



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Participación de conductancias de potasio  
en la integración sináptica cortico-estriatal

## TESIS

Que para obtener el título de

PSICÓLOGO

PRESENTA:

Mario Alberto Arias García

Jurado:

Presidenta: Dra. Maria Asunción Corsi Cabrera

Vocal: Dra. Elvira Galarraga Palacio

Secretario: Dr. César Casasola Castro

Suplente: Dr. Fernando Peña Ortega

Suplente: Dr. Jaime Eduardo Calixto González



México, D.F

Septiembre 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó en el departamento de Neurociencias del Instituto de fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Elvira Galarraga Palacio.

El proyecto de investigación se desarrolló con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México: IN201507.

Igualmente se contó con el apoyo del Programa de Investigación Multidisciplinaria de Proyectos Universitarios de Liderazgo y Superación Académica (IMPULSA 03). “Células troncales adultas, regeneración neuronal y enfermedad de Parkinson” UNAM.

## *Agradecimientos*

A mi familia por su invaluable e incondicional apoyo:

Irene García Galindo, Roberto Arias Martínez y Nancy Y Arias García.

A la Dra. Elvira Galarraga Palacio por la excelente dirección de este trabajo.

Al Dr. José Bargas Díaz por el gran apoyo que brindó al proyecto.

Al Dr. José Fernando Peña Ortega, por su amable revisión de la tesis.

Al Biólogo Dagoberto Tapia Ramírez, por el asesoramiento y colaboración en el trabajo anatómico de esta tesis.

Al diseñador Odrey González, por el asesoramiento de la realización de esquemas y animación de las ilustraciones.

Al comité sinodal por sus aportaciones y comentarios:

Presidenta: Dra. Maria Asunción Corsi Cabrera.

Vocal: Dra. Elvira Galarraga Palacio.

Secretario: Dr. César Casasola Castro.

Suplente: Dr. Fernando Peña Ortega.

Suplente: Dr. Jaime Eduardo Calixto González.

A mis compañeros del instituto:

Edén Flores, Bianca Vizcarra, Gisselle López, Janet Barroso, Belén Pérez, Aleph Prieto, José Aceves, Teresa Hernández, Pavel Rueda, Ricardo Hernández, Esther Lara, Omar Hernández, Jesús Pérez, Víctor Plata, Mariana Duhne, Antonio Laville.

Por compartir la experiencia académica

A mis amigos:

Ahmed Mendoza, Amanda Rodríguez, Víctor Mendoza, Roberto Archundia, Omar Elizalde, Jennifer Montiel, Maribel Delgado, Cristina Hernández, Viridiana Becerril, Yamil Rodríguez, Pamela Camarillo, Roberto Hernández, Héctor Meléndez, Carlos Gutiérrez, José Luis Colocía.

Porque me han acompañado durante el camino de la vida.

INDICE	Página
CAPÍTULO 1	
Ganglios Basales (GB)	
Neostriado (NE).....	1
Entradas sinápticas al Neostriado.....	2
Eferentes Neostriatales.....	2
Vía directa.....	3
Vía indirecta.....	3
Población neuronal del Neostriado.....	4
Interneuronas del Neostriado.....	5
CAPÍTULO 2	
Canales de potasio dependientes de calcio	
Canales BK.....	7
Canales SK.....	10
Canales IK .....	12
CAPÍTULO 3	
Propiedades electrofisiológicas de la Neurona Espinosa Mediana	
Generación de potenciales de acción y potencial de membrana.....	13
Canales de calcio activados por voltaje.....	13
Canales de potasio dependientes de calcio.....	14
Micro y nano dominios de los canales Kca.....	15
Participación de (IK <sub>Ca</sub> ) en la repolarización del potencial de acción y el postpotencial hiperpolarizante.....	16

## CAPÍTULO 4

Integración Sináptica.....	18
Registros en vivo .....	19
Registros in vitro.....	21

## CAPÍTULO 5

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Antecedentes.....	28
Hipótesis.....	30
Objetivos.....	30
Método.....	31

## CAPÍTULO 6

### RESULTADOS

Caracterización electrofisiológica de las neuronas neoesriatales de proyección.....	36
Relación corriente voltaje.....	36
Frecuencia de disparo de las neuronas de proyección.....	38
Integración sináptica cortico-estriatal.....	40
Participación de los canales BK en la integración sináptica cortico-estriatal de las NEMs D1 y D2.....	42
Contribución del canal BK a distintas intensidades de estimulación en las NEM D1 y D2.....	46
Curva intensidad de estimulación vs Duración a la amplitud media en presencia de caribdotoxina.....	48
Participación de los canales tipo SK en la integración sináptica cortico-estriatal de las NEMs D1 y D2.....	50

Contribución del canal SK a distintas intensidades de estimulación en las NEM D1 y D2.....	53
--	----

Curva intensidad de estimulación vs Duración a la amplitud media en presencia de apamina.....	56
---	----

## CAPÍTULO 7

### DISCUSIÓN

Integración sináptica cortico-estriatal.....	58
--	----

Participación de conductancias de potasio dependientes de calcio en la integración sináptica.....	58
---	----

Participación de los canales BK en la integración sináptica cortico-estriatal.....	60
--	----

Participación del canal SK en la integración sináptica cortico-estriatal.....	61
---	----

Diferencias intrínsecas de las NEM D1 y NEM D2 que ayudan a explicar la participación de los canales BK y SK en la respuesta cortico-estriatal.....	62
---	----

Implicaciones funcionales de los canales de potasio dependientes de calcio en la conducta.....	66
--	----

Conclusiones.....	68
-------------------	----

Bibliografía.....	69
-------------------	----

## Resumen

Las neuronas espinosas medianas (NEM) son las neuronas de proyección del Neostriado (NE), estas células llevan a cabo múltiples procesos cognitivos y la iniciación y control del movimiento. Se han identificado dos tipos de neuronas de proyección en este núcleo, de acuerdo a la expresión de receptores a dopamina (D1 y D2), expresión de péptidos (SP y ENK) y por la proyección a distintos núcleos del circuito de los ganglios basales (SNr y GPe).

Estas neuronas hasta ahora se han descrito como una población electrofisiológicamente homogénea, recientemente se describió que la respuesta sináptica cortico-estriatal, difiere en los dos tipos de células neostriatales (D1 y D2). Las diferencias se hacen evidentes en la duración a la amplitud media y el área bajo la respuesta sináptica, ambas mediciones tienen que ver con la repolarización del evento sináptico. Basándonos en lo anterior se estudió la participación de las conductancias de potasio dependientes de calcio tipo BK y SK, en la respuesta sináptica cortico-estriatal de NEMs D1 y D2.

En el presente estudio se llevaron a cabo registros intracelulares de neuronas del neostriado dorsal, el objetivo del trabajo fue estudiar la participación de las conductancias de potasio dependientes de calcio (tipo BK y SK) en la integración sináptica cortico-estriatal. En estos experimentos se obtuvo como resultado que las conductancias tipo BK y SK participan de forma distinta en las NEM D1 y D2, estas diferencias se enlistan a continuación:

La participación de los canales de potasio dependientes de calcio en la respuesta sináptica cortico-estriatal, es mayor en las NEMs D2, que en las neuronas D1

Los canales BK no participan en la forma de la respuesta sináptica, estas conductancias se encuentran principalmente repolarizando el evento sináptico en ambos tipos neuronales, determinando la duración de la despolarización.

Los canales SK facilitan la repolarización en las neuronas de proyección NEM D1 y sólo en las neuronas D2, determinan la forma de la respuesta sináptica (repolarización inicial característica de estas neuronas).

Los canales BK y SK participan sólo en la repolarización sináptica supraumbral en las neuronas de proyección NEM D1, mientras que en las neuronas NEM D2 participan en la repolarización desde las respuestas subumbrales.

Las corrientes postsinápticas estudiadas, son importantes para explicar las diferentes respuestas cortico-estriatales de las NEMs. Dado que estas corrientes están sujetas a neuromodulación por diversos transmisores, su importancia fisiológica resulta incuestionable.



# Participación de conductancias de potasio en la integración sináptica cortico-estriatal

## Capítulo 1

### Ganglios Basales

Los Ganglios Basales (GB) anatómicamente sobresalen en cuanto a su distribución ya que representan uno de los más grandes circuitos en el cerebro.

Este circuito permite múltiples procesos como: la iniciación y control del movimiento voluntario, aprendizaje motor, memoria de procedimiento, además de funciones cognoscitivas y emocionales (Graybiel, 1997,2000; Yin et al., 2004. Grahn et al., 2008, 2009; White, 2009).

Los GB son un conjunto de núcleos subcorticales distribuidos en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo. Se encuentran presentes en peces, aves, reptiles y mamíferos (Reiner et al., 1998).

El circuito anatómico y funcional de los GB está comprendido por: el Neostriado (caudado, putamen y acumbens); el globo pálido en su segmento interno y externo; la sustancia nigra parte compacta y reticulata. Así como el núcleo subtalámico (Mink, 1996; Groenewegen, 2003).

#### Neostriado

El Neostriado (NE) comparte entre sus tres núcleos (caudado, putamen y acumbens) la misma población neuronal: la Neurona Espinosa Mediana (NEM) o MSN (*Medium Spiny Neuron*) por sus siglas en inglés. Sin embargo se ha podido diferenciar a estos núcleos por sus diferentes funciones. El caudado y putamen, ambos ubicados en el estriado dorsal, se caracterizan por llevar a cabo funciones sensorio motrices y asociativas, mientras que al núcleo accumbens, localizado en el NE ventromedial, se le ha distinguido por participar en procesos emotivos como el refuerzo o la expectativa de la recompensa, ya que también pertenece al sistema límbico.

## Entradas sinápticas al neostriado

El NE se ha caracterizado por ser el núcleo que recibe las aferencias de los diversos núcleos que proyectan a los ganglios basales, es de resaltar que las NEMs que componen este núcleo integran información de múltiples estructuras cerebrales y distintos tipos de mensajeros químicos o neurotransmisores.

La sustancia Nigra parte compacta proyecta a este núcleo su principal abastecimiento de dopamina (Freund et al., 1985). También recibe aferencias serotoninérgicas provenientes de la parte dorsal del núcleo Raphe y de la Amígdala basolateral (Waselus et al., 2006).

Por otra parte las proyecciones glutamatérgicas se dan por las aferentes de núcleos intralaminares y de la línea media del tálamo (Castle et al., 2005; Künzle, 2006; Smeal et al., 2008; Ding et al., 2008). No obstante el mayor abastecimiento de aferentes excitatorias que el NE recibe, son por parte de la corteza cerebral.

Múltiples trabajos anatómicos y funcionales han evidenciado que la mayoría de las áreas corticales envían sus axones al estriado, sin embargo, parece tener mayor aferentación la corteza prefrontal, motora, sensorial y de asociación (Selemon et al., 1985; Haber et al., 2000; Postuma et al., 2006).

## Eferentes Neoestriatales

El NE proyecta la información que recibe a través de dos vías que se les ha llamado “vía directa” y “vía indirecta” debido a los relevos sinápticos que presenta cada vía antes de salir del circuito de los ganglios basales. Funcionalmente la vía directa facilita el movimiento, mientras que la vía indirecta lo inhibe. (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Mink, 1996; Groenewegen, 2003).

### Vía directa

La vía directa comienza con proyecciones corticales que son integradas por las NEMs del neostriado, las cuales envían sus axones GABAérgicos hacia núcleos de salida de los (GB): el Globo pálido interno (GPi) y la sustancia nigra reticulada (SNr). Esta inhibición que las neuronas de proyección tienen sobre los núcleos de salida, permite que estos dejen de inhibir GABAérgicamente a los núcleos: ventral anterior y lateral del Tálamo, para que finalmente este último relevo envíe proyecciones excitatorias hacia la corteza motora, promoviendo de esta manera el movimiento (Ver figura 1).

Las neuronas de la vía directa o “estriatonigrales” han sido caracterizadas por su alta expresión de receptores a dopamina de la familia D1 y colinérgicos muscarínicos de tipo M1 y M4 (Kreitzer & Malenka, 2008). Más la expresión de sustancia P (SP) y dynorfina. (D1-NEMs).

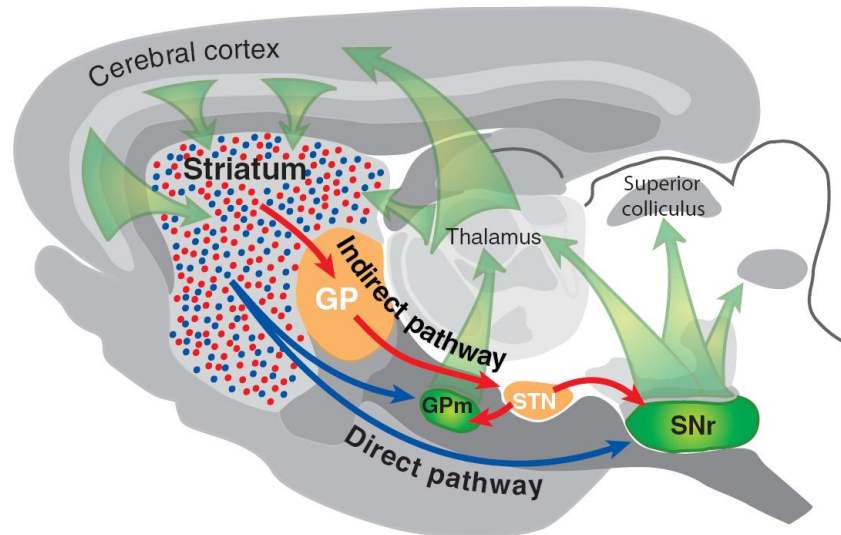
### Vía indirecta

De manera contraria la vía indirecta inhibe los movimientos, debido a que cuando las células neostriatales de esta vía son estimuladas por la corteza motora, éstas envían sus aferentes GABAérgicas al GPe. Las células de este núcleo que estaban inhibiendo al núcleo subtalámico (NST), dejan de hacerlo por la previa inhibición de las NEMs sobre el GPe. Lo cual permite al NST enviar proyecciones glutamatérgicas hacia el GPi, que es de naturaleza GABAérgica.

Por último, al ser estimulado el GPi éste proyecta aferentes inhibitorias sobre el tálamo desfavoreciendo la proyección excitatoria que este núcleo tiene sobre la corteza motora, y por lo tanto impide el movimiento (Ver figura 1).

Las neuronas de la vía indirecta o “estriatopalidales” (D2-NEMs), son caracterizadas por su robusta expresión de receptores dopaminérgicos de la familia D2 y colinérgicos tipo M1 (Kreitzer & Malenka, 2008). También se ha identificado la coexpresión del neuropéptido encefalina (ENK).

Las neuronas GABAérgicas neostriatales se han podido distinguir por su trayectoria dentro del circuito de los ganglios basales como se mencionó anteriormente, también por su expresión de receptores y péptidos. Sin embargo, no se ha podido ver una localización anatómica preferencial, por el contrario se ha descrito que estas células se encuentran ampliamente distribuidas homogéneamente por todo el Neostriado (Deng et al., 2006).



**Figura 1.** Vía Directa e Indirecta de los Ganglios Basales

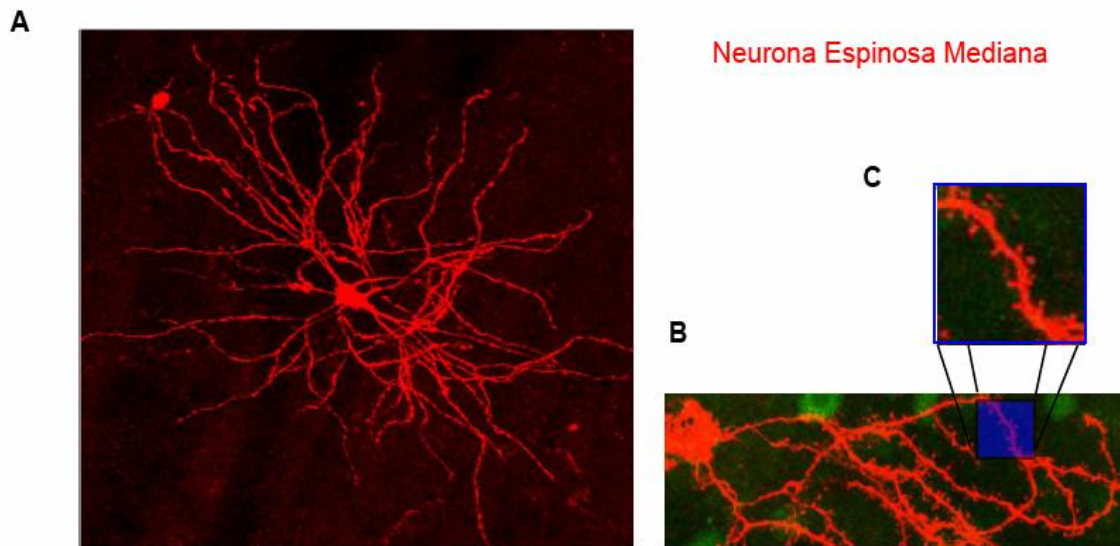
Se representa: Cerebral cortex (Corteza cerebral), Striatum: (Estriado), GP: (Globo pálido externo), GPM: (Globo pálido interno), STN: (Núcleo subtalámico). SNr: (Sustancia nigra reticulata), Thalamus: (Tálamo), Superior colliculus: (Coliculo superior). (Tomado de Gerfen, 2006).

#### Población neuronal del neostriado

##### Neurona Espinosa Mediana

La neurona neostriatal es llamada neurona espinosa mediana por su amplia distribución de espinas alrededor de sus dendritas. Las dendritas de estas células se arborizan en todas direcciones, abarcando un radio de 300 a 500  $\mu\text{m}$ . En promedio presentan de 4 a 6 dendritas principales que a su vez pueden ser divididas 2 o 3 veces más, teniendo en total de 25 a 30 ramas terminales (Wilson, 2004). Su cuerpo celular tiene un diámetro de 10 a 15  $\mu\text{m}$  y carece de espinas dendríticas. A diferencia de las dendritas, sus axones exhiben ángulos más

agudos y tampoco tienen espinas dendríticas (estas características se pueden apreciar fácilmente en la figura 2). Es de destacar que sus axones cubren casi la mitad de la superficie total de la célula, de tal manera que presentan varios puntos de contacto antes de llegar a su blanco dentro o fuera del Neocórtex (Bishop et al., 1982; Kawaguchi, 1997; Wilson, 2004). La neurona de proyección neocortical representa el 95 % del total de la población neuronal. El porcentaje restante pertenece a interneuronas (Mink , 1996; Tepper et al., 2004).



**Figura 2.** Neurona espinosa mediana marcada intracelularmente con biocitina. (A) arborización de sus dendritas. (B) Diferente NEM con mayor amplificación donde se pueden observar sus espinas dendríticas. (C) Amplificación de la zona marcada en azul. Se aprecia mayor detalle de las espinas dendríticas.

### Interneuronas del Neocórtex

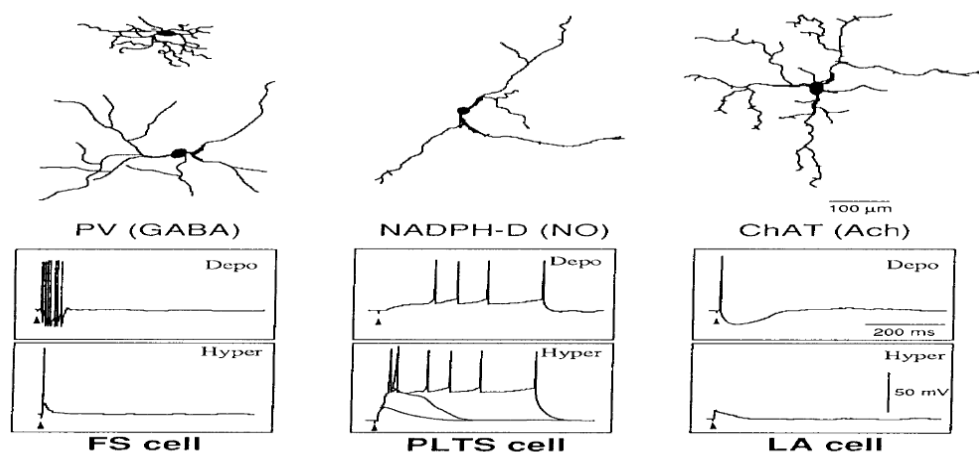
Interaccionando con el circuito del Neocórtex residen tres tipos de interneuronas identificadas a partir de sus propiedades inmunocitoquímicas, electrofisiológicas y anatómicas (la representación anatómica se muestra en la figura 3).

La neurona gigante colinérgica o célula de largo postpotencial hiperpolarizante, presenta un cuerpo celular fusiforme de 20 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, de donde emergen de 2 a 5 dendritas principales que no presentan espinas dendríticas o de manera muy difusa. Su potencial de membrana es de -60 mV, genera potenciales

de acción de manera tónica, además de presentar un largo pospotencial hiperpolarizante (figura 3C) y gran capacidad de rectificación cuando se le dan pulsos hiperpolarizantes. Histoquímicamente es positiva a acetilcolinesterasa (Wilson et al., 1990; Kawaguchi, 1993,1997).

Las dos interneuronas restantes son de naturaleza GABAérgica, una de ellas presenta potenciales de acción sumamente rápidos que generan frecuencias altas de disparo y de hecho de ahí deriva su nombre (*fast spiking cells*, figura 3 A). Estas células son inmunoreactivas a parvalbumina, el diámetro de su cuerpo celular es de 10 a 25  $\mu\text{m}$ . Estas neuronas tienen un potencial de membrana de -80 mV (Kawaguchi et Al., 1995; Kawaguchi, 1993,1997).

La interneurona de bajo umbral (*LTS cells*), colibera neuropéptido Y, NOS y somatostatina, el diámetro de su cuerpo celular es de 12 a 25  $\mu\text{m}$ . Presenta una arborización dendrítica y axónica menor respecto a las dos interneuronas anteriores y a la neurona de proyección. Su potencial de membrana se encuentra alrededor de los -60 mV. Esta interneurona se caracteriza por disparar espigas de calcio de bajo umbral de activación (generados por canales de calcio tipo T, figura 3B), que a su vez genera ráfagas de potenciales de acción. Por lo cual se les ha denominado neuronas de bajo umbral de activación (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi et al., 1995).



**Figura 3.** Características anatómicas y electrofisiológicas de las interneuronas del estriado. En la parte superior de la figura: Anatomía de interneuronas del neostriado. Parte inferior: Propiedades electrofisiológicas, tomado de Kawaguchi, 1993.

## Capítulo 2

### **Canales de potasio dependientes de calcio**

La despolarización de la membrana celular permite la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que aumentan la probabilidad de que canales de potasio dependientes de calcio (Kca) se abran y repolaricen a la célula. Lo cual es una retroalimentación negativa muy importante que permite a la neurona alejarla de la muerte por excitotoxicidad (Bentzen B et al., 2007). Estos canales se encuentran ampliamente distribuidos de forma selectiva en diversas estructuras cerebrales (Stocker M & Pedarzani P 2000). Además se ha descrito la participación de estos canales en diversos procesos fisiológicos tales como: neurosecreción, la forma y duración de los potenciales de acción, el post potencial hiperpolarizante, la frecuencia de disparo y recientemente en la integración sináptica (Sah, 1996; Bennett et al., 2000; Stocker, 2004).

Los canales de potasio dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se han clasificado tomando en cuenta sus propiedades biofísicas y farmacológicas en 3 amplias familias llamadas: BK, SK e IK.

