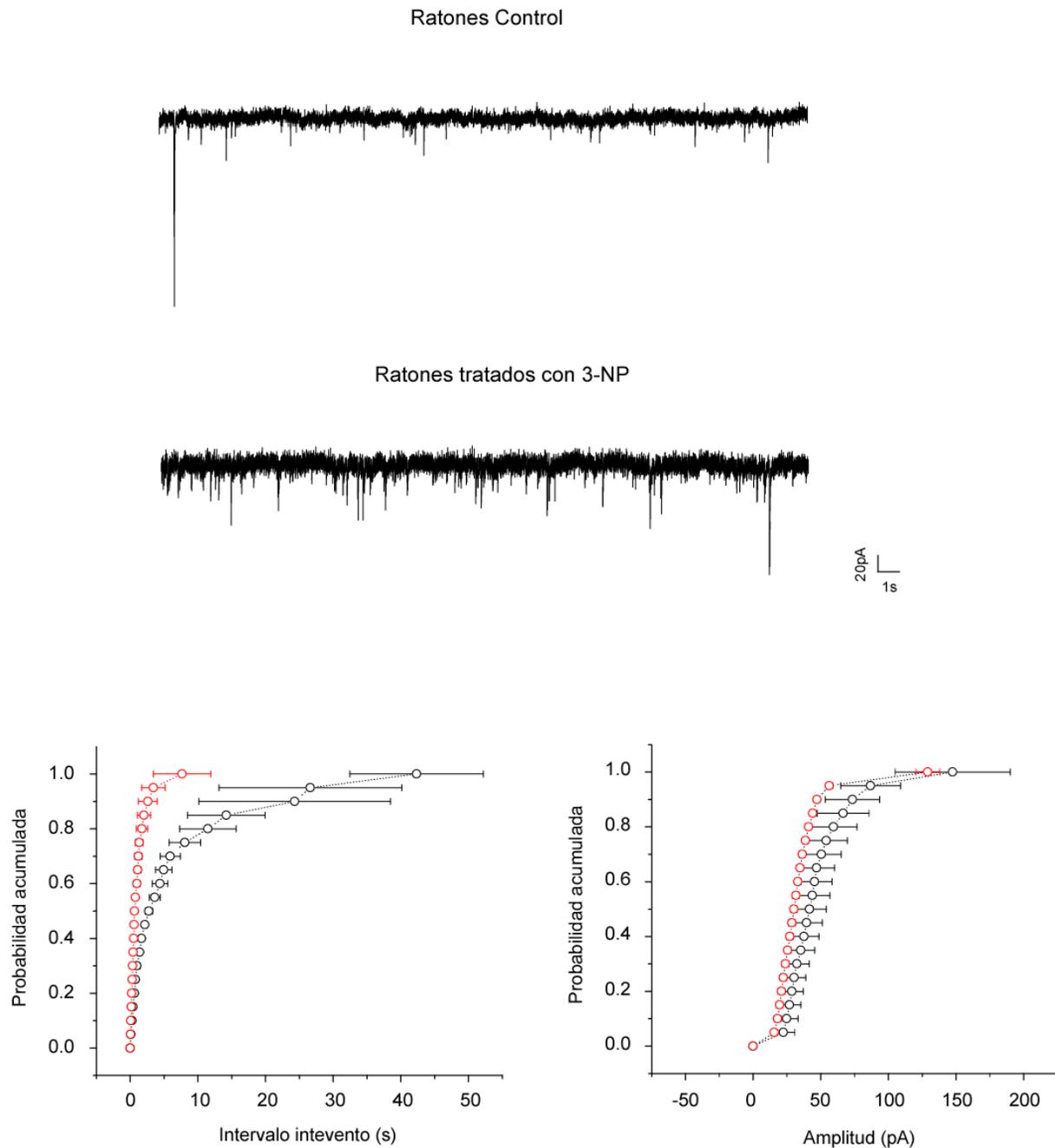


Figura 31. Diferencias en la actividad sináptica espontánea entre ratones control y con daño por 3-NP. Arriba: trazos representativos de ratones control y ratones 3-NP. Abajo: graficas de frecuencia y amplitud acumuladas; círculos rojos: ratones 3-NP (n=3) y círculos negros: ratones control (n=3).

7. DISCUSIÓN

La plasticidad y los procesos sinápticos estriatales están altamente modulados por dopamina. Este neuromodulador regula una diversidad de acciones fisiológicas mediante los diferentes subtipos de receptores que tiene (RD₁₋₅), los cuales también tienen diferentes afinidades a dopamina además de activar distintas vías de señalización y con ello diversos procesos. Otro punto importante a considerar es la ubicación del receptor, ya sea que se encuentre en la presinapsis o en la postsinapsis, en las dendritas, en el soma, o en la terminal, también genera distintos procesos.

En este trabajo analizamos las sinapsis de interneuronas GABAérgicas con neuronas espinosas medianas, en donde la distribución de los receptores dopaminérgicos está dada en la presinapsis por las interneuronas GABAérgicas - PV (+) que expresan mayoritariamente a los RD₅ (70%); y en la postsinapsis se distribuyen de manera diferencial: las NEM de la vía directa expresan los RD₁ (90%), RD₃ (50%) y RD₄ (10%) y las NEM de la vía indirecta expresan los RD₂ (90%), RD₁ (10%), RD₃ (10%), RD₄ (10%) y RD₅ (10%) (Tritsch y Sabatini, 2012). Esto nos dio como resultado una gran diversidad de respuestas a la modulación por dopamina.

Tomando en cuenta estos puntos discutiremos nuestros resultados en tres partes, comenzando con la modulación de dopamina en estas sinapsis GABAérgicas, posteriormente veremos el papel de la dopamina en la plasticidad sináptica GABAérgica para finalmente compararla con el modelo de 3-NP donde tenemos un daño estriatal.

Modulación de dopamina en la transmisión sináptica

Activando a los **RD1**, con el agonista, observamos tanto incrementos como decrementos en las corrientes inhibitorias, estas respuestas diferentes podrían estar dadas por los dos tipos de receptores a D1 presentes en nuestras sinapsis: los presinápticos RD₅ de las interneuronas y los postsinápticos RD₁ de las NEM de la vía directa. Como ya se ha visto la activación postsináptica genera decrementos en las corrientes activadas por GABA (Hernández-Echeagaray et al., 2007), mientras que la activación presináptica genera incrementos en corrientes activadas por GABA



(Tecuapetla et al., 2009). Sin embargo el uso del antagonista a RD1 nos produjo también incrementos y decrementos en las corrientes, sugiriéndonos que estos efectos se debe a la activación de los RD2 por la DA endógena que al bloquear los RD1 se desenmascara. Lo cual coincide con la activación de los **RD2** que genera tanto incrementos como decrementos en las corrientes inhibitorias y al bloquear a estos receptores con el Sulpiride se pierde la modulación.

Los RD2 tienen varios subtipos de receptores, de los cuales en nuestras sinapsis encontramos principalmente a los RD₂ en las NEM de la vía indirecta y los RD₃ en las NEM de la vía directa siendo estos últimos los de mayor afinidad a DA. Así mismo en nuestros resultados observamos que la **DA** produce efectos diferentes dependiendo de la concentración, lo cual ya se ha demostrado en otras sinapsis inhibitorias (Li et al., 2012). A bajas concentraciones observamos un decremento de las corrientes mientras que a concentraciones altas se presenta tanto decremento como incremento; lo que nos lleva a pensar que a bajas concentraciones se activan los receptores de alta afinidad a DA, es decir los RD₃ quienes serían entonces los responsables de los decrementos en las corrientes; mientras que a altas concentraciones se activan los dos RD₃ y RD₂ siendo entonces, estos últimos, responsables de los incrementos de las corrientes inhibitorias.

Concluyendo con esto que la modulación dopaminérgica, en estas sinapsis inhibitorias, está dada por la activación de los RD2; observando respuestas diferenciales dependiendo del subtipo de receptor activado, es decir los RD₃ producen decrementos en las corrientes mientras que los RD₂ generan incrementos. Esta dualidad en las respuestas podría explicarse con mecanismos de señalización diferentes. Por una parte se ha demostrado que los RD₃ inducen la internalización de los receptores GABA_A disminuyendo las corrientes inhibitorias, esta internalización dependiente de clatrina fue inhibida con tratamientos de AMP cíclico (Chen et al., 2006) evidenciando la participación de PKA. Así pues se sabe que los RD₃, al ser un subtipo de los RD2, bloquean a la adenilato ciclasa desencadenando una disminución en la actividad de PKA quien ya no fosforilaría a los receptores GABA_A propiciando su internalización y con ello la disminución de las corrientes inhibitorias (figura 32A). Por su parte los RD₂ podrían relacionarse con otra vía de señalización, pues el decremento de adenilato ciclasa y de la actividad de PKA también disminuye la actividad de la fosfatasa PP2A, la cual se ha relacionado con la defosforilación de la subunidad β de los



receptores $GABA_A$ (Goffin et al., 2010); y por lo tanto si disminuye la defosforilación de los receptores $GABA_A$ también decrementa su endocitosis, generando con ello un incremento en las corrientes inhibitorias (figura 32B).

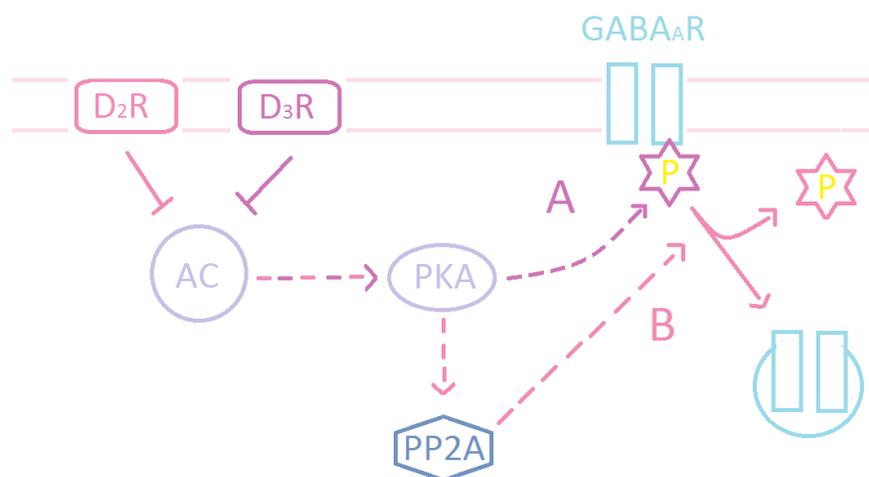


Figura 32. Diferentes vías de señalización que pueden activar los receptores D2. Disminución de las corrientes inhibitorias (A), vía la inhibición de la fosforilación de los $GABA_A R$, con la activación de los D_3R que inhiben a la AC y PKA. Incremento de corrientes inhibitorias (B) por la inhibición en la defosforilación de los $GABA_A R$ vía la activación de los D_2R , que bloquea a la AC disminuyendo a la actividad de PKA y de PP2A. Las líneas punteadas representan una disminución en la actividad de la proteína.

Modulación de la plasticidad sináptica inhibitoria

La **plasticidad sináptica** se ha vuelto cada vez más importante en el análisis de la memoria y el aprendizaje, debido a que sus formas a largo plazo (LTD y LTP) son vistas como una de las grandes propiedades del cerebro que representan la capacidad de codificar y retener memorias mediante la remodelación sináptica (Calabresi et al., 2009).

En el estriado se han observado estos dos tipos de plasticidad, sin embargo la más caracterizada y la que normalmente se genera con protocolos de baja o alta estimulación, es la LTD; tanto en sinapsis excitatorias (Calabresi et al., 1996) como inhibitorias (Adermark et al., 2009, Rueda-Orozco et al., 2009).

En el caso de las **sinapsis excitatorias** se ha demostrado que la LTD es generada por la activación retrograda de los receptores a endocannabinoides (endCa), CB1, disminuyendo presinápticamente la liberación de glutamato. Sin embargo, la dopamina tiene un papel fundamental en ésta LTD corticoestriatal pues se ha demostrado que antagonistas de los RD1 y RD2 previenen la plasticidad y que ratones deficientes del receptor RD2 no presentan la plasticidad (Calabresi et al., 1997). Se ha postulado que esta dependencia de los RD2 esta mediada por las interneuronas colinérgicas, las cuales expresan altos niveles de RD2 y al activarse disminuyen la liberación de acetilcolina, disminuyendo así la actividad de los receptores muscarínicos y generando la entrada de calcio necesaria para la activación de los canales de calcio tipo L y con ello la liberación de calcio y la LTD (Wang et al., 2006).

En las **sinapsis inhibitorias** también se ha observado la LTD dependiente de Ca^{2+} a bajas frecuencias de estimulación (Adermark et al., 2009), siendo necesaria la entrada de calcio ya sea por la activación de los canales de calcio tipo L, los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) o con potenciales hiperpolarizantes (Lovinger y Mathur, 2012).

La LTD GABAérgica obtenida en este trabajo, entre interneuronas GABAérgicas principalmente FS y las NEM, también depende de la entrada de calcio vía los canales de calcio tipo L; ya que observamos que en presencia de nifedipina se bloquea la LTD obtenida. Generando quizá el mismo mecanismo de activación retrograda de los receptores a endocannabinoides (endCa), CB1, que son los que se encuentran presentes en las FS (Narushima et al., 2006) y disminuyendo presinápticamente la liberación de GABA (Figura 33).



