



00381

27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

*ACCIONES MODULADORAS DE LAS
CITOKINAS Y NUCLEÓTIDOS SOBRE LA
TRANSMISIÓN SINÁPTICA DE NEURONAS
PIRAMIDALES DEL HIPOCAMPO*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

M. EN C. VÍCTOR MENDOZA FERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. EN C. CARLOS BARAJAS LÓPEZ

2001



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 está 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.

Con inmensa admiración y cariño quiero agradecer a la persona más fuerte que conozco, mi mamá la Sra. **Rufina Fernández Mejía**, quien me ha enseñado a trabajar y conducirme por la vida sin dejar de luchar hasta alcanzar nuestras metas. Te quiero mamá.

Con todo el respeto y cariño del mundo, doy las gracias a mi papá el Sr. **Armando Mendoza Hernández**, quien con su sabiduría e inteligencia me ha dado la pauta para crecer personal y profesionalmente. Te quiero papá.

Con un inmenso amor quiero agradecer a la “bombom” **Mónica Méndez Díaz** por . . . todo (cariño, comprensión, apoyo, compañía, ayuda psicológica). Te quiero necesariamente.

A dos pequeños que hacen mis días más difíciles pero sustanciosos **Aline Mendoza Méndez** y **Víctor Mendoza Méndez**, los que siempre pero siempre están pendientes de cada paso que doy y con gran ánimo me alientan a seguir cuando digo “no puedo más”. Son mi vida . . . gracias.

Por supuesto al maestro de maestros **Dr. Carlos Barajas López**. Por todo, absolutamente todo el conocimiento, formación y obsesión al trabajo. Por el apoyo recibido en las instalaciones de la Facultad de Medicina, departamento de Anatomía y Biología celular de Queen’s University.

También gracia a **Rosa Espinosa Luna**, quién como técnico de laboratorio en Queen’s me apoyo en cada progreso de la parte experimental que contiene esta tesis. Mil gracias Rosa.

A todo aquellos que de alguna u otra forma contribuyeron a que este objetivo se cumpliera . . . al fin.

Dedico la realización de este trabajo a ALINE y VICTOR por su esfuerzo constante

ÍNDICE	iii
I.- RESUMEN	v
II - SUMMARY	vi
II - INTRODUCCIÓN	
1 Antecedentes	
1 1. Elementos neuronales del hipocampo	1
1 2. Transmisión sináptica en los axones colaterales de Schaffer	4
1 3. Neuromodulación de la transmisión sináptica	11
1 4. INF- α como neuromodulares	13
1 5. Nucleótidos como neuromoduladores	17
1 6. Planteamiento del problema	19
1 7. Justificación	20
2 Hipótesis	
2 1. Hipótesis generales	21
2 2. Hipótesis particulares	21
3 Objetivos	
3 1. Objetivos generales	21
3 2. Objetivos particulares	22
IV - METODOLOGÍA	
1 Preparación de las rebanadas de hipocampo (región CA1)	23
2 Cámara de registro	25
3 Registro de la actividad eléctrica de las neuronas piramidales	26
4 Soluciones y fármacos	27
5 Análisis de resultados	29
V - RESULTADOS	
1 Observaciones generales	30
2 Efectos del Interferon- α (IFN- α) sobre la transmisión sináptica del hipocampo	
a) Efectos del IFN- α sobre la excitabilidad de las células piramidales de CA1	31
b) Efecto del IFN- α sobre los potenciales sinápticos mediados por glutamato y GABA	33
c) Acciones del IFN- α sobre la plasticidad sináptica del hipocampo	35
3 Efectos del ATP sobre la transmisión sináptica del hipocampo	
a) Efectos del ATP y varios análogos sobre los potenciales postsinápticos excitadores mediados por glutamato (gEPSPs)	42
b) Efectos de los antagonistas de los receptores purinérgicos sobre la inhibición de los gEPSPs mediada por ATP	46
c) El catabolismo del ATP se requiere sus acciones Presinápticas	50

d) Papel de las proteínas de unión a nucleótidos de guanina en los efectos del ATP	52
VI - DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	56
VII - BIBLIOGRAFÍA GENERAL	68
VIII - ANEXO A	74
INTERFERON- α INHIBITS LONG-TERM POTENTIATION AND UNMASKS A LONG-TERM DEPRESSION IN THE RAT HIPPOCAMPUS Victor Mendoza-Fernández, R. David Andrew, and Carlos Barajas-López <i>Brain Res</i> 885:14-24, 2000.	
IX - ANEXO B	85
ATP INHIBITS GLUTAMATE SYNAPTIC RELEASE BY ACTING AT P2Y RECEPTORS IN PYRAMIDAL NEURONS OF HIPPOCAMPAL SLICES Victor Mendoza-Fernández, R. David Andrew, and Carlos Barajas-López <i>JPET</i> 293(1):172-179, 2000.	

I.- RESUMEN

ACCIONES MODULADORAS DE LAS CITOKINAS Y NUCLEÓTIDOS SOBRE LA TRANSMISION SINÁPTICA DE NEURONAS PIRAMIDALES DEL HIPOCAMPO. Mendoza-Fernández Víctor, tesis doctoral.