#### Canales BK

Los canales BK o Maxi K (Kca 1.1) recibieron su nombre por la gran conductancia que presentan "*Big Conductances*". Se ha descrito que este canal es codificado por el gen KCNMA1 10q22 (Gutman et al., 2003). Participa en la repolarización del potencial de acción y en la parte rápida del post potencial (Pineda et al., 1992; Bennett et al., 2000).

El canal Maxi K permite una corriente saliente de 200 a 400 pS. La apertura de este canal requiere de calcio y despolarización de la membrana celular (-50 a 70 mV). También se han caracterizado por su alta sensibilidad para ser bloqueados por las toxinas peptídicas Caribdotoxina e Iberotoxina de forma muy específica, ambos péptidos extraídos del veneno del escorpión. Recientemente también se ha

descrito a las micotoxinas paxilina y penitrem como bloqueadores de estos canales (Sanchez & McMamus, 1996; Sah et al., 2002). Por otra parte el compuesto químico NS11021 y el Ácido Pimárico (PiMA) aumentan la probabilidad de apertura del canal, alterando su sensibilidad al calcio (Bentzen et al., 2007; Imaizumi et al., 2002).

### Estructura del canal

En la figura 4 se representa la estructura del canal BK, la cual esta conformada por 4 subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ . Las 4 subunidades  $\alpha$  forman un tetrámero que da paso al poro del canal, cada subunidad  $\alpha$  consta de 7 segmentos transmembranales (S0 a S6).

Similar a otros canales de potasio el sensor de voltaje de este canal está ubicado en el segmento S4, el poro permeable a potasio se forma entre el segmento S5 y S6 (Orio et al., 2002), mientras que el sensor de calcio "*calcium bowl*" se encuentra entre los segmentos S9 y S10 (Meera et al., 1997). La terminal NH<sub>2</sub> se encuentra en el segmento S0, y la terminal COO<sup>-</sup> se localiza en el segmento S10.

A pesar de que el sensor de calcio y voltaje se encuentran en la subunidad  $\alpha$ ; La subunidad  $\beta$  puede modificar la cinética y farmacología del canal. De tal forma que es muy importante la participación de esta subunidad en la fisiología del canal BK.

La subunidad  $\beta$ , consta de dos segmentos transmembranales (ver figura 4), a la fecha se han descrito 4 diferentes subunidades  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ), las cuales resultan ser de suma importancia para la modulación del canal BK. (Orio et al., 2002).

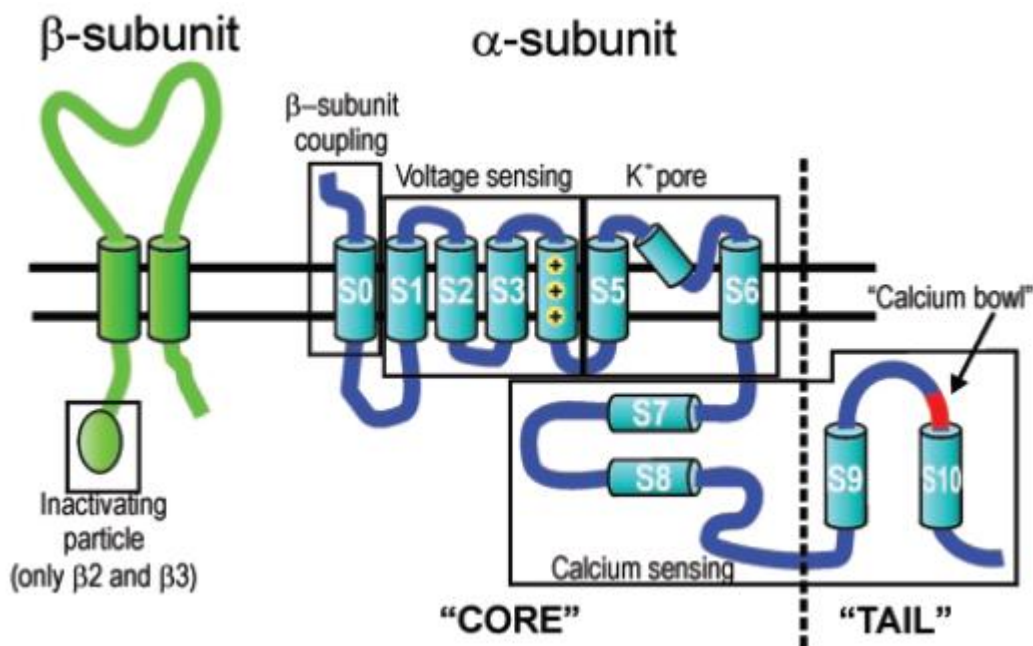
La primera subunidad  $\beta$  en clonarse fue la  $\beta_1$ , en membranas de células de musculo liso, se ha reportado que esta subunidad participa en la estabilidad del proceso de apertura y cierre del canal (Brenner et al., 2000).

La subunidad  $\beta_2$  se encuentra expresada preferencialmente en células cromafines y cerebro. La coexpresión de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta_2$  favorece la inactivación de la corriente de este canal (Orio et al., 2002).



En la coexpresión de la subunidad  $\beta_3$  no se muestran cambios en la cinética y activación de canal, esta combinación de subunidades se encuentra expresada en células gonadales, páncreas y el baso (Xia et al., 2000).

En cuanto a la subunidad  $\beta_4$ , se ha visto expresada principalmente en el cerebro, la coexpresión con la subunidad  $\alpha$  decreta la sensibilidad al calcio y por lo tanto la cinética de activación del canal (Brenner et al., 2000).



**Figura 4.** Esquema de la estructura del canal BK. A la derecha de la figura, se encuentra representada la subunidad  $\alpha$  y a la izquierda la subunidad  $\beta$ . Tomado de Orio et al., 2002).

## Canales SK

El segundo tipo de los canales de potasio dependientes de calcio ha sido distinguido por su baja conductancia, la cual va de 2 a 20 Ps, de modo que se le llamó “*small conductance*” o SK. Varios trabajos han revelado su participación en el post potencial hiperpolarizante “sAHP” (Pineda et al., 1992, Stocker, 2004; Faber et al., 2007).

Este canal no requiere de voltaje para su activación, únicamente de la elevación de calcio intracelular, aproximadamente de 400 a 800 nM. Este canal es bloqueado por la toxina peptídica Apamina, la cual es extraída del veneno de abeja. Por otra parte se ha reportado que el 1-ethyl-2-benzimidazolinone (EBIO) altera la sensibilidad de calcio y aumenta la probabilidad de apertura del canal (Sah et al., 2002).

Los canales SK se han podido separar en subclases de acuerdo a su perfil farmacológico y por el gen que los codifica. Sin embargo, estos canales presentan como ancestro común el gen KCNN.

Para el SK1 o Kca 2.1 corresponde el gen KCNN1 y farmacológicamente es insensible a la apamina. El SK2 (Kca 2.2) es codificado por el gen KCNN2; tiene una IC 50 de 63 pM de apamina para ser bloqueado. Por último el canal SK3 (Kca2.3) muestra una IC 50 de 2 nM de apamina y es codificado por el gen KCNN3 (Ishii et al., 1997a; Gutman et al., 2003).

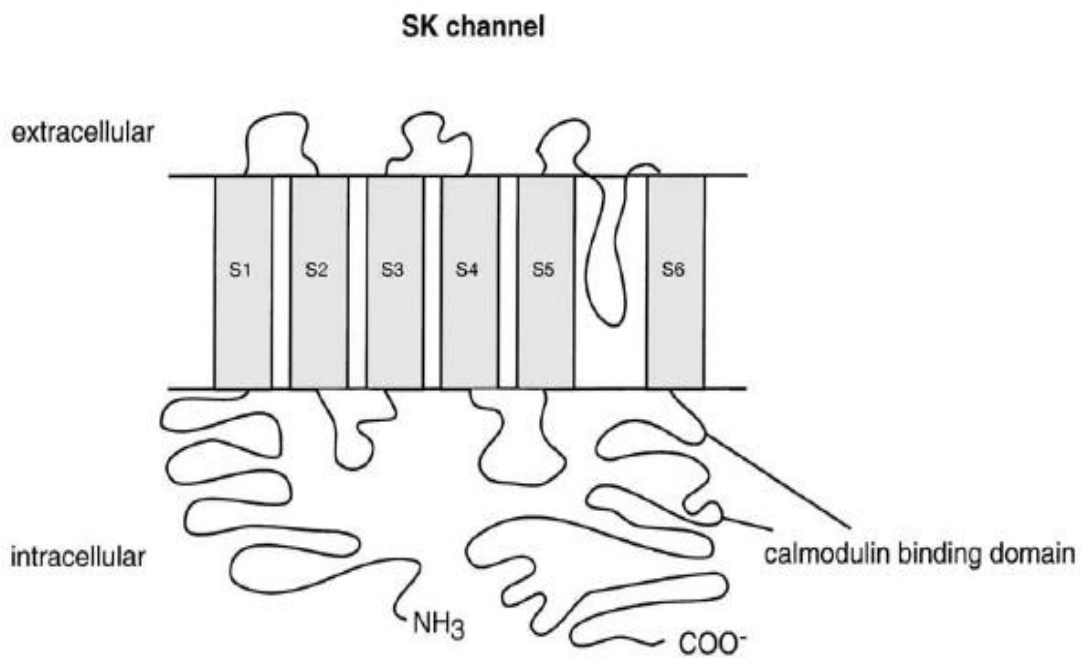
### Estructura del canal

En la figura 5 se muestra la estructura del canal SK, donde se puede observar que cuenta con seis dominios transmembranales (S1 al S6). También se puede ver que tanto la terminal amino (NH<sub>3</sub>) como la carboxilo (COO<sup>-</sup>), se encuentran inmersas en el citoplasma; algunos trabajos proponen la localización del poro

entre el segmento 5 y 6 (Gutman GA et al., 2003). Cabe señalar que este canal no tiene una relación directa con el calcio para su apertura, como es el caso del canal BK e IK. Este canal requiere del acople de la proteína calmodulina (CAM). Dicho acople se da en la terminal COO-, donde se encuentra un sitio específico para llevarlo a cabo.

La CAM debe ser activada por calcio intracelular, para ello se requiere de dos moléculas de Ca<sup>2+</sup> en su terminal NH<sub>3</sub> y dos restantes en su terminal COO-.

Una vez activado el sitio de unión de la CAM, el canal SK muestra un cambio conformacional que permite la apertura del poro selectivo a potasio (Faber et al., 2003; Stocker, 2004).



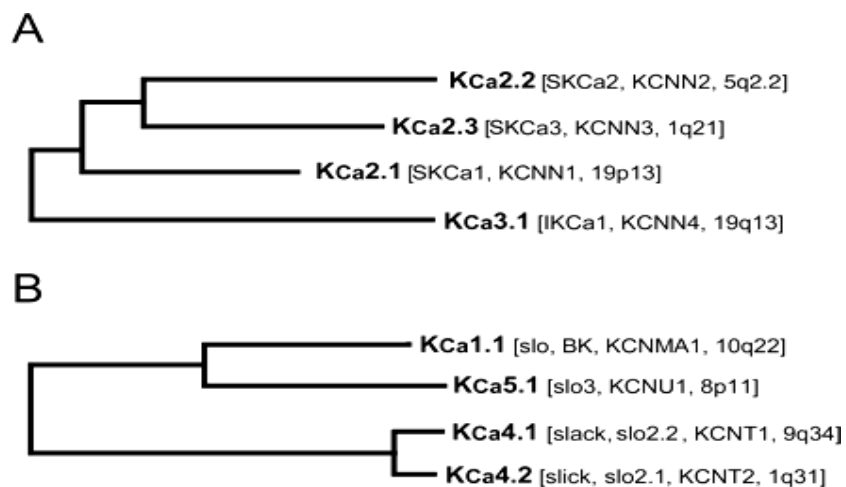
**Figura 5.** Esquema de la estructura del canal SK. Tomado de Sah et al., 2002.

## Canales IK

El tercer tipo de canal de Kca es el denominado IK o Kca 3.1. Este canal es codificado por el gen KCNN4 19q13 (Gutman et al., 2003). El IK presenta una conductancia intermedia entre el SK y el BK (aproximada de 20 a 100 pS), de ahí su nombre. A diferencia del canal BK y SK, este canal no se encuentra expresado en el cerebro, pero si se ha reportado su presencia en células epiteliales o glóbulos rojos, de manera similar a los canales SK no requieren de despolarización para ser activados, únicamente de la elevación de calcio intracelular (Sah et al., 2002).

El perfil farmacológico de estos canales es muy amplio ya que se ha visto que son sensibles a caribdotoxina, clotrimazole y EBIO, pero insensibles a apamina e iberotoxina.

Para concluir, se puede decir que dadas las propiedades farmacológicas y biofísicas de cada uno de los canales Kca, estos pueden ser distinguidos de forma clara y robusta (Ishii et al., 1997 b). A continuación se muestra un esquema del árbol filogenético de los canales de potasio dependientes de calcio descritos anteriormente.



**Figura 6.** Árbol filogenético de los canales de potasio dependientes de calcio. Se esquematiza (de izquierda a derecha) la nomenclatura del canal de  $K^+$ , el gen que lo codifica y la región específica del gen. Tomado de Gutman et al., 2003.

## CAPÍTULO 3

### **Propiedades electrofisiológicas de la Neurona Espinosa Mediana**

#### Generación de potenciales de acción y potencial de membrana

Desde los primeros registros electrofisiológicos se ha caracterizado a las NEMs, por la presencia de una rampa despolarizante de varios cientos de milisegundos que retrasa la generación del primer potencial de acción. Esto se puede ver cuando se dan pasos de corriente despolarizante en el soma de la neurona (Kita et. al., 1985. Bargas et. al., 1989 Nisenbaum et. al., 1994). Registros intracelulares (Bargas et. al., 1989) así como, experimentos en *current clamp* y *voltage clamp* (Nisenbaum et. al., 1994; 1995; 1996), han puesto de manifiesto que la rampa despolarizante y el retraso en la generación del primer potencial de acción, son debidos a la interacción de las corrientes salientes de potasio (IA). Así como corrientes entrantes de sodio (Na<sup>+</sup>) y calcio (Ca<sup>++</sup>) (Bargas et. al., 1989; Nisenbaum et. al., 1994). El canal de calcio tipo L, participa en la parte tardía de la rampa despolarizante de estas células, facilitando la generación del primer potencial de acción (Hernández-López et al., 1997; Pérez-Garci et. al., 2003).

La neurona neostriatal también se ha caracterizado por tener un potencial de membrana alrededor de  $-85$  mV, *in vitro*. Esta propiedad intrínseca es mediada por la corriente de potasio de rectificación entrante, o en inglés (*K<sub>ir</sub>*). Esta conductancia de potasio por lo tanto impide que la célula permanezca despolarizada. Este canal es bloqueado por Bario ( $100\mu\text{M}$ ) o Cesio ( $3\text{mM}$ ) lo cual produce una despolarización del potencial de membrana de  $-84.5 \pm 2.3$  a  $67.7 \pm 5.5$  (Pacheco-Cano et. al., 1994; Nisenbaum & Wilson, 1995).

#### Canales de calcio activados por voltaje

El flujo de calcio al interior de la célula permite diversos procesos fisiológicos tales como: la liberación de neurotransmisores, la generación de mesetas despolarizantes, activación de cascadas de señalización, etc (Pérez-Garci et al., 2003. Pineda et al., 1992; Ding et. al., 2008).

En el sistema nervioso central se han descrito diferentes tipos de canales de calcio activados por voltaje, en inglés VGCC (voltage gated calcium channels). Éstos se han podido clasificar con base a una extensa variedad de estudios electrofisiológicos y farmacológicos. La primera clasificación corresponde a los canales dependientes de voltaje de bajo umbral tales como el canal T. La segunda clasificación incluye a canales que muestran un umbral intermedio, que sólo es el canal R. Finalmente, la más amplia clasificación está conformada por aquellos canales cuya apertura está mediada por un alto umbral de activación. Estos son: L, N, P y Q. En las neuronas de proyección del neocórtex se encuentran los canales de calcio activados por voltaje tipo: L, N, P/ Q y R (Bargas et. al., 1994).

#### Canales de potasio dependientes de calcio

Experimentos en *voltaje clamp*, en la modalidad de fijación de voltaje Bargas y cols en el año 1999. Utilizando bloqueadores de  $Ca^{2+}$ , como cadmio ( $Cd^{2+}$ ) (200-400 $\mu$ M) y quelantes intracelulares de  $Ca^{2+}$  (BAPTA), revelaron la presencia de corrientes salientes sensibles a  $Ca^{2+}$  en las NEMs. Toxinas peptídicas con una alta afinidad a corrientes de potasio dependientes de  $Ca^{2+}$  ( $IK_{Ca}$ ) han ayudado a identificar los componentes de la corriente saliente sensible a  $Cd^{2+}$  (10 nM de Caribdotoxina (CBTX) o Iberotoxina (IBTX), bloqueadores específicos de canales de potasio dependientes de calcio tipo BK, reducen un 34% del total de la corriente saliente sensible a  $Cd^{2+}$ , del mismo modo 200 nM de Apamina, toxina peptídica selectiva a canales de potasio dependientes de calcio tipo SK, muestra una reducción del 29% del total de la corriente saliente sensible a  $Cd^{2+}$  (Bargas et al., 1999).

La aplicación de Apamina seguido de CBTX reduce aun más la corriente saliente sensible a  $Cd^{2+}$ . Por otra parte, el orden de aplicación de las toxinas no muestra ninguna alteración de los resultados ya obtenidos. Lo cual nos indica que se trata de dos corrientes salientes de potasio distintas que son reguladas por la entrada de calcio al interior de la célula (Bargas et al., 1999).

Algunos estudios que han tratado de aislar las corrientes salientes de potasio en las NEMs, sugieren que la corriente saliente sensible a  $\text{Cd}^{2++}$  representa un 53% del total de las corrientes salientes (Bargas et. al., 1999). Al bloquear simultáneamente con CBTX y Apamina se logra un bloqueo aproximado del 50%, lo cual corresponde con el porcentaje del bloqueo dado por la aplicación de  $\text{Cd}^{2++}$ . Sin embargo, dado que el  $\text{Cd}^{2++}$  no es un bloqueador muy selectivo para los canales de calcio, no fue posible identificar que corrientes en especial se encuentran alimentando a los canales ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ).

Para lo anterior Vilchis C. y cols., en el 2000, utilizaron toxinas que bloquean diferentes canales de calcio sobre las corrientes aisladas de potasio sensibles a  $\text{Cd}^{2++}$ . Por ejemplo CgTX como antagonista de la corriente de calcio tipo N, AgaTX bloqueador de la corriente de calcio tipo P/Q, CTx MVIIC, para bloquear ambos canales (N y P/Q) y finalmente Nitredipina como bloqueador del canal de calcio L. Estos experimentos tuvieron como resultado que únicamente las toxinas que bloqueaban los canales de calcio tipo N y P/Q, podían ocluir la corriente sensible a  $\text{Cd}^{2++}$ . De tal modo que los canales de calcio  $\text{Ca}_{\text{v}2.2}$  tipo N y  $\text{Ca}_{\text{v}2.1}$  tipo P/Q, alimentan a los canales de potasio dependientes de calcio en las neuronas neocorticales (Vilchis et al., 2000).

#### Micro y nano dominios de los canales $\text{K}_{\text{Ca}}$

Como se ha mencionado anteriormente el calcio intracelular es un mensajero que interviene en múltiples procesos fisiológicos, uno de ellos es la activación de canales de potasio dependientes de calcio (BK y SK), para este fenómeno se ha propuesto que los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  y los canales de calcio dependientes de voltaje, forman complejos especializados que permiten que el calcio sólo intervenga en esta función específica. Los complejos formados entre los  $\text{K}_{\text{Ca}}$  y los VGCC, pueden ser de nanodominios (35 nm) o microdominios (>70 nm), dependiendo de la distancia a que se encuentren entre sí en la membrana celular (Fakler & Adelman, 2008).

Por ejemplo, los canales BK forman nanodominios en las células de Purkinje con canales de calcio tipo P y Q (Edgerton et al., 2002; Womack et al., 2004), en la

retina se forman con el canal de calcio tipo L (Grimes et al., 2009). Los canales BK no sólo forman nanodominios, también se ha reportado que pueden formar microdominios, es decir su activación responde al incremento intracelular de calcio de una o varias fuentes, que se presume están a mayor distancia del canal BK respecto a los complejos formados en nanodominios.

Por otra parte los canales SK igualmente forman nanodominios; se ha reportado que en células piramidales disociadas de hipocampo estos complejos se forman con el canal de calcio tipo L (Marrion et al., 1998).

Los complejos en nanodominios entre el canal SK y fuentes de calcio también se ha dado con receptores canal, como el receptor de acetilcolina (nAChRs) y el receptor a glutamato NMDA (Vetter et al., 1998; Florillo et al., 1998; Shah et al., 2002; Ngo-Anh et al., 2005). Algunos experimentos con quelantes de calcio como BAPTA y EGTA, han propuesto que los complejos entre el canal SK y las fuentes de calcio, también forman microdominios. Dicho fenómeno es facilitado por la alta sensibilidad al calcio que este canal tiene. Es decir, los canales SK no necesitan estar en nanodominios para su apertura, ya que la gran afinidad al calcio les permite ser activados con el incremento de calcio intracelular de una o varias fuentes, que pudiesen estar alejadas de estos canales (Fakler & Adelman, 2008). En estos ejemplos se puede notar que la localización de los canales Kca en la membrana celular, ayuda a que el proceso fisiológico que estos canales representen sea altamente especializado.

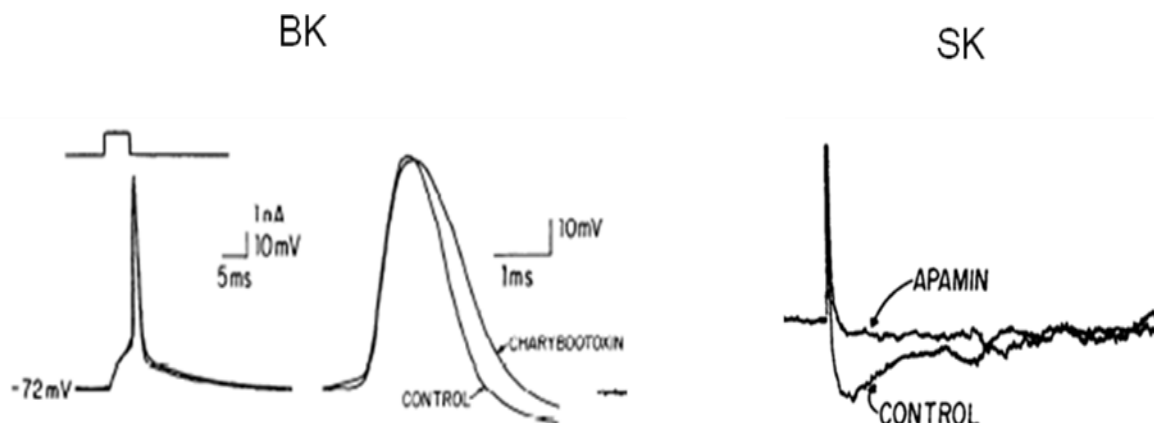
Participación de ( $I_{KCa}$ ) en la repolarización del potencial de acción y el postpotencial hiperpolarizante

Las NEMs muestran un disparo tónico regular con poca adaptación (Galarraga et al., 1989; Nisenbaum et al., 1994; Hernández López et al., 2000; Perez-Garci et al., 2003; Venance et al., 2003; Galarraga et al., 2007). Conforme se prolonga el tiempo en que se mantienen disparando estas células, se puede ver su tendencia a espaciar más el tiempo entre espigas de potenciales de acción. Se ha visto que esta leve adaptación de la frecuencia de disparo es mediada por canales de



potasio dependientes de calcio BK y SK (Pineda et al., 1992). Estos canales se encuentran regulando la repolarización del potencial de acción y el postpotencial hiperpolarizante (PPH). La repolarización del potencial de acción se encuentra facilitada por el canal BK, mientras que en el PPH participa el canal SK (ver figura 7). Al bloquear algunos de estos canales con toxinas específicas como Caribdotoxina o Apamina, se incrementa la frecuencia de disparo (Pineda et. al., 1992).