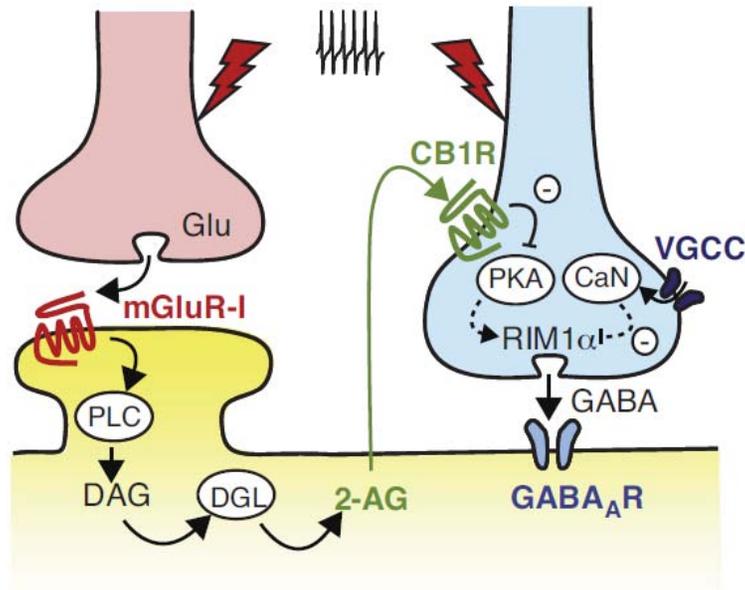


Figura 33. Mecanismo molecular presináptico de la plasticidad GABAérgica desencadenado por la actividad aferente repetitiva. La actividad libera glutamato el cual activa a los mGluR-I: receptores metabotrópicos de glutamato del grupo 1, los cuales generan la producción de DAG: diacilglicerol mediante PLC: fosfolipasa C. La DGL: diacilglicerol lipasa convierte el DAG en 2-AG: endocanabinoide, estos activan retrogradamente a los CB1R: receptores a cannabinoides tipo 1 quienes inhiben a PKA: proteína cinasa A en la presinapsis GABAérgica. A su vez la actividad de la interneurona incrementa el calcio intracelular vía los canales de calcio activados por voltaje (VGCC) aumentando la actividad de la calcineurina (CaN). Este incremento junto con la reducción de la actividad de PKA pueden disminuir el estado de fosforilación de un sustrato aún no identificado en la maquinaria de liberación para deprimir persistentemente la liberación de GABA vía RIM1 α . (Castillo et al., 2011).

Sin embargo, observamos que la PKA postsináptica también participa en la generación de nuestra LTD GABAérgica, pues el bloqueo de esta cinasa con H89 provoca la pérdida de la LTD. Se sabe que la PKA está relacionada con los receptores a D1 y por lo tanto podría ser el enlace a los cambios observados al activar y bloquear los distintos receptores a DA.

En nuestro trabajo obtuvimos diferentes tipos de plasticidad y en diferente proporción dependiendo del receptor a dopamina activado (Figura 34), por lo que debe ser un efecto compuesto en donde participen tanto los RD1 y RD2 postsinápticos como los RD1 presinápticos. Pensando en ello observamos que la LTD es generada de manera postsináptica pues depende de la activación de los RD2 y las interneuronas GABAérgicas no tienen este receptor, además de que la LTD requiere a PKA postsinápticamente. Entonces los RD2 podrían estar disminuyendo la actividad de la AC

y ésta la de PKA, quien disminuye la fosforilación a los RGABA_A generando una disminución de las corrientes inhibitorias y con ello la LTD. Se sabe además que estos RD2 reducen las corrientes de los canales de calcio tipo L (Hernández-López et al., 2000), que como mencionamos también participan en la generación de LTD.

Al activar a los RD2 con el agonista observamos una LTP presináptica y como en la presinapsis solo hay RD1 estos pudieran estar siendo activados por la DA endógena que activa principalmente a los RD1 presinápticos, es decir a los RD_5 .

Por su parte la activación de los RD1 postsinápticos genera LTD pues en presencia del agonista de los RD1 obtuvimos 100% de LTD, es decir tanto las NEM con RD2 como las NEM con RD1 generaron la LTD. Esto quizás se deba a que los RD2 se activan con la DA endógena y los RD1 con el agonista, estos últimos podrían estar disminuyendo la amplitud de las corrientes inhibitorias postsinápticas mediante la subunidad $\beta 1$ de los receptores GABA_A vía PKA / DARP32 / Fosfatasa 1 como ya se ha mencionado (Flores-Hernández et al., 2000).

Finalmente observamos que la DA endógena a bajas concentraciones se comporta prácticamente como cuando se activan los RD2, mientras que en altas concentraciones observamos una LTP presináptica que se conserva aún en presencia del antagonista a los RD2, es decir con la activación presináptica de los RD1 obtenemos LTP.

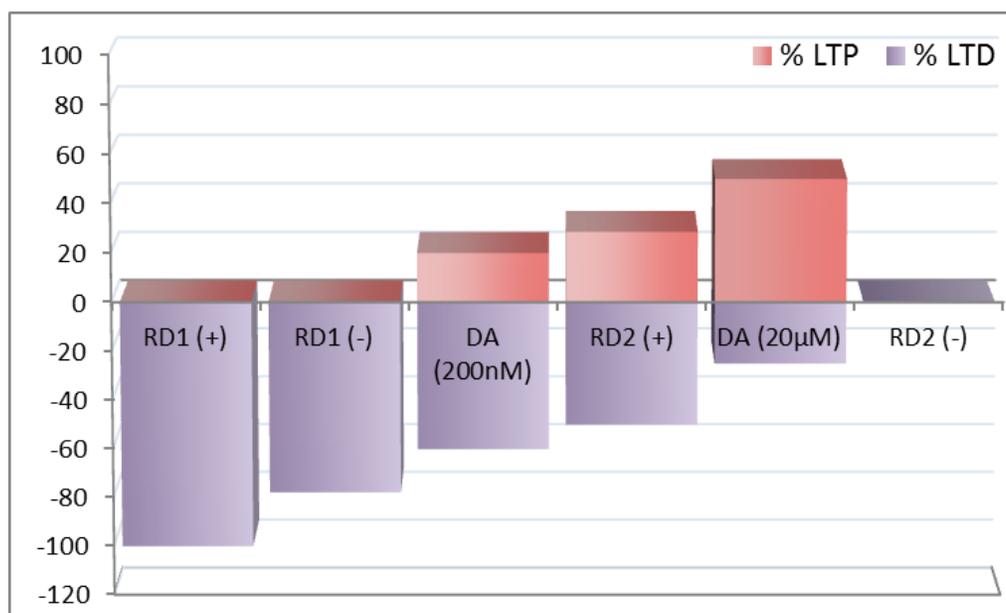


Figura 34. Diferentes tipos y porcentaje de plasticidad GABAérgica obtenida en los registros al activar distintos tipos de receptores dopaminérgicos.



La plasticidad en las vías de señalización

Las NEMs tienen receptores a dopamina segregados en sus dos vías de salida, en donde aproximadamente el 50% de ellas presentan RD1 y el otro 50% RD2, por lo que se pensó que la plasticidad GABAérgica estriatal podría estar presente solo en las NEMs de alguna de estas vías. Sin embargo demostramos que la LTD se presenta en los dos tipos de NEMs, ya que además de demostrar que la activación de los dos tipos de receptores a dopamina postsinápticos generan LTD pudimos confirmar en ratones BAC D1-GFP que la generación de la LTD se da tanto en las NEMs que tienen RD1 como las que no lo tienen. Interesantemente observamos que la generación de LTP estuvo presente solo NEMs de la vía indirecta, pero como hemos visto esta plasticidad tiene un mecanismo presináptico y no depende de los RD2. Tal vez como este tipo de plasticidad se presenta menos que la LTD quizá por eso no pudimos verla en todas las NEMs ó quizá aunque sea un mecanismo presináptico solo se presente en NEMs de la vía indirecta.

El modelo de 3-NP

Cuando los animales son tratados con ácido 3-nitropropiónico (3-NP), modelo farmacológico que usamos para imitar la histopatología de la HD, el mismo protocolo de estimulación de alta frecuencia que inducía LTD ahora genera potenciación a largo plazo (LTP). Estos cambios en la plasticidad podrían deberse a una mayor actividad de las NEMs, causada por el efecto del 3-NP, pues se han observado cambios en la plasticidad debidos al tiempo de disparo entre la célula presináptica y la postsináptica. Como se ha visto en el hipocampo donde la LTD se induce si la FS presináptica dispara durante o poco tiempo después del tren de potenciales de acción en las piramidales, mientras que la LTP GABAérgica es inducida cuando la FS presináptica dispara al menos 400ms después de que lo hiciera la piramidal postsináptica (Holmgren y Ziberter, 2001).

Otros cambios postsinápticos causados por el 3-NP, como la disminución de las dendritas (Beal et al., 1993) hace que la información que llega al soma ahora sea más importante, en nuestro caso la información de las interneuronas GABAérgicas,



contribuyendo quizá con la generación de la LTP que presentan los animales inyectados con 3-NP.

Adicionalmente también observamos cambios presinápticos pues nuestros resultados en los registros de GAP Free demostraron que los ratones tratados con 3-NP presentan cambios en la frecuencia de liberación, es decir, cambios presinápticos. Finalmente demostramos que la LTP presente en nuestros registros es modulada a través de mecanismos presinápticos y observamos que los ratones control también presentan LTP y esta incrementa cuando se tiene alta concentración de DA. Por lo que probablemente en nuestro modelo de daño con el 3-NP podría estarse modificando la concentración de DA, la cual es determinante en la plasticidad que se presenta así como en los daños que se causan en la HD. Se ha descrito que cambios en los niveles de DA y en el número de receptores contribuye a un movimiento anormal y deficiencias cognitivas en HD. Durante periodos tempranos de hiperkinesia del HD los niveles de DA incrementan mientras que los receptores a DA disminuyen (Chen et al., 2013).

De manera interesante, esta LTP generada en ratones tratados con 3-NP fue abolida y se regresó a una LTD al bloquear a PKA. Como observamos en los registros de animales control la activación de los RD2 es importante en la generación de LTD, y se sabe que estos receptores a su vez inhiben a PKA mediante la inhibición de la adenilato ciclasa. Esta inhibición de PKA es muy importante para la generación de LTD y no de LTP, lo cual podemos ver en los ratones tratados con 3-NP pues si bloqueamos directamente PKA, evadiendo los daños causados en los receptores a dopamina, regresamos a las condiciones control perdidas por el daño neuronal del 3-NP no solo inhibiendo la LTP sino regresando a una plasticidad control, la LTD.

El entendimiento de los daños producidos por el 3-NP y las consecuencias observadas en las conexiones sinápticas, tanto en la modulación sináptica como en la plasticidad sináptica, además del papel tan importante que tiene la DA en la regulación de éstas, son un gran avance en la comprensión de las funciones del estriado y su integración en el proceso final de la información motora.



8. CONCLUSIONES

- ☆ Las sinapsis entre interneuronas GABAérgicas y NEM del estriado están moduladas por DA, esta modulación requiere la activación de los receptores a DA y genera respuestas diferenciales que dependen del subtipo de receptor activado.
- ☆ La plasticidad GABAérgica generada en el estriado, entre interneuronas y NEM, es LTD dependiente de los canales de calcio tipo L, de PKA postsináptica y de los RD2.
- ☆ Esta plasticidad GABAérgica es modulada por DA generando dos tipos de plasticidad, la LTD activada tanto por los RD2 como por los RD1 postsinápticos y una LTP generada por la activación de los RD1 presinápticos.
- ☆ Los ratones tratados con 3-NP generan una LTP presináptica generada quizá por las altas concentraciones de DA, emulando lo observado en la HD.
- ☆ En los ratones dañados con 3-NP pudimos regresar a la plasticidad obtenida en ratones sin daño, es decir obtener una LTD, bloqueando a PKA de manera postsináptica.



9. BIBLIOGRAFÍA

- Adermark L, Talani G, Lovinger DM (2009) Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *Eur J Neurosci* 29:32-41.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 60:409-470.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13:4181-4192.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4):527-542.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O (2010) Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 68:815-834.
- Brouillet E, Conde F, Beal MF, Hantraye P (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59:427-468.
- Calabresi P, Maj R, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1992a) Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci* 12:4224-4233.
- Calabresi P, Mercuri NB, Di Filippo M (2009) Synaptic plasticity, dopamine and Parkinson's disease: one step ahead. *Brain* 132:285-287.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30:211-219.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1992b) Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *Eur J Neurosci* 4:929-935.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1996) The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 19:19-24.



- Calabresi P, Saiardi A, Pisani A, Baik JH, Centonze D, Mercuri NB, Bernardi G, Borrelli E (1997) Abnormal synaptic plasticity in the striatum of mice lacking dopamine D2 receptors. *J Neurosci* 17:4536-4544.
- Carlson NR (2004) *Physiology of behavior*. Boston: Pearson/A&B.
- Carlson NR (2006) *Fisiología de la conducta*. Madrid: Addison Wesley.
- Castillo PE, Chiu CQ, Carroll RC (2011) Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 21:328-338.
- Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS (1993) Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9576-9580.
- Cepeda C, Wu N, Andre VM, Cummings DM, Levine MS (2007) The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81:253-271.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
- Chen G, Kittler JT, Moss SJ, Yan Z (2006) Dopamine D3 receptors regulate GABAA receptor function through a phospho-dependent endocytosis mechanism in nucleus accumbens. *J Neurosci* 26:2513-2521.
- Chen JY, Wang EA, Cepeda C, Levine MS (2013) Dopamine imbalance in Huntington's disease: a mechanism for the lack of behavioral flexibility. *Front Neurosci* 7:114.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.
- Di Filippo M, Tozzi A, Picconi B, Ghiglieri V, Calabresi P (2007) Plastic abnormalities in experimental Huntington's disease. *Curr Opin Pharmacol* 7:106-111.
- Fino E, Glowinski J, Venance L (2005) Bidirectional activity-dependent plasticity at corticostriatal synapses. *J Neurosci* 25:11279-11287.
- Flores-Hernández J, Hernández S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P, Surmeier DJ (2000) D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol* 83:2996-3004.
- Gerfen CR (1984) The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311:461-464.
- Gerfen CR (1989) The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 246:385-388.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15:133-139.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.



- Goffin D, Ali AB, Rampersaud N, Harkavyi A, Fuchs C, Whitton PS, Nairn AC, Jovanovic JN (2010) Dopamine-dependent tuning of striatal inhibitory synaptogenesis. *J Neurosci* 30:2935-2950.
- Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13:244-254.
- Gubellini P, Pisani A, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2004) Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. *Prog Neurobiol* 74:271-300.
- Gustafson N, Gireesh-Dharmaraj E, Czubayko U, Blackwell KT, Plenz D (2006) A comparative voltage and current-clamp analysis of feedback and feedforward synaptic transmission in the striatal microcircuit in vitro. *J Neurophysiol* 95:737-752.
- Guzman JN, Hernández A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J,argas J (2003) Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci* 23:8931-8940.
- Heimer LW, R. D. (1975) The subcortical projections of the allocortex: Similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex, and the neocortex. *Golgi centennial symposium* 17.
- Hernández-Echeagaray E (2010) Advances in the neurobiology of huntington's disease.
- Hernández-Echeagaray E, Cepeda C, Ariano MA, Lobo MK, Sibley DR, Levine MS (2007) Dopamine reduction of GABA currents in striatal medium-sized spiny neurons is mediated principally by the D(1) receptor subtype. *Neurochem Res* 32:229-240.
- Hernández-Echeagaray E, Starling AJ, Cepeda C, Levine MS (2004) Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: are dendrites necessary? *Eur J Neurosci* 19:2455-2463.
- Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E,argas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987-8995.
- Hernández -Echeagaray E (2004) Avances sobre la Neurobiología de la Enfermedad de Huntington, *Temas Selectos de Neurociencias III*. pp 33-41: Javier Velásquez Moctezuma.
- Holmgren CD, Zilberter Y (2001) Coincident spiking activity induces long-term changes in inhibition of neocortical pyramidal cells. *J Neurosci* 21:8270-8277.
- Huntington G (1872) On chorea. *The medical and surgical report* 26: 317-321.
- Jakel RJ, Maragos WF (2000) Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci* 23:239-245.
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13:4908-4923.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.



- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10:3421-3438.
- Kemp JLaP, T. P. S. (1970) Cortico-striate projections in monkey. *Brain* 93:22.
- Kita H (1993) GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99:51-72.
- Koos T, Tepper JM, Wilson CJ (2004) Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24:7916-7922.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2007) Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445:643-647.
- Kunzle H (1975) Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain Res* 88:195-209.
- Kunzle H (1977) Projections from the primary somatosensory cortex to basal ganglia and thalamus in the monkey. *Exp Brain Res* 30:481-492.
- Kunzle H (1978) An autoradiographic analysis of the efferent connections from premotor and adjacent prefrontal regions (areas 6 and 9) in *macaca fascicularis*. *Brain Behav Evol* 15:185-234.
- Li YC, Wang MJ, Gao WJ (2012) Hyperdopaminergic modulation of inhibitory transmission is dependent on GSK-3 β signaling-mediated trafficking of GABA_A receptors. *J Neurochem* 122:308-320.
- Lovinger DM, Mathur BN (2012) Endocannabinoids in striatal plasticity. *Parkinsonism Relat Disord* 18 Suppl 1:S132-134.
- Lynch GS, Dunwiddie T, Gribkoff V (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266:737-739.
- Martin JB (1982) Huntington's disease: genetically programmed cell death in the human central nervous system. *Nature* 299:205-206.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649-711.
- Mink JW (1996) The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol* 50:381-425.
- Muller D, Toni N, Buchs PA (2000) Spine changes associated with long-term potentiation. *Hippocampus* 10:596-604.
- Narushima M, Uchigashima M, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M (2006) Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *Eur J Neurosci* 24:2246-2252.
- Nasr P, Gursahani HI, Pang Z, Bondada V, Lee J, Hadley RW, Geddes JW (2003) Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int* 43:89-99.



- Nishi A, Kuroiwa M, Shuto T (2011) Mechanisms for the modulation of dopamine d(1) receptor signaling in striatal neurons. *Front Neuroanat* 5:43.
- Olsen RW, Sieghart W (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 60:243-260.
- Olsen RW, Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56:141-148.
- Pérez-Severiano F, Rios C, Segovia J (2000) Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res* 862:234-237.
- Prensa L, Gimenez-Amaya JM, Parent A (1998) Morphological features of neurons containing calcium-binding proteins in the human striatum. *J Comp Neurol* 390:552-563.
- Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackam A, Hayden MR, Li Y, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C, Cattaneo E (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* 20:3705-3713.
- Rigamonti D, Sipione S, Goffredo D, Zuccato C, Fossale E, Cattaneo E (2001) Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J Biol Chem* 276:14545-14548.
- Rodríguez E, Rivera I, Astorga S, Mendoza E, Garcia F, Hernández-Echeagaray E (2010) Uncoupling oxidative/energy metabolism with low sub chronic doses of 3-nitropropionic acid or iodoacetate in vivo produces striatal cell damage. *Int J Biol Sci* 6:199-212.
- Rueda-Orozco PE, Mendoza E, Hernandez R, Aceves JJ, Ibanez-Sandoval O, Galarraga E, Bargas J (2009) Diversity in long-term synaptic plasticity at inhibitory synapses of striatal spiny neurons. *Learn Mem* 16:474-478.
- Schroder KF, Hopf A, Lange H, Thorner G (1975) [Morphometrical-statistical structure analysis of human striatum, pallidum and subthalamic nucleus]. *J Hirnforsch* 16:333-350.
- Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1985) Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci* 5:776-794.
- Sten Grillner AMG (2006) *Microcircuits: The Interface between Neurons and Global Brain Function*: MIT Press.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579-6591.
- Szydłowski SN, Pollak Dorocic I, Planert H, Carlen M, Meletis K, Silberberg G (2013) Target selectivity of feedforward inhibition by striatal fast-spiking interneurons. *J Neurosci* 33:1678-1683.
- Takagi H, Mizuta H, Matsuda T, Inagaki S, Tateishi K, Hamaoka T (1984) The occurrence of cholecystokinin-like immunoreactive neurons in the rat neostriatum: light and electron microscopic analysis. *Brain Res* 309:346-349.



- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J, Galarraga E (2007) Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10258-10263.
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzman JN, Galarraga E, Bargas J (2005) Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol* 93:1119-1126.
- Tecuapetla F, Koos T, Tepper JM, Kabbani N, Yeckel MF (2009) Differential dopaminergic modulation of neostriatal synaptic connections of striatopallidal axon collaterals. *J Neurosci* 29:8977-8990.
- Tepper JM, Koos T, Wilson CJ (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 27:662-669.
- Tepper JM, Sharpe NA, Koos TZ, Trent F (1998) Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev Neurosci* 20:125-145.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koos T, Ibanez-Sandoval O (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat* 4:150.
- Tepper JM, Wilson CJ, Koos T (2008) Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. *Brain Res Rev* 58:272-281.
- Thomas P, Mortensen M, Hosie AM, Smart TG (2005) Dynamic mobility of functional GABA_A receptors at inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 8:889-897.
- Tisch S, Silberstein P, Limousin-Dowsey P, Jahanshahi M (2004) The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatr Clin North Am* 27:757-799.
- Tritsch NX, Sabatini BL (2012) Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76:33-50.
- Ulrich D, Bettler B (2007) GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol* 17:298-303.
- Vitek JL, Giroux M (2000) Physiology of hypokinetic and hyperkinetic movement disorders: model for dyskinesia. *Ann Neurol* 47:S131-140.
- Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci* 27:468-474.
- Wang Z, Kai L, Day M, Ronesi J, Yin HH, Ding J, Tkatch T, Lovinger DM, Surmeier DJ (2006) Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50:443-452.
- Weiner WJ, Lang AE (1989) *Movement disorders: a comprehensive survey*. Mount Kisco, NY, Futura Publishing Co. 293-346.
- Willis GL, Moore C, Armstrong SM (2012) Breaking away from dopamine deficiency: an essential new direction for Parkinson's disease. *Rev Neurosci* 23:403-428.



10. APÉNDICE

10.1. Artículo Publicado en revista internacional Indixada

Nieto Mendoza E and Hernández Echeagaray E. Dopaminergic modulation of striatal inhibitory transmission and long-term plasticity. *Neural Plasticity*, 2015, ID 789502, 15 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/789502>



Research Article

Dopaminergic Modulation of Striatal Inhibitory Transmission and Long-Term Plasticity

Elizabeth Nieto Mendoza and Elizabeth Hernández Echeagaray

Unidad de Biomedicina, FES-I, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

Correspondence should be addressed to Elizabeth Hernández Echeagaray; aehe67@gmail.com

Received 9 March 2015; Revised 20 May 2015; Accepted 27 May 2015

Academic Editor: Marco Atzori

Copyright © 2015 E. Nieto Mendoza and E. Hernández Echeagaray. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Dopamine (DA) modulates glutamatergic synaptic transmission and its plasticity in the striatum; however it is not well known how DA modulates long-term plasticity of striatal GABAergic inhibitory synapses. This work focused on the analysis of both dopaminergic modulation of inhibitory synapses and the synaptic plasticity established between GABAergic afferents to medium spiny neurons (MSNs). Our results showed that low and high DA concentrations mainly reduced the amplitude of inhibitory synaptic response; however detailed analysis of the D1 and D2 participation in this modulation displayed a wide variability in synaptic response. Analyzing DA participation in striatal GABAergic plasticity we observed that high frequency stimulation (HFS) of GABAergic interneurons in the presence of DA at a low concentration (200 nM) favored the expression of inhibitory striatal LTD, whereas higher concentration of DA (20 μ M) primarily induced LTP. Interestingly, the plasticity induced in an animal model of striatal degeneration mimicked that induced in the presence of DA at a high concentration, which was not abolished with D2 antagonist but was prevented by PKA blocker.

1. Introduction

Dopamine (DA) is involved in different functions of the nervous system like cognition, reward mechanisms, motor functions, learning, and memory. In the striatum, DA modulates synaptic transmission and synaptic plasticity through the activation of its DA receptors [1–4]. The modulation of DA depends on receptor subtype stimulated in a particular synapse; for example, activation of D1-class dopamine receptors (D1) increases glutamatergic responses mediated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors in the corticostriatal pathway, and the stimulation of D2-class dopamine receptors (D2) attenuates them [5, 6]. Additionally, D1 and D2 activation is involved in the generation of long-term depression (LTD) and D1 contributes to long-term potentiating (LTP) of excitatory synapses of corticostriatal pathway [7, 8].

Although the striatum receives a massive amount of glutamatergic influences from the cortex and thalamus, MSNs, the projection cells, and most of local circuits of interneurons

use GABA as a neurotransmitter [9]. GABAergic synapses on MSNs are also modulated by DA; for instance, activation of postsynaptic D1 receptors reduces GABA currents in MSNs [10], whereas the presynaptic activation of D1 receptors of axon collaterals of other MSNs increases the IPSC amplitude on MSNs and presynaptic D2 receptors decrease it [11].

Stimulation of MSNs or GABAergic interneurons with low and high frequency stimulation protocol induces short-term depression (STD) in striatal GABAergic synapses as the main form of synaptic plasticity [12, 13]. This short-term synaptic plasticity is also modulated by DA; activation of D1 receptors increases STD, while D2 agonist decreases it [14]. Long-term plasticity can be produced at inhibitory synapses on MSNs [15]; however, it remains unclear how DA modulates this type of plasticity.

Changes in DA content in the striatum are related to motor impairments, procedural learning, and cognitive deficits in animal models of neurodegeneration; low content of DA is associated with the development of Parkinson's Disease (PD), while high concentration of DA is related to symptoms

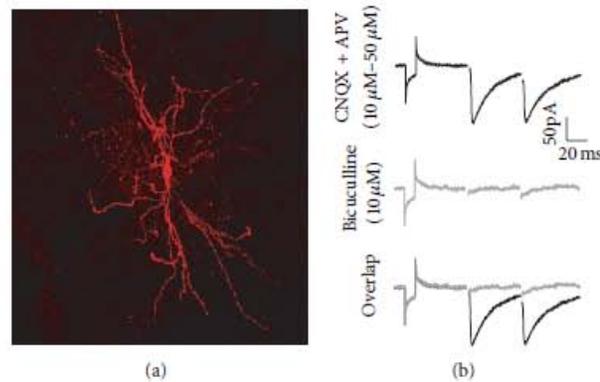


FIGURE 1: Characterization of IPSCs recordings in MSNs. (a) Reconstruction of a MSN filled with biocytin during electrophysiological recordings in voltage clamp mode and subsequently processed with avidin-Cy3. (b) Top: IPSCs of the MSNs in the presence of CNQX (10 μ M) and APV (50 μ M). Middle: Bicuculline (10 μ M) abolished the IPSCs of MSNs. Bottom: overlap of the recordings. $H_V = -70$ mV.

of early stages of Huntington's Disease (HD) [16–18]; perhaps changes in synaptic plasticity underlie some of the deficits observed in such pathologies. Altered corticostriatal synaptic plasticity has been described after modifying DA receptors or DA content [8, 19], but it is not known how DA modulates inhibitory long-term synaptic plasticity on MSNs in striatal degeneration, nor if DA concentration is determinant to produce a specific type of plasticity.

In this study, DA effects on GABAergic inhibitory synaptic connections on principal neurons as well as in its synaptic long-term plasticity were analyzed. In addition, inhibitory long-term synaptic plasticity of an animal model of striatal degeneration was compared with the plasticity obtained using different concentrations of DA in control conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Slice Preparation. Male C57/BL6 mice (Harlan Laboratories Inc., Mexico) ~40 days old and kept at room temperature (RT, 25°C) under a 12:12 h light:dark cycle with free access to food and water were used. To evaluate plasticity of inhibitory synapses on MSN in an animal model of striatal degeneration, some mice were treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (3-NP) for 5 days (15 mg/kg, once a day) as previously described [20, 21]. To identify MSNs that exhibited plasticity BACDI-GFP mice were used in some experiments. Experimental procedures were performed in accordance with international guidelines of animal care and the National Committee on Animal Research Ethics for the Care of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999).

Mice were ether-anesthetized in an induction chamber and later decapitated. Brains were removed and immersed in cold (4°C) artificial cerebral spinal fluid (CSF) bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂, containing the following composition (in mM): 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 130 NaCl, 3 KCl, 5 MgCl₂, 10 glucose, and 1 CaCl₂, and maintained at a pH 7.4. Sagittal brain slices (300 μ m) containing striatum were cut using a vibratome (Pelco 102, 1000 Plus model). Before experimental recordings, the slices were incubated (1 hr, RT)

in the following artificial cerebrospinal fluid (ACSF; in mM): 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 130 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 10 glucose, and 2 CaCl₂, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂.

2.2. Electrophysiological Recordings. Electrophysiology was performed in a recording chamber perfused (2 mL/min) with ACSF bubbled with 95% O₂/5% CO₂, and cells were visualized using a microscope (BX51WI, Olympus, Germany) with DIC illumination, an infrared filter coupled to a CCD camera, and water immersion objective magnification (Olympus X Lum PlanFl 20x/0.95 W, Japan). MSNs of the dorsolateral striatum were whole-cell recorded using pulled (3–6 M Ω , Sutter Instruments, Inc., Model P-97) borosilicate pipettes (IB150F-4, World Precision Instruments, Inc.) filled with (in mM) 72 KH₂PO₄, 36 KCl, 2 MgCl₂·6H₂O, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na₂ATP, 0.2 Na₃GTP, and 5 QX-314 to block unclamped action currents and 0.5% biocytin for further reconstruction, pH 7.2, 275 mOsm/L. Recordings were amplified (Axopatch 200B, Axon Instrument, Molecular Devices, USA), digitized (Digidata 1320 A, Axon Instrument, Molecular Devices, USA), and captured (5 kHz) using the pClamp 9.1 software (Axon Instrument, Molecular Devices, USA). Series and input resistance were compensated and monitored by evoking a transmembranal current with a voltage command during the experiment. Cells with unstable access resistance or more than 30 M Ω were excluded from the analysis.