La transmisión sináptica, permite a las células del sistema nervioso central (SNC), comunicarse eficientemente entre ellas. Ésta se realiza a través de contactos funcionales entre las neuronas, denominados sinápsis. La sinápsis química permite la comunicación celular vía la secreción de neurotransmisores por parte de la neurona presináptica, produciendo posteriormente el flujo de corriente en la neurona postsináptica, por la activación de receptores específicos. En el hipocampo, el principal neurotransmisor que media la comunicación entre las células piramidales de la región CA1, es el glutamato. Éste actúa, a través de su interacción con receptores ionotrópicos (NMDA) y metabotrópicos (AMPA y Kainato). En esta estructura, se han descrito también varias sustancias capaces de modular la comunicación sináptica glutamatérgica entre las células piramidales, durante procesos fisiológicos y fisiopatológicos. En el presente trabajo se analizaron los efectos del adenosin-5'-trifosfato (ATP) y del interferon- α (IFN- α) sobre la transmisión sináptica en neuronas piramidales de la región CA1 en hipocampo. El ATP se ha descrito como un sustancia neuromoduladora en el sistema nervioso periférico (SNP) y en la unión neuromuscular. Es coliberado con acetilcolina y glutamato en varias partes de cerebro, incluyendo corteza, cerebelo e hipocampo. recientemente se le ha involucrado en la protección del hipocampo durante procesos hipoxicos. El IFN- α , es sintetizado y liberado por células neuronales y de la glia en corteza, hipotálamo e hipocampo, durante varias fases del desarrollo neuronal y durante procesos neurodegenerativos. Esta sustancia, induce varios efectos neuromoduladores en diversas partes del SNC, sin embargo, su mecanismo de acción es aún desconocido. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar y determinar el posible mecanismo de acción por el cual el ATP y el IFN- α son capaces de modificar la actividad sináptica en las células piramidales de CA1. Nuestros resultados sugieren por una parte, que el ATP inhibe la liberación de glutamato a través de su interacción con receptores purinérgicos (P_{2Y}) a nivel presináptico, acoplados a una proteína G e independiente de su hidrólisis a adenosina en el espacio extracelular. Por otro lado el IFN- α , modifica la transmisión sináptica glutamatérgica y la plasticidad sináptica (potenciación de largo término; LTP y depresión de largo término, LTD), sin afectar significativamente la transmisión mediada por GABA, ni las propiedades eléctricas de las neuronas piramidales, tales como potencial de membrana, resistencia de la membrana, ni la frecuencia de disparos de los potenciales de acción. Este efecto, parece tener componentes pre- y postsinápticos. El IFN- α afectó la interacción del glutamato con receptores no-NMDA y no alteró la respuesta mediada por receptores NMDA. Finalmente, nuestros resultados muestran que esta citokina media sus efectos a través de su interacción con receptores que requieren la activación de una cinasa de la tirosina. El presente estudio, nos proporciona información útil para poder entender los mecanismos por los cuales el ATP y el IFN- α modulan la comunicación sináptica entre las neuronas piramidales, así como para poder entender algunos aspectos relacionados con los procesos fisiológicos involucrados en el desarrollo, aprendizaje, memoria y durante los procesos neurodegenerativos en los cuales ambas sustancias han sido fuertemente implicadas.

II. - SUMMARY

MODULATORY ACTIONS OF CYTOKINES AND NUCLEOTIDES ON SYNAPTIC TRANSMISSION OF THE PYRAMIDAL CELLS IN HIPPOCAMPUS AREA. Mendoza-Fernández Víctor, doctoral thesis

Neurons of the Central Nervous system (CNS) have an efficient communication mechanism, which consists in functional contacts between neurons, called synapses. Chemical synapses enable communication via the secretion of neurotransmitter, by the presynaptic neuron produce secondary current flow in postsynaptic neuron by acting on specific receptor molecules. In the hippocampus, glutamate is the major neurotransmitter that mediates the communication between pyramidal cells in CA1 region. Glutamate acts through its interaction with ionotropic (NMDA) and metabotropic receptors (AMPA and Kainate). Has been shown in this structure, the presence of several substances, during physiologic and physiopathologic processes, these substances have the ability to modulate glutamate-mediated synaptic communication in pyramidal cells. In the present study we analysed the adenosine-5'-triphosphate (ATP) and Interferon- α (IFN- α) effects on synaptic transmission in the pyramidal cells in CA1 region of hippocampus. ATP has been described as neuromodulator in peripheral nervous system and in the neuromuscular junction. This substance is co released with acetylcholine and glutamate in several areas of the brain, such cortex, cerebellum and hippocampus, this nucleotide has been implicated recently in the hippocampal protection during hypoxic processes. In the other hand, IFN- α is synthesized and released by neuronal and glia cells in cortex, hypothalamus and hippocampus, during neuronal development and neurodegenerative processes. This cytokine induces several neuromodulatory effects in several areas of the CNS. however, its mechanisms action is unknown. Our objectives were, characterized and determinate the action mechanisms that ATP and IFN- α are acting to modulate the synaptic activity and synaptic plasticity between pyramidal cells in CA1 region. Our results suggest that ATP inhibits the glutamate release by acting at presynaptic level, and interacting with purinergic receptors (P2Y) coupled to G-protein and independently of its extra cellular hydrolysis to adenosine. With respect to IFN- α , this cytokine modulates glutamate-mediated synaptic transmission and synaptic plasticity (long term potentiation, LTP and long term depression, LTD). This substance did not alter GABA-mediated synaptic transmission, or electrical properties of the pyramidal neurons, such as membrane potential, membrane input resistance, nor action potential frequency firing. The IFN- α modified glutamate interaction with non-NMDA receptors and did not modify its interaction with NMDA receptors. Finally, the cytokine's effects are mediated by its interaction with a receptor that needs the tyrosine kinase activation. The present study, give us information to understand the mechanisms than ATP and IFN- α using to modulate the synaptic communication between pyramidal neurons, and know the aspect related to physiological processes involved in central nervous development, learning, memory and degenerative processes, where both substances are strongly involved.