El canal SK puede ser modulado por neurotransmisores como: Dopamina (Hernández-López et. al., 1996), acetilcolina (Stocker, 2004) y algunas hormonas como la aldosterona (Sørensen et al., 2008) y la somatostatina (Vilchis et al., 2002; Galarraga et al., 1997); ésta última ejerce doble modulación, por una parte incrementa la corriente del canal BK mientras que reduce la corriente SK (Galarraga et al., 1997). La modulación que los distintos neurotransmisores y hormonas tienen sobre estos canales, se da indirectamente por medio de la acción que estos transmisores tienen sobre los canales de calcio que alimentan a los canales BK y SK (Perez-Rosello et al., 2005) o directamente sobre los canales de potasio (Galarraga et al., 1997; Maingret et al., 2008; Stocker, 2004).



**Figura 7.** Efecto de Caribdotoxina en la repolarización del potencial de acción y efecto de Apamina en el post potencial hiperpolarizante. Tomado de Pineda et al., 1992.

## CAPÍTULO 4

### **Integración Sináptica**

El neostriado es la estructura que recibe todas las entradas sinápticas del circuito de los ganglios basales, éste núcleo recibe información de casi todas las áreas de la corteza cerebral (Selemon et al., 1985; Haber et al., 2000. Postuma et al., 2006), así como de los núcleos intralaminares del tálamo (Castle et al., 2005; Künzle 2006; Smeal et al., 2008; Ding et al., 2008). El NE también es innervado por células nigrales y del núcleo del raphe (Freund et al., 1985; Waselus et al., 2006).

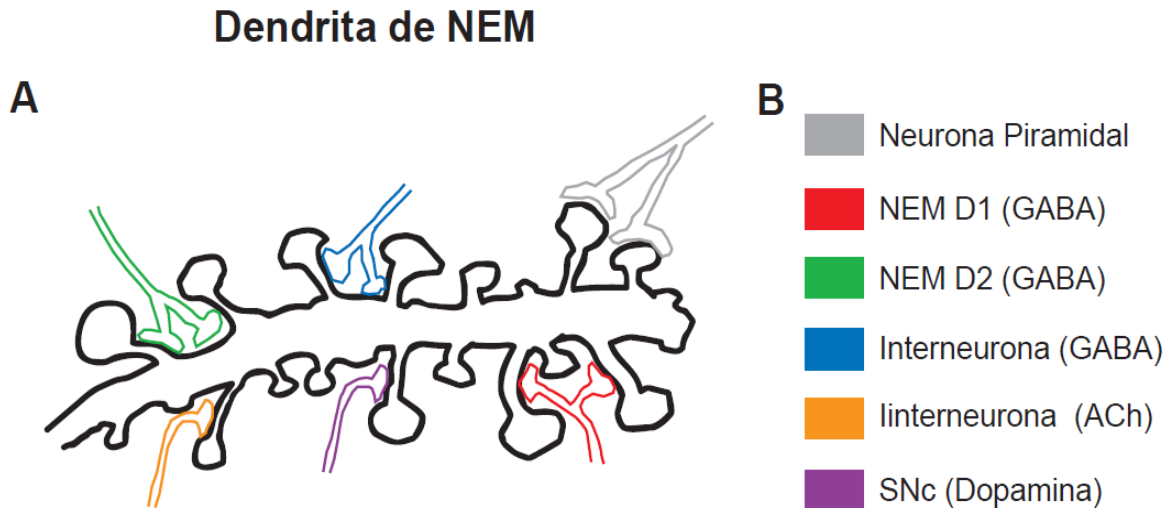
El 95% de las neuronas neostriatales son de naturaleza GABAérgica y se encuentran altamente interconectadas entre sí (Tunstall et al., 2002; Koos et al., 2004; Tecuapetla et al., 2007). Dos interneuronas del circuito también son GABAérgicas, lo cual nos deja ver que este núcleo se distingue por ser inhibitorio.

Registros de pares de neuronas entre interneuronas y neuronas espinosas medianas han revelado que las interneuronas *Fast spiking* son las que se pueden encontrar con mayor probabilidad conectadas unidireccionalmente entre sí, seguidas de las LTS. Por el contrario, a la fecha no se ha podido registrar un par entre gigante colinérgica y neurona espinosa mediana (Tecuapetla et al., 2007; Gittis et al., 2010).

Las fibras corticales que proyectan al estriado hacen contactos monosinápticos con NEMs e interneuronas (Kawaguchi et al., 1995; Mallet et al., 2005; Plotkin et al., 2005). Sin embargo, se ha descrito que las interneuronas reciben con menor retardo sináptico el *input* cortical, de tal manera que cuando una NEM recibe un comando cortical, esta célula se encuentra integrando información excitatoria por parte de corteza e inhibitoria por parte de colaterales axónicas de NEMs e interneuronas.

En síntesis, la neurona de proyección de este núcleo (NEM) lleva a cabo un complejo proceso de integración sináptica compuesto de múltiples

neurotransmisores y neuromoduladores (ver figura 8), que una vez integrados se proyectan hacia los núcleos de salida del circuito de los ganglios basales (Globo pálido y Sustancia nigra reticulada) a través de sus respectivas vías “directa e indirecta”.



**Figura 8.** Esquema de la compleja integración sináptica de la neurona neostriatal. A. Espina dendrítica y los diferentes neurotransmisores y neuromoduladores que inervan a las NEMs. B. Representación en color de los diversos neurotransmisores y moduladores que simbolizan las diferentes aferencias neostriatales.

### Registros en vivo

Registros intracelulares en vivo han mostrado que las neuronas neostriatales tienen cambios periódicos entre un estado en la membrana hiperpolarizado y otro despolarizado (Wilson & Groves, 1981; Wilson & Kawaguchi, 1996). El estado hiperpolarizado “*Down state*” se caracteriza por tener un potencial de membrana muy similar al de reposo de estas células (de -94 a -61 mV), con pequeños cambios de voltaje como resultado de las diversas entradas sinápticas espontáneas.

El estado despolarizado tiene un potencial de membrana de -45 mV, que puede o no tener potenciales de acción en forma de *burst* o ráfagas, esta propiedad neocortical es también conocida como el “*Up*” state (ver figura 9).

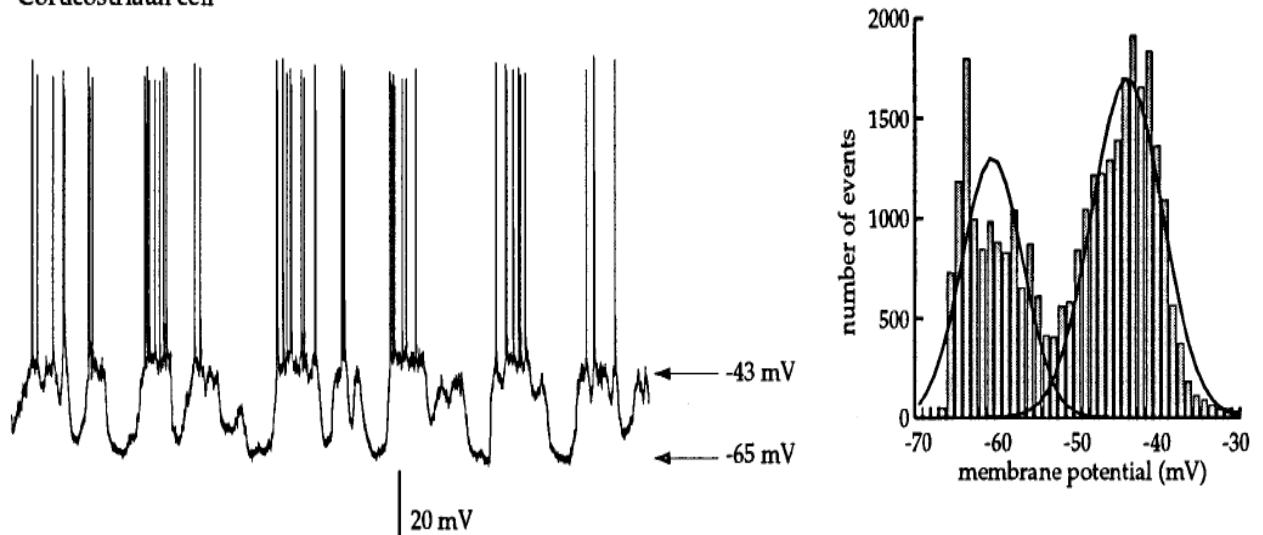
En estudios realizados *In vitro* en estas neuronas se ha reportado que no muestran dichas transiciones espontáneamente, a menos que sean estimuladas por la corteza (Vergara et al., 2003; Flores-Barrera et al., 2009; 2010) o que se suministre un agonista de receptores tipo NMDA.

De acuerdo con la literatura actual, la actividad biestable de estas neuronas que se ha estudiado en animales en vivo y en experimentos *in vitro*, son el resultado de la interacción entre las aferentes glutamatérgicas de corteza y tálamo (Wilson & Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997) y las propiedades intrínsecas que estas neuronas tienen en respuesta a dicha aferencia.

Experimentos *in vitro* han señalado que el potencial de membrana en estas condiciones es alrededor de -85 mV (Nisenbaum & Wilson, 1995), lo cual es un potencial de membrana muy similar al que se tiene durante un *Down state* registrado en animales en vivo; Cabe señalar que en este fenómeno es fundamental la participación del canal de potasio KIR, ya que esta conductancia ayuda a mantener a estas células en un potencial de membrana hiperpolarizado (Nisenbaum & Wilson, 1995).

Las transiciones en el potencial de membrana de estas células tienen un gran significado funcional, ya que el “*UP*” y “*Down state*” son el código que subyace a los procesos funcionales que el circuito de los ganglios basales lleva a cabo.

### Corticostriatal cell

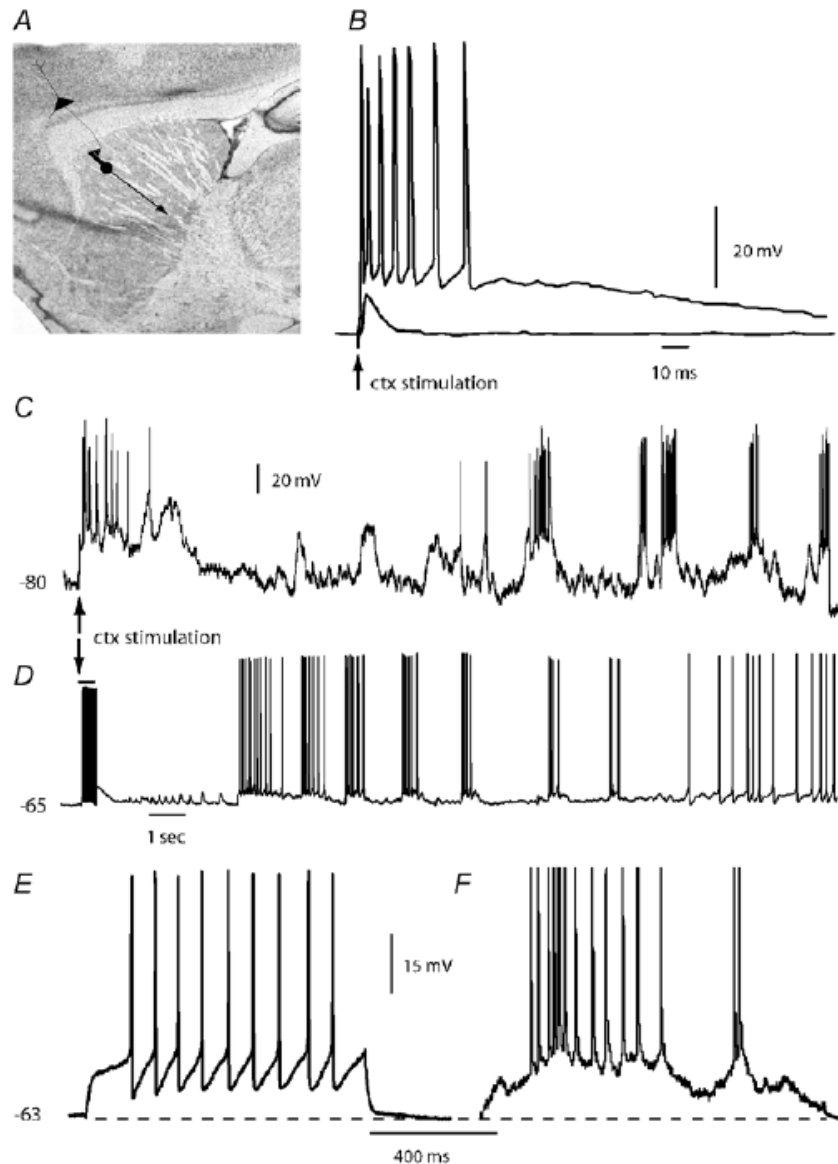


**Figura 10.** Ejemplo de "Up y Down state". Tomado de Stern et al., 1997

### Registros in vitro

Vergara y cols. en el 2003, al dar un tren de pulsos en la corteza sensoriomotriz, lograron ver el *UP y Down state in vitro* (figura 10). Estos experimentos muestran que los canales AMPA/Kainato junto con el receptor NMDA es fundamental para las oscilaciones neostriatales. Los canales AMPA/Kainato proveen de cierta despolarización a la membrana para que el receptor NMDA pueda ser activado. La sinergia de estas dos conductancias desencadenan mecanismos intrínsecos que hacen posible el *Up state* de las neuronas espinosas medianas.

En estos experimentos cuando se aplicó NMDA al sistema de perfusión, un único choque eléctrico de estimulación en corteza fue necesario para presenciar las oscilaciones neostriatales. Por otra parte cuando se aplicó el bloqueador de NMDA (AP5), esta respuesta quedó abolida. Estos experimentos sugieren que la estimulación supraumbral puede ser capaz de activar los receptores AMPA/Kainato y NMDA, y de esta forma producir una meseta despolarizante que anticipa al *UP y Down state*.



**Figura 10:** UP y Down state in vitro. (A) Rebanada sagital de cerebro de roedor que preserva las fibras cortico-estriatales (C-F). Se puede apreciar las características de la transición bifásica in vitro. Tomado de Vergara et al., 2003.

Los receptores AMPA son necesarios para la iniciación de la respuesta cortico-estriatal, sin embargo no lo son para el mantenimiento de la actividad biestable. El mantenimiento y amplificación de esta respuesta se debe a la participación del canal de calcio tipo L (Vergara et al., 2003; Pérez-Garci et al., 2003).

De acuerdo a lo anterior se puede plantear que, las fibras glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral activan el receptor-canal NMDA, el cual induce mecanismos intrínsecos de las neuronas espinosas medianas, como la activación del canal de calcio tipo L y canales de potasio, que hacen posible dicha actividad biestable (Wilson & Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997; Vergara et al., 2003).

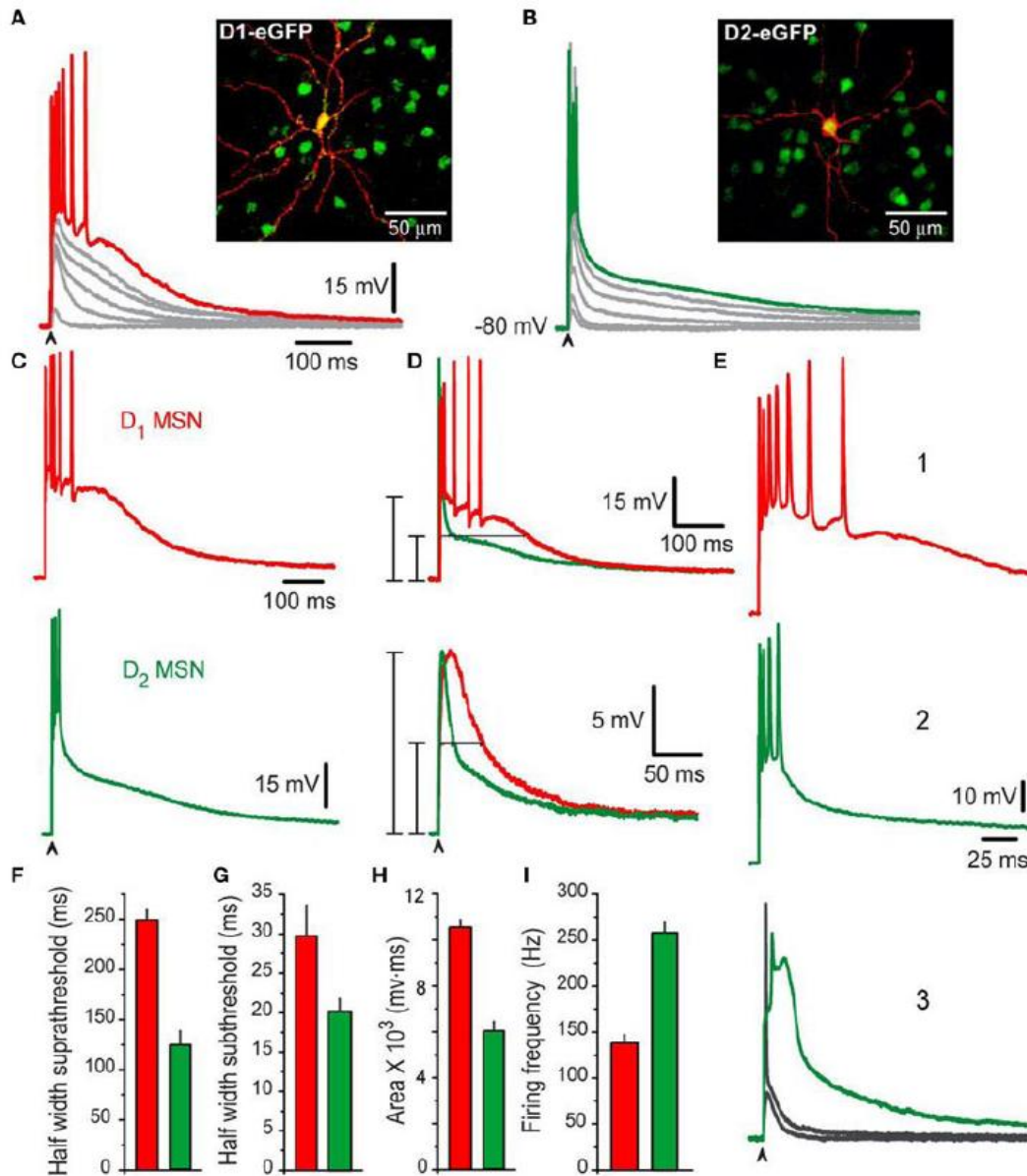
En rebanadas que preservan conexiones cortico-estriatales se ha podido ver que un sólo choque de estimulación cortical es capaz de inducir una meseta despolarizante acompañada de potenciales de acción en neuronas neoestriatales (Kita et al., 1985; Kita et al., 1996; Bargas et al., 1991; Vergara et al., 2003). Esta respuesta es consecuente de aferentes glutamatérgicas provenientes de corteza que hacen contactos monosinápticos en espinas dendríticas de NEMs (D1 y D2) e interneuronas estriatales (Kitai et al., 1976; Kawaguchi et al., 1995; Flores-Barrera et al., 2009).

Recientemente con la ayuda de ratones transgénicos (*bacterial artificial chromosome, BAC*) que expresan la proteína verde fluorescente (*GFP*) bajo el control del promotor del receptor de dopamina D1 ó D2. Se ha podido diferenciar claramente que la integración sináptica cortico-estriatal de las neuronas pertenecientes a la vía directa (NEM D1) difiere de las células que conforman la vía indirecta (NEM D2) esto se puede apreciar claramente en la figura 11 inciso A,B (Flores-Barrera et al., 2010).

Comparando la respuesta supraumbral en NEM D1 y NEM D2, las neuronas D1 tienen una duración a la amplitud media en promedio de  $250 \pm 9$  ms, mientras que las neuronas D2 tienen un promedio de  $124 \pm 13$  ms. Esta diferencia se pudo presenciar desde amplitudes subumbrales (inciso D figura 11), en donde las NEM D1 tuvieron una duración de  $29 \pm 3$  ms y las D2 de  $19 \pm 2$  ms.

Las diferencias entre estos dos tipos celulares fueron consistentes con el área bajo la respuesta cortico-estriatal, las células estriato-nigrales tuvieron un valor promedio de  $10,546 \pm 33$  mV\*ms en contraste con las neuronas estriato-palidales,

las cuales tuvieron un área de  $5,987 \pm 427$  mV\*ms, incremento significativamente mayor. Estas mediciones se muestran gráficamente en los incisos F,G y H de la figura 11.



**Figura 11.** Diferencias en la integración sináptica cortico-estriatal de las NEMs A,B. Estimulación supraumbra, en rojo la NEM D1 y en verde la NEM D2, estas respuestas fueron obtenidas de BAC eGFP D1 y D2. C,D. Área bajo la respuesta sináptica y Duración a la amplitud media. F-H. Resumen de las medidas sinápticas en forma de histograma. E 1-2. Trazos amplificados a un menor barrido, el cual ilustra la frecuencia de disparo. 3. Potencial autorregenerativo de calcio característico de las NEMs D2. I. Histograma de la frecuencia de disparo. Tomado de Flores-Barrera et. al., 2010.



Otra diferencia entre estas células es la frecuencia de disparo, siendo que en respuesta a la estimulación supraumbral tienen una frecuencia de  $138 \pm 8$  Hz vs.  $258 \pm 11$  Hz para D1 y D2 respectivamente. Además de alcanzar frecuencias más altas, las neuronas de la vía indirecta se han caracterizado por tener potenciales autorregenerativos de calcio, en vez de generar breves trenes de potenciales de acción al inicio de la respuesta (figura 11, número 3) (Kita et al., 1985; Bargas et al., 1991; Flores-Barrera et al., 2010).