Inhibitory synaptic currents were evoked via a tungsten stimulating electrode (12 μ m tip; FHC, 0.1 Hz) positioned inside the striatum (100 μ m from the recording pipette) and connected to an isolation unit (DS2AK, DigiMiter Ltd., Hertfordshire, UK). All recordings were conducted in MSNs (Figure 1(a), $H_V = -70$ mV) in the presence of glutamatergic antagonists (CNQX 10 μ M and APV 50 μ M) to isolate the GABAergic component, which was abolished in the presence of Bicuculline (10 μ M; Figure 1(b)). To induce striatal plasticity, a high frequency stimulation (HSF) protocol was used (3 trains, 3 seconds, of 100 Hz with an interval of 10 seconds between each train), and the cells were recorded for at least 40 min after the HFS.

2.3. Image Acquisition. Fluorescent images were obtained with a Hamamatsu (Orca C4742-95) camera coupled to the Olympus image acquisition system Cell M (excitation light 450–490 nm through a dichroic filter; emission light 502–538). Some slices were fixed and covered with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for reconstruction. Visualization was made through a confocal fluorescence microscopy (Olympus Fv-1000) and acquired with the OLYMPUS FLUO VIEW 3.1 software.

2.4. Statistical Analysis. Data were analyzed and plotted off-line using Microcal Origin 7 (Microcal Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA) and the statistical software Sigma Plot (Systat Software, Inc., San José, CA) with a parametric test or a nonparametric test if the data did not display a normal distribution. Data are expressed as mean \pm SEM and significance was set at $p < 0.05$. The final figures were edited using Adobe Illustrator 10 or Adobe Creative Suite 5 (Adobe Systems, Inc., San José, CA).

3. Results

3.1. Dopaminergic Modulation of GABAergic Synaptic Transmission. MSNs of the striatum have two types of GABAergic synapses, those from axon collaterals of other MSNs and those from GABAergic interneurons. We performed intrastriatal stimulation; then, most of the GABAergic synaptic response was due to the stimulation of GABAergic interneurons [11, 14, 22, 23]. To determine the role of DA on these synapses, the effects of DA, DA agonists and antagonists on the GABAergic Inhibitory Postsynaptic Currents (IPSCs) were analyzed.

3.2. DA Modulation of Striatal GABAergic Transmission. Several studies have shown that DA modulatory effects on GABAergic transmission depend on the activation of different DA receptor subtypes [24, 25]. Then, to evaluate modulatory effects of DA on striatal GABAergic transmission, we studied the effect of DA treatment on MSNs using two different concentrations of DA (200 nM and 20 μ M) previously reported to have differential effects on modulation of GABAergic transmission (Li et al., 2012). Low DA concentration (200 nM) decreased IPSC amplitude compared with the control in 42.9% ($n = 3$) of the recorded cells ($t_2 = 5.968$, $p = 0.027$; two-tailed paired t -test; Figures 2(a)–2(c)). In these cells, the PPR did not exhibit a significant change (Figure 2(d)), which would suggest a postsynaptic modulatory effect; however the kinetics current did not change in the presence of low DA concentration (Figures 2(e) and 2(f)) which suggests a presynaptic modulatory effect. The remaining recorded cells ($n = 4$, 57.1%) did not exhibit any amplitude change in the presence of low DA concentration (Figure 2(c)), suggesting that DA in low concentration did not modulate all GABAergic transmission on recorded MSNs.

Thirteen MSNs were evaluated with higher concentration of DA (20 μ M), and 53.8% ($n = 7$) of the recorded cells did not exhibit any modulation (Figure 2(i)), but 38.5% ($n = 5$) of the recorded cells did decrease the IPSC amplitude in

its presence. Figures 2(g) and 2(h) illustrate that the IPSC amplitude was reduced by 39.9% from control amplitude ($t_4 = 3.150$, $p = 0.0345$; two-tailed paired t -test; Figure 2(g)). The PPR did not exhibit significant changes (PPR: $t_4 = -1.171$, $p = 0.307$; Figure 2(j)); in addition, the rise time significantly increased by 28% compared with control (rise time: $t_4 = 3.393$, $p = 0.0275$; two-tailed paired t -test; Figure 2(k)), and the decay time constant remained the same (decay time: $t_2 = -1.928$, $p = 0.12$; Figure 2(l)). This data suggests that 20 μ M of DA modulates GABAergic transmission through a postsynaptic mechanism. Only one cell (7.7%) exhibited an amplitude increase after the application of DA at the high concentration (data not shown).

3.3. D1 and D2 Receptor Activation Modulates Striatal GABAergic Transmission. In order to identify the DA receptor responsible for specific effects of GABAergic transmission modulation, it was evaluated in the presence of D1 or D2 agonist and antagonist.

In the presence of the D1 agonist (SKF81297 10 μ M), 50% ($n = 4$) of the recorded cells exhibited a decrease in the IPSC amplitude, 37.5% ($n = 3$) exhibited an increase, and 12.5% ($n = 1$) of the cells exhibit no change in the IPSC amplitude (Figure 3(a)). In the cells that exhibited an amplitude reduction, the amplitude was reduced by 27% compared with the control, and this difference was statistically significant (control 100.519 ± 0.880 versus SKF 73.694 ± 4.499 , $t_3 = 5851$, $p = 0.001$; two-tailed paired t -test). In the cells that exhibited an amplitude increase, the amplitude increased by 74% compared with the control (control 100.248 ± 0.599 versus SKF 174.361 ± 6.546 , $t_2 = 2791$, $p = 0.049$; two-tailed paired t -test).

Paired-pulse analysis and measurement of the rise time and the decay time of the IPSC were analyzed to determine the pre- or postsynaptic nature of the modulatory effect. For the recordings in which the amplitude of the IPSC increased, the paired-pulse ratio (PPR) did not change (PPR: $t_2 = 0.301$, $p = 0.778$; two-tailed paired t -test; Figure 3(b)), nor did the time constants (rise time: $t_2 = -0.246$, $p = 0.818$; two-tailed paired t -test; Figure 3(c); decay time: $t_2 = 1677$, $p = 0.169$; two-tailed paired t -test; Figure 3(d)). For those recordings in which the IPSC exhibited a decrease in the presence of the D1 agonist, the decrease in the PPR was not significantly different ($n = 4$, PPR: $t_3 = 2324$, $p = 0.059$), nor were the changes in the kinetics (rise time: $t_3 = -0.287$, $p = 0.784$; two-tailed paired t -test; decay time: $t_3 = -0.340$, $p = 0.746$; two-tailed paired t -test). To construct the kinetics bars presented in Figures 3(c) and 3(d), all of the data from the cells were combined because they did not exhibit statistical changes in their kinetics. PPR exhibited no change in the presence of the D1 agonist, which may indicate a postsynaptic modulatory mechanism of the SKF81297; however the kinetics of the currents did not change in the presence of the D1 agonist which indicates a presynaptic mechanism for this modulation.

We next went to evaluate if endogenous DA affected IPSC amplitude by acting on D1 receptors; then D1 receptors were blocked. In the presence of the D1 antagonist, SCH23390 (1 μ M), the IPSC amplitude increased by 54% compared with

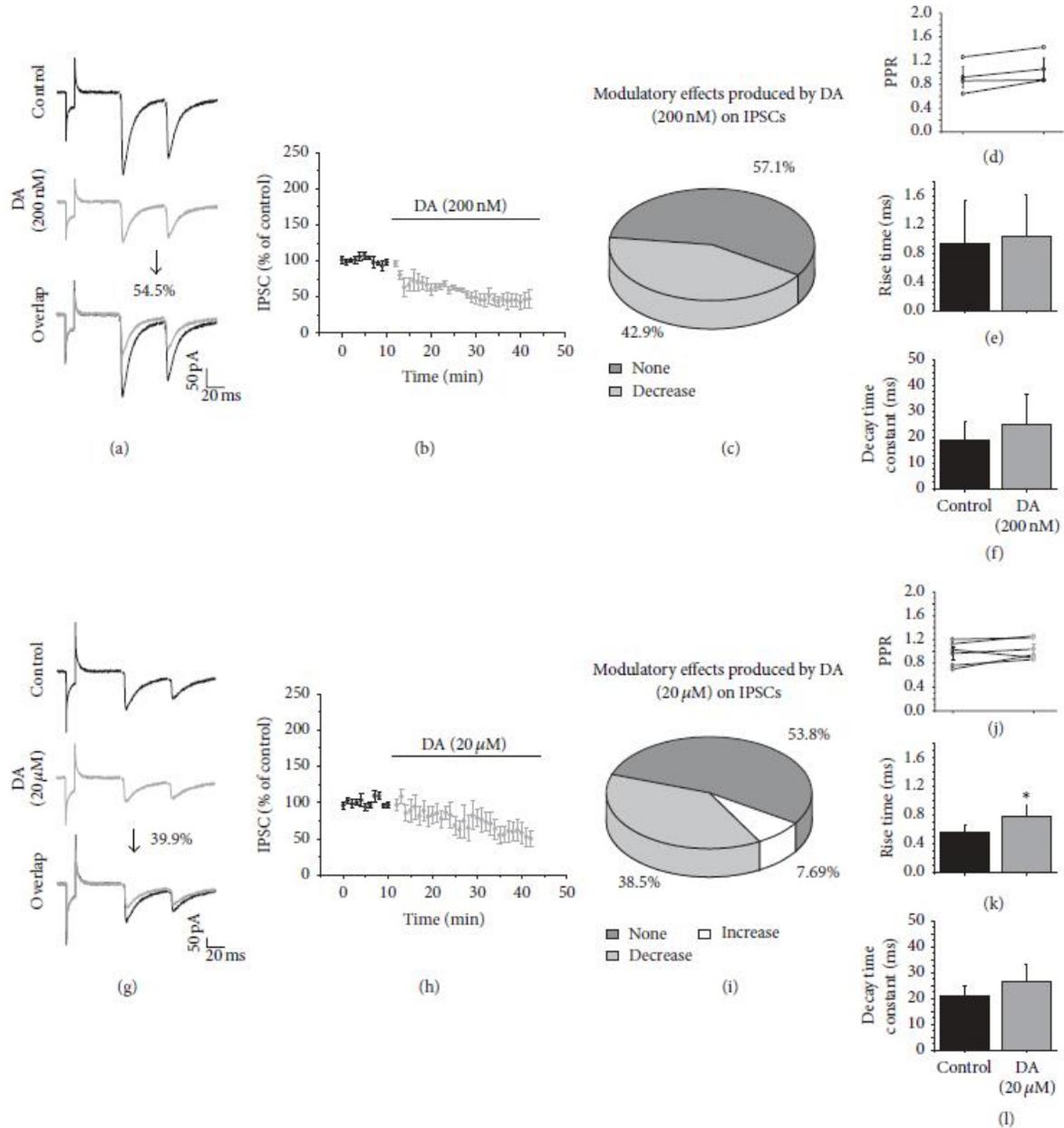


FIGURE 2: DA modulation of striatal GABAergic transmission. (a and g) show IPSCs traces in the control (top) and in the presence of DA ((a) 200 nM or (g) 20 μM in the middle) and an overlap of the recordings (bottom). (b and h) illustrate the time course of the DA effects. Data are presented as percentage of change compared with the control in all graphs. (c and i) Pie charts illustrate the distribution of the modulatory effects of DA (200 nM and 20 μM, resp.) on the IPSC amplitude. (d and l) display the PPR comparison of the IPSCs in the control and in the presence of DA. (e and k) The rise time and (f and l) the decay time constants of the IPSCs in the control and in the presence of DA. In this figure and the rest $H_V = -70$ mV, and recordings were in presence of CNQX (10 μM) and APV (50 μM).

the control (control 101.465 ± 0.816 versus SCH 155.553 ± 15.191 ; $t_4 = 3555$, $p = 0.007$; two-tailed paired t -test) in 71.4% ($n = 5$) of the recorded cells (Figure 3(e)). The analysis of the PPR (Figure 3(f)) and time constants (Figures 3(g) and 3(h)) revealed that there were no significant changes.

14.3% ($n = 1$) of the cells exhibited a decrease in their IPSC amplitude in the presence of SCH23390, and 14.3% ($n = 1$) of the cells exhibited no change (data not shown). These data illustrated that endogenous DA reduced the IPSC amplitude in the majority of the recorded MSNs.