III.- INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

1.1. Elementos neuronales del hipocampo

El hipocampo, recibe su nombre por su semejanza con los caballos de mar (del griego *hippo* = caballo, *kampos* = monstruo de mar), es la estructura cortical mejor caracterizada. Su organización es ideal para el desarrollo de estudios de investigación fisiológica y anatómica. Se conoce mucho sobre su organización sináptica y de las características del funcionamiento de las neuronas que lo conforman. Esta estructura es de gran interés para diversos grupos de investigación por su relación con algunas patologías neurológicas, así como por el papel importante que juega en las funciones cognitivas de diversos organismos.

Estudios neurofisiológicos, sugieren que el hipocampo juega un papel clave en ciertos aspectos del aprendizaje y de la memoria. Aunque la naturaleza exacta de las funciones mnemónicas que realiza el hipocampo permanecen aún desconocidas (Hammond, C., 1996).

En la figura 1 se muestran los elementos neuronales presentes en una rebanada delgada del hipocampo tomada transversalmente a su eje longitudinal. Muchos de los circuitos intrínsecos del hipocampo se conservan en rebanadas tomadas con esta orientación, así como los caminos longitudinales y perpendiculares al plano de la rebanada (Tseng, M T, 1986).

El hipocampo propiamente está dividido en cuatro regiones (fig. 1) las cuales han sido tradicionalmente designadas como CA1 a CA4 (cuyas siglas provienen del latín *cornu Amon*). El *gyrus dentate*, el *subiculum*, y la corteza *entorhinal* se incluyen en un término más general conocido como formación hipocámpal o la región hipocámpal. Básicamente el hipocampo está constituido por las regiones CA1 y CA3. La región CA2 es muy pequeña e indistinguible en algunas

especies El área que se encuentra localizada entre el *gyrus dentate* y el estrato *granulosum* de la región CA3 se le denomina región *hilar*, *polimórfica* o *hilus*. Tanto el hipocampo como el *gyrus dentate* son estructuras corticales de tres láminas. Las tres láminas fundamentales del hipocampo son la polimórfica (estrato *oriens*), la piramidal (estrato *pyramidale*) y la molecular (estrato *radiatum* y estrato *lacunosum-moleculare*) (Amaral, D.G y Witter, M.P., 1989, Brown, T.H y Zador, A.M., 1991)

El hipocampo funciona como un centro que integra la información proveniente de varios sitios sensoriales. a través de la corteza *entorhinal*, la región septal y contralateral del hipocampo principalmente. Estas regiones tienen comunicación con los elementos neuronales del hipocampo para poder establecer un flujo de información en un circuito cerrado, que finaliza con el establecimiento de una respuesta integral (Kandel, E.R., 1997).

Las principales neuronas del hipocampo son las neuronas piramidales. Su cuerpo neuronal o soma, está organizado en una lámina conocida con el nombre de estrato piramidal. Este, básicamente es una lámina curva constituida por dos o tres cuerpos celulares. El soma de las células piramidales es cónico (en forma de pirámide), con las siguientes dimensiones promedio: de 20 a 40 μm de base y con una altura de 40 a 60 μm . Cada célula cuenta con una dendrita apical de 5 a 10 μm de diámetro, que pasa del estrato *radiatum* al estrato *lacunosum-moleculare*. Presentan varias dendritas basales con un diámetro de 3 a 6 μm , que arborizan en un área de 200 a 300 μm y forman el estrato *oriens*, tanto las dendritas basales como las dendritas apicales están cubiertas con espinas (Sarnat, H.B. y Netsky, M.G., 1981, Brown, T.H. y Zador, A.M., 1991).

La morfología de las células piramidales varía gradualmente en función del sitio en que se localicen en el hipocampo, por ejemplo, el soma es más grande en CA3 que en CA1, las dendritas apicales se vuelven más largas, más delgadas y más regulares en la forma de sus arborizaciones en CA1 que en CA3 (Hammond, C , 1996)

Existen también varios tipos de interneuronas de carácter inhibitorio en el hipocampo, específicamente en CA1, han sido identificadas las células Basket, las células no-Basket y las interneuronas O/A. Estas interneuronas junto con las neuronas piramidales forman sinápsis funcionales locales que deciden el tipo de respuesta que dará la neurona piramidal a diversos estímulos (Brown, T H y Zador, A M , 1991)

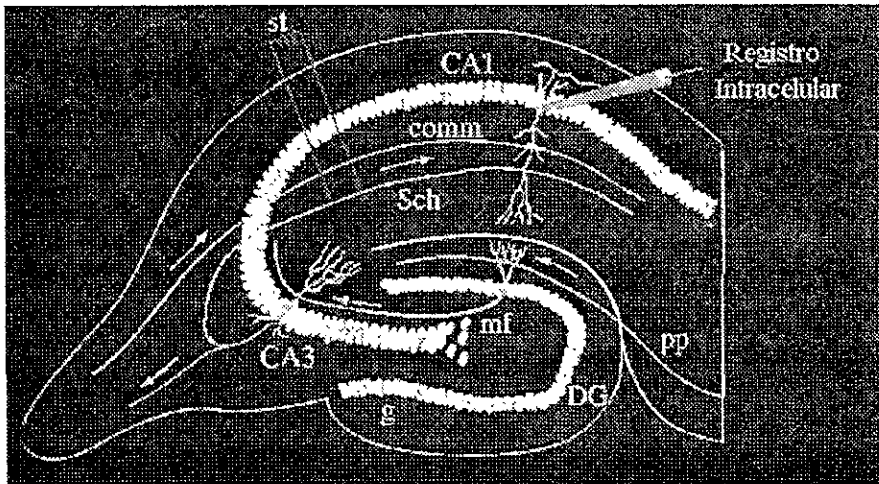


Figura 1 Elementos neuronales de la formación hipocámpal. Las áreas marcadas incluyen el subículo, parte de la corteza entorrinal, el giro dentado y las regiones CA1 a CA4. El hipocampo se divide en (1) estrato oriens, (2) estrato piramidale (la lámina de cuerpos celulares se ilustra como óvalos), (3) estrato radiatum, y (4) estrato lacunosum-moleculare. Se esquematiza también la forma más comúnmente usada para inducir un potencial sináptico: que es aplicando un estímulo en las fibras colaterales de Schaffer y registrar la actividad eléctrica en una neurona de CA1 a través de un microelectrodo (Modificado de Cajal, 1911)