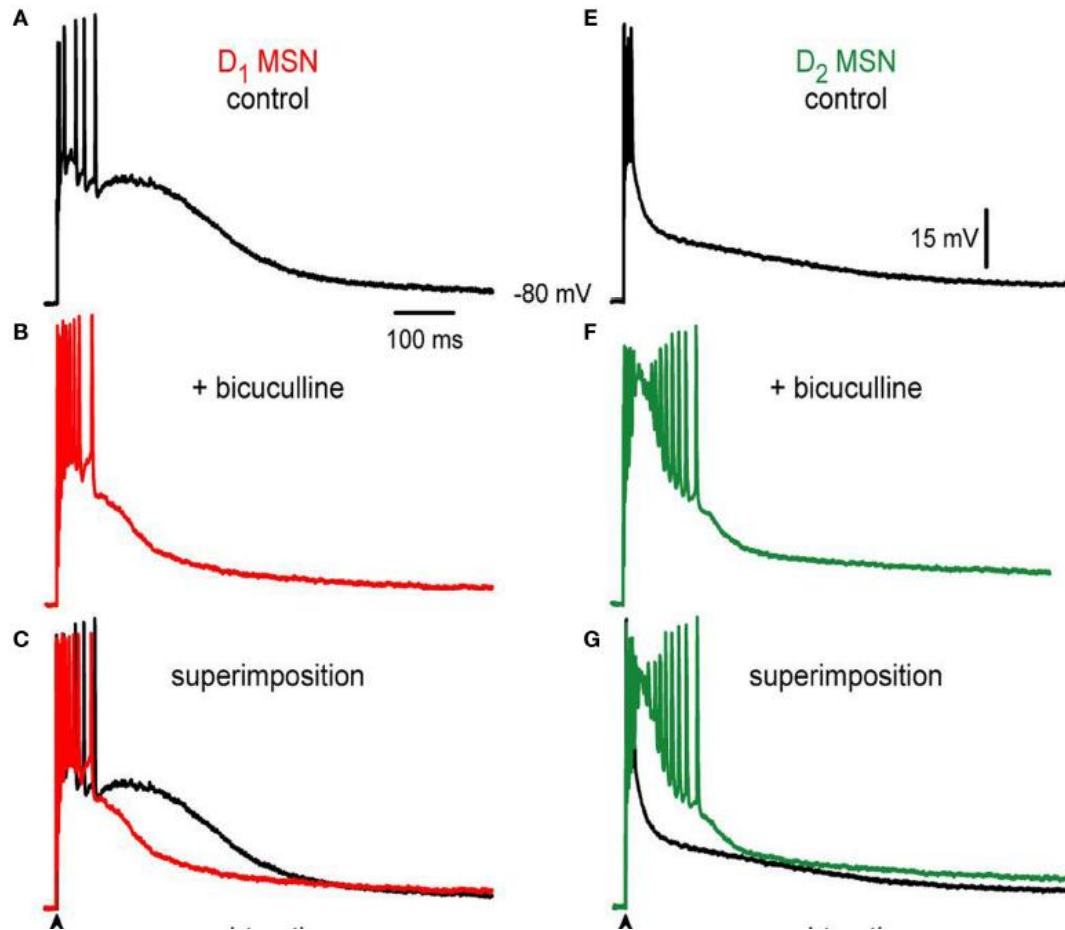
Es ampliamente sabido que las neuronas estriatales reciben contactos inhibitorios por parte de colaterales axónicas de NEMs y de interneuronas (Tunstall et al., 2002; Koos et al., 2004 Tecuapetla et al., 2007). Recientemente se mostró que la integración GABAérgica de las neuronas estriato-palidales difiere de las estriato-nigrales (Flores-Barrera et al., 2010).

En las neuronas D1 la participación GABAérgica tiene una acción dual (Figura 12 inciso A, B). Al bloquear el receptor  $GABA_A$  con bicuculina ( $10 \mu M$ ), la respuesta inicial de la integración sináptica cortico-estriatal se incrementa en amplitud y frecuencia de disparo, mientras que la meseta despolarizante característica de este tipo neuronal es disminuida. Estos experimentos siguieron que el componente GABAérgico al inicio de la respuesta restringe la despolarización inicial. Y en la parte tardía, ayuda a incrementar y mantener la meseta despolarizante. El área bajo la respuesta supraumbral se incrementó un 28% al inicio y disminuyó el 25% durante la meseta después de bloquear los receptores GABAérgicos con bicuculina.

De manera contrastante las neuronas D2 (Figura 12 inciso E, F) quedan más despolarizadas a lo largo de toda la respuesta sináptica en presencia de bicuculina. Por lo tanto, el área bajo la respuesta sináptica se incrementó un 76% de manera uniforme. En estas células el bloqueo del canal  $GABA_A$  también repercutió en el incremento de la frecuencia de disparo, de tal forma que en estas

células el GABA ayuda a reducir la excitabilidad intrínseca y el número de potenciales de acción.

Estudios previos, también han encontrado diferencias fisiológicas entre estos dos grupos neuronales (NEMs D1 y D2) como, la probabilidad de liberación, la capacidad para generar plasticidad de largo plazo, frecuencia de disparo distinta, actividad espontánea, etc (Kreitzer & Malenka, 2007; Cepeda et al., 2008; Ade et al., 2008). Sin embargo, a la fecha no se había encontrado la manera de evidenciar la identidad de las neuronas neostriatales (D1 o D2) durante un experimento electrofisiológico, tal como lo proponen los experimentos previamente reportados (Flores-Barrera et al., 2010). La diferencia en la respuesta corticoestriatal entre las NEMs, ha sido confirmada en rebanadas de cerebro de ratas, utilizando doble marcado (intracelular e inmunocitoquímico) para identificar el péptido de expresión en neuronas de la vía directa e indirecta (Flores-Barrera et al., 2010).



**Figura 12.** Diferente contribución GABAérgica en las neuronas espinosas medianas. (A,E) Respuesta sináptica supraumbral cortico-estriatal para NEM D1 y NEM D2. (B,F) Respuesta sináptica después de la adición de 10  $\mu$ M de bicuculina. (C,G) Sobreposición de los registros controles y experimentales. Tomado de Flores-Barrera et al., 2010.

## CAPÍTULO 5

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### Antecedentes

Hasta ahora las neuronas espinosas estriopalidales y estriopalidales (vía directa e indirecta) se han descrito como una población electrofisiológicamente homogénea. Similares en número e indistinguibles en tamaño, forma y propiedades electrofisiológicas básicas. El mayor obstáculo para conocer sus diferencias ha sido la dificultad para distinguirlas.

Actualmente estas neuronas se pueden estudiar *in vitro* por separado, en el ratón transgénico BAC (*bacterial artificial chromosome*), el cual expresa una proteína verde fluorescente en las regiones promotoras del receptor dopaminérgico D1 ó D2.

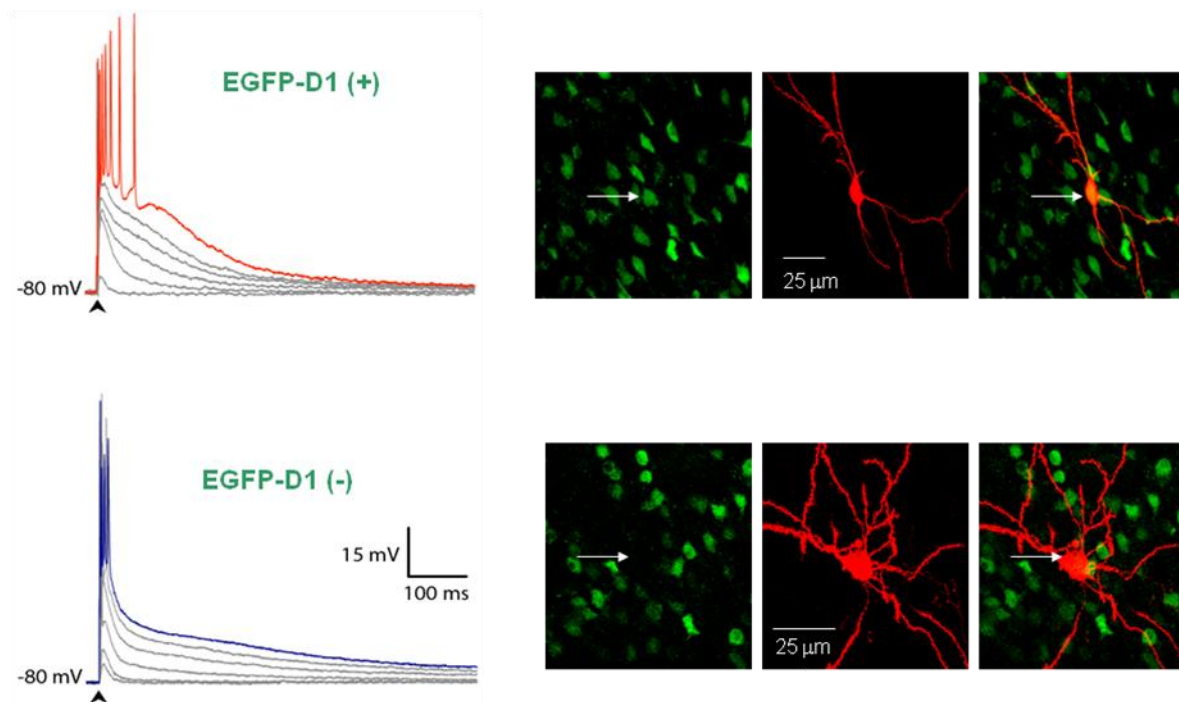
Estudios previos al uso de ratones BAC EGFP-D1 y EGFP-D2 no han encontrado diferencias en las propiedades electrofisiológicas entre las neuronas de la vía directa e indirecta que permitan identificarlas durante su registro. Ambos tipos neuronales presentan un disparo tónico, regular y con poca adaptación, resistencias de entrada, valores de capacitancia similares y un potencial de membrana en reposo hiperpolarizado (Bargas et al., 1989; Nisenbaum et al., 1994; 1995; Venance & Glowinski, 2003; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Gertler, 2008).

Sin embargo, el antecedente más importante de este proyecto de investigación es el haber observado por primera vez diferencias radicales en la integración sináptica cortical de las neuronas espinosas medianas que conforman la vía directa y la vía indirecta (Flores-Barrera et al., 2010).

Las diferencias en las respuestas cortico-estriatales se observan en los componentes tempranos y tardios de la trayectoria del voltaje, la duración de las respuestas sinápticas de las neuronas pertenecientes a cada vía, el área bajo la

respuesta sináptica y frecuencia de disparo. Sin embargo, la distinta integración GABAérgica en cada una de las neuronas de proyección previamente estudiada (figura12), no explica totalmente el curso temporal tan diferente que tienen las NEMs D1 y D2. De tal forma que se desconoce si existen diferencias intrínsecas en estas neuronas que determinen sus diferencias en la respuestas corticoestriatales.

En la figura 13 se muestran las respuestas sinápticas para NEM D1 y NEM D2 identificadas por medio del raton transgénico BAC eGFP D1. Las respuestas fueron obtenidas con un sólo estímulo (cabeza de flecha) en la corteza cerebral (con intensidades crecientes hasta alcanzar una respuesta supraumbral), en esta figura se pueden ver las diferencias en la integración sináptica de cada tipo celular.



**Figura 13.** Respuesta sináptica a la estimulación Cortico-estriatal (Flores Barrera E & Vizcarra Chacón B 2010). La respuesta en rojo corresponde a la neurona perteneciente a la vía directa (D1) eGFP (positivo) y la respuesta en azul representa a la neurona de la vía indirecta (D2) eGFP (negativo). A la derecha de la figura se puede observar su inmunocitoquímica: en rojo la célula registrada y en verde la proteína verde fluorescente (eGFP) expresada bajo el promotor D1.

## **Hipótesis**

Dado que la diferencia en la respuesta cortico-estriatal observada en las neuronas de proyección de la vía directa e indirecta (Flores-Barrera et al., 2010), se refleja principalmente en la duración y amplitud de las respuestas y dado que, estos parámetros se encuentran estrechamente ligados a la fase de repolarización del evento sináptico creemos que:

La participación de las conductancias de potasio dependientes de calcio presentes en estas neuronas (tipo BK y SK), es distinta y determinante en la integración sináptica cortico-estriatal de las neuronas de proyección de las vías directa e indirecta.

## **Objetivos**

General:

Estudiar la participación de las conductancias de potasio dependientes de calcio (tipo BK y SK) en la integración sináptica cortico-estriatal.

Particulares:

Determinar la proporción y el curso temporal de la participación de la corriente de potasio tipo BK en la respuesta sináptica cortico-estriatal de las neuronas de la vía directa e indirecta.

Determinar la proporción y el curso temporal de la corriente de potasio tipo SK durante la respuesta sináptica cortico-estriatal de las neuronas de la vía directa e indirecta.

## Método

En esta tesis se utilizaron ratones transgénicos *BAC eGFP (D1)*, los cuales expresan proteína verde fluorescente bajo el control del promotor de los receptores a dopamina de la familia D1. Estos animales permitieron identificar a las neuronas de la vía directa *eGFP (D1)* positivo, de aquellas que pertenecían a la vía indirecta *eGFP (D1)* negativo (Flores-Barrera et al., 2010; Heintz, 2001; Matemales et al., 2009). Los ratones utilizados, fueron ratones adultos (60 a 90 días de edad) previamente genotipificados como positivos a *eGFP (D1)* por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) o *polymerase Chain Reaction*.

También se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* de 160 gr, que equivale al peso de ratas adultas (PD60). Se ha reportado que en la integración sináptica cortico-estriatal no hay diferencias entre estas dos especies (Flores-Barrera et al 2010).

Los experimentos para la relación intensidad de corriente vs frecuencia de disparo y aquellos en donde se realizó el protocolo de integración sináptica para corroborar que no había diferencia entre células de rata y ratón fueron realizados en cerebros de rata adulta. Una vez confirmada la respuesta, los experimentos restantes en donde se estudió la participación de los canales BK y SK en la integración sináptica cortico-estriatal, fueron realizados con el ratón transgénico *BAC eGFP D1*.

### Obtención de rebanadas

Se utilizaron rebanadas sagitales de 300  $\mu\text{m}$  de grosor, de cerebros de ratones transgénicos *BAC eGFP (D1)* o ratas de la cepa *wistar* adultos, ambos del sexo masculino. Para su obtención, se decapitó al animal previamente anestesiado con ketamina/xylacina. Una vez extraído el cerebro, se sumergió en líquido cerebroespinal artificial (LCA) a 4°C, constituido (en mM) 127.5 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> y 11 de glucosa (pH 7.4 300mOsm/1). Esta preparación

fue burbujeada continuamente con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (carbógeno), el cerebro permaneció en esa solución por 1 minuto antes de quitarle el cerebelo y bulbo olfatorio.

Después se procedió a separar los dos hemisferios mediante un corte sagital por la línea media y luego se pegó con cianocrilato en el piso de una caja de petri colocada en un vibratomo (PELCO 101), habiendo hecho lo anterior, la caja de petri se llenó con (LCA) burbujeado con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> para obtener las rebanadas sagitales donde el núcleo neocortical dorsal estuviera presente, posteriormente las rebanadas fueron incubadas en (LCA) con carbógeno por 1 hora a temperatura ambiente para su recuperación. Finalmente las rebanadas se colocaron en la cámara de registro y se perfundieron a una tasa de 1ml/minuto a una temperatura de 33 a 35°C.

#### Registros Electrofisiológicos

Para los registros intracelulares se emplearon microelectrodos de vidrio (borosilicato *Frederick Haer & Co, Bowdoinham ME*) llenados con acetato de potasio 3M como conductor de corriente y biocitina al 1% para marcar las células registradas.

Los electrodos fueron elaborados con un estirador de micropipetas horizontal (*Sutter Instruments Co P-87*), la resistencia de los microelectrodos se mantuvo en un rango de 80 a 120 MΩ.

La señal registrada fue amplificada con un sistema de amplificación de alta impedancia, acoplado a un puente activo de *Wheatstone (Neuro Data, Cygus Technology, inc. Delaware Water Gap, Pa)* los registros se digitalizaron a 40 kHz.

Durante cada experimento la señal electrofisiológica se monitoreó con un osciloscopio (*Nicolet 310, Madison WI.*) y se balanceó el puente de *Wheatstone* para quedar con los desplazamientos de voltaje dados por la resistencia de entrada de la neurona.



A través del electrodo de registro se inyectaron pulsos rectangulares de corriente de duración y amplitud variable generados por un estimulador (*Grass instruments S88, Quincy MA*), la intensidad y duración de los estímulos fueron controlados mediante una unidad de aislamiento (*Digitimer LTD, DS2A*).

Por medio de un electrodo bipolar concéntrico (50 $\mu$ m) colocado sobre la corteza cerebral región sensoriomotriz de la rebanada de cerebro del ratón, se aplicó un choque breve de voltaje de intensidad variable (8-30 V) a una frecuencia de 0.1Hz producidos por un estimulador (*Grass instruments S88, Quincy MA*). La intensidad fue controlada mediante una unidad de aislamiento (*Digitimer LTD, DS2A*).

Una vez que se obtuvo el empale de la NEM, se aseguró que la célula no presentara evidencia eléctrica de daño celular y que su patrón de disparo tuviera las características de una neurona de proyección neocortical. En estas condiciones el potencial de reposo registrado fue de -85 +/- 5 mV.

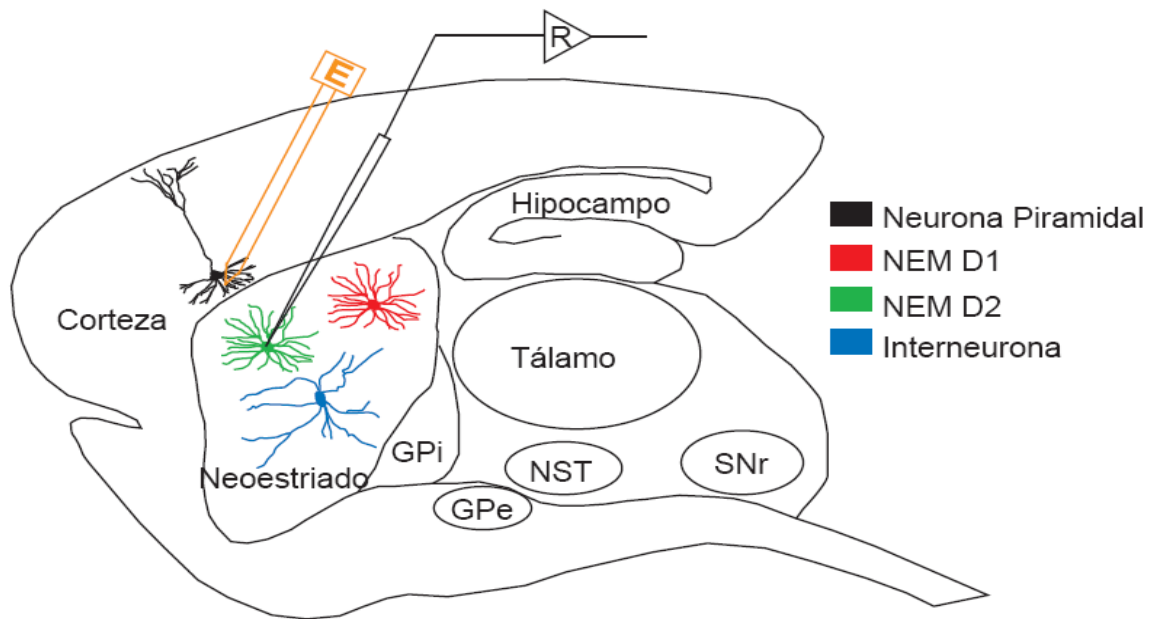
Cada experimento constó básicamente de dos fases:

1.- Fase control: los protocolos experimentales se realizaron en ausencia total de fármacos a una temperatura de 33-35 °C y un potencial de mantenimiento de -85 mV para el protocolo de la relación intensidad de corriente-voltaje (IV) y -80 mV para la respuesta cortico-estriatal (sináptico simple SS).

2.- Fase experimental: Los experimentos (IV) y (SS) se repitieron en las mismas condiciones, en presencia de los bloqueadores de canales de potasio: Apamina (100 nM) y Caribdotoxina (20 nM). Bloqueadores de la corriente SK y BK respectivamente. Los fármacos se agregaron al medio de perfusión y permanecieron difundiendo por lo menos 15 min, antes de iniciar la segunda fase experimental. Los fármacos fueron preparados al momento del experimento a partir de alícuotas que contenían la cantidad precisa para cada experimento, los *stocks* se mantuvieron en congelación para su preservación.

El protocolo de la relación intensidad de corriente-voltaje (IV), se llevó a cabo dando pasos de corriente despolarizante e hiperpolarizante en el soma de la célula registrada, hasta alcanzar su umbral de disparo y la generación de varios potenciales de acción.

La respuesta cortico-estriatal se obtuvo estimulando en la corteza por medio de un electrodo concéntrico bipolar de 50 micras de diámetro y registrando en neuronas neostriatales (Figura 14, E y R), se utilizaron diferentes intensidades de estimulación hasta sobrepasar el umbral de disparo y obtener una respuesta supraumbral que permitió distinguir claramente el tipo de neurona de proyección registrada (ver figura 13).



**Figura 14.** Esquema de los componentes del circuito neostriatal y ensamble experimental. El electrodo de estimulación (E) situado en la capa 5 de la corteza cerebral y el electrodo de registro (R) dentro del neostriado dorsal. La neurona piramidal que inerva el circuito estriatal se muestra en color negro; En rojo se representa la neurona de la vía directa (D1); y en verde la neurona de la vía indirecta (D2). La neurona en azul representa a las interneuronas estriatales.

## Marcado intracelular

Para el marcado de las células registradas se utilizó biocitina (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO*) al 1%, contenida en el microelectrodo de registro; Una vez finalizado el registro electrofisiológico, se inyectó la biocitina por medio de un amplificador *Neurodata amplifier* dando pulsos de corriente positiva y negativa en un rango de 0.25 a 5 nA durante 15 minutos.

Posteriormente, las rebanadas fueron fijadas en paraformaldehído al 4 % por al menos 1 hora, después se colocó la rebanada durante 10 minutos en *KPBS 1X* para retirar el exceso de fijador, al terminar el lavado, las rebanadas se incluyeron en agar al 7% y posteriormente se obtuvieron cortes sagitales de 50  $\mu\text{m}$  de espesor en presencia de *KPBS* por medio de un vibratomo, a continuación se incubaron las rebanadas en 500 $\mu\text{l}$  de PBS 1X-Triton con CY-3 estreptavidina 1:100 (Vector, Burlingham, CA, USA) que se fija con alta afinidad a la biotina, contenida en la biocitina, el periodo de incubación fue de por lo menos 4 horas a temperatura ambiente, esta tinción permite observar la morfología somato-dendrítica de las NEMs registradas.

La visualización de doble o triple marcado (biocitina – GFP y/o SP/ENK) se llevó a cabo con un microscopio confocal *Olympus fluo view FV 1000*.

## Fármacos

Apamina (100 nM) Obtenidos por: Alome labs	Bloqueador de canales SK
Caribdotoxina (10 nM) Obtenidos por: Alome labs	Bloqueador de los canales BK

## Procesamiento de datos

Los datos obtenidos fueron digitalizados y transferidos a una computadora PC mediante uso de programas diseñados en el laboratorio en el ambiente *LabView* (*National instruments, Austin TX*), los datos digitalizados fueron analizados y graficados en el programa (*Origin V 7.0; Microcal TM, Northampton MA*), las figuras fueron realizadas en el programa *Adobe Illustrator* versión 10.

## Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se parearon, es decir, que en cada neurona registrada se compararon las respuestas en condición control y en condición experimental. Para lo anterior se utilizó la prueba no paramétrica de rangos asignados: T de Wilcoxon de dos colas (Siegel y Castellan 1995; Systat V.7. SPSS inc Chicago IL). También se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, para analizar las diferencias entre grupos neuronales.