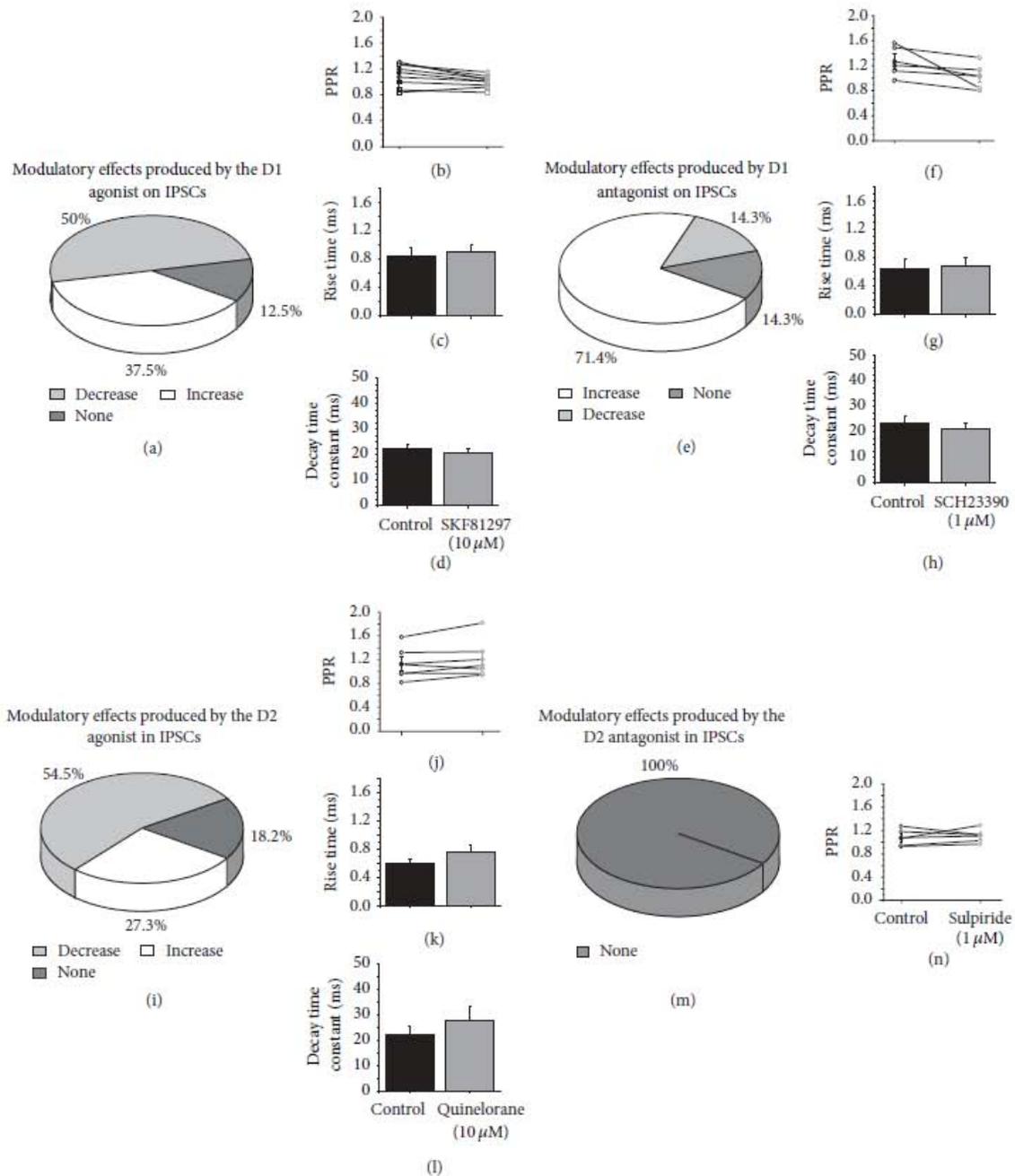


FIGURE 3: D1 and D2 receptors modulate striatal GABAergic transmission. (a, e, i, and m) are pie charts to illustrate the distribution of the modulatory effects of the D1 agonist, D1 antagonist, D2 agonist, and D2 antagonist, respectively, on the IPSC amplitude. (b, f, j, and n) display the PPR comparison of IPSCs in the control and after the addition of the DA reagent. (c, g, and k) The rise time and (d, h, and l) the decay time constants of the IPSCs in the control and in the presence of SKF81297 (10 μ M), SCH23390 (1 μ M), Quinelorane (10 μ M), and sulpiride (1 μ M).

To evaluate if DA effects on IPSC amplitude were mediated by the activation of D2 receptors, 11 MSNs were evaluated in the presence of the D2 agonist (Quinelorane, 10 μ M). In this situation, the IPSC amplitude decreased in 54.5% ($n = 6$), increased in 27.3% ($n = 3$), and produced no effect in 18.2% ($n = 2$) of the recorded cells (Figure 3(i)). In the cells with an IPSC amplitude decrease, the amplitude was reduced by 41% compared with control and the modulation was statistically significant (control 100.11 ± 0.26 versus Quinelorane 58.69 ± 3.046 , $t_5 = 13.246$, $p = 0.00004$; two-tailed paired t -test; Figure 3(i)). These results indicated that DA through the activation of D2 receptors reduced GABAergic transmission. The PPR did not change suggesting a postsynaptic mechanism (Figure 3(j)), nor however the IPSC kinetics did, suggesting a presynaptic mediated mechanism (Figures 3(k) and 3(l)).

To evaluate if endogenous DA affected IPSC amplitude through D2 activated mechanisms, the D2 antagonist sulpiride (1 μ M) was studied. Sulpiride produced no change in the IPSC amplitude, PPR, or current kinetics ($n = 5$, Figures 3(m) and 3(n)). These experiments illustrated that endogenous DA do not modulate IPSC amplitude by D2 activation.

3.4. GABAergic Synaptic Plasticity. To analyze the synaptic plasticity of the IPSCs in MSNs, HFS was given to 14 MSNs cells (see Section 2). Figure 4(a) presents the IPSC amplitude before (top) and after HFS (middle). HFS significantly decreased the IPSC amplitude by 49% compared with the amplitude before the train ($t_6 = 5919$, $p < 0.001$), in 50% ($n = 7$) of the recorded cells; this reduction persisted for more than 30 minutes; then, the current amplitude decrease was considered to be long-term depression (LTD; Figure 4(b)). The PPR before and after HFS did not change ($n = 7$; Figure 4(d)) nor did the time constants (Figures 4(e) and 4(f)). 42.9% ($n = 6$) of the recorded cells showed no change in the current amplitude after HFS, and only 7.14% ($n = 1$) of recorded cells exhibited an amplitude increase (Figure 4(c)).

To evaluate if all types of MSN developed inhibitory long-term plasticity, some experiments were performed on slices coming from BACDI-GFP mice. 13 cells were recorded, 4 cells did not exhibit any plasticity, and both BACDI-GFP-positive ($n = 3$) and BACDI-GFP-negative ($n = 3$) MSNs developed LTD after HFS; no one of the evaluated BACDI-GFP-positive cells developed LTP; however 3 BACDI-GFP-negative cells developed LTP. Figure 4(g) illustrates the reconstruction of a D1-GFP-negative expressing neuron that displayed GABAergic LTD; this neuron was considered as D2 expressing MSN.

From these results we conclude that MSNs expressing D1 and D2 developed LTD as the prevalent form of inhibitory long-term plasticity, and only neurons expressing D2 receptors displayed LTP.

3.5. GABAergic Synaptic Plasticity in Presence of DA. Once we showed that GABAergic synapses exhibit LTD as the main form of synaptic plasticity, we investigated whether DA modulate this form of plasticity. The role of DA in modulating GABAergic plasticity was also evaluated using two concentrations (200 nM and 20 μ M). In the presence of a low concentration of DA (200 nM), HFS induced LTD (Figure 5(a))

in 60% ($n = 3$) of the recorded cells, LTP was produced in only 20% ($n = 1$) of the recorded cells (Figure 5(c)), and 20% ($n = 1$) did not displayed any plasticity. In the cells in which LTD was observed, the amplitude was reduced by 73.11% compared with the current amplitude before HFS ($t_2 = 10.255$, $p = 0.00938$; Figures 5(a) and 5(b)). DA (200 nM) did not generate changes in the PPR nor in the current kinetics (Figures 5(d)–5(f)). High concentration of DA (20 μ M) induced a significant increase in the IPSC amplitude after HFS ($t_3 = 1.826$, $p = 0.125$, Figures 5(b) and 5(g)) in 50% ($n = 4$) of the evaluated cells (Figure 5(h)). The PPR and current kinetics did not change (Figures 5(i)–5(k)).

3.6. D1 Receptors Modulation of Striatal GABAergic Synaptic Plasticity. To better analyze DA effects of plasticity we used specific agonist and antagonist of dopamine receptors. In the presence of the D1 agonist SKF81297 (10 μ M), HFS induced LTD in all of the recorded cells ($n = 7$, $t_6 = 77$, $p < 0.001$; two-tailed paired t -test; Figures 6(a)–6(c)). The PPR (Figure 6(d)), rise time, and decay time did not change (Figures 6(e) and 6(f)) after HFS, indicating that D1 agonist activation modulates the LTD expression on striatal inhibitory plasticity through presynaptic mechanisms.

In the presence of the D1 antagonist, SCH23390 (1 μ M), HFS induced LTD in 77.8% ($n = 7$) of the recorded cells ($t_6 = 10.042$; $p < 0.001$; two-tailed paired t -test, Figures 6(g)–6(i)). The PPR (Figure 6(j)) and the time constants of the currents (Figures 6(k) and 6(l)) did not change. 22.2% ($n = 2$) of the recorded cells in the presence of the D1 antagonist did not develop any plasticity (Figure 6(i)). If D1 receptor activation was responsible for generating LTD, the block of the D1 receptors would eliminate LTD; however, 77.8% of the cells remained producing LTD (Figure 6(i)); then, receptors other than D1 should favor LTD on inhibitory synapses.

3.7. D2 Receptor Modulation of Striatal GABAergic Synaptic Plasticity. We next went to evaluate D2 receptors role in striatal plasticity of inhibitory synapses on MSN. In the presence of the D2 agonist Quinelorane (10 μ M), HFS generated LTD in 50% ($n = 7$) of the recorded cells and LTP in 28.6% ($n = 4$) of them. In those cells where LTD was generated, the amplitude of IPSC was reduced by 45.06% compared with the amplitude before HFS (Pre-HFS = 100.895 ± 0.687 versus Post-HFS = 55.833 ± 7.316 ; $t_6 = 5.838$, $p = 0.001$; two-tailed paired t -test, Figures 7(a) and 7(b)). The LTD did not produce changes in the PPR or in the current kinetics (Figures 7(d)–7(f)). In those cells that exhibited LTP in the presence of Quinelorane (Figure 7(c)), the increase in the IPSC amplitude was statistically significant ($t_3 = 5.685$, $p = 0.002$). The PPR significantly decreased ($t_3 = 2.398$, $p = 0.0373$) without any change in the current kinetics, indicative of presynaptic mechanisms in D2 modulation of LTP (data not shown). The rest of the recorded cells (21.4%, $n = 3$) demonstrated no change after HFS (Figure 7(c)). Data obtained in this section suggested that D2 receptor participates in the induction of LTD but also in LTP of GABAergic plasticity because the percentage of cells that exhibited LTP increased from 7.14 in control conditions to 28.6%.



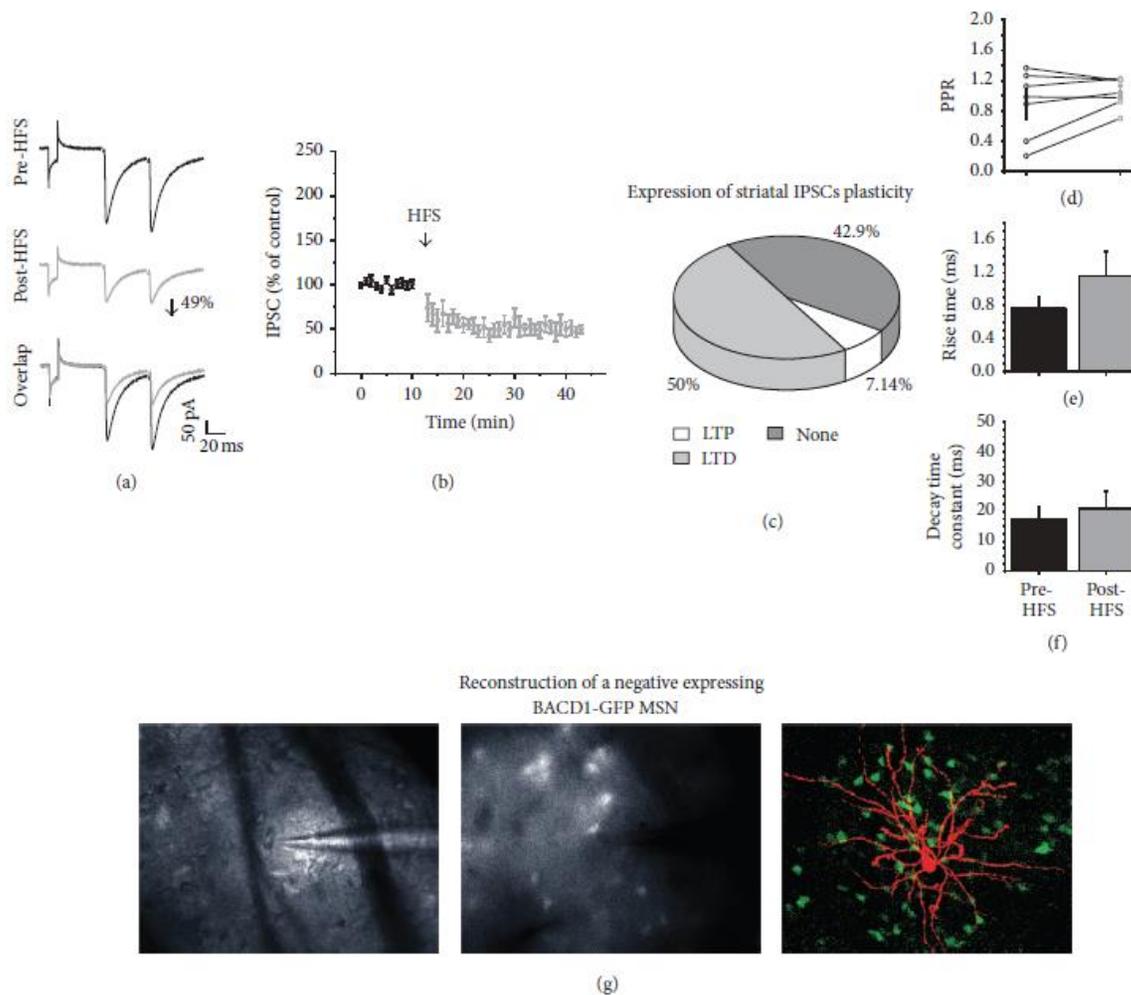


FIGURE 4: GABAergic synaptic plasticity. (a) shows representative traces of IPSC before and after the HFS (3 trains, of 100 Hz, for 3 s, with 10 s of interval). (b) Time course of the IPSC amplitudes before and after HFS. The data are normalized and presented as the percentage of change compared with the control in this figure and the rest of figures. (c) Distribution, in percentages, of the type of plasticity generated by HFS, 50% developed LTD, 7.14% developed LTP, and 42.9% did not develop plasticity. (d) PPR comparison of the IPSCs before and after HFS did not change. (e) Rise time and (f) decay time constants before and after stimulation. (g) Reconstruction of a MSN that exhibited LTD but was not positive to D1-GFP. In the left 10x magnification of the cell, in the middle 60x augmentation, note that no fluorescence is observed in the tip of the electrode. In the right, the cell was filled with biocytin during the electrophysiological recording and later processed with avidin-Cy3, to visualize it. Note that there is no overlap between GFP and the Cy3 of the MSN.