1.2. Transmisión sináptica en los axones colaterales de Schaffer

Las conexiones sinápticas en el hipocampo son principalmente de tipo axo-dendríticas y axo-somáticas, guardando una estructura convencional. Los axones colaterales de Schaffer de la neuronas piramidales de CA3 están parcialmente mielinizados, con nódulos de Ranvier a intervalos de 60 a 70 μm . De los nódulos salen de dos a tres axones no mielinizados, los cuales siguen una trayectoria paralela a las fibras que les dieron origen. Cada una de estas ramas presenta varias protuberancias, las que hacen contacto con una o dos espinas dendríticas (Amaral, D.G. y Witter, M.P., 1989).

Consistente con su actividad excitadora, las sinápsis que forman las fibras colaterales de Schaffer son de tipo I, lo que significa que presentan una membrana asimétrica rodeada por vesículas irregulares. Estas sinápsis se realizan sobre las espinas dendríticas. Una característica peculiar de dichas sinápsis es la "espinula o espina" que se encuentra en la terminal presináptica (Andersen, P., 1990).

Las sinápsis que forman las fibras colaterales de Schaffer sobre las neuronas piramidales de CA1 son las más extensamente estudiadas en el cerebro de mamíferos, debido a que representan un modelo experimental bastante adecuado para el análisis de la actividad sináptica y los mecanismos involucrados en su modulación. Tal ventaja es debida a que el tracto de fibras presinápticas, las áreas de contacto sináptico y la lámina de cuerpos celulares postsinápticos, pueden ser visualizadas bajo inspección microscópica de baja resolución, de tal forma, que los electrodos de registro y estimulación pueden ser colocados bajo control visual. Esta sinápsis se utiliza ampliamente para hacer estudios intracelulares de la plasticidad sináptica (Brown, T.H. y Zador, A.M., 1991).

La organización funcional de la sinápsis en el hipocampo que forman los axones colaterales de Schaffer presenta la siguiente disposición las fibras del camino perforante hacen sinápsis sobre las células granulares del giro dentado, estas células granulares envían sus axones conocidos con el nombre de fibras mossy a la región CA3 donde hacen sinápsis con las neuronas piramidales, las cuales a su vez a través de las fibras colaterales de Schaffer en la región CA1 forman sinápsis con las neuronas piramidales.

En rebanadas de cerebro las propiedades eléctricas pasivas de las neuronas piramidales de la región CA1 en hipocampo, medidas con la técnica de microelectrodo a 35°C, muestran los siguientes valores potencial de membrana en reposo en un rango que va de -55 a 75 mV, la resistencia de membrana en rangos de 19 a 80 MΩ y una constante de tiempo de membrana que va de 7.5 a 14.3 ms. Estas células presentan potenciales de acción, generalmente en trenes de descarga, provocados por pulsos depolarizantes (Henderson, G., 1992, Madison, D V., 1993)

En las neuronas piramidales de CA1 se pueden observar potenciales postsinápticos espontáneos a potenciales de membrana de reposo. Varios potenciales postsinápticos pueden ser registrados cuando se aplica un estímulo adecuado a las neuronas presinápticas. La forma más reproducible de inducir potenciales sinápticos es por medio de la estimulación de las neuronas presinápticas con pulsos eléctricos con duraciones iguales o menores a 0.5 ms. Con este método se provoca un potencial de acción que viaja a lo largo de la terminal nerviosa e induce la liberación de neurotransmisores al activar canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la terminal nerviosa (Fig. 2)

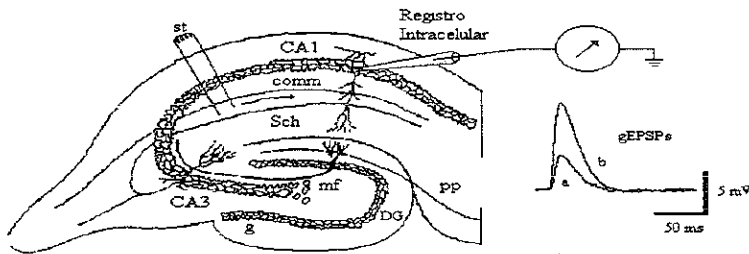


Figura No. 2. Organización sináptica en el hipocampo utilizada para el registro de potenciales postsinápticos excitadores (gEPSPs) en rebanadas de hipocampo, mantenidas *in vitro*. Se muestra también, los gEPSPs registrados de una célula piramidal, antes (a) y después (b) de usar una estimulación tetánica a través del electrodo de estimulación (st). Abreviaturas pp=camino perforante, comm Sch= fibras colaterales de Schaffer, DG= giro dentado, g= células granulares y CA1, CA3= zona CA1 y CA3 del hipocampo respectivamente (Modificado de Cajal, 1911)

Los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) registrados en las neuronas, presentan una duración de 50 a 100 ms y amplitudes de 20 a 25 mV, estos potenciales son mediados por la liberación de glutamato y la subsecuente activación de receptores no-NMDA (receptores AMPA o KA) en la membrana postsináptica. Durante el potencial se observan cambios en la conductancia a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Madison, D V, 1993)

Los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs) que se registran en estas neuronas, presentan una duración de 60 a 110 ms y amplitudes de 4 a 12 mV, estos potenciales son mediados por la liberación de GABA y su interacción con receptores GABA_A en las membranas postsinápticas. A través de este canal hay un aumento en la conductancia a los iones Cl^- , que se estima de aproximadamente 20 pS cuando se encuentran abiertos 3000 canales GABA_A en el pico del IPSP. Se observan también EPSPs e IPSPs miniatura, siendo mediados por la liberación de pequeños cuantos.

de glutamato y por la liberación de pequeñas cantidades de GABA respectivamente (Amaral, D G y Witter, M P , 1989, Henderson, G , 1992; Hammond, C , 1996).