## CAPÍTULO 6

### RESULTADOS

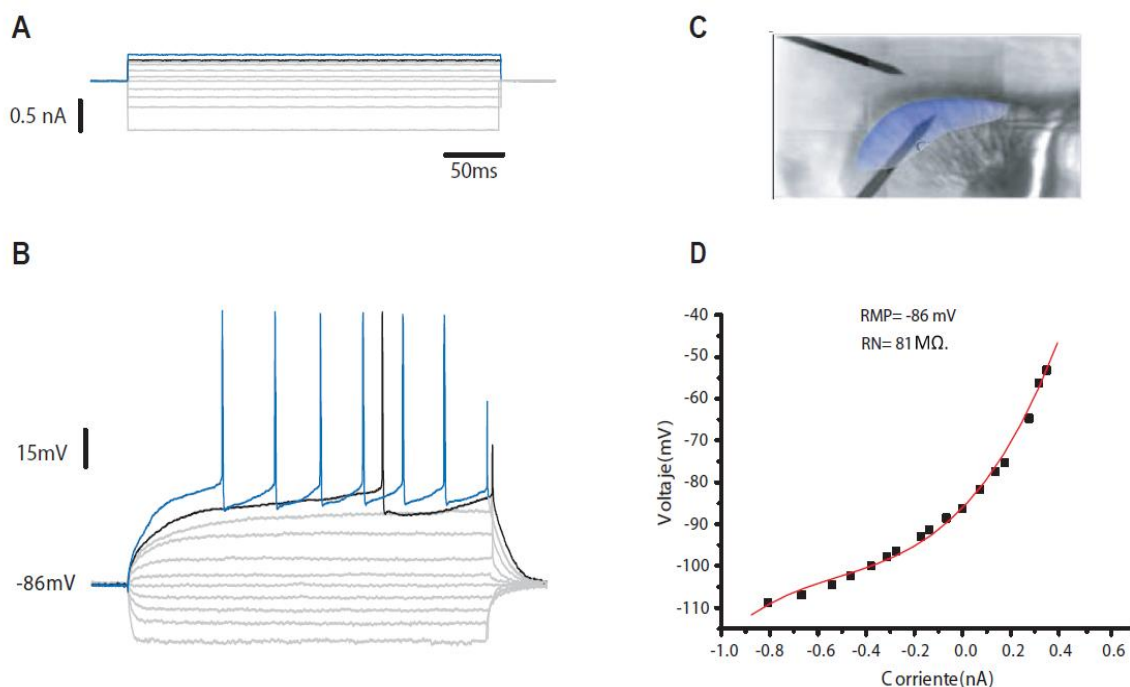
#### **Caracterización electrofisiológica de las neuronas neocorticales de proyección**

Relación corriente voltaje.

Para esta tesis se registraron un total de 70 neuronas en el estriado dorsal (figura 15C, zona azul), obtenidas de cerebros de ratas y ratones BAC eGFP las cuales exhibían características propias de neuronas de proyección (Bargas et al., 1989; Pineda et al., 1992; Nisenbaum et al., 1994; 1995; Venance & Glowinski, 2003; Cepeda et al., 2008; Day et al., 2008; Gertler, 2008). Estas neuronas al ser estimuladas en el soma con escalones de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes de intensidad creciente (figura 15 A), presentan un retardo en la generación del primer potencial de acción, este retardo tiene la forma de una rampa despolarizante de varios cientos de milisegundos (figura 15 B, trazo negro despolarizante).

También es característico su patrón de disparo tónico regular y con poca adaptación (trazo azul fig.15 B), en cuanto a la respuesta de estas neuronas a pulsos de corriente hiperpolarizantes se puede observar cierta oposición del voltaje a la hiperpolarización (figura15 D), esto debido al rectificador entrante (Galarraga et al., 1996). También se distingue en estas neuronas su potencial de membrana hiperpolarizado, alrededor de los -85 mV y una resistencia de entrada aproximada a los 55 M $\Omega$ .

En la figura 15 D se observa la relación corriente inyectada vs voltaje registrado, obtenida de los registros (trazos mostrados en fig. 15 A,B), la relación corriente vs voltaje es no lineal y es similar en ambos tipos de neuronas de proyección del neocórtico (Galarraga et al., 1994; Shen et al., 2007; Cepeda et al., 2008).

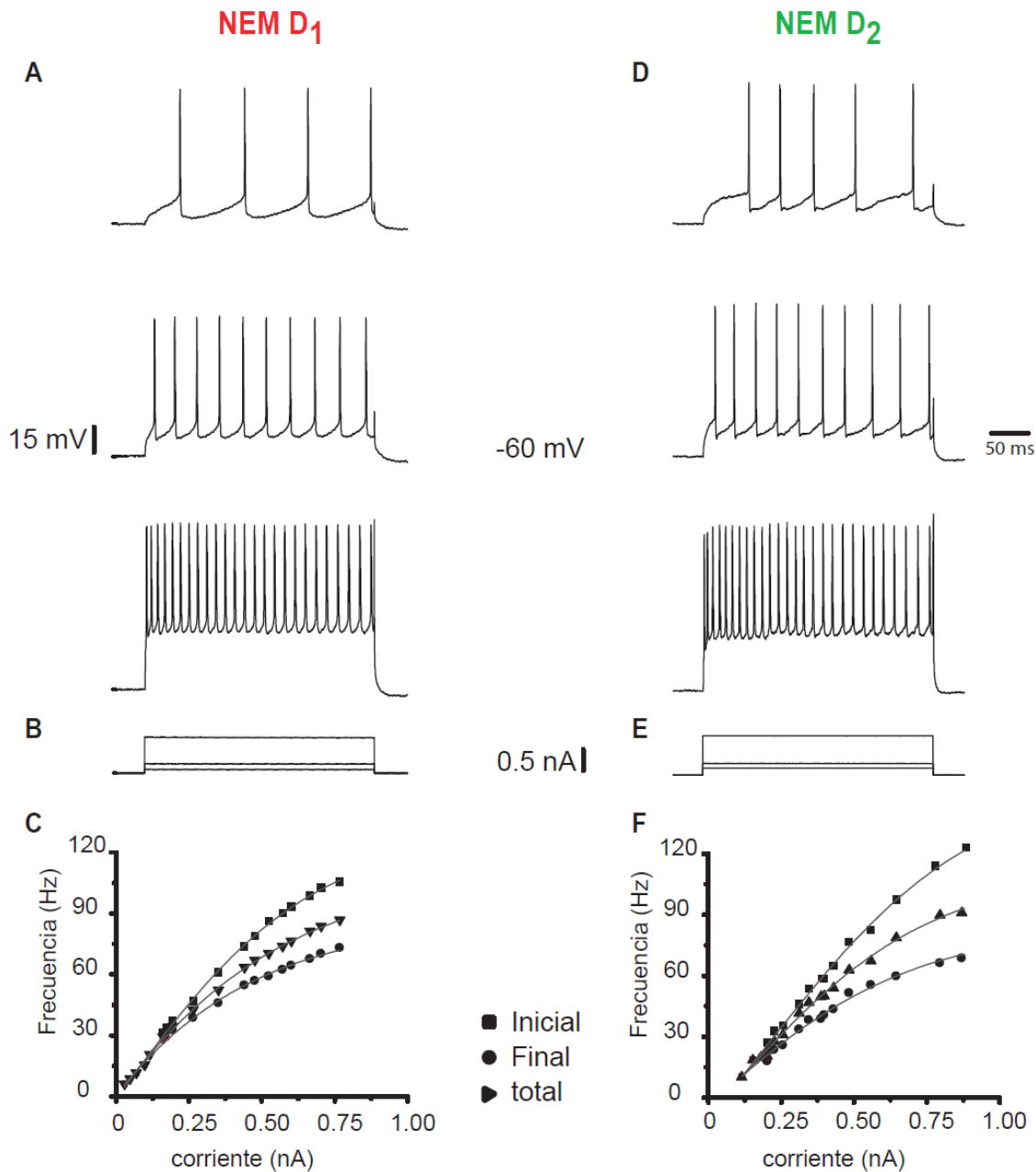


**Figura 15.** Identificación electrofisiológica de las neuronas espinosas medianas. (A) Corriente inyectada en el soma (nótese que es de mayor intensidad la corriente hiperpolarizante) (B) Trayectoria de voltaje en respuesta a la estimulación somática subumbral (trazos grises), umbral (trazo negro) y supraumbral (trazo azul) (C) Esquema de la zona de registro, el Neocórtico dorsal se encuentra sombreado en azul, Tomado de Ding et. al., 2008. (D) Relación corriente voltaje o curva IV. Observe las propiedades no lineales de estas neuronas.

## **Frecuencia de disparo de las neuronas de proyección**

Como se ha mencionado en los capítulos anteriores, las neuronas de proyección neostriatales se han podido separar en dos grandes familias de acuerdo a su expresión de péptidos (SP, ENK y dinorfina), receptores (D1 o D2) y núcleos de proyección fuera del estriado (GPi/SNr) y (GPe), vía directa e indirecta respectivamente. Sin embargo, hasta ahora solo se ha descrito mayor excitabilidad en las neuronas de la vía indirecta (Shen et al., 2007)

La siguiente figura (16) muestra la relación entre la intensidad de corriente y la frecuencia de disparo de una neurona estriato-nigral y otra estriato-palidal ambas obtenidas de cerebros de ratas adultas e identificadas con sus respectivos péptidos (SP + y ENK +). Las dos neuronas presentan un disparo tónico, regular y con poca adaptación, esto se puede notar en la estimulación más baja (registros superiores). En la medida que se dan pasos de corriente más despolarizados, se puede ver que los últimos potenciales de acción presentan mayor espacio interespiga, dicho fenómeno se da por la activación de canales de potasio activados por el calcio que permeó durante los primeros potenciales de acción (Pineda et al., 1992). Cabe mencionar que las neuronas de la vía indirecta presentan una frecuencia inicial mayor que las neuronas de la vía directa (fig.16 F cuadros), a pesar de alcanzar frecuencias finales y totales similares (graficas con triangulos y circulos). En general ambas neuronas muestran frecuencias y modo de disparo similar.



**Figura 16.** Relación intensidad de corriente vs frecuencia de disparo en NEM D1 y D2. (A,D) Frecuencia de disparo en respuesta a distintas intensidades de estimulación para NEM D1 y D2. En las frecuencias más altas se puede ver una ligera adaptación. (B,E) Pasos de corriente despolarizante aplicados en este protocolo. Las neuronas se fijaron a un potencial de mantenimiento de -60 mV. (C,F) Muestra la relación, intensidad de la corriente vs frecuencia de disparo inicial, final y total para la NEM D1 y D2.

## Integración sináptica cortico-estriatal

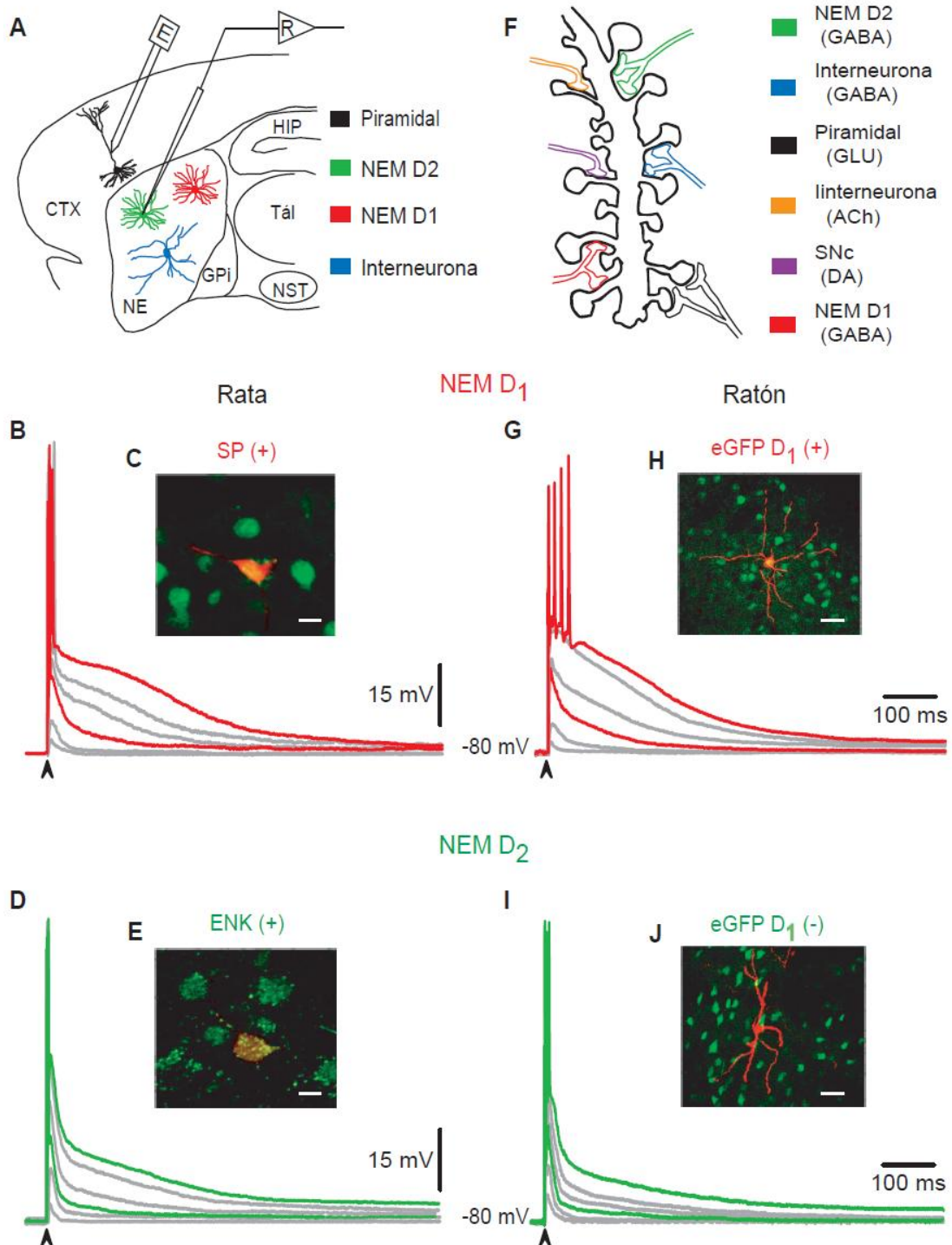
La rebanada sagital que comúnmente se ha utilizado en experimentos *in vitro* para estudiar las proyecciones cortico-estriatales, preserva muy bien las fibras corticales que inervan el estriado (Flores Barrera et al., 2009), en esta preparación varios grupos de investigación han hecho aportaciones al campo (Kita et al., 1985, Kita et al., 1996; Bargas et al., 1991; Vergara et al., 2003); No obstante, en su mayoría la exploración experimental que han hecho ha sido a nivel subumbral y umbral (Smeal et al., 2008; Ding et al., 2008;) y sólo en algunos casos supraumbral (Bargas et al., 1991; Flores-Barrera et al., 2009; 2010).

Recientemente, Flores-Barrera y cols. 2010, por primera vez lograron ver diferencias electrofisiológicas en la integración sináptica cortico-estriatal de las neuronas identificadas de la vía directa respecto a las de la vía indirecta, a un nivel supraumbral de despolarización (Ver figura 11), lo cual permite saber durante un experimento electrofisiológico, si la neurona registrada es estriato-nigral o estriato palidal, dato que anteriormente sólo se podía obtener *off line*, es decir al término del experimento por medio de inmunocitoquímica o recientemente con ratones transgénicos *BAC eGFP D1* o *D2* (Gerfen, 2006; Matamales et al., 2009). Esta respuesta en la presente tesis, se ha podido reproducir fielmente y ha sido confirmada con ratones transgénicos *BAC eGFP D1* y neuronas de ratas adultas identificadas con sus respectivos neuropéptidos SP/ENK, “vía directa e indirecta” respectivamente (Ver figura 17).

Por medio de un electrodo bipolar concéntrico con punta de lápiz de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, se estimuló la corteza cerebral en la región sensorio-motora con choques de 0.1ms a intensidades crecientes hasta alcanzar una activación supraumbral en la neurona de registro (Figura 17 B, G, D e I). Los pasos de estimulación permiten distinguir la activación subumbral, umbral y supraumbral (trazos en color) dejando clara la diferencia en la integración sináptica cortico-estriatal que tienen las neuronas de la vía directa e indirecta.



En este trabajo se realizaron experimentos en ratas adultas y ratones BAC eGFP D1, en la figura 17 se puede observar que no hay diferencias en la respuesta sináptica cortico-estriatal en las distintas especies de roedores (inciso B vs G para NEM D1 y D vs I para NEM D2).



**Figura 17.** Diferente integración sináptica en NEMs D1 y D2. (A) Esquema del protocolo de estimulación y registro. (B) Integración sináptica cortico-estriatal de la NEM D1 de rata adulta, se puede observar la respuesta a intensidades crecientes de estimulación. En rojo se muestra la respuesta umbral y supra umbral máxima, en gris las respuestas subumbrales y supraumbrales. (C) inmunocitoquímica de la neurona registrada, la cual corresponde a una neurona inmunoreactiva a sustancia P (D) Integración sináptica cortico-estriatal de la NEM D2 de rata adulta, los trazos en color verde corresponden a la respuesta umbral y supraumbral máxima. En gris se representan las respuestas subumbrales y supraumbrales. (E) Inmunocitoquímica de la célula registrada ENK positiva. (F) Esquema de la compleja integración sináptica que las NEMs realizan. (G) Registro de la respuesta sináptica cortico-estriatal de una NEM D1 en ratón eGFP D1. (H) Colocalización de la NEM D1 registrada y GFP. (I) Registro de la respuesta sináptica cortico-estriatal de una NEM D2 en ratón eGFP D1. (J) Reconstrucción anatómica de la neurona registrada, en esa foto se puede apreciar que la GFP, no colocaliza con la neurona. La cabeza de flecha al pie de las respuestas sinápticas indica el momento de la estimulación. La barra en color blanco de los incisos E y C, representa la escala (15  $\mu\text{m}$ ), las de los incisos H y J, es equivalente a (30  $\mu\text{m}$ ).

### **Participación de los canales BK en la integración sináptica cortico-estriatal de las NEMs D1 y D2**

En la primera serie de experimentos se evaluó la participación de los canales BK en la integración sináptica cortico-estriatal, en la figura 18 se muestran las respuestas supraumbrales cortico-estriatales de una NEM D1 (A) y una NEM D2 (F) en condición control. En la misma figura (B y G) se muestran estas respuestas después de agregar 20 nM de caribdotoxina (bloqueador específico de los canales BK). Ambos registros se sobrepone para su mejor comparación en (C y H). En los dos casos el bloqueo de los canales BK incrementó el área bajo la respuesta sináptica, las NEM D1 (n=6) en condición control tuvieron en promedio un área en (mV\*ms) de  $10,993 \pm 1,130$  como error estándar vs  $14,323 \pm 1,153$  (mV \* ms) después del bloqueo del canal BK. Esta medición se obtuvo con la integral de milivoltios x milisegundos (mV \* ms) de la respuesta sináptica. Valores estadísticamente significativos  $p \leq 0.05$ .

Para las NEM D2 (n=6), en condición control se obtuvo en promedio un área bajo la respuesta sináptica de  $7,448 \pm 458$  como error estándar, vs  $10,500 \pm 817$  (mV \* ms) en condición experimental  $p \leq 0.05$ . El porcentaje del incremento en el área bajo la respuesta sináptica fue mayor para las neuronas de la vía indirecta 40%, respecto a las neuronas de la vía directa, en las cuales sólo se incrementó un 30%,  $p \leq 0.05$ . En la Figura 18 inciso E, se muestra un histograma que resume esta información.

Para tener una aproximación de la cinética de activación de los canales BK en la respuesta sináptica, se llevó a cabo una resta digital de los trazos sinápticos en condición control y los trazos en presencia de la toxina, en esta medición se encontró sorprendentemente que las las NEM D1 difirieron de las NEM D2 en proporción de la corriente de los canales BK, durante la respuesta corticoestriatal. Ésto se puede ver claramente en la figura 18 (inciso D e I), donde se muestra que el componente sensible a caribdotoxina es diferente en cada una de ellas.

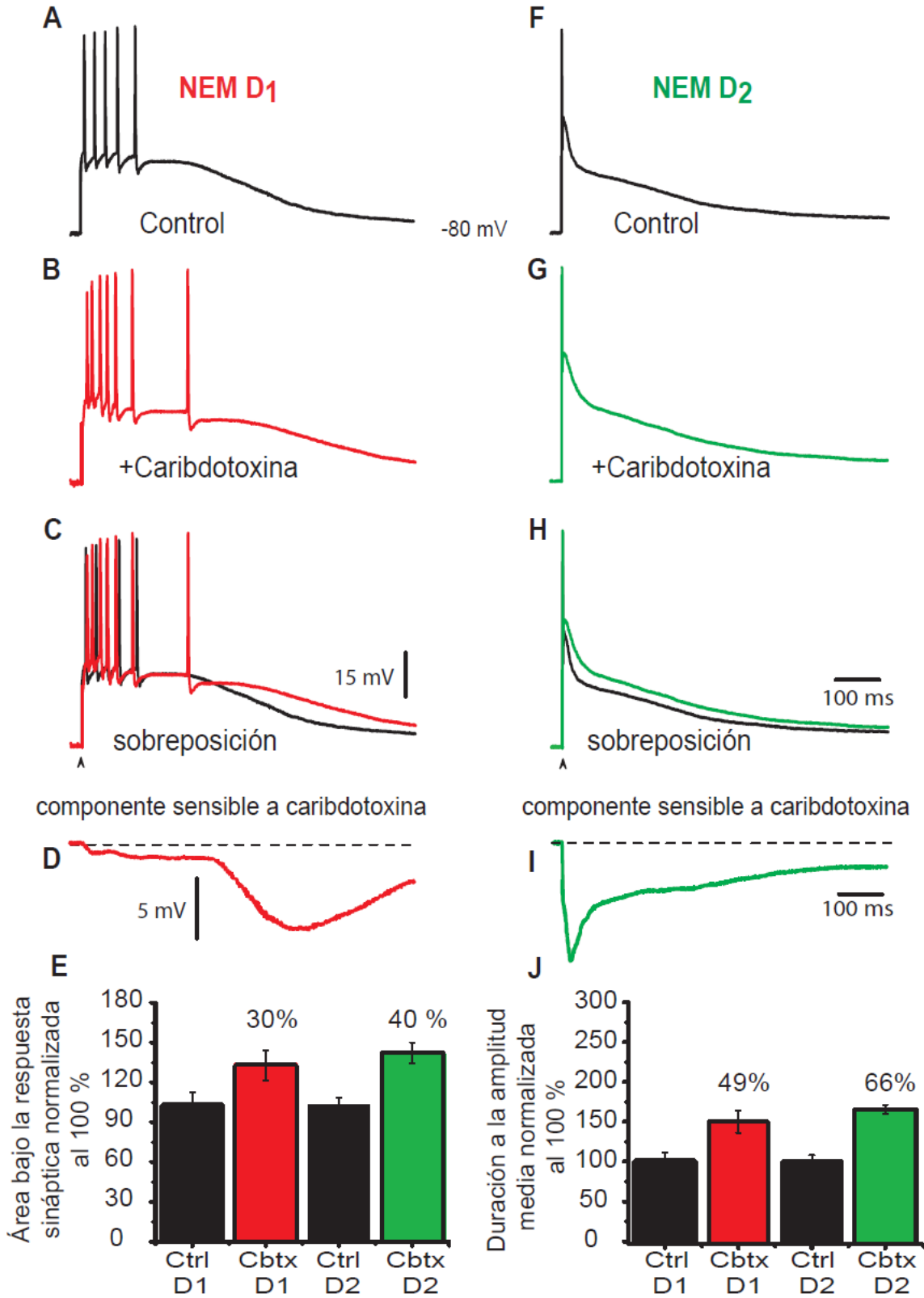
En la misma figura se puede notar que la participación del canal BK en las NEM D2 se da durante todo el evento sináptico, con mayor amplitud al inicio de la respuesta y con un decaimiento rápido durante los primeros 150 ms, al final del evento sináptico la participación de esta conductancia es casi nula. Además, dicha activación se da casi de forma inmediata al inicio de la estimulación cortical. El momento de estimulación queda esquematizado en la figura 18 incisos C y H. Por la cabeza de flecha negra.