In the presence of the antagonist D2 sulpiride (1 μ M), HFS generated a modest but statistically significant LTD in all of the recorded cells ($n = 8$, Pre-HFS = 102.107 ± 1.36 versus Post-HFS = 74.28 ± 6.25 ; $t_7 = 4.933$, $p = 0.00169$; two-tailed t -test; Figures 8(g), 8(h), and 8(i)); however the LTD generated in the presence of sulpiride was slightly compared with that observed with Quinelorane (IPSC reduced by 45.06% in the presence of Quinelorane and 27.8% in the presence of sulpiride), suggesting that sulpiride reduced part of the LTD generated by D2 stimulation. The PPR did not change ($n = 8$; Figure 7(j)) nor did the time constants ($n = 8$; Figures 7(k) and 7(l)). Higher concentration of sulpiride (10 μ M) was

needed to fully prevent the LTD induction after HFS ($n = 5$; Pre-HFS = 100.47 ± 0.21 versus Post-HFS = 118.82 ± 15.70 , $t_4 = -1.182$, $p = 0.303$; two-tailed t -test; Figures 7(m) and 7(n)). This data demonstrated that the block of D2 receptors prevented LTD induction in inhibitory synapses on MSN.

Once knowing that the D2 antagonist abolished the development of LTD after HFS protocol, we evaluated the effect of HFS in the presence of both DA 200 nM and the D2 antagonist sulpiride (10 μ M). Under this condition, sulpiride prevented the LTD generated by HFS in presence of DA (200 nM) ($n = 3$; Figures 8(a) and 8(b)), without changes in the PPR (Figure 8(c)). Conversely, in the presence of



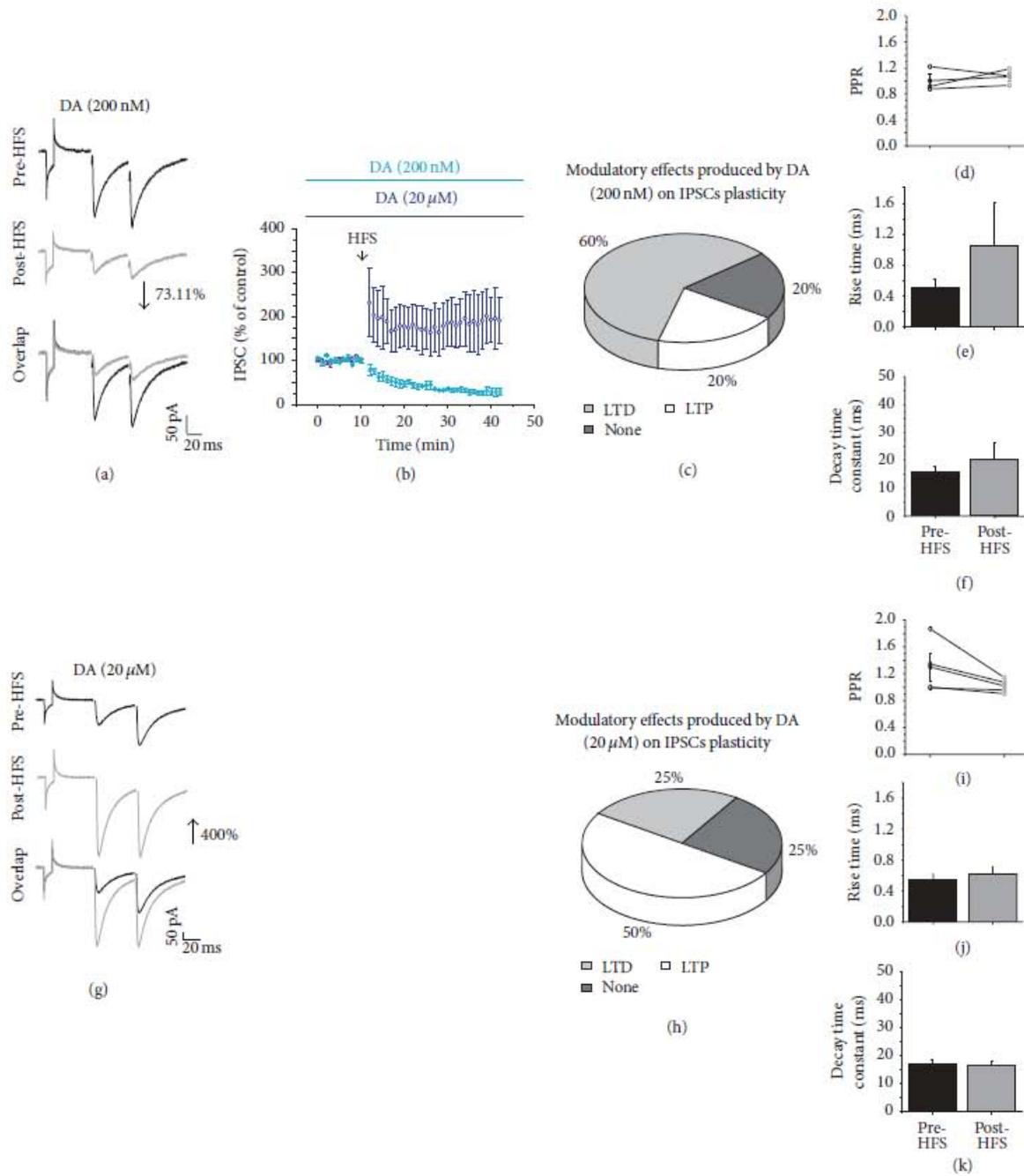


FIGURE 5: DA modulates GABAergic synaptic plasticity of MSNs. (a and g) are representative IPSC traces in the presence of DA (200 nM or 20 μM, resp.) before (top) and after HFS (middle) and an overlap of the recordings (bottom). (b) Time course of the IPSC amplitude before and after HFS in the presence of DA 200 nM (light blue) and 20 μM (dark blue, resp.). (c and h) show the distribution, in percentages, of the types of plasticity that were generated in the presence of DA (200 nM or 20 μM, resp.). (d and i) are the PPR comparisons of the IPSCs before and after HFS in the presence of DA (200 nM or 20 μM). (e and j) are the rise time, while (f and k) are the decay time before and after HFS in the presence of DA (200 nM or 20 μM).



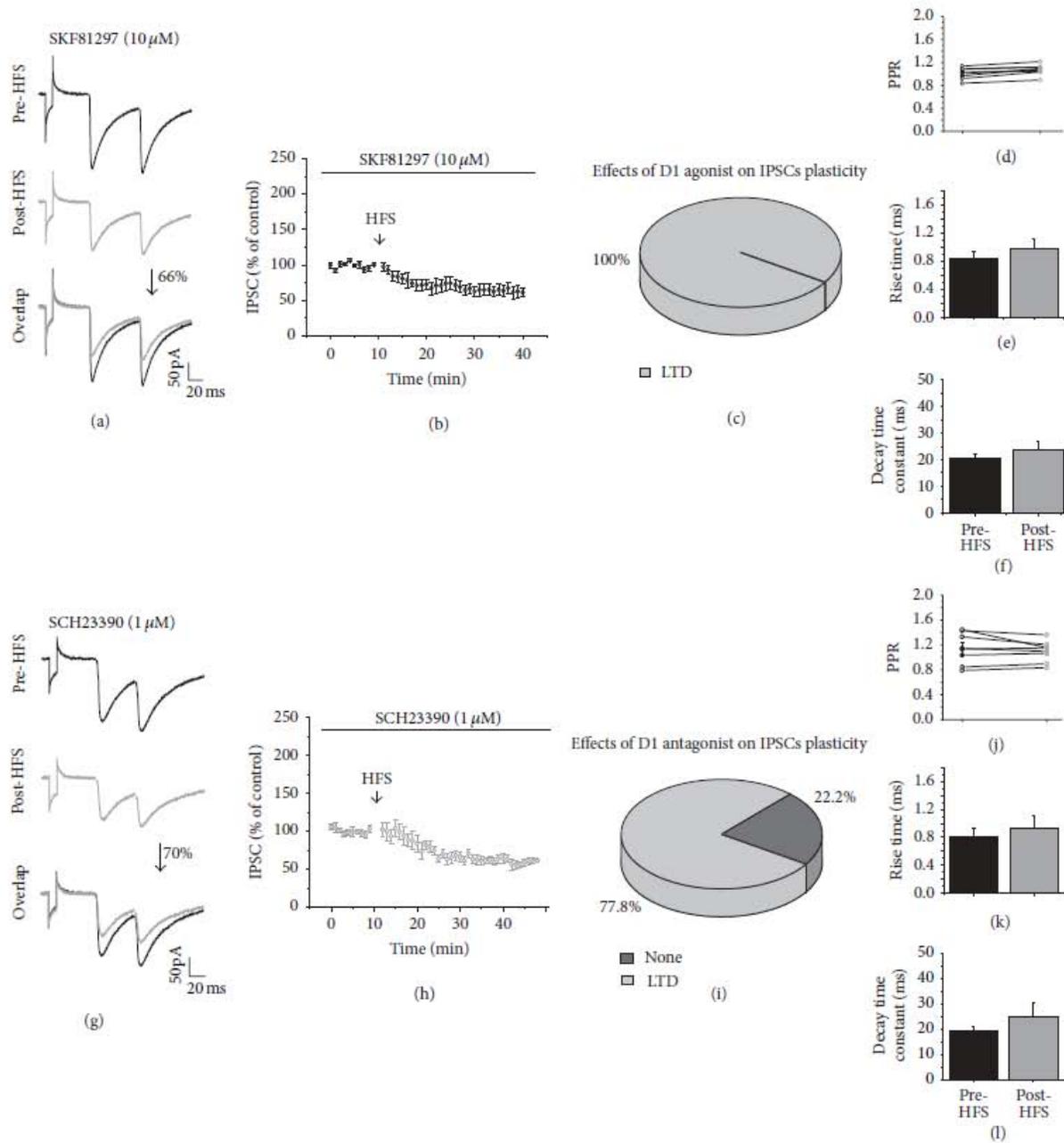


FIGURE 6: D1 modulation of GABAergic synaptic plasticity. (a and g) show representative IPSC traces before HFS (top) and after HFS (middle) and an overlap of the recordings (bottom), all in the presence of the D1 agonist SKF81297 (10 μ M) and the D1 antagonist SCH23390 (1 μ M), respectively. (b and h) illustrate the time course of the effects of HFS on the IPSC amplitude in the presence of SKF81297 and SCH23390, respectively. (c and i) display the distribution in percentages of the types of plasticity that were generated in the presence of the D1 agonist or antagonist. (d and j) are the PPR comparison of the IPSCs before and after HFS in presence of SKF81297 and SCH23390, respectively. (e and k) are the rise time, while (f and l) are the decay time in the presence of SKF81297 and SCH23390, respectively, before and after HFS.



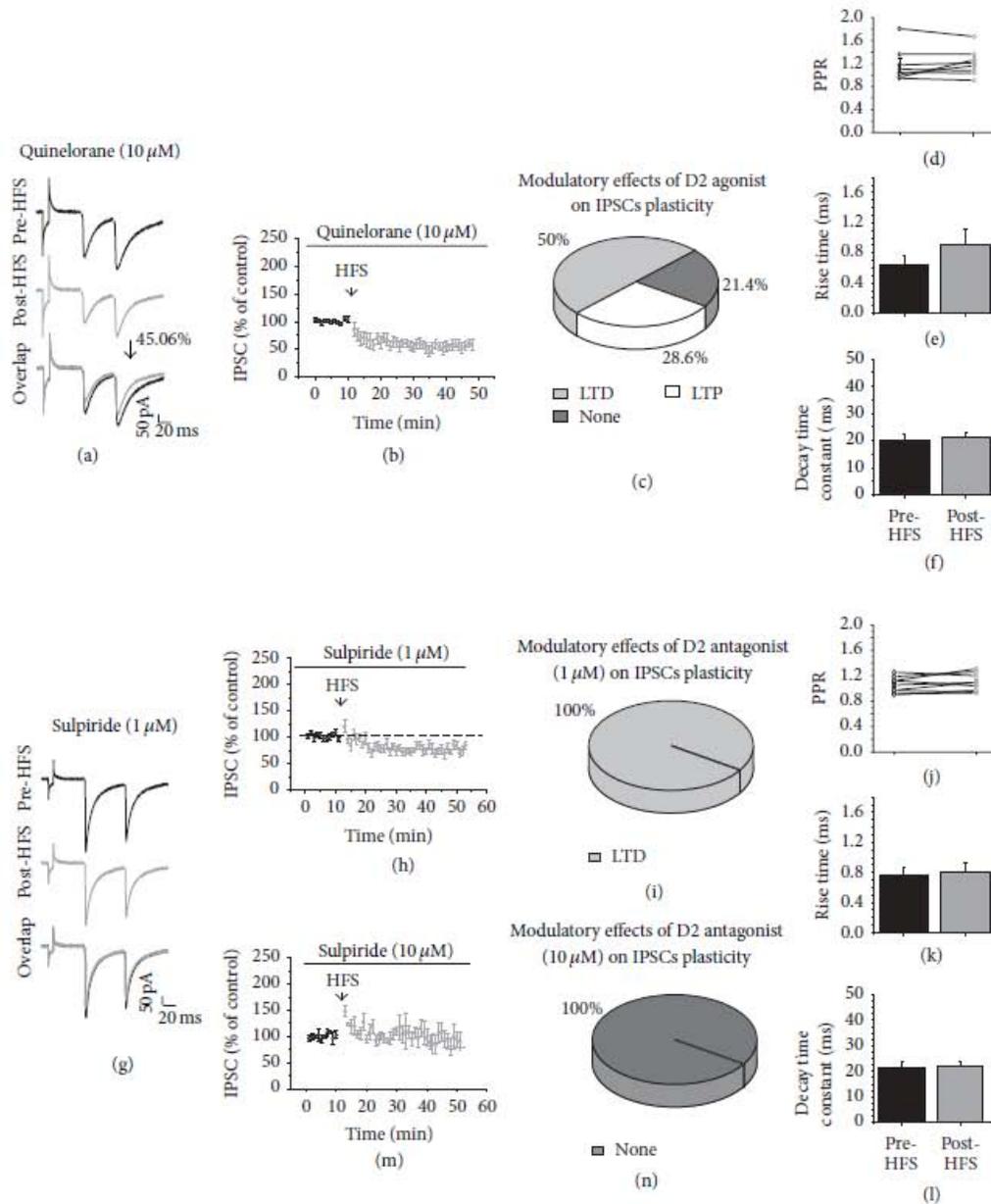


FIGURE 7: D2 modulation of GABAergic synaptic plasticity. (a and g) show representative IPSC traces before (top) and after HFS (middle) in the presence of the D2 agonist (Quinelorane, 10 μM) and the D2 antagonist (sulpiride, 1 μM), respectively, and an overlap of the recordings (bottom). (b, h, and m) are the time course of the IPSC amplitude before and after HFS in the presence of Quinelorane or sulpiride. (c and i) illustrate the distribution, in percentages, of the types of plasticity that were generated in the presence of the D2 agents. (d and j) are the PPR comparison of the IPSCs before and after HFS in presence of Quinelorane or sulpiride. (e and k) are the rise time and (f and l) are the decay time in the presence of Quinelorane or sulpiride before and after HFS. (n) HFS in the presence of sulpiride blocks the generation of LTD.