Bliss y Lomo en 1973 (Bliss y Lomo, 1973) demostraron que la estimulación con trenes de corta duración y con alta frecuencia en las neuronas del hipocampo, produce un incremento en la amplitud de los EPSPs registrados en las neuronas piramidales postsinápticas en respuesta de estímulos con baja frecuencia. Específicamente en el presente trabajo sólo nos referiremos a la potenciación de largo término (LTP, del inglés long term potentiation) que presentan las neuronas piramidales de la región CA1 por la estimulación de los axones colaterales de Schaffer.

Un estímulo único aplicado a los axones colaterales de Schaffer, induce un EPSP con las características señaladas anteriormente en las neuronas piramidales de CA1. Cuando es aplicada una estimulación tetánica (un tren de 1 s de duración, compuesto de 50 a 100 estímulos a 100 Hz), a los axones colaterales de Schaffer, a través del mismo electrodo de estimulación y generamos nuevamente un EPSP por medio de un único estímulo, después de la estimulación tetánica, el EPSP registrado presentará un incremento en la duración y en su amplitud (comparado con el EPSP registrado antes del estímulo tetánico), por lo que se dice que el EPSP se potenció (Bliss y Lomo, 1973, Malenka, R C , 1994, Malenka, R C y Nicoll, R A , 1999). Esta potenciación es de un 30 a 50% en su amplitud y persiste horas cuando es registrado *in vitro* e incluso días cuando es registrado *in vivo* (ver Fig 2).

La inducción del LTP resulta de dos respuestas importantes en la interacción sináptica. por una parte en la terminal presináptica se genera un aumento transitorio en la liberación de glutamato y por otra parte en la terminación postsináptica hay un aumento en la concentración intracelular de los iones Ca^{2+} . La expresión del LTP involucra la activación aumentada de receptores no-NMDA,

específicamente los receptores AMPA, así como los receptores NMDA. Los receptores AMPA están involucrados directamente en el componente temprano del LTP mientras que los receptores NMDA participan mayoritariamente en el componente tardío, cuando el nivel de depolarización es suficiente en la neurona postsináptica para que el Mg^{2+} permita el flujo de iones a través del receptor. Otros receptores asociados a este fenómeno, son los receptores a glutamato de tipo metabotrópico (MgluRs), los cuales están involucrados directamente en la regulación de umbral para la inducción del LTP (Stevens, C.F., 1993, Malenka, R.C., 1994, Malenka, R.C. y Nicoll, R.A., 1999)

Actualmente, se tiene bien establecido otro evento de larga duración el cual se induce con un estímulo de baja frecuencia que causa una depresión de larga duración en la actividad sináptica, conocido como depresión de largo término (LTD, del inglés long term depression, Malenka, R.C., 1994). Este evento se induce en el área de CA1 por medio de un único estímulo de baja frecuencia, por ejemplo, a una frecuencia de 1 a 5 Hz con una duración igual o mayor a los 15 min (usualmente se usan 900 pulsos a 1 Hz de frecuencia). Aunque la inducción del LTD y el LTP son diferentes, sorpresivamente comparte muchas características con el LTP, por ejemplo, requieren la activación de receptores NMDA y un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que el LTD registrado en varios tipos de células, como neuronas piramidales de CA1 del hipocampo, cerebelares, de corteza visual, del striatum y de CA3 del hipocampo, depende principalmente de la activación de receptores MgluRs y que éste es capaz de desactivar al LTP por medio de la estimulación de las células involucradas en la sinápsis, mediante el uso de un estímulo de baja frecuencia. Estas evidencias, permiten formular una simple hipótesis, la cual considera al Ca^{2+} intracelular como la señal que controla la dirección del cambio en la respuesta sináptica. Esta hipótesis también involucra balance en la actividad de dos enzimas importantes en el señalamiento intracelular mediado por este ión, como lo son la proteína cinasa II dependiente de

Ca^{2+} calmodulina (CaMKII) y la proteína fosfatasa 1 (PP1) Ambas enzimas podrían influenciar la respuesta sináptica a través de sus estados de fosforilación De tal forma que, pequeños cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} , favorezcan la activación de la PP1 mientras que grandes cambios en la concentración de Ca^{2+} facilitarían un incremento en la actividad de CaMKII Debido a que PP1 no es influenciada directamente por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se ha propuesto a la cascada de proteínas fosfatasas dependientes de Ca^{2+} que involucra la activación de calcineurina y la defosforilación del inhibidor 1, como el transductor de la señal de Ca^{2+} que incrementaría la actividad de la enzima PP1 Estudios recientes en los que se han utilizado inhibidores de estas enzimas han confirmado este modelo (Malenka, R. C., 1994, Mayford, M *et al*, 1995)