En contraste, en las NEM D1, la corriente BK se activa poco al inicio de la respuesta sináptica, teniendo mayor amplitud después de los 300 milisegundos de haber iniciado el evento sináptico y perdura hasta el término del mismo.

A pesar de observarse un incremento en la frecuencia de disparo al inicio de la respuesta, es de resaltar que en estas células ésta conductancia participa sobre todo en la repolarización de la meseta despolarizante que precede a los potenciales de acción (Inciso D, figura 18).

Dado que en ambas neuronas de proyección (estriatonigrales y estriatopalidales) el canal BK participa en la repolarización de la respuesta ortodrómica cortico-estriatal, se midió la duración del evento a la amplitud media en condición control vs experimental.

En este parametro se encontró que las NEM D1 tuvieron una duración en condición control promedio de  $394 \pm 43$  ms, como error estandar vs  $591 \pm 82$  ms  $p \leq 0.05$  (n=6), en condición experimental para la respuesta supraumbral. En contraste, las NEM D2 en ausencia del fármaco tuvieron una duración promedio de  $211 \pm 78$  ms y en presencia de caribdotoxina se obtuvo una duración promedio de  $351 \pm 18$  ms  $P \leq 0.04$  (n=6). Lo anterior representa un incremento en la duración a la amplitud media del 49% para NEM D1 y 66% para las NEM D2  $p \leq 0.05$ . Ésto se puede ver resumido en el histograma de la figura 18, inciso J.



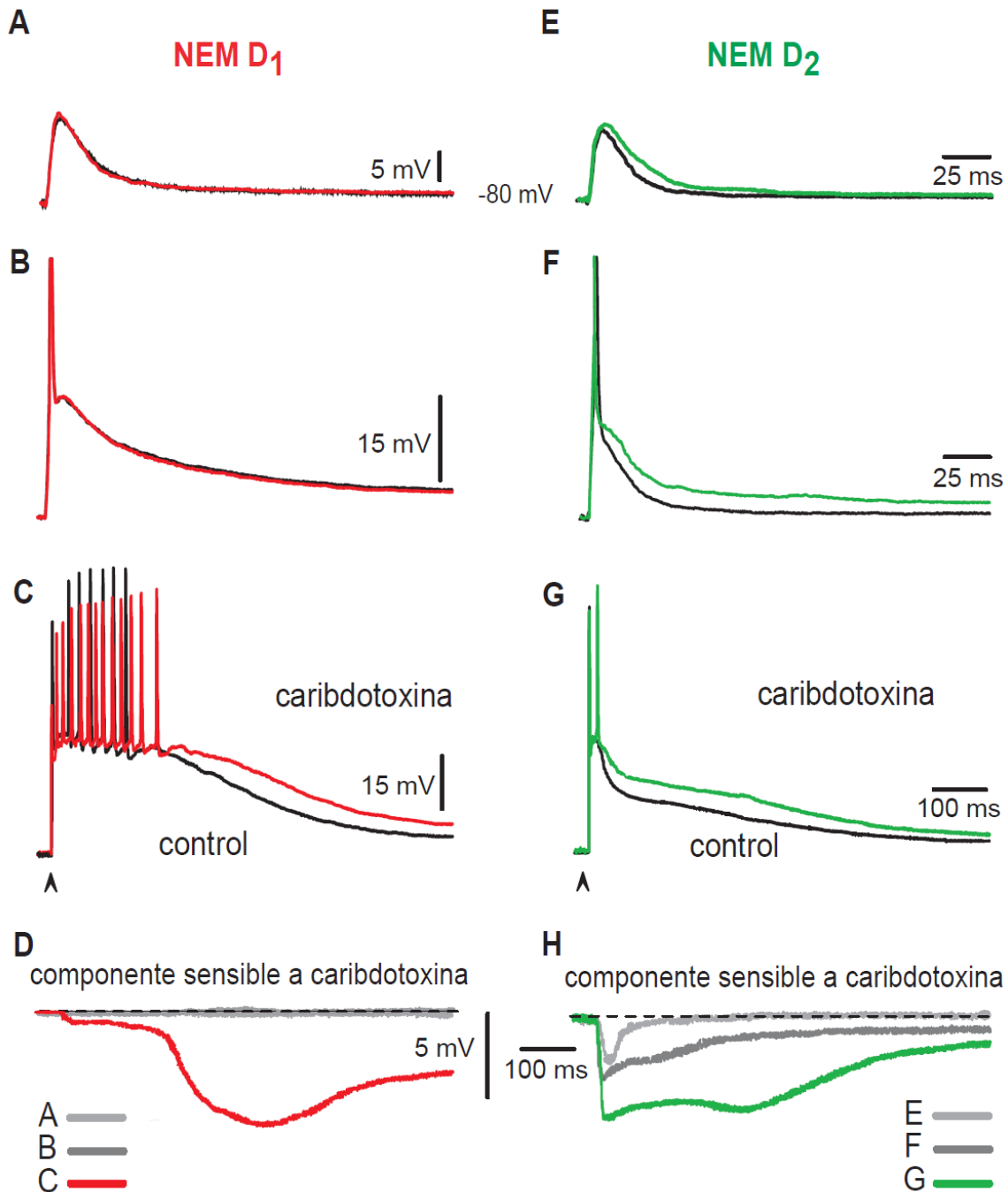
**Figura 18.** Participación del canal BK en la integración sináptica cortico-estriatal. (A,F) Respuesta supraumbral control para NEMs D1 y D2 respectivamente. (B,G)

Respuesta supraumbral en presencia de caribdotoxina, en color rojo las NEM D1 y en verde las NEM D2. (C,H) Sobreposición de las respuestas supraumbrales control vs experimental para NEM D1 y D2 respectivamente. (D,I) Sustracción digital, donde se muestra la diferencia en los tiempos y la trayectoria del componente sensible a caribdotoxina. (E) Representación gráfica del incremento del área bajo la respuesta sináptica Cortico-estriatal. (J) Histogramas del % de incremento en la duración a la amplitud media para NEM D1 y D2.

### **Contribución del canal BK a distintas intensidades de estimulación en las NEM D1 y D2**

Con el objeto de estudiar si la participación de los canales BK era dependiente de la despolarización alcanzada por la respuesta cortico-estriatal, se realizaron experimentos antes y después de bloquear dichos canales a distintas intensidades de estimulación.

En la figura 19 se muestran dos neuronas de proyección identificadas como NEM D1 y NEM D2 en control (trazos negros) y en presencia de caribdotoxina (trazos en rojo para la NEM D1 y trazos en verde para la NEM D2) a diferentes intensidades de estimulación: subumbral (A y E), umbral (B y F) y supraumbral (C y G). Como puede observarse, la participación de esta corriente en las NEM D1, sólo es evidente durante la repolarización de la respuesta corticoestriatal supraumbral (fig.19 C), mientras que en las NEM D2, la participación de esta corriente se hace presente desde la estimulación subumbral (incisos E, F y G). También se puede notar que el componente sensible a esta toxina en las NEM D2, permanece durante toda la respuesta sináptica en todos los niveles de estimulación (la cabeza de flecha indica el momento de la estimulación cortical). Las restas digitales de las respuestas sobrepuestas muestran el componente sensible a la toxina para cada intensidad de estimulación (D y H). Note como se incrementa dicho componente en la NEM D2 (Fig.19 H).



**Figura 19.** Participación del canal BK en la respuesta cortico-estriatal a despolarización subumbral, umbral y supraumbral en las NEM D1 y D2. (A, B, C) Sobreposición de las respuestas sinápticas: subumbral, umbral y supraumbral. En color negro el registro control y en color rojo el experimental para NEM D1. (D) Resta digital del componente sensible a caribdotoxina a las distintas intensidades de estimulación en escalas de grises se representa la activación subumbral y umbral, en rojo la participación supraumbral. (E, F, G) Sobreposición de las respuestas sinápticas: subumbral, umbral y supraumbral para la NEM D2. En

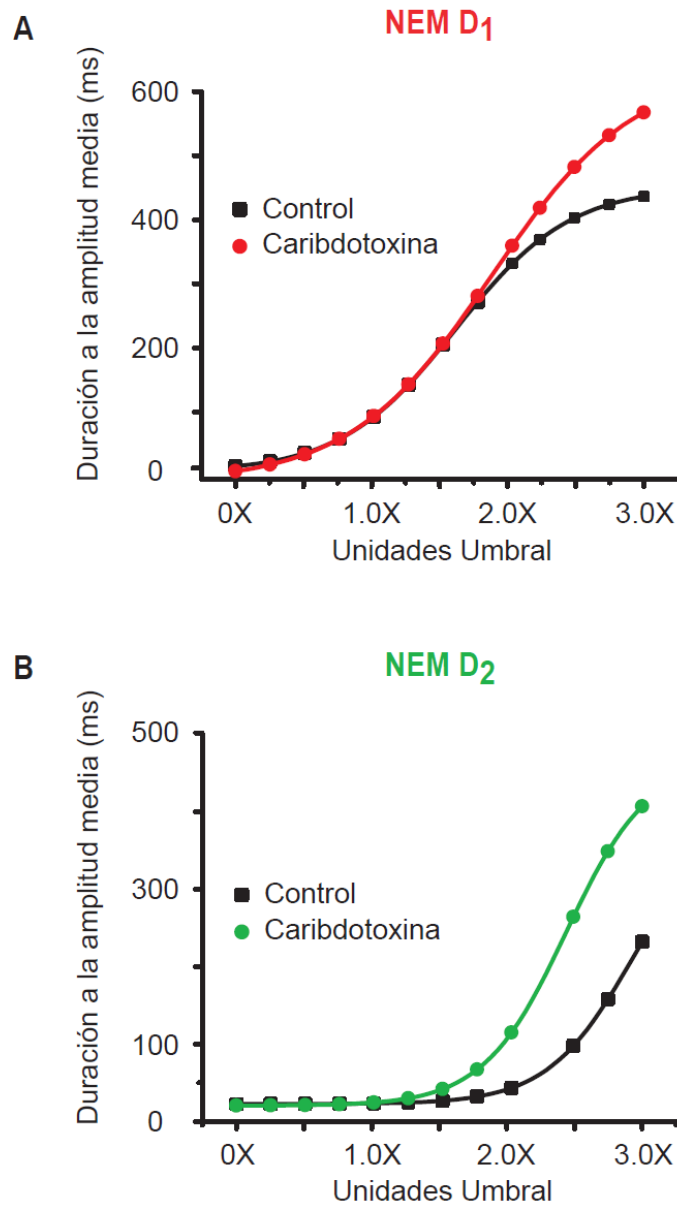
negro el registro control y en verde el experimental, note la participación de los canales BK en todas las intensidades de estimulación. (H) Sustracción digital del componente sensible a caribdotoxina para todas las intensidades de estimulación, en escalas de grises, se muestra las intensidades subumbral y umbral; en verde la activación supraumbral. D y H, mantienen el mismo barrido de evento sináptico (800 ms), en el cual se puede apreciar la participación de estos canales durante todo el evento sináptico.

### **Curva intensidad de estimulación vs Duración a la amplitud media en presencia de caribdotoxina**

Los experimentos sugieren que la activación de las corrientes de los canales BK se da en tiempos diferentes para las NEM D1 y NEM D2, para analizar este detalle se evaluó la relación intensidad umbral vs duración a la amplitud media (ms) de las respuestas sinápticas. En este análisis se normalizó la intensidad de estimulación respecto a la intensidad necesaria para obtener una respuesta umbral 1X, de tal forma que la intensidad de estimulación subumbral tuvo valores menores a 1X y los supraumbrales valores mayores a 1X. En el presente análisis se puede apreciar con claridad que los canales BK en las NEM D1 repolarizan la respuesta sináptica, sólo a niveles de despolarización supraumbral. (Inciso A de la figura 20 cuadros negros respuesta control vs círculos rojos, respuesta en presencia de caribdotoxina). Por otra parte en el inciso B de la figura 20 se muestra que los canales BK en las NEM D2 participan a partir de la respuesta umbral. En este inciso los cuadros negros representan la respuesta control y los círculos verdes la respuesta experimental (en presencia de caribdotoxina).

En esta figura también se puede apreciar que la participación de la conductancia BK es mayor en las NEM D2 que en las NEM D1.





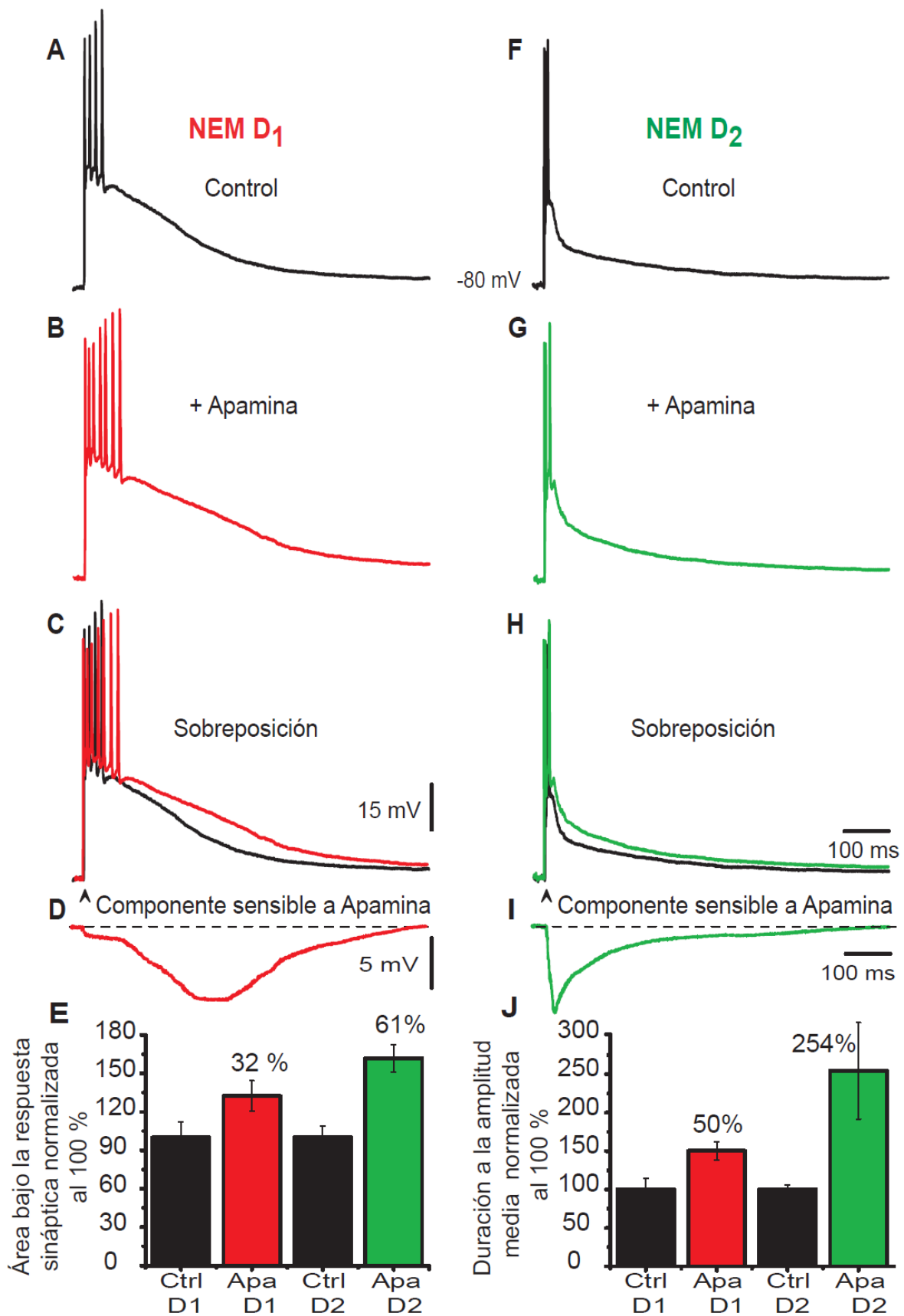
**Figura 20.** Curva intensidad de estimulación vs duración a la amplitud media de la respuesta sináptica. (A) En cuadros negros se muestra la duración a la amplitud media del evento sináptico a distintas intensidades de estimulación, el valor 1X representa la estimulación que provocó el umbral de disparo, los demás valores son múltiplos o dividendos de la intensidad umbral. Los círculos en color rojo representan la duración a la amplitud media en presencia de caribdotoxina, a las mismas intensidades de estimulación que en control para la NEM D1. (B) curva para la NEM D2, los cuadros negros representan la duración a la amplitud media de la respuesta sináptica en condición control. Esta medición en presencia del fármaco esta representada en círculos de color verde. Note que la activación de los canales BK en las NEM D1 se da sólo a nivel supraumbral.

## **Participación de los canales tipo SK en la integración sináptica cortico-estriatal de las NEMs D1 y D2**

En la siguiente figura (21) se muestran las respuestas supraumbrales cortico-estriatales de una NEM D1 (A) y una NEM D2 (F) identificadas en condición control. En la misma figura (B y G) se muestran estas respuestas después de agregar 100 nM de Apamina (bloqueador de los canales SK) al sistema de perfusión. Ambos registros se muestran sobrepuestos en C y H para su mejor comparación. En los dos casos el bloqueo de los canales SK incrementó el área bajo la respuesta cortico-estriatal. En condición control las NEM D1 tuvieron un área bajo la respuesta sináptica en (mV \* ms) promedio de  $7,478 \pm 911$  como error estandar. En contraste, en presencia del fármaco tuvieron un área promedio de  $9,860 \pm 1114$  (mV \* ms)  $p \leq 0.05$  (n=5).

Por otra parte las NEM D2, tuvieron un área bajo la respuesta sináptica cortico-estriatal promedio de  $4,482 \pm 41$  (mV \* ms), en condición control y en presencia de apamina se obtuvo un área promedio de  $7,248 \pm 783$  (mV \* ms).  $P \leq 0.1$  (n= 2).

Lo anterior representa un incremento del 32% para las NEM D1 y un sorprendente incremento del 61% para las NEM D2. El inciso E, de la figura 21 se encuentra gráficamente el incremento en el área bajo la respuesta por el bloqueo de apamina en NEM D1 y NEM D2.



**Figura 21.** Participación de los canales SK en la integración sináptica cortico-estriatal en NEM D1 y D2. (A, F) Respuesta supraumbral control para D1 y D2. (B, G) Respuesta sináptica supraumbral en presencia de apamina; en rojo NEM D1 y en verde NEM D2. (C, H) Sobreposición de las respuestas supraumbrales control vs experimental para D1 y D2 respectivamente. (D, I) componente sensible a apamina (E) Histograma del % de incremento en el área bajo la respuesta sináptica, por el bloqueo del canal SK para D1 y D2. (J) Histograma del % de incremento en la duración a la amplitud media, para D1 y D2.

Para conocer el curso temporal de la conductancia SK, de las neuronas neoestriatales, se realizó un sustracción digital (descrita anteriormente en los experimentos con CBTX). En el inciso D e I de la figura 21 se puede ver el componente sensible a apamina, resultante de la resta digital para los dos tipos neuronales. Ahí se puede notar que, de manera similar al bloqueo por caribdotoxina en las neuronas D1, el curso temporal de la conductancia SK ocurre de forma más tardía que en las NEM D2, aproximadamente después de los 100 ms del estímulo cortical y justo cuando empieza la meseta despolarizante que distingue a este tipo celular. En contraste, en las NEM D2, la contribución de esta conductancia se da exactamente al inicio de la respuesta y permanece durante todo el evento sináptico, teniendo mayor énfasis al inicio de la respuesta sináptica (inciso H e I, figura 21).

En la figura 21 inciso J, se muestra la representación gráfica del incremento de la duración en la respuesta sináptica a la amplitud media. En esta medición se obtuvo que las NEM D1 en condición control tuvieron una duración promedio de  $214 \pm 31$  ms. En contraste, cuando se aplicó apamina al baño, la duración se incrementó a  $322 \pm 35$  ms. ( $n=5$ )  $p \leq 0.05$ .

La misma medición se hizo para las NEM D2, las cuales en ausencia del fármaco tuvieron una duración a la amplitud media promedio de  $46 \pm 2$  ms y en presencia de apamina la duración fue en promedio de  $117 \pm 62$  ms ( $n=2$ )  $p \leq 0.1$ .

La medición anterior representa un incremento del 50 % para las NEM D1, y para las NEM D2 un 254 % de incremento  $p \leq 0.09$ . Estos valores dejan ver nuevamente

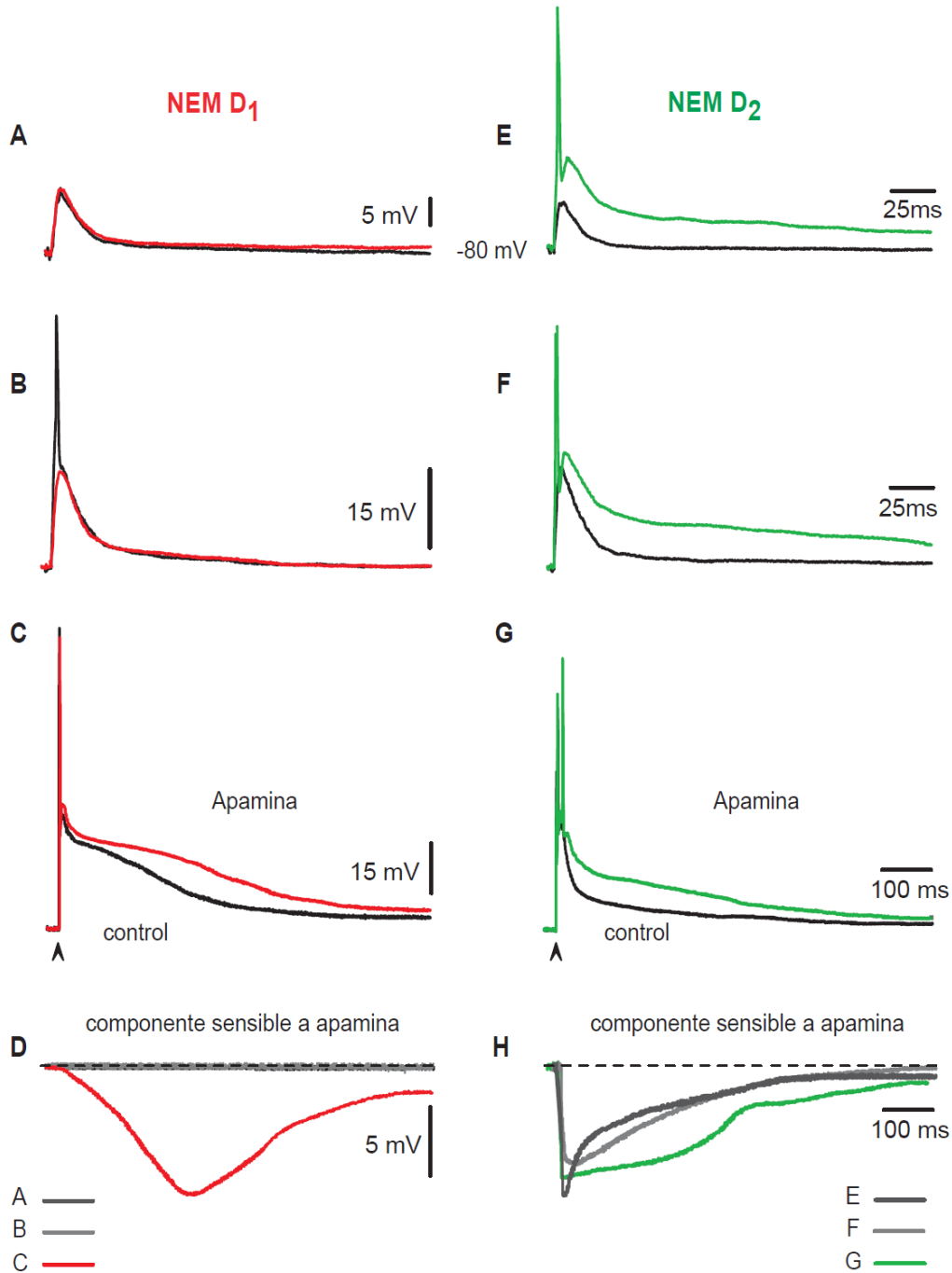
la distinta participación de la conductancia SK en la repolarización de la integración sináptica cortico-estriatal.