DA (20 μM), sulpiride did not affect the LTP generated by HFS ($n = 3$; Figures 8(b) and 8(d)) and no changes were obtained in the PPR. Interestingly, PKA inhibitor H89 inside the recording pipette prevented the induction of any plasticity ($n = 5$, Pre-HFS = 103.33 ± 1.66 ; Post-HFS = 103.86 ± 8.66 ;

$t_4 = -0.0617$, $p = 0.954$; two-tailed t -test; Figures 8(f) and 8(g)).

3.8. GABAergic Synaptic Plasticity in Striatal Degeneration: Role of DA. High levels of DA have been observed in early



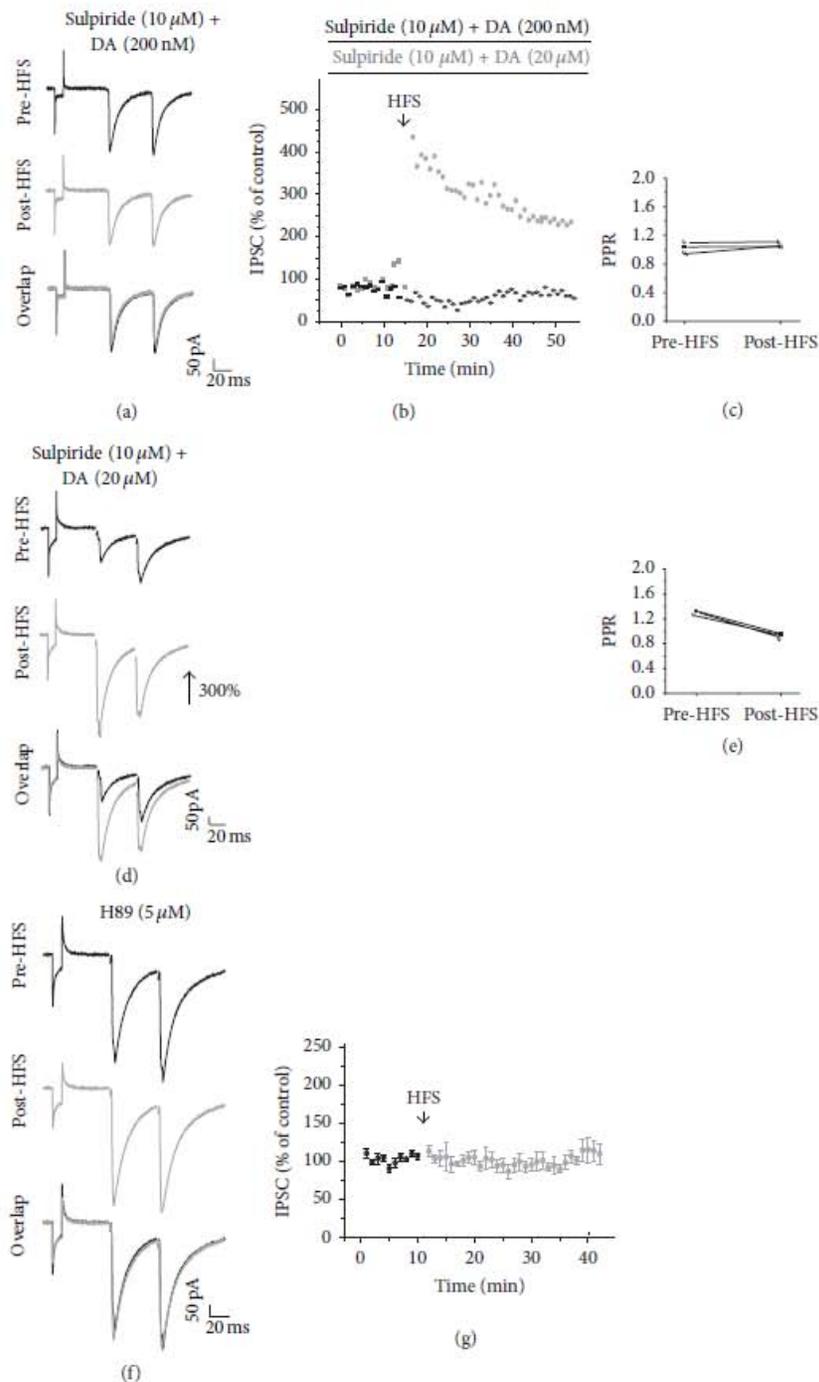


FIGURE 8: Sulpiride and H89 on DA triggered plasticity. (a and d) are representative IPSC traces in the presence of DA + sulpiride before (top) and after HFS (middle) and the overlap of the recordings (bottom). (b) Time course of the IPSC amplitude of two experiments before and after HFS in the presence of DA (200 nM) + sulpiride (10 μ M) and DA (20 μ M) + sulpiride (10 μ M). Note that sulpiride prevented the LTD induced by DA 200 nM but did not prevent the LTP induced by HFS in the presence of DA (20 μ M). (c and e) are the PPR comparison of the IPSCs before and after HFS in presence of DA (200 nM or 20 μ M, resp.) + sulpiride (10 μ M). (f) illustrates representative IPSC traces in the presence of PKA inhibitor H89. (g) Time course of the IPSC amplitude in the presence of the PKA blocker. Note that H89 blocks striatal plasticity induction.

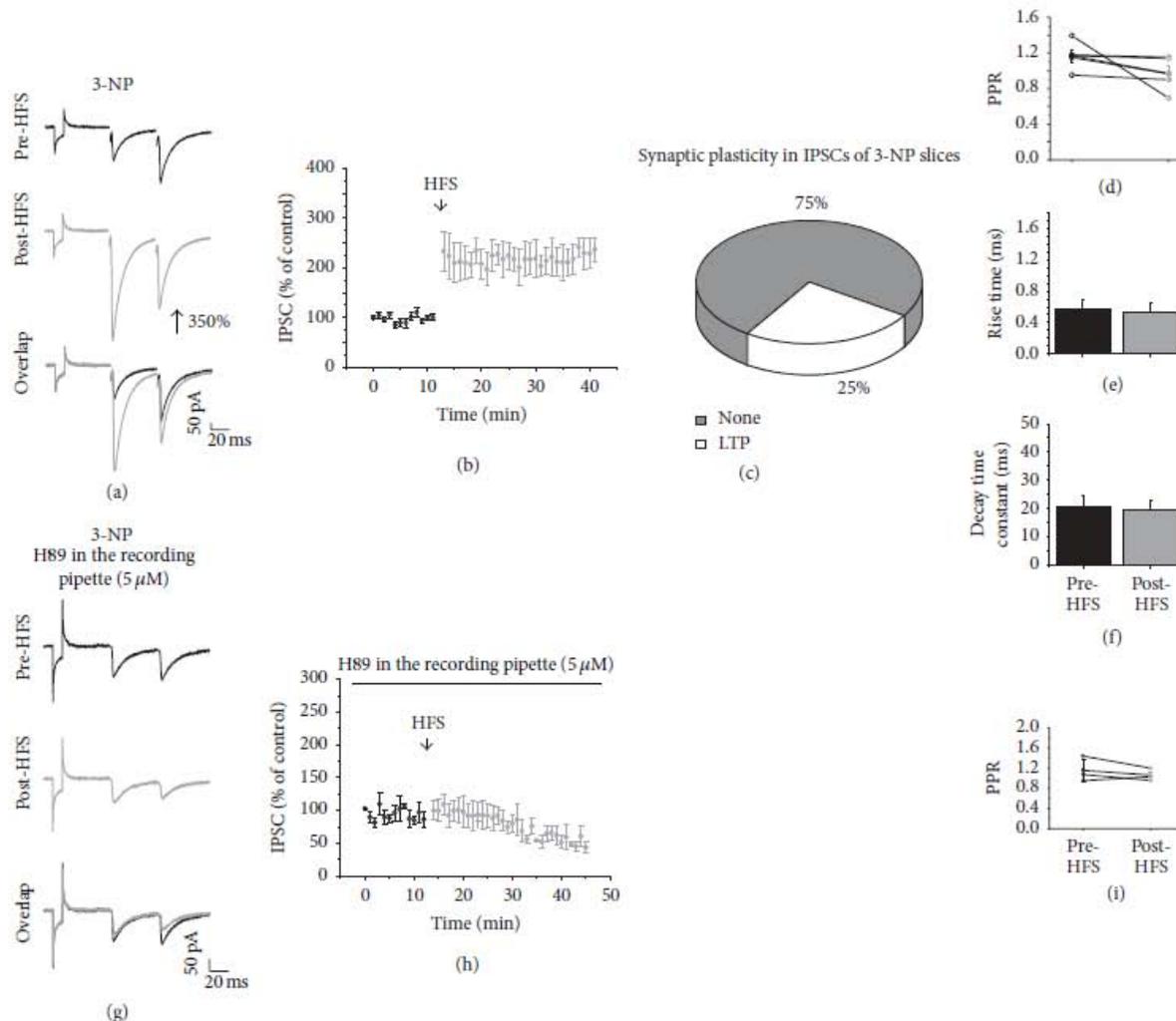


FIGURE 9: Synaptic plasticity in the striatal degeneration. (a) shows representative traces of IPSC before (top) and after HFS (middle) and an overlap of the traces (bottom). Note that LTP is produced after HFS. (b) illustrates the time course of the IPSC amplitude before and after HFS. (c) displays the percentage of cells that exhibited LTP after HFS in 3-NP-treated slices. (d) shows the PPR comparison of the IPSCs before and after HFS. (e) The rise time and (f) decay time constants before and after HFS. (g) shows representative IPSCs traces before (top) and after HFS (middle) in the presence of H89 (5 μ M) and overlap of the traces (bottom). (h) Time course of the IPSC amplitude before and after HFS in the presence of H89 (5 μ M). Note that the block of PKA prevented the generation of LTP in 3-NP slices. (i) is the PPR comparison of the IPSCs before and after HFS in the presence of H89.

stages of striatal degeneration such as HD, and then we wondered if GABAergic plasticity in such conditions could be similar to that observed under high DA concentration. Therefore, some experiments were designed to analyze the type of plasticity triggered in the IPSCs during the striatal degeneration induced by the systemic administration of 3-NP (15 mg/kg, i.p., 5 days). Of the 20 recorded cells from 3-NP-treated mice slices, only 5 of the recorded cells (25%) exhibited synaptic plasticity (Figure 9(c)). Interestingly, the type of plasticity generated was only LTP (Pre-HFS = 97.45 ± 1.73 versus Post-HFS = 220.45 ± 26.32 ; $t_4 = -4.565$; $p = 0.0103$, Figures 9(a) and 9(b)). This result was similar to

that obtained in the presence of DA (20 μ M). No changes were observed in the PPR (Figure 9(d)) or in the current kinetics before and after HFS (Figures 8(e) and 8(f)). In the presence of the D1 antagonist, LTP induction was prevented in cells from 3-NP-treated mice (Pre-HFS = 98.87 ± 1.26 versus Post-HSF = 105.19 ± 8.62 ; $t_8 = -0.725$, $p = 0.489$; two-tailed t -test, data not shown). Furthermore, as the block of PKA signaling pathway prevented the LTP induced in the presence of DA in high concentration (20 μ M, Figure 8(g)), we performed some experiments with the PKA inhibitor H89 (5 μ M) inside of the recording pipette in slices from 3-NP-treated mice. In this situation, the LTP induction after HFS

was prevented (Figures 9(g) and 9(h)) and LTD development was favored (Pre-HFS = 98.16 ± 2.95 versus Post-HFS = 55.22 ± 9.54 ; $t_2 = 6.52$; $p = 0.02$; two-tailed t -test) without changes in the PPR (Figure 9(i)). This result supports the idea that LTP of inhibitory synapses on MSNs is triggered by PKA signaling pathway in striatal degeneration and its postsynaptic inhibition promotes the development of LTD.

4. Discussion

The present study describes that DA modulation of GABAergic synapses on MSNs and the type of plasticity developed depend on the DA concentration and the activation of D1- or D2-class receptors. Also DA effect on striatal plasticity was altered in striatal degeneration.

4.1. DA Modulation of GABAergic Synapses on MSNs. DA at a low and high concentration decreased the IPSC amplitude compared with the control conditions in most of the recorded cells. However when specific D1 and D2 agents were evaluated modulation on GABAergic synapses depended on DA receptors activation or inhibition. The D1 agonist produced decrease and increase in the IPSC amplitude of the MSNs recorded. The D1 family receptors include the D₁ and D₅ receptors, which are differentially located in striatal neurons, and exhibited different affinities for the agonist [26] and different dependencies on the G protein/adenylyl cyclase signaling pathway [27]. Additionally, there are also diverse responses due to the activation of pre- or postsynaptic mechanisms. In recordings from dissociated MSNs, SKF81297 (1–10 μ M) reduces the postsynaptic GABA ligand-gated-currents [10, 28]. On the contrary, the presynaptic D₁ receptor activation of axonal collaterals from MSNs stimulates GABAergic synapses on other MSNs [29]. Furthermore, D₅ receptors are expressed in the terminals of GABAergic interneurons [30], because most of the cells recruited with intrastriatal stimulation are the GABAergic interneurons [23]; changes in the IPSC amplitude in the presence of the D1 agonist may be due to the activation of the presynaptic D₅ receptors on GABAergic interneurons.

Blocking the D1 receptors mainly produced an increase in the GABAergic currents, suggesting that when D1 receptors are blocked, the D2 activation by endogenous DA is unmasked. The agonist D2, Quinelorane 10 μ M, also produces decrease and increase of the IPSC amplitude. D2 receptors belong to a family that has several subtypes, such as D₂, D₃, and D₄; the striatum mostly expresses D₂ and D₃ [26] and Quinelorane affects both of them and may produce different responses depending on receptor sensitivity and selectivity [31]. D2 receptors are located postsynaptically in the MSNs that express enkephalins, but they are also autoreceptors in the striatal dopaminergic terminals; low concentrations of DA activate them, decreasing the endogenous release of DA as a response [26]. Subsequently, in those cells in which the D2 agonist produced an IPSC amplitude increase, the effect may be postsynaptically mediated, whereas a decrease in the IPSC may be related to a presynaptic effect. Earlier study showed that the stimulation of presynaptic D2 receptors decreases GABAergic synaptic amplitude [29].