De esta forma, durante una estimulación prolongada a baja frecuencia (1Hz), el Ca^{2+} entra por la espina dendrítica vía canales asociados al receptor NMDA y genera un pequeño incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ El calcio se une a CaM, la cual preferentemente activa calcineurina (PP2B) La calcineurina defosforila al inhibidor 1 (I1), lo que automáticamente activa a la enzima PP1 La PP1 una vez activa puede actuar sobre un gran número de sustratos, entre los que se incluyen la CaMKII, receptores AMPA y quizás la activación de un posible mensajero retrogrado Por otra parte, durante la estimulación de alta frecuencia, una gran cantidad de Ca^{2+} entra a la espina dendrítica vía los canales asociados a los receptores NMDA, de esta forma el Ca^{2+} se une preferentemente a la enzima CaM que a su vez activa de manera selectiva a la CaMKII La CaMKII activada puede actuar sobre el mismo sustrato involucrado durante el LTD. La proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) también es activada por las altas concentraciones de Ca^{2+} y fosforila al inhibidor 1, lo que inactiva a la enzima PP1, (Mayford, M *et al*, 1995; Ohiet, R H S, et al, 1997) Fig 3

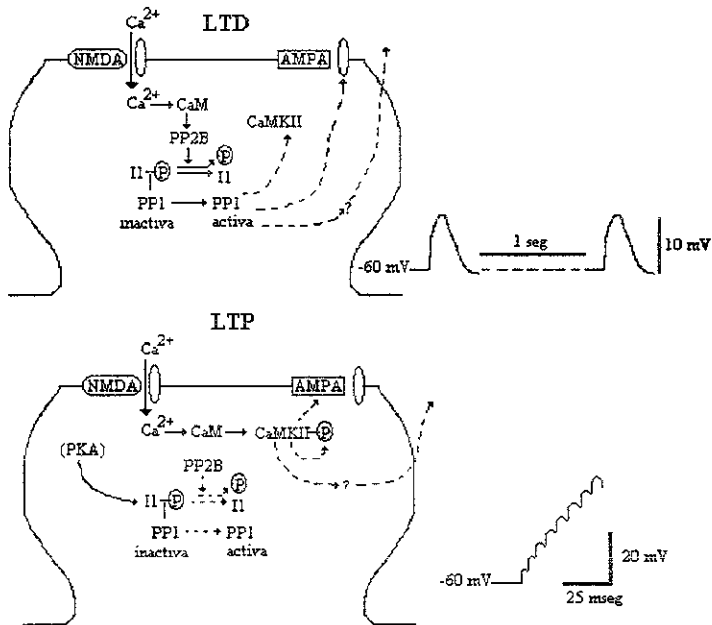


Figura No. 3. Modelo que explica la cascada de señalamientos intracelulares que median al LTD y al LTP. Durante la estimulación prolongada a baja frecuencia (1Hz, como se muestra a lado de la espinilla sináptica que genera un LTD), el Ca^{2+} entra a la espinilla dendrítica a través del canal receptor de NMDA lo que causa un pequeño incremento en la $[Ca^{2+}]$. El Ca^{2+} se une a la CaM, la cual preferentemente se une a calcineurina (PP2B). Calcineurina, entonces defosforila al inhibidor I (II), el deja de inhibir a la PP1. Una vez que la PP1 está activada, puede actuar sobre un gran número de sustratos, incluyendo CaMKII, subunidades del receptor AMPA e incluso algunos procesos que influyen en la producción de un mensajero retrogrado. Durante la estimulación de alta frecuencia (100 Hz, como se muestra a lado de la espinilla sináptica que genera un LTP), una cantidad grande de Ca^{2+} entra a la espinilla dendrítica a través de el canal del receptor NMDA. En estas condiciones, el Ca^{2+} se une a CaM y preferentemente activa a la CaMKII. Activa la CaMKII puede actuar sobre los mismos sustratos que están modificados durante el LTD. La cinasa de las proteínas dependiente de AMPc (PKA) también puede ser activada por altas $[Ca^{2+}]$ lo que provoca la fosforilación del II (Modificado de Malenka, R.C., 1994)

1.3 Neuromodulación de la transmisión sináptica

A partir de que Loewi, Elliot y Langley (Dale, H H , 1935) consideraron a las sustancias químicas como mediadores de la comunicación sináptica entre las células excitables, las sinápsis químicas de tipo excitador e inhibitor representaron el modelo más sencillo para describir la transmisión sináptica central y neuromuscular. Más adelante, este modelo tuvo que desarrollarse para poder explicar la mayoría de las observaciones fisiológicas de los tejidos excitables. Así que, el modelo más adecuado tenía que contemplarse con base a un tipo de sinápsis más compleja, la cual incluyese al mismo tiempo, alguna de las siguientes características: la participación de diferentes primeros mensajeros (neurotransmisores y/o neuropéptidos), actuando a través de diferentes receptores y activando diferentes sistemas de segunda mensajería. A este tipo de mecanismos de mayor duración se les agrupa dentro del término de *Neuromodulación* (Shepherd, G M 1988)

En el hipocampo, el proceso de la neuromodulación de la transmisión sináptica ha sido objeto de gran variedad de estudios; tomando aspectos como la interacción de los diferentes neurotransmisores y neuropéptidos, que las neuronas piramidales co-expresan y co-liberan por la estimulación de las fibras aferentes y analizando cual es el papel que éstas interacciones juegan en los procesos fisiológicos que regula esta estructura. Las preparaciones de rebanadas de hipocampo *in vitro*, permiten analizar la comunicación de sinápsis individuales y de circuitos de sinápsis en una región de tejido estable y donde las manipulaciones farmacológicas pueden realizarse a través de la solución del baño.

De este tipo de estudios, se ha podido establecer que la comunicación sináptica en el hipocampo, mediada principalmente por el glutamato, puede ser modulada por sustancias químicas liberadas en esta región, tales como la 5-Hidróxitriptamina (5-HT), la acetilcolina (ACh) y la noradrenalina.