### **Contribución del canal SK a distintas intensidades de estimulación en las NEM D1 y D2**

Con el objeto de estudiar si la participación de los canales SK era dependiente de la despolarización alcanzada por la respuesta cortico-estriatal, se realizaron experimentos antes y después de bloquear dichos canales a distintas intensidades de estimulación.

En la figura 22 se muestran dos neuronas de proyección identificadas como NEM D1 y NEM D2, en control (trazos negros) y en presencia de 100 nM de apamina (trazos en rojo para la NEM D1 y trazos en verde para la NEM D2) a diferentes intensidades de estimulación: subumbral (A y E), umbral (B y F) y supraumbral (C y G). Como puede observarse en la figura 22 (incisos A,B,C), la activación de la corriente SK en las NEM D1 se hizo evidente sólo hasta la respuesta supraumbral, de forma contrastante en las NEM D2 la participación de la conductancia SK se observa desde la despolarización subumbral, hasta la supraumbral (Figura 22 incisos E,F,G). En el inciso D de la figura 22, se muestran las restas digitales de la despolarización subumbral, umbral (en gris) y supraumbral (en rojo), donde se puede notar que el componente sensible a apamina en las NEM D1 sólo es evidente a nivel supraumbral, ésto durante la repolarización de la meseta que precede a los potenciales de acción, es decir esta conductancia en las NEM D1 no participa a niveles de despolarización subumbral y umbral por el contrario, sólo se activa lenta y gradualmente en la despolarización supraumbral máxima. De tal manera que en estas neuronas, esta conductancia se encuentra repolarizando la repuesta supraumbral máxima, sobre todo después de los trescientos milisegundos hasta el final del evento, es decir en la repolarización de la meseta supraumbral.

En el inciso H de la figura 22 se representa en escala de grises la resta digital para la activación subumbral y umbral y en verde la sustracción para la despolarización supraumbral para la NEM D2. En éste inciso se puede apreciar que el cambio en el voltaje resultante de la sustracción digital, es evidente desde la mínima estimulación. Además a diferencia de las NEM D1, esta conductancia en las NEM D2 se activa de forma inmediata a la despolarización sináptica, provocada por la estimulación cortical (la cabeza de flecha indica el momento de estimulación). Adicionalmente esta conductancia permanece hasta el final del evento a cualquier intensidad de estimulación (subumbral, umbral y supraumbral).



**Figura 22.** Contribución de la conductancia SK en las neuronas de proyección del estriado. (A,E): efecto del bloqueo por apamina en la intensidad subumbral, en negro los registros controles; en rojo el registro experimental para D1 y en verde para D2. (B,F) Respuesta umbral. (C,G) registros obtenidos con estimulación supraumbral. (D,H) sustracción digital de los registros superpuestos a distintas intensidades de estimulación. En escala de grises se muestra la activación subumbral y umbral, y en rojo y verde la supraumbral, para D1 y D2 respectivamente.

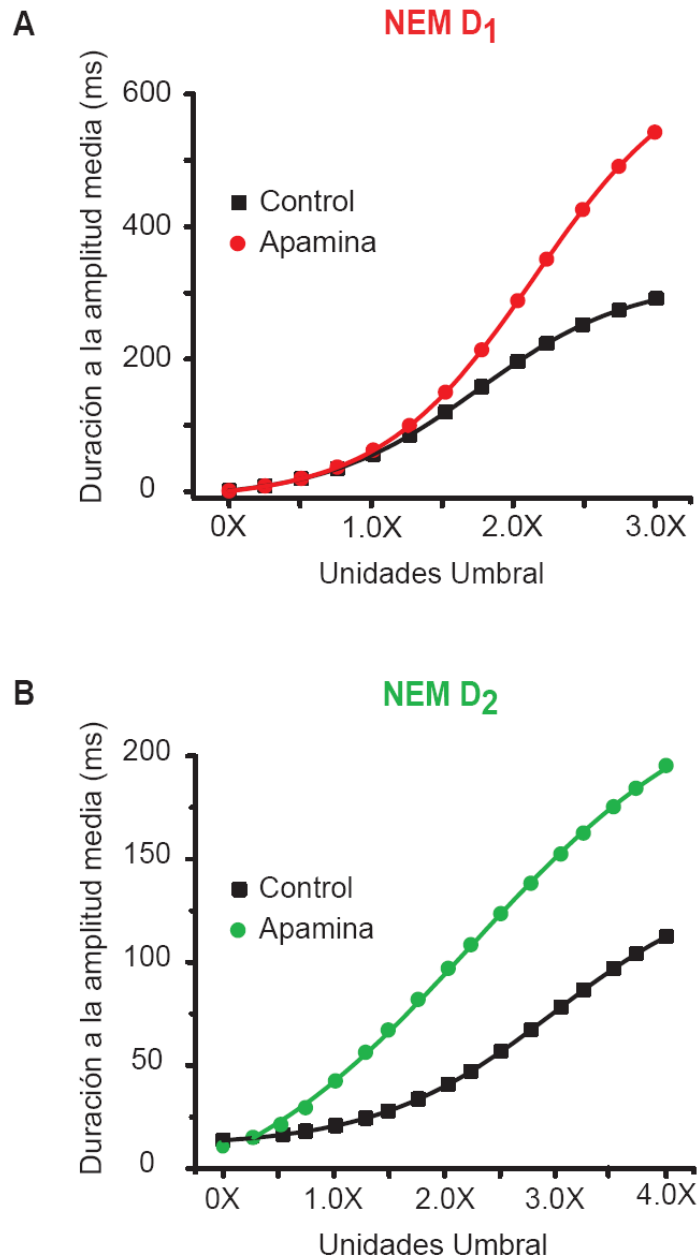
### **Curva intensidad de estimulación vs Duración a la amplitud media en presencia de apamina**

Los resultados en esta última serie de experimentos sugieren que la activación de los canales SK se da en tiempos y cinéticas diferentes para las NEM D1 y NEM D2, para analizar este detalle se evaluó la relación intensidad umbral vs duración a la amplitud media (este análisis se describió anteriormente en los experimentos con caribdotoxina).

En este análisis se puede apreciar con claridad que los canales SK en las NEM D1 repolarizan la respuesta sináptica, a partir del umbral de disparo, y permanece hasta la respuesta supraumbral repolarizando la respuesta (Figura 23 inciso A cuadros negros duración respuesta control y círculos rojos respuesta experimental). De tal forma se puede inferir que la repolarización por las conductancias SK en estas células, toma mayor fuerza de repolarización sináptica a partir de la respuesta umbral.

En las NEM D2 la conductancia dada por el canal SK, se activa desde la respuesta subumbral hasta la supraumbral, sin embargo esta conductancia toma mayor fuerza, conforme la amplitud de la respuesta sináptica aumenta. Ver figura 23 inciso B, en esta figura la respuesta control esta representada en cuadros negros y la experimental en círculos verdes.





**Figura 23.** Curva intensidad de estimulación vs duración a la amplitud media. (A) curva control para la NEM D<sub>1</sub>, en cuadros negros muestra la duración a la amplitud media del evento sináptico a distintas intensidades de estimulación umbral. Los círculos en color rojo representan la duración a la amplitud media en presencia de apamina. (B) curva intensidad de estimulación vs duración a la amplitud media para la NEM D<sub>2</sub>, los cuadros negros esquematizan la respuesta en condición control y en círculos de color verde en condición experimental. Note que la participación de los canales SK en las NEM D<sub>2</sub> es a partir de la despolarización subumbral hasta la supraumbral, mientras que en las NEM D<sub>1</sub> sólo se da en la despolarización supraumbral.

Cabe mencionar que aunque la muestra experimental de las NEM D2 en presencia de apamina es pequeña, la participación de la conductancia SK difiere entre células neocorticales (D1 y D2). Es decir la participación de la conductancia SK es mayor en las NEM D2 que en las D1. Dado que las diferencias eran claras con la muestra experimental que se tenía en esta investigación, se intento reducir al mínimo necesario el uso de animales transgénicos.

## CAPÍTULO 7

### **Discusión**

#### **Integración sináptica cortico-estriatal**

En esta tesis se corroboró que la respuesta cortico-estriatal de las neuronas estriatales de proyección de la vía directa y de la vía indirecta son distintas (Fig. 17), incluso, esta diferencia se observa tanto en células de rata como de ratón BAC eGFP D1.

Estudios previos del laboratorio, han mostrado que la contribución GABAérgica es fundamental para entender las diferencias en las respuestas corticales de estas neuronas (Flores-barrera et al, 2010). En la presente tesis se muestra por primera vez que la participación de las conductancias de potasio dependientes de calcio tipo BK y SK, también son fundamentales para entender la diferente integración sináptica que las NEM D1 y D2 muestran en la respuesta ortodrómica cortico-estriatal.

#### **Participación de conductancias de potasio dependientes de calcio en la integración sináptica**

En la literatura se ha descrito el papel de los canales de potasio dependientes de calcio (Kca), en distintos tipos neuronales. Específicamente, durante la fase de repolarización del potencial de acción y el post-potencial que le sigue (Pineda et al., 1992; Bennett et al., 2000; Bond et al., 2005; Stocker, 2004). Sin embargo,

recientemente se ha descrito que estos canales participan en la integración y repolarización de eventos sinápticos (Cai et al., 2004; Bond et al., 2005; Faber et al., 2007; Benhassine et al., 2009). La participación de las IKCa en la integración sináptica se ha estudiado en neuronas piramidales de la corteza cerebral e hipocampo, donde la organización anatómica de estas neuronas esta laminada y se puede registrar el extenso árbol dendrítico (Larkum et al., 2009; Murayama et al., 2009). No obstante, la mayor ventaja que se ha tenido para estudiar estas conductancias en la integración dendrítica, es justamente el diámetro que presentan las dendritas de las neuronas piramidales, que va del orden de 3 a 5  $\mu\text{m}$  (Larkum et al., 2009), cabe mencionar que estos registros se han hecho con la técnica de *patch clamp*.

En el caso de las neuronas neocorticales, la distribución anatómica no está organizada en láminas, y el árbol dendrítico de estas células se encuentra distribuido de manera radial. Sin embargo la mayor dificultad para hacer registros dendríticos en las NEMs ha sido el diámetro que tienen estas dendritas, que van del orden de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  (Bishop et al., 1982). De tal forma que ha sido imposible llevar a cabo registros dendríticos en las NEM, al menos con las técnicas convencionales de electrofisiología (*patch clamp* y registro intracelular). Sin embargo, de acuerdo con los resultados fisiológicos descritos en esta tesis, se puede asumir que estos canales se encuentran distribuidos a lo largo de la arborización dendrítica, como se ha descrito en células piramidales de la corteza cerebral e hipocampo (Sailer et al., 2006; Benhassine & Berger, 2005; Ngo-Anh et al., 2005).

A diferencia de lo reportado hasta ahora en células piramidales de la corteza cerebral e hipocampo, las neuronas neocorticales (NEM D1 y NEM D2) presentan diferentes respuestas sinápticas a la misma entrada cortical. Por lo que fue interesante estudiar la participación de estas conductancias en sus respuestas ortodrómicas corticales.

## **Participación de los canales BK en la integración sináptica cortico-estriatal**

La apertura del canal BK depende calcio y de voltaje (Sah et al., 2002). Se ha descrito que la apertura del canal BK, en células disociadas neostriatales se da a través del calcio que entra a la célula preferentemente a través de los canales de calcio tipo N y P/Q (Vilchis et al., 2000). Durante el proceso de integración sináptica cortico-estriatal, estos canales también pueden ser activados por la despolarización producida por el receptor-canal NMDA y/o la entrada de calcio a través de estos canales (NMDA), tal como se ha reportado para otros tipos neuronales (Isaacson et al., 2001; Schoppa et al., 2001). Cabe señalar que es probable que la apertura del canal BK, también se favorezca de la sinergia de estas dos fuentes de calcio (canales N y P/Q y el receptor-canal NMDA) y no sólo de una de ellas.

Tal como se reporta en los resultados de esta tesis, la participación de la conductancia BK, difieren en el curso temporal de las respuestas sinápticas de las NEM D1 y NEM D2. Fué sorprendente que esta conductancia participara en las NEM D1 sólo a nivel de despolarización supraumbral, dejando “aparentemente” la despolarización subumbral y umbral intactas. También fue característico, que la conductancia de estos canales participaran sobre todo en la repolarización de la meseta despolarizante del evento sináptico supraumbral en estas neuronas.

Por otra parte la participación de los canales BK en la respuesta sináptica de las NEM D2, se hizo evidente desde la despolarización umbral y durante todo el curso temporal de las respuestas cortico-estriatales, teniendo mayor participación al principio de la respuesta (fig.18 y 19).

## **Participación del canal SK en la integración sináptica cortico-estriatal**

Existen tres clases de canales SK: SK1, SK2 y SK3 (Ishii et al., 1997a; Gutman et al., 2003) de los cuales, sólo el canal SK3 se encuentra ampliamente expresado en el neocórtex (Stocker et al., 2000; Sailer et al., 2004). De tal manera que los resultados de este trabajo se deben a la participación principalmente de este canal.

De manera similar a las corrientes BK, en células neocorticales disociadas, se han podido comprobar que las corrientes tipo SK también son activadas por corrientes de calcio tipo N y P/Q (Vilchis et al., 2000). Así mismo se ha reportado en otras neuronas que el canal SK, puede ser alimentado del calcio que fluye al interior de la célula, por el receptor-canal NMDA (Florillo et al., 1998; Shah et al., 2002; Ngo-Anh et al., 2005).

En las NEM D1, la contribución de los canales tipo SK sólo se hizo evidente en respuestas supraumbrales, principalmente durante la repolarización de la meseta despolarizante y sin modificar de manera significativa la trayectoria de voltaje del evento sináptico.

En el caso de las NEM D2, la participación del canal SK en la integración sináptica cortico-estriatal, se pudo ver desde intensidades de estimulación subumbral hasta la supraumbral. Es decir, esta conductancia repolariza las despolarizaciones de origen sináptico y su efecto se observa a lo largo de toda la respuesta sináptica, principalmente al inicio del evento (fig.21 y 22). En estos experimentos también se deja ver que el bloqueo del canal SK, aumentó la amplitud y la duración del evento sináptico (Figura 22) lo cual nos está sugiriendo, que esta conductancia puede ser fundamental para la forma de la respuesta sináptica de estas neuronas.

## **Diferencias intrínsecas de las NEM D1 y NEM D2 que ayudan a explicar la participación de los canales BK y SK en la respuesta cortico-estriatal**

Es claro que la participación de los canales de potasio dependientes de calcio es distinta en las neuronas de proyección del neocórtex. A continuación se resumirán algunos hallazgos reportados en la literatura, que ayudan a interpretar estas diferencias.

Como primer punto:

Se sabe que la respuesta cortico-estriatal es el resultado de la interacción del microcircuito estriatal, las fibras corticales que inervan al circuito estriatal se encuentran haciendo contactos con interneuronas GABAérgicas y con NEMs, las cuales hacen contactos entre si, de tal forma que cuando una NEM D1 o D2, recibe una entrada cortical, esta integra en realidad la información que todo el microcircuito le proyecta (colaterales axónicas, interneuronas, moduladores, glutamato etc), es decir no solo integra la respuesta glutamatérgica (Flores-Barrera et al., 2009; Carrillo Reid et al., 2008; 2009). Recientemente estudios realizados en ratones transgénicos BAC eGFP han mostrado que el GABA tiene un efecto bifásico en las NEMs D1, es decir, hiperpolariza la primera parte de la respuesta sináptica y despolariza la parte tardía, ayudando a mantener la meseta que estas neuronas presentan. Por otro lado, este mismo transmisor tiene efectos hiperpolarizantes durante toda la respuesta sináptica de las NEMs D2 (Flores Barrera et al., 2010) esto se mostró en la figura 13 del texto.

Adicionalmente, la participación de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA es mayor en la respuesta cortico-estriatal de las NEM D1 que en las NEM D2. La reducción del área bajo la respuesta sináptica en presencia del bloqueador de receptores NMDA en las NEM D1 es de 54%, mientras que para las NEM D2 sólo se reduce el 15% respecto al control (Vizcarra-Chacón & Flores-Barrera, 2010 datos no publicados).

Como segundo punto:

Se ha descrito que las neuronas neocorticales pueden generar potenciales dendríticos autoregenerativos de calcio, esto en el caso exclusivo de las NEM D2 (Bargas et al., 1991; Flores-Barrera et al., 2010). Adjuntamente se han hecho registros dendríticos con imágenes de calcio, en donde se ha podido ver que las dendritas de las NEM D2, conservan mejor la propagación dendrítica de calcio a lo largo de sus dendritas, lo anterior cuando se dan pulsos despolarizantes de corriente en el soma "*Back propagation*" (Day et al., 2008). En el caso de las NEM D1, esta propagación se ve atenuada en pocos micrómetros de distancia con respecto al soma. Éste dato, en primera instancia respalda que las NEM D2 mantienen un mecanismo intrínseco que les permite tener mayor cantidad de calcio en sus dendritas e incluso generar los potenciales de calcio antes mencionados. De manera complementaria, los experimentos de (*back propagation*) nos dejan ver de manera fehaciente que la propiedad electrofisiológica se mantiene en mayor distancia en las NEM D2 a diferencia de las NEM D1, de tal forma que es más probable ver eventos electrofisiológicos que ocurren en las dendritas en las NEM D2, cuando el electrodo de registro se encuentra en el soma de la neurona (Day et al., 2008).

Como tercer punto:

Recientemente se han descrito algunas diferencias moleculares en estas neuronas, por ejemplo en la expresión de canales KIR 2.3 en las neuronas de la vía indirecta (Shen et al., 2007) o diferente proporción de subunidades en sus receptores a GABA o a Glutamato (Fantin et al., 2007; Ade et al, 2008) incluso se ha reportado en neuronas del estriado ventral que la expresión del canal BK tiene diferente subunidad  $\beta$  en el soma y en las dendritas (Martin et al., 2004). Lo anterior nos sugiere que estas neuronas pueden tener varias diferencias moleculares que puedan favorecer la diferencia en la integración sináptica que recientemente se publicó (Flores-Barrera et al., 2010)

Tomando en cuenta los puntos anteriores, podemos explicar las diferencias encontradas en esta tesis, al bloquear los canales BK o SK en las respuestas cortico-estriatales de las NEM D1 y D2 como sigue:

En las NEM D1 el efecto de las toxinas (caribdotoxina y apamina) se apreció sobre todo en la repolarización de la meseta despolarizante supraumbrales, justo donde el receptor-canal NMDA, está participando con mayor fuerza en el evento sináptico facilitado por la despolarización provocada por la activación de receptores GABAérgicos (Flores barrera et al., 2009; 2010). Dado que las NEM D1 tienen mayor contribución de activación de receptores NMDA, es probable que los canales Kca estén siendo activados predominantemente por el calcio que fluye a través del receptor-canal NMDA en estas neuronas (Florillo et al., 1998; Shah et al., 2002; Ngo-Anh et al., 2005). La diferencia funcional más importante entre estas dos conductancias podría ser que los canales BK incrementan la frecuencia de disparo en la respuesta sináptica, mientras que los canales SK evitan, gradualmente la despolarización, repolarizando la membrana.

En el caso de las NEM D2 la participación de los canales Kca es evidente desde respuestas sinápticas subumbrales. Lo anterior puede ser explicado, en parte, por la alta actividad de calcio que las dendritas de estas neuronas tienen, a través de la generación de potenciales de calcio autorregenerativos en sus dendritas (Bargas et al., 1991; Day et al., 2008; Flores-Barrera et al., 2010). Aunado a una menor participación de receptores tipo NMDA en la respuesta de estas neuronas, se sugiere que la activación de canales BK y SK en las NEM D2, se debe principalmente a la entrada de calcio a través de canales voltaje- dependientes. La acción GABAérgica en las neuronas de la vía indirecta y la participación de conductancias de potasio dependientes de calcio, sinérgicamente, evitan la generación y propagación excesiva de potenciales de acción y potenciales autorregenerativos de calcio generados en sus dendritas.

La diferencia funcional más importante de los canales de potasio activados por calcio en las NEM D2, es que los canales SK pueden estar determinando la



trayectoria de voltaje y la repolarización inicial característica de estas neuronas (ver figura 21 y 22).

También se ha reportado que los canales Kca pueden formar micro y nano dominios con la fuente de calcio que los activa (Fakler & Adelman, 2008), dado que la participación de los Kca en las NEM D1 sólo se da durante la repolarización de la meseta despolarizante que tienen estas células, y esta meseta esta principalmente dada por el receptor-canal NMDA puede ser que los canales Kca y los receptores NMDA, estén formando un nanodominio (muy cerca de las espinas dendríticas) que funcionalmente este facilitando una retroalimentación negativa de despolarización membranal en las NEM D1.

Es sabido que el canal SK es más sensible al calcio que el canal BK, el primero se activa con concentraciones del orden nM, mientras que los BK, requieren concentraciones en  $\mu\text{M}$ ; esto quiere decir que el canal SK, no necesariamente requiere estar muy cerca de la fuente de calcio para ser activado. En los experimentos de esta tesis, la participación de los canales SK, fué desde eventos umbrales (NEM D1) y subumbrales para las NEM D2 (despolarizaciones pequeñas en las que el receptor canal NMDA no esta activado), de tal forma que los Kca en las NEM D2 pueden estar formando microdominios, es decir los canales Kca y las fuentes de calcio se encuentran a mayor distancia que en las NEM D1 (suponiendo que éste sea el mecanismo).

Las fuentes específicas de calcio para activar esta conductancia requieren de futuras investigaciones. Sin embargo, un trabajo reciente ha mostrado incrementos de calcio en las espinas dendríticas y en los troncos dendríticos de las NEM D2, relacionados con la activación del receptor canal NMDA y canales de calcio tipo T y L siendo estos últimos muy importantes en los troncos dendríticos (Higley & Sabatini 2010). Lo cual sugiere, que las fuentes de calcio para activar canales BK y SK pudieran ser distintos entre las NEMs (D1 y D2) y aún más, en las dendritas y en el soma ya que en el soma de estas neuronas estos canales se activan por los canales N y P/Q, Por último, ¿Por qué se observó mayor participación de estas

conductancias (BK y SK) en la respuesta ortodrómica cortico-estriata de las NEM D2?

Lo anterior pudiera darse por los distintos canales de Kca que tenga cada tipo neuronal (NEM D1 y NEM D2). Dado que recientemente se han encontrado diferencias moleculares entre éstas dos neuronas (Shen et al 2007; Fantin et al, 2007; Ade et al, 2008; Day et al., 2008), existe la probabilidad de que los canales Kca no sean la excepción y que las NEM D2 tengan canales más sensibles o con mayor eficacia en la conducción de los iones de potasio.