4.2. GABAergic Synaptic Plasticity and Its DA Modulation. HFS decreased the IPSC amplitude in 50% of the experiments; these results are consistent with those obtained by others using different stimulation protocols [32, 33].

DA concentration was crucial for determining the type of inhibitory plasticity triggered at the striatum. In the presence of DA, HFS generated both LTD and LTP; however, a low DA concentration (200 nM) produced mostly LTD, whereas higher concentration of DA (20 μ M) favored LTP in half of the experiments. DA at low concentrations activates high affinity receptors, whereas higher concentrations also activate low affinity receptors. D2 receptors possess higher affinity for DA and their stimulation facilitates LTD. Moreover, the administration of sulpiride 10 μ M prevented the LTD induced with HFS in the presence of DA at 200 nM, whereas the administration of sulpiride in the presence of DA at 20 μ M did not prevent the induction of LTP, but only H89 did, supporting the notion that D2 receptors play an important role in triggering striatal LTD in inhibitory synapses at the striatum, whereas D1 activation coupled to PKA signaling pathway is mainly involved in generating LTP in the GABAergic synapses. However, we cannot rule out that postsynaptic D2 receptors may mediate increases in the IPSCs after HFS in the presence of 20 μ M of DA because postsynaptic D2 in MSNs of the indirect pathway can stimulate intracellular calcium through the phospholipase C pathway [34]. This pathway enhances GABA_A currents by mobilizing intracellular Ca²⁺ [35].

4.3. D1 and D2 Modulation of Striatal GABAergic Synaptic Plasticity. To better understand DA receptors role in plasticity, specific DA agonist and antagonist were evaluated. In the presence of the D1 agonist, HFS produced LTD in all recorded cells. Despite this finding, HFS in the presence of the D1 antagonist still generated LTD in a large percentage of the cells (77.8%), demonstrating that the inhibition of D1 receptors did not prevent the development of striatal LTD in the majority of the inhibitory synapses.

HFS in the presence of the D2 agonist generated LTD in 50% of the cells and LTP in 28% of the cells. Nevertheless, in the presence of the D2 antagonist, all Inhibitory plasticity in MSNs was prevented. In fact, in D2 knockout mice LTD of corticostriatal excitatory plasticity is abolished, generating LTP instead [36]. Our results indicate that D2 receptors play an important role in triggering LTD of inhibitory striatal plasticity as well.

4.4. GABAergic Plasticity in Striatal Degeneration. Synaptic abnormalities in corticostriatal pathway have been described after acute 3-NP treatment [21, 37, 38], but there is no study of changes on inhibitory synapses on MSNs. Evaluation of synaptic plasticity of this connection on damaged MSNs indicated that 75% of the recorded cells did not exhibit any plasticity, while the other 25% of the cells exhibited only LTP. The LTP produced in slices of 3-NP-treated mice resembled the LTP triggered under high levels of DA in normal tissue (Figures 9(b) and 5(b), resp.). This LTP was affected by the D1 antagonist and the PKA inhibitor (Figures 9(g) and 9(h)) which in its presence generates LTD, suggesting that D1

receptors are involved in the plasticity observed in damaged striatal tissue. Striatal LTP in IPSCs may result from a dysregulation in DA release [39] produced by 3-NP, as observed in other animal models of striatal degeneration [19]. It appears that a sustained elevation of DA or an imbalance in its concentration causes selective degeneration of striatal GABAergic neurons and motor dysfunction [17, 18]. A reduction in D1 receptors has been documented in acute 3-NP administration [37]; if this were the case within *in vivo* subchronic treatment, an alternative mechanism to explain LTP in striatal IPSCs is that feed forward inhibition mechanism, mediated mainly by fast spiking (FS) interneurons [40] on MSNs expressing D1 receptors (direct pathway), was overactivated in damaged striatum; in fact we have shown a reduction in number of spines, and dendrites tick in our 3-NP model of degeneration [21] which may indicate that interneurons projecting on the perisomatic area would have more synaptic impact on MSNs than those arriving in distal areas; FS are the ones heavily innervating perisomatic area in MSNs [9]; then LTP exhibited in MSN expressing D1 receptors may be produced when FS are activated with field stimulation in control slices as well as in slices from damaged striatum; further experiments should test this hypothesis.

5. Conclusion

DA effect on striatal plasticity was different from its modulatory action in inhibitory synapses on MSNs. The variability on synaptic responses may be due in part to the set of GABAergic afferents to MSNs (mainly interneurons) stimulated that exhibit different DA receptors as well as DA receptors that are present in recorded MSNs.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT Grant no. 81062-2007 and DGAPA-PAPIIT Grant no. IN201307. Elizabeth Nieto Mendoza received a Ph.D. fellowship from CONACyT-México and a thesis fellowship from COMECyT. This work is a partial fulfillment of the requirements for her Ph.D. degree in biomedical sciences at Universidad Nacional Autónoma de México. The authors thank The Mutant Mouse Regional Resource Center U42OD010918, University of Missouri, for producing BACDI-GFP; C. Rivera and X. Ayala for breeding them in the animal facility of the IFC, UNAM; E. Mendoza and D. Tapia for technical support during the experimental procedures and for histological processing, respectively; and Dr. J. Vargas (IFC, UNAM) for his comments on this work.

References

- [1] E. S. Bromberg-Martin, M. Matsumoto, and O. Hikosaka, "Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting," *Neuron*, vol. 68, no. 5, pp. 815–834, 2010.
- [2] A. Nishi, M. Kuroiwa, and T. Shuto, "Mechanisms for the modulation of dopamine D₁ receptor signaling in striatal neurons," *Frontiers in Neuroanatomy*, vol. 5, article 43, 2011.
- [3] G. L. Willis, C. Moore, and S. M. Armstrong, "Breaking away from dopamine deficiency: an essential new direction for Parkinson's disease," *Reviews in the Neurosciences*, vol. 23, no. 4, pp. 403–428, 2012.
- [4] P. Calabresi, N. B. Mercuri, and M. Di Filippo, "Synaptic plasticity, dopamine and Parkinson's disease: one step ahead," *Brain*, vol. 132, no. 2, pp. 285–287, 2009.
- [5] C. Cepeda, N. A. Buchwald, and M. S. Levine, "Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 20, pp. 9576–9580, 1993.
- [6] E. Hernández-Echeagaray, A. J. Starling, C. Cepeda, and M. S. Levine, "Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: are dendrites necessary?" *European Journal of Neuroscience*, vol. 19, no. 9, pp. 2455–2463, 2004.
- [7] P. Calabresi, R. Maj, A. Pisani, N. B. Mercuri, and G. Bernardi, "Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization," *The Journal of Neuroscience*, vol. 12, no. 11, pp. 4224–4233, 1992.
- [8] P. Calabresi, B. Picconi, A. Tozzi, and M. Di Filippo, "Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity," *Trends in Neurosciences*, vol. 30, no. 5, pp. 211–219, 2007.
- [9] Y. Kawaguchi, C. J. Wilson, S. J. Augood, and P. C. Emson, "Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization," *Trends in Neurosciences*, vol. 18, no. 12, pp. 527–535, 1995.
- [10] E. Hernández-Echeagaray, C. Cepeda, M. A. Ariano, M. K. Lobo, D. R. Sibley, and M. S. Levine, "Dopamine reduction of GABA currents in striatal medium-sized spiny neurons is mediated principally by the D₁ receptor subtype," *Neurochemical Research*, vol. 32, no. 2, pp. 229–240, 2007.
- [11] J. N. Guzmán, A. Hernández, E. Galarraga et al., "Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum," *The Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 26, pp. 8931–8940, 2003.
- [12] N. Gustafson, E. Gireesh-Dharmaraj, U. Czubayko, K. T. Blackwell, and D. Plenz, "A comparative voltage and current-clamp analysis of feedback and feedforward synaptic transmission in the striatal microcircuit *in vitro*," *Journal of Neurophysiology*, vol. 95, no. 2, pp. 737–752, 2006.
- [13] T. Koos, J. M. Tepper, and C. J. Wilson, "Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum," *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 36, pp. 7916–7922, 2004.
- [14] F. Tecuapetla, L. Carrillo-Reid, J. Vargas, and E. Galarraga, "Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 24, pp. 10258–10263, 2007.
- [15] P. E. Rueda-Orozco, E. Mendoza, R. Hernandez et al., "Diversity in long-term synaptic plasticity at inhibitory synapses of striatal spiny neurons," *Learning & Memory*, vol. 16, no. 8, pp. 474–478, 2009.
- [16] M. Darvas, C. W. Henschen, and R. D. Palmiter, "Contributions of signaling by dopamine neurons in dorsal striatum to cognitive behaviors corresponding to those observed in Parkinson's disease," *Neurobiology of Disease*, vol. 65, pp. 112–123, 2014.



- [17] M. Cyr, J.-M. Beaulieu, A. Laakso et al., "Sustained elevation of extracellular dopamine causes motor dysfunction and selective degeneration of striatal GABAergic neurons," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 19, pp. 11035–11040, 2003.
- [18] J. Y. Chen, E. A. Wang, C. Cepeda, and M. S. Levine, "Dopamine imbalance in Huntington's disease: a mechanism for the lack of behavioral flexibility," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 7, article 114, 2013.
- [19] C. Cepeda, K. P. S. Murphy, M. Parent, and M. S. Levine, "The role of dopamine in Huntington's disease," *Progress in Brain Research*, vol. 211, pp. 235–254, 2014.
- [20] E. Hernández-Echeagaray, G. de la Rosa-López, and E. Mendoza-Duarte, "The use of the mitochondrial toxin 3-NP to uncover cellular dysfunction in Huntington's disease," in *Huntington's Disease—Core Concepts and Current Advances*, N. E. Tunaly, Ed., chapter 15, pp. 347–360, InTech, Rijeka, Croatia, 2012.
- [21] E. Mendoza, J. A. Miranda-Barrientos, R. A. Vázquez-Roque et al., "In vivo mitochondrial inhibition alters corticostriatal synaptic function and the modulatory effects of neurotrophins," *Neuroscience*, vol. 280, pp. 156–170, 2014.
- [22] D. Jaeger, H. Kita, and C. J. Wilson, "Surround inhibition among projection neurons is weak or nonexistent in the rat neostriatum," *Journal of Neurophysiology*, vol. 72, no. 5, pp. 2555–2558, 1994.
- [23] F. Tecuapetla, L. Carrillo-Reid, J. N. Guzmán, E. Galarraga, and J. Bargas, "Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation," *Journal of Neurophysiology*, vol. 93, no. 2, pp. 1119–1126, 2005.
- [24] H. Trantham-Davidson, L. C. Neely, A. Lavin, and J. K. Seamans, "Mechanisms underlying differential D1 versus D2 dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex," *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 47, pp. 10652–10659, 2004.
- [25] Y.-C. Li, M.-J. Wang, and W.-J. Gao, "Hyperdopaminergic modulation of inhibitory transmission is dependent on GSK-3 β signaling-mediated trafficking of GABA_A receptors," *Journal of Neurochemistry*, vol. 122, no. 2, pp. 308–320, 2012.
- [26] J.-M. Beaulieu and R. R. Gainetdinov, "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors," *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 1, pp. 182–217, 2011.
- [27] Q. Wang, J. P. Jolly, J. D. Surmeier et al., "Differential dependence of the D₁ and D₅ dopamine receptors on the G protein γ_7 subunit for activation of adenylyl cyclase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 42, pp. 39386–39393, 2001.
- [28] J. Flores-Hernandez, S. Hernandez, G. L. Snyder et al., "D₁ dopamine receptor activation reduces GABA_A receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PPI signaling cascade," *Journal of Neurophysiology*, vol. 83, no. 5, pp. 2996–3004, 2000.
- [29] F. Tecuapetla, T. Koós, J. M. Tepper, N. Kabbani, and M. E. Yeckel, "Differential dopaminergic modulation of neostriatal synaptic connections of striatopallidal axon collaterals," *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 28, pp. 8977–8990, 2009.
- [30] N. X. Tritsch and B. L. Sabatini, "Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum," *Neuron*, vol. 76, no. 1, pp. 33–50, 2012.
- [31] S. Ananthan, S. K. Saini, G. Zhou et al., "Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of a series of [4-(4-carboxamidobutyl)]-1-arylpiperazines: insights into structural features contributing to dopamine D3 versus D2 receptor subtype selectivity," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 57, no. 16, pp. 7042–7060, 2014.
- [32] L. Adermark and D. M. Lovinger, "Frequency-dependent inversion of net striatal output by endocannabinoid-dependent plasticity at different synaptic inputs," *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 5, pp. 1375–1380, 2009.
- [33] L. Adermark, G. Talani, and D. M. Lovinger, "Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity," *European Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 1, pp. 32–41, 2009.
- [34] S. Hernández-López, T. Tkatch, E. Perez-Garci et al., "D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]-IP3-calciurein-signaling cascade," *Journal of Neuroscience*, vol. 20, no. 24, pp. 8987–8995, 2000.
- [35] H. Toyoda, M. Saito, H. Sato et al., "Enhanced lateral inhibition in the barrel cortex by deletion of phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2 in mice," *Pflügers Archiv*, vol. 467, no. 7, pp. 1445–1456, 2015.
- [36] P. Calabresi, A. Saiardi, A. Pisani et al., "Abnormal synaptic plasticity in the striatum of mice lacking dopamine D2 receptors," *The Journal of Neuroscience*, vol. 17, no. 12, pp. 4536–4544, 1997.
- [37] M. Napolitano, D. Centonze, P. Gubellini et al., "Inhibition of mitochondrial complex II alters striatal expression of genes involved in glutamatergic and dopaminergic signaling: possible implications for Huntington's disease," *Neurobiology of Disease*, vol. 15, no. 2, pp. 407–414, 2004.
- [38] M. Di Filippo, A. Tozzi, B. Picconi, V. Ghiglieri, and P. Calabresi, "Plastic abnormalities in experimental Huntington's disease," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 7, no. 1, pp. 106–111, 2007.
- [39] M. A. Johnson, V. Rajan, C. E. Miller, and R. M. Wightman, "Dopamine release is severely compromised in the R6/2 mouse model of Huntington's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 97, no. 3, pp. 737–746, 2006.
- [40] A. H. Gittis, A. B. Nelson, M. T. Thwin, J. J. Palop, and A. C. Kreitzer, "Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 6, pp. 2223–2234, 2010.