(NA) Las principales funciones de estos neurotransmisores, están relacionadas con los aspectos funcionales de las neuronas piramidales; por ejemplo, la 5-HT regula la frecuencia de disparo y algunos aspectos relacionados con la plasticidad neuronal. La Ach actúa como un inhibidor presináptico de la transmisión excitadora, por medio de un aumento en la amplitud de la hiperpolarización observada después de inducirse una serie de potenciales de acción. Por último, la NA puede aumentar el grado de excitabilidad de las neuronas piramidales de la región de CA1, a través de la inhibición directa de las interneuronas hipocampales, que utilizan al GABA como principal neurotransmisor (Brown, T.H y Zador, A.M , 1991)

Actualmente, se tiene bien documentada la presencia de otro tipo de sustancias dentro del SNC, las cuales hace algún tiempo se consideraban ajenas al mismo. Tal es el caso de las sustancias de origen inmune, las cuales tienen la capacidad de pasar al SNC y también de ser sintetizadas por las células nerviosas. Entre los principales compuestos de carácter inmunológico se encuentran la Interleucina-1 β (IL-1 β), el Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y el Interferón- α (IFN- α). El papel que estas sustancias tienen en el SNC, aún se desconoce, sin embargo, su presencia durante procesos fisiológicos (crecimiento y desarrollo) y fisiopatológicos (isquemia, infecciones e inflamación), hace suponer que estas sustancias pueden formar parte de las señales que regulan algunas de las manifestaciones neurológicas (fiebre, somnolencia, anorexia, problemas de memoria y aprendizaje) que se observan durante dichos procesos. Posiblemente, a través de su acción directa sobre las sinápsis químicas establecidas en sitios específicos dentro del SNC, los cuales se encargan de regular o controlar aspectos como la temperatura, la ingesta de alimento e incluso los

mecanismos involucrados en los procesos de memoria y el aprendizaje (Plata-Salamán, C R , 1991; Patterson, P H. y Nawa, H 1993, Dafny, N , 1998)

A partir de la década de los 80's, los nucleótidos como la adenosina y el ATP principalmente, han sido considerados como sustancias con funciones neuromoduladoras en varios tejidos, incluyendo músculo liso, SNP y SNC. Con base a su producción local y la capacidad que presentan las terminales nerviosas de las fibras colaterales de Schaffer para liberarlas a la endidura sináptica, se cree que los nucleótidos pueden estar involucrados en eventos como la plasticidad sináptica y en la protección de las neuronas a procesos isquémicos (El-Moatassin, C , et al , 1992, Inoue, K ,et al , 1996, Inoue, K , 1998) Sin embargo, el papel que estas sustancias juegan en el proceso de comunicación sináptica donde el glutamato es el principal neurotransmisor aun no ha sido evaluado Abriendo la posibilidad de establecer tanto a las sustancias de origen inmunológico como a las sustancias que participan en el metabolismo celular, como neuromoduladores capaces de modificar la respuesta neuronal al principal neurotransmisor dentro del hipocampo y con ello modificar las funciones que son reguladas por este centro cerebral

1.4 Citokinas como neuromoduladores

El IFN- α fue detectado originalmente en células inmunológicas Las propiedades biológicas del IFN- α incluyen una potente actividad anti-viral, a través de la inhibición de la proliferación viral y aumentando la respuesta inmune Inicialmente se pensó que el IFN- α , era producido por macrófagos, linfocitos y monocitos, sin embargo, esta citokina se produce a bajos niveles fisiológicos En una parte de este trabajo, nos centraremos en discutir los efectos del IFN- α sobre el sistema nervioso.

Durante las terapias inmunológicas de largo término, en las cuales se usan citocinas tales como el IFN- α , para el tratamiento de enfermedades hematológicas, SIDA y enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, se han observado efectos adversos sobre el SNC que son debidos a la presencia de la molécula en sí (Adams, F., *et al.*, 1984, Rothwell, N.J. y Reiton, J.K., 1993) Además de los efectos inmunológicos inducidos por el IFN- α , esta sustancia produce una serie de efectos de tipo no inmunológico en los pacientes en tratamiento con esta citokina, tales como: trastornos motores y sensoriales, fiebre, anorexia, confusión, depresión y sueño, los cuales se consideran síntomas de daño directo en el SNC (Plata-Salamán, C.R., 1991; Dafny, N., 1998).

Dentro del cerebro el IFN- α alcanza concentraciones significativas en aquellos sitios en los cuales no existe continuidad de la barrera hematoencefálica (hipotálamo y puente), bajando la concentración en las áreas que se encuentran cubiertas totalmente o lejos de la barrera hematoencefálica (médula espinal) Dentro del SNC existen sitios de unión para el IFN- α los cuales representan un posible sitio de unión para esta citokina y por ende una posible forma por la cual ejerza sus efectos sobre la actividad neuronal También, se ha reportado que el IFN- α puede unirse a receptores opioides en membranas biológicas (Prieto-Gómez, B , *et al.*, 1983, Dafny, N., 1998)

El IFN- α ejerce efectos colaterales sobre el SNC, los cuales desaparecen cuando se detiene el tratamiento con esta citokina. Dentro de los efectos que modifican la conducta, tenemos a la fatiga, la astenia, la anorexia, los síntomas de fiebre semejantes a la influenza, escalofríos, dolor de cabeza y dolor muscular (Dafny, N., 1998). En roedores, la administración de esta citokina disminuye la actividad motora y la ingesta de alimento, lo cual se correlaciona con cambios en la actividad electroencefalográfica Cuando se emplean dosis altas de IFN- α , se observan daños

neurodegenerativos, tales como incapacidad para concentrarse, dolor de cabeza intenso, pérdida de la locomoción, problemas emocionales y ftofobia; también, se han reportado a estas concentraciones, problemas de atención, alucinaciones, estados anormales del humor, delirium, conducta psicótica y daños neurocognitivos (confusión, daños en la memoria inmediata y en la habilidad intelectual) (Bocci, V., 1988, Patterson, P.H. y Nawa, H. 1993).