De cualquier manera en ambos tipos neuronales, los canales de potasio dependientes de calcio son necesarios para repolarizar las respuestas cortico-estriatales, una respuesta compleja, que representa electrofisiológicamente a los comandos motores corticales que recibe el neocórtex.

### **Implicaciones funcionales de los canales de potasio dependientes de calcio en la conducta**

Experimentos realizados en neuronas piramidales han demostrado que los canales de potasio dependientes de calcio participan en la generación de LTP, lo cual, como es sabido es un indicador de plasticidad sináptica. Además, experimentos conductuales han planteado que estas conductancias están involucradas en procesos de aprendizaje y memoria (Stackman et al., 2002; Matthews et al., 2008; Hammond et al., 2006), ya que al bloquearlos se ha visto que la ejecución en las tareas de reconocimiento de objetos, o el laberinto de Morris se ven mejorados. Por el contrario, cuando se prueban sus agonistas o se sobreexpresan los canales por medio de manipulación genética, la ejecución se ve afectada (Hammond et al., 2006).

Cabe enfatizar que los estudios que se han realizado, relacionando la conducta de roedores y los Kca, ha sido en su mayoría en el hipocampo y corteza cerebral. A la fecha no se han descrito este tipo de estudios en el neostriado, siendo que este núcleo se caracteriza por almacenar y generar un gran repertorio de procesos cognitivos y motores (Balleine et al., 2009; Grahan et al., 2008, 2009; Kreitzer et al., 2008; Yin et al., 2006; 2009). Dada la evidencia experimental que se ha reportado en la literatura, es probable que los Kca, también estén participando en procesos cognitivos y motores en el neostriado.

Por otra parte se ha estudiado la relación de los Kca y la tolerancia al alcohol, en neuronas neostriatales. Donde al parecer el canal BK está mayormente implicado (Feinberg et al., 2008; Martin et al., 2008; Treisman, 2009). Asimismo, se ha relacionado a estos canales con la epilepsia, ya que la delección o mutaciones de la subunidad  $\beta 4$  del canal BK, provocan actividad epiléptica en hipocampo y corteza cerebral (Brenner et al., 2005; Lee et al., 2009; Pacheco et al., 2008).

Una de las disfunciones estriatales, resulta en la enfermedad de Parkinson, en la cual las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta, mueren y dejan de abastecer de dopamina al estriado (Dunnett et al., 1981; DeLong, 1990; Hutchison et al., 2004; Kreitzer et al., 2007).

En la literatura que describe la enfermedad de Parkinson, también ha descrito que las interneuronas estriatales que liberan acetilcolina, se encuentran liberando este neurotransmisor en demasía (Welch et al., 1976; Ueda et al., 1995). Ésto es importante, porque los canales de calcio voltaje dependientes, son modulados por estos neurotransmisores (Hernández López et al., 1997, 2000; Pérez Rosello et al., 2005; Pérez Burgos et al., 2008, 2010), de tal forma que la fisiología normal de los canales BK y SK, pudiera estar alterada. Cabe señalar que tampoco se ha reportado nada en la literatura respecto a la relación que hay entre estos canales y la enfermedad de Parkinson en el neostriado.

## Conclusiones

1. En esta tesis, se confirmó que la respuesta ortodrómica cortico-estriatal es diferente en las neuronas de proyección de la vía directa e indirecta tanto en el neoestriado de ratas como de ratones BAC.
2. La participación de los canales de potasio dependientes de calcio en la respuesta sináptica cortico-estriatal, es mayor en las neuronas de la vía indirecta, que en las neuronas de la vía directa.
3. Los canales BK no participan en la forma de la respuesta sináptica, estas conductancias se encuentran principalmente repolarizando el evento sináptico en ambos tipos neuronales, determinando la duración de la despolarización.
4. Los canales SK facilitan la repolarización en las neuronas de proyección de la vía directa e indirecta y sólo en las neuronas de la vía indirecta determinan la forma de la respuesta sináptica (repolarización inicial característica de estas neuronas).
5. Los canales BK y SK participan sólo en la repolarización sináptica supraumbral en las neuronas de proyección de la vía directa, mientras que en las neuronas de la vía indirecta participan en la repolarización desde las respuestas subumbrales.

## Bibliografía

Ade KK, Janssen MJ, Ortinski PI, Vicini S (2008) Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 28(5): 1185-1197.

Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989 12:366-375.

Balleine BW, Liljeholm M, Ostlund SB (2009) The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav Brain Res.* 1:43-52.

Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989) An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Expe Brain Res.* 1: 146-156.

Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1991) Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res.* 1:159-163.

Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994) Cellular and molecular Characterization of Ca<sup>2+</sup> Currents in Acutely Isolated, Adult Rat Neostriatal Neurons *The Journal of Neuroscience.* 11: 6667-6666.

Bargas J, Ayala CX, Vilchis C, Pineda JC, Galarraga E (1999) Ca<sup>2+</sup>-activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience.* 88: 479-488.

Bennett BD, Callaway JC, Wilson CJ (2000) Intrinsic Membrane Properties Underlying Spontaneous Tonic Firing in Neostriatal Cholinergic Interneurons *The Journal of Neuroscience.* 22:8493-8503.

Benhassine N, Berger T (2005) Homogeneous distribution of large-conductance calcium-dependent potassium channels on soma and apical dendrite of rat neocortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci.* 4:914-26.

Benhassine N & Berger T (2009) Large-conductance calcium-dependent potassium channels prevent dendritic excitability in neocortical pyramidal neurons *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 457:1133-1145.

Bishop GA, Chang HT, Kitai ST (1982) Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience.* 7: 179-191.

Bentzen BH, Nardi A, Calloe K, Madsen LS, Olesen SP, Grunnet M (2007) The Small Molecule NS11021 Is a Potent and Specific Activator of Ca<sup>2+</sup>-Activated Big Conductance K Channels. *Mol Pharmacol.* 72:1033–1044.

Bond CT, s Maylie J Adelman JP (2005). SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Current Opinion in Neurobiology*. 15:305-311.

Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, Aldrich RW (2000) Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem*. 3:6453-61.

Brenner R, Chen QH, Vilaythong A, Toney GM, Noebels JL, Aldrich RW (2005) BK channel beta4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures. *Nat Neurosci*. 12:1752-1759.

Cai X, Liang CW, Muralidharan S, Kao JP, Tang CM, Thompson SM (2004) Unique Roles of SK and Kv4.2 Potassium Channels in Dendritic Integration *Neuron* 44: 351–364.

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

Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibáñez-Sandoval O, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Vargas J (2009) Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol*. 101:737-49.

Castle M, Aymerich MS, Sanchez-Escobar C, Gonzalo N, Obeso JA, Lanciego JL. (2005) Thalamic innervation of the direct and indirect basal ganglia pathways in the rat: Ipsilateral and contralateral projections. *J Comp Neurol*. 7:143-153.

Cepeda C, André VM, Yamazaki I, Wu N, Kleiman-Weiner M, Levine MS (2008) Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *European Journal of Neuroscience* 27:671–682.

Day M, Wokosin D, Plotkin L, Tian X, Surmeier DJ (2008) Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J. of Neurosci* 45:11603–11614.

DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.

Deng YP, Lei WL, Reiner A (2006) Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. *J Chem Neuroanat* 32:101-116.

Ding J, Peterson JD, Surmeier J. (2008) Corticostriatal and thalamostriatal synapses have distinctive Properties. *The Journal of Neuroscience* 25: 6483- 6492

Dunnett SB, Björklund A, Stenevi U, Iversen SD (1981) Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res* 2:147-161.

Edgerton JR, Reinhart PH (2003) Distinct contributions of small and large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol* 548:53-69.

Fantín M, Martín M, Auberson YP, Morari M (2007) NR2A and NR2B subunit containing NMDA receptors differentially regulate striatal output pathways. *J. of Neurochem* 103, 2200–2211.

Faber LE, Sah P (2007) Functions of SK channels in central neurons *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 34: 1077–1083.

Fakler B, Adelman JP (2008) Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59:873-81.

Feinberg-Zadek PL, Martin G, Treistman SN (2008) BK channel subunit composition modulates molecular tolerance to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 7:1207-16.

Fiorillo CD, Williams JT (1998) Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature*. 6688:78-82.

Flores-Barrera E, Laville A, Plata V, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (2009) Inhibitory contribution to suprathreshold corticostriatal responses: an experimental and modeling study. *Cell Mol Neurobiol*. 5:719-731.

Flores-Barrera E, Vizcarra-Chacón BJ, Tapia D, Bargas J and Galarraga E (2010) Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front Syst Neurosci*. 4: 1-14.

Freund TF, Bolam JP, Björklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Powell JF, Smith AD (1985) Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J Neurosci* 5:603-616.

Galarraga E, Bargas J, Sierra A, Aceves J (1989) The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 75:157-68.

Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández JV, Bargas J (1994) Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res* 100:239-49.

Galarraga E, Vilchis C, Tkatch T, Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T, Perez-Garci E, Hernandez-Echeagaray E, Surmeier DJ, Bargas J (2007) Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience* 146:537-54

Gerfen CR (2006). Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease *Nat Neurosci.*9:251-259.

Grahn JA, Parkinson JA, Owen AM (2008) The cognitive functions of the caudate nucleus. *Prog Neurobiol* 86:141-155.

Grahn JA, Parkinson JA, Owen AM (2009) The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. *Behav Brain Res.* 12:53-60.

Gertler TS, Chan CS, Surmeier J (2008) Dichotomous Anatomical Properties of Adult Striatal Medium Spiny Neurons. *The Journal of Neuroscience* 43: 10814-10824.

Graybiel A M (1997) The Basal Ganglia and Cognitive Pattern Generators *Schizophrenia Bulletin* 23:459-469.

Graybiel A M (2000) The basal ganglia *Current Biology* 10:509-511.

Grimes WN, Li W, Chávez AE, Diamond JS (2009) BK channels modulate pre- and postsynaptic signaling at reciprocal synapses in retina. *Nat Neurosci* 12:585-92.

Gittis AH, Nelson AB, Thwin MT, Palop JJ, Kreitzer AC (2010) Distinct Roles of GABAergic Interneurons in the Regulation of Striatal Output Pathways *The Journal of Neuroscience.* 6:2223-2234

Groenewegen H (2003) The Basal Ganglia and Motor Control. *Neural plasticity* 10: 107-120.

Künzle H (2006) Thalamo-striatal projections in the hedgehog tenrec. *Brain Res.* 19:78-92.

Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DA, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, Mckinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Sieno S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wulff AW, Wymore RS. International Union of Pharmacology (2003) XLI. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Potassium Channels *Pharmacol Rev* 55:583-586.

Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci.* 15:2369-2382



Hammond RS, Bond CT, Strassmaier T, Ngo-Anh TJ, Adelman JP, Maylie J, Stackman RW (2006) Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel type 2 (SK2) modulates hippocampal learning, memory, and synaptic plasticity. *J Neurosci.* Feb 6:1844-53.

Heintz N (2001) BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nat Rev Neurosci.* 12:861-870.

Hernández-López S, Bargas J, Reyes A, Galarraga E. (1996) Dopamine modulates the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *NeuroReport*, 7: 454-456.

Hernandez-López S., Bargas J., Surmeier D. J., Reyes A., Galarraga E (1997) D1 Receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-Type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J. Neurosci.* 17(9): 3334-3342.

Hernández-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D2 Dopamine Receptors in Striatal Medium Spiny Neurons Reduce L-Type Ca<sup>2+</sup> Currents and Excitability via a Novel PLCβ1–IP3–Calcineurin-Signaling Cascade. *The Journal of Neuroscience.* 24:8987–8995

Higley MJ, Sabatini BL (2010) Competitive regulation of synaptic Ca<sup>2+</sup> influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat Neurosci.*13:958-66.

Hutchison WD, Dostrovsky JO, Walters JR, Courtemanche R, Boraud T, Goldberg J, Brown P (2004) Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci.* 42:9240-9243.

Imaizumi Y, sakamoto K, Yamada A, Hotta A, Hay S, Muraki M, Uchiyama M, Ohwada T (2002) Molecular Basis of Pimarane Compounds as Novel Activators of Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel αSubunit. *Mol Pharmacol.* 62: 836-846.

Isaacson JS, Murphy GJ (2001) Glutamate-mediated extrasynaptic inhibition: direct coupling of NMDA receptors to Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Neuron.* 6:1027-34.

Ishii TM, Maylie J, Adelman JP (1997a) Determinants of Apamin and α-tubocurarine Block in SK Potassium Channels. *The journal of biological chemistry* 37: 23195-23200.

Ishii TM, silvia C, Hirschberg B, Bond C, Adelman JP Maylie J (1997b) A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11651-11656

Kawaguchi Y (1993) Physiological, Morphological, and Histochemical characterization of Three Classes of Interneurons in Rat Neostriatum. *The Journal of Neuroscience* 13: 4908-4923

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18: 527-535

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

Kreitzer AC, Malenka RC (2007) Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature.* 2007. 447: 643-647.

Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron.* 4: 543-554.

Kitai ST, Kocsis JD, Preston RJ, Sugimori M (1976) Monosynaptic inputs to caudate neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Research,* 109 (1976) 601-606

Kita T, Kita H, Kitai ST (1985) Effects of 4-Aminopyridine (4-AP) on Rat Neostriatal Neurons in an In Vitro Slice Preparation. *Brain Research,* 361: 10-18

Kita H (1996). Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neuroscience.* 74:925-940.

Koos T, Tepper JM, Wilson CJ (2004) Comparison of IPSCs Evoked by Spiny and Fast-Spiking Neurons in the Neostriatum. *The Journal of Neuroscience,* September 24: 7916-7922.

Künzle H. (2006) Thalamo-striatal projections in the hedgehog tenrec. *Brain research* 100: 78-92

Larkum ME, Nevian T, Sandler M, Polsky A, Schiller J (2009) Synaptic Integration in Tuft Dendrites of Layer 5 Pyramidal Neurons: A New Unifying Principle. *Science* 325: 756- 760.

Lee US, Cui J (2009)  $\beta$  subunit-specific modulations of BK channel function by a mutation associated with epilepsy and dyskinesia. *J Physiol.* 581:1481-98.

Maingret F, Coste B, Hao J, Giamarchi A, Allen D, Crest M, Litchfield DW, Adelman JP, Delmas P (2008) Neurotransmitter modulation of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K (SK) channels by regulation of Ca<sup>2+</sup> gating. *Neuron.* 3: 439–449.

Mallet N, Ballion B, Le Moine C, Gonon F (2006) Cortical Inputs and GABA Interneurons Imbalance Projection Neurons in the Striatum of Parkinsonian Rats The Journal of Neuroscience. 14: 3875-3884

Martin GE, Puig S, Pietrzykowski A, Zadek P, Emery P, Treistman S (2004) Somatic localization of a specific large-conductance calcium-activated potassium channel subtype controls compartmentalized ethanol sensitivity in the nucleus accumbens. J Neurosci. 29:6563-6572.

Martin GE, Hendrickson LM, Penta KL, Friesen RM, Pietrzykowski AZ, Tapper AR, Treistman SN (2008) Identification of a BK channel auxiliary protein controlling molecular and behavioral tolerance to alcohol. Proc Natl Acad Sci U S A. 45:17543-8.

Marrion NV, Tavalin SJ (1998) Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by co-localized Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal neurons. Nature. 395:900-5.

Meera P, Wallner M, Song M, Toro L (1997) Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>1</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 14066–14071.

Matamales M, Bertran-Gonzalez J, Salomon L, Degos B, Deniau JM, Valjent E, Herve D, Girault JA. (2009) Striatal Medium-Sized Spiny Neurons: Identification by Nuclear Staining and Study of Neuronal Subpopulations in BAC Transgenic. Plos One. 3: e 4770.

Matthews EA, Weible AP, Shah S, Disterhoft JF (2008) The BK-mediated fAHP is modulated by learning a hippocampus-dependent task. Proc Natl Acad Sci U S A. 39:15154-9.

Mink JW (1996) the basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. Progress in Neurobiology. 50:381- 425.

Murayama M, Pérez-Garci E, Nevian T, Bock T, Senn W, Larkum ME. (2009) Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. Nature. 7233:1137-1141.

Ngo-Anh TJ, Bloodgood BL, Lin M, Sabatini BL, Maylie J, Adelman JP (2005) SK channels and NMDA receptors form a Ca<sup>2+</sup>-mediated feedback loop in dendritic spines. Nat Neurosci. 5:642-649.

Nisenbaum E, Xu ZC, Wilson CJ (1994) Contribution of a Slowly Inactivating Potassium Current to the Transition to Firing of Neostriatal Spiny Projection Neurons. Journal of Neurophysiology. 7: 1174-1189.

Nisenbaum Es, Wilson CJ (1995) Potassium Currents Responsible for Inward and Outward Rectification in Rat Neostriatal Spiny Projection Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 15: 4449-4463.

Nisenbaum ES, Wilson CJ, Foehring RC, Surmeier DJ (1996) Isolation and Characterization of a Persistent Potassium Current in Neostriatal Neurons. *Journal of Neurophysiology*. 76: 1180-1194.

Orio P, Rojas P, Ferreira G, Latorre R (2000) New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci*. 2002 17:156-61.

Pacheco-Cano MT, Bargas J, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E (1996) Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs(+)-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res*. 110:205-11.

Pacheco Otalora LF, Hernandez EF, Arshadmansab MF, Francisco S, Willis M, Ermolinsky B, Zarei M, Knaus HG, Garrido-Sanabria ER (2008) Down-regulation of BK channel expression in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res*. 1200:116-31.

Perez-Burgos A, Perez-Rosello T, Salgado H, Flores-Barrera E, Prieto GA, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J (2008) Muscarinic M(1) modulation of N and L types of calcium channels is mediated by protein kinase C in neostriatal neurons. *Neuroscience*. 4:1079-97.

Perez-Burgos A, Prieto GA, Galarraga E, Bargas J (2010) CaV2.1 channels are modulated by muscarinic M1 receptors through phosphoinositide hydrolysis in neostriatal neurons. *Neuroscience*. 2:293-9.

Perez-Garci E, Bargas J, Galarraga E (2003) The role of Ca<sup>2+</sup> channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport*. 9: 1253-1256

Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman JN, Galarraga E, Bargas J (2005) Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurophysiol*. 5:2507-2519.

Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J. (1992) Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol*.68: 287-94.

Plotkin JL, Wu N, Chesselet MF, Levine MS (2005) Functional and molecular development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons and their cortical inputs. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 22, pp. 1097–1108, 2005

Postuma RB, Dagher A (2006) Basal ganglia functional connectivity based on a meta-analysis of 126 positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging publications. *Cereb Cortex*. 16:1508-1521.

Reiner A, Medina L, Veenman CL (1998) Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Research Rev* 28:235-285.

Shah MM, Haylett DG (2002) K<sup>+</sup> currents generated by NMDA receptor activation in rat hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 6:2983-2989.

Sah P (1996) Ca<sup>2+</sup> activated K currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci*. 19: 150-154

Sah P, Faber LE (2002) Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Progress in Neurobiology* 66 : 345-353.

Shen W, Tian X, Day M, Ulrich S, Tkatch T, Nathanson NM, Surmeier DJ (2007) Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci*. 11:1458-1466.

Stackman RW, Hammond RS, Linardatos E, Gerlach A, Maylie J, Adelman JP, Tzounopoulos T (2002) Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *J Neurosci*. 23:10163-71.

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

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

Sailer CA, Kaufmann WA, Marksteiner J, Knaus HG (2004) Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Mol Cell Neurosci*.3:458-69.

Sailer CA, Kaufmann WA, Kogler M, Chen L, Sausbier U, Ottersen OP, Ruth P, Shipston MJ, Knaus HG (2006) Immunolocalization of BK channels in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*.2:442-54.

Sanchez M, McManus OB (1996) Paxilline Inhibition of the Alpha-subunit of the Highconductance Calcium-activated Potassium Channel. *Neuropharmacology* 7: 963-968

Schoppa NE, Westbrook GL (2001) NMDA receptors turn to another channel for inhibition. *Neuron*. 6:877-9.

Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1985) Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci.* 5:776-794.

Siegel S y Castellan NJ (1995) Estadística no paramétrica: Aplicada a las ciencias de la conducta. 4ª edición. México trillas.

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

Smeal RM, Keefe KA, Wilcox KS (2008) Differences in excitatory transmission between thalamic and cortical afferents to single spiny efferent neurons of rat dorsal striatum. *European Journal of Neuroscience.* 28: 2041-2052.

Sørensen MV, Matos1 JE, Sausbier M, Sausbier U, Ruth P, Praetorius HA, Leipziger J (2008). Aldosterone increases KCa1.1 (BK) channel-mediated colonic K+ secretion. *J Physiol* 586:4251–4264

Stocker M, Pedarzani P (2000) Differential Distribution of Three Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel Subunits, SK1, SK2, and SK3, in the Adult Rat Central Nervous System. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15: 476-493

Stocker M (2004) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci.* :758-70.

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

Tepper JM, Koós T, Wilson CJ (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci.* 27:662-669.

Treisman SN, Martin GE (2009) BK Channels: mediators and models for alcohol tolerance. *Trends Neurosci.* 12:629-37.

Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR (2002) Inhibitory Interactions Between Spiny Projection Neurons in the Rat Striatum. *J Neurophysiol* 88:1263-1269.

Ueda H, Sato K, Okumura F, Mitsu Y (1995) L-DOPA inhibits spontaneous acetylcholine release from the striatum of experimental Parkinson's model rats. *Brain Res.* 1-2:213-6.

Venance L, Glowinski J (2003) Heterogeneity of spike frequency adaptation among medium spiny neurons from the rat striatum. *Neuroscience.* 122:77-92.

Vergara R., Rick C., Hernández-López S., Laville J. A., Guzman J. N., Galarraga E., Surmeier D.J., Bargas J (2003) Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J. Physiol.* 553(1): 169-182.

Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galván E, Galarraga E (2000)  $Ca^{2+}$  channels that activate  $Ca^{2+}$  dependent  $K^{+}$  currents in neostriatal neurons. *Neuroscience*, 95: 745-752.

Vilchis C, Bargas J, Pérez- Rosello T, Salgado H, Galarraga E (2002) Somatostatin modulates  $Ca^{2+}$  currents in neostriatal. *Neuroscience* 3: 555-567.

Waselus M , Galvez JP, Valentino RJ , Van Bockstaele EJ. (2006) Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 31: 233–242

Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barhanin J, Boulter J, Brown MC, Saffiote-Kolman J, Heinemann SF, Elgoyhen AB (1999) Role of  $\alpha 9$  nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron.* 1:93-103.

Welch MJ, Markham CH, Jenden DJ (1976) Acetylcholine and choline in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*4:367-74.

White NM (2009) Some highlights of research on the effects of caudate nucleus lesions over the past 200 years. *Behav Brain Res.* 12:3-23.

Wilson CJ Groves PM (1981) Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Research,* 220: 67-80.

Wilson C J, Chang H T, Kitai ST (1990) Firing Patterns and Synaptic Potentials of Identified Giant Spiny Interneurons in the Rat Neostriatum. *The Journal of Neuroscience.* 70: 508-519

Wilson C.J., Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J. Neurosci.* 7:2397-2410.

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

Womack MD, Chevez C, Khodakhah K (2004) Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci.* 24:8818-22.

Xia XM, Ding JP, Lingle CJ (1999) Molecular basis for the inactivation of Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J Neurosci.* 19:5255-64.

Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2004) Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur J Neurosci.* 2004 19:181-189.

Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci.* 6:464-76.

Yin HH, Mulcare SP, Hilário MR, Clouse E, Holloway T, Davis MI, Hansson AC, Lovinger DM, Costa RM (2009) Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci.* 12:333-41.