Todos estos antecedentes, sugieren claramente una interacción directa entre el IFN- α y la actividad de las neuronas centrales. La hipótesis de que las citokinas juegan un papel importante en la comunicación entre el sistema inmune y el SNC se fundamenta en las acciones moduladoras que estas sustancias presentan sobre diferentes células nerviosas (Plata-Salamán, C R., 1991). Recientemente, usando la técnica de patch-clamp, configuración célula íntegra, se reportó que la IL- 1β , pero no la IL-6 ni el TNF, potencian las corrientes membranales de cloro (Cl⁻) inducidas por GABA en cultivos primarios de neuronas provenientes de cerebros de embriones de pollo (Lawrence, G M., 1991). La IL- 1β , también disminuye las corrientes de Ca²⁺ activadas por voltaje, en neuronas hipocampales de la región CA1 de cobayos a concentraciones patofisiológicas (Plata-Salaman, C R. y French-Mullen, J.M., 1992).

Además, estas citokinas modulan varias corrientes iónicas dependientes de voltaje en invertebrados. Por otra parte, la IL-6 induce una diferenciación neuronal de las células PC12, aumentando el tamaño y el número de sus neuritas, así como el número de canales de sodio (Na²⁺) dependientes de voltaje que poseen estas células y aumenta la sobrevivencia de neuronas colinérgicas y catecolaminérgicas en cultivo (Satoh, T y Nakamura, S., 1988). Estas citokinas, también regulan la expresión de la sustancia P (SP) en algunas neuronas del sistema nervioso autónoma y en el plexo

mientérico de rata (Hofman, F M., 1989). El TNF- α , inhibe en la liberación de NA en la terminal axonal, inducida por la estimulación de neuronas aisladas de la eminencia media de rata, efecto dependiente de la concentración (Elenkov, I J , Kovacs, K , 1992)

El mecanismo por el cual las citokinas llevan a cabo sus efectos inmunológicos, involucra el reconocimiento de receptores que se localizan generalmente en la membrana celular. Estos inducen una señal intracelular, la cual despierta una respuesta celular específica. Particularmente, los IFN de tipo I (IFN- α , β y τ) una vez unidos a su receptor inducen, la activación de una enzima cinasa de la tirosina 2 (Tyk2), unida al dominio intracelular del receptor y a la Janus cinasa 1 (JAK1) que adiciona dos grupos fosfato (Pi) a residuos de la tirosina. Ambas enzimas fosforilan a tres diferentes proteínas conocidas como STAT (del inglés Signal Transducers). La fosforilación de las tirosinas, induce su asociación a una cuarta proteína de 48 Kda. El complejo resultante se une a ciertos genes dentro del núcleo, lo que induce la respuesta inmunológica. Interesantemente, las acciones de las citokinas pueden estar mediadas también, por la vía de la estimulación de la síntesis del óxido nítrico en algunos tejidos incluyendo neuronas (Eizirik, D L., Cagliero, E., 1992; Gaillard, T, 1992; Minc-Glomb, D , Tsarfaty, I, 1994). Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual las citokinas pueden modular la respuesta sináptica aún se desconoce, generando gran número de interrogantes sobre el papel que juegan estos neuromoduladores dentro del SNC.

1.5 Nucleótidos como neuromoduladores

Actualmente, la adenosina y el ATP son considerados como neurotransmisores en varios tejidos incluyendo el músculo liso (Burnstock, G y Kennedy, C, 1985), neuronas periféricas (Bean, B.P y Friel, D.D, 1990, Evans, R.J *et al.*, 1992) y en el SNC (Edwards, F.A., *et al.*, 1992, Shen, K, Z y North, R.A., 1993) La aplicación exógena de ATP provoca respuestas a través de dos subclases de receptores P2, conocidos como P2X y P2Y. Los receptores P2X son ionotrópicos, mientras que los P2Y son receptores acoplados a proteínas G. Varios grupos de investigadores han identificado a los receptores P2 por clonación en neuronas periféricas y centrales (P2Y Webb, T.E., *et al.*, 1993, P2X Collo, G., *et al.*, 1996, Abbracchio, M.P y Burnstock, G., 1994, Fredholm, B.B. 1994) Recientemente, a partir del conocimiento de las acciones moleculares del ATP, la función de estos receptores dentro del SNC recientemente han tomado mucha atención.

La adenosina y el ATP son liberados como consecuencia de la actividad fisiológica en las células excitables y ejercen efectos potentes sobre las funciones neuronales y sinápticas. Una de las principales funciones de los nucleótidos en el SNC es la neuroprotección, la cual se lleva básicamente por la inhibición de la liberación de glutamato, pues esta acción puede resultar en una maniobra efectiva de protección neuronal durante la hipoxia y el proceso isquémico, especialmente en el hipocampo (Burnstock, G. 1990, Inoue, K., 1995, Inoue, K. *et al.*, 1996)

La liberación de glutamato puede ser inhibida por la reducción de la entrada de Ca^{2+} a las terminales nerviosas. Esto se ha logrado por medio del uso de antagonistas de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, del tipo N y L, neurotransmisores como GABA, adenosina (Dolphin y Prestwich 1985, Fredholm *et al.*, 1989) y ATP (Inoue, K. *et al.*, 1996), posiblemente por la vía de la inhibición de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje o por una hiperpolarización en la terminal nerviosa.

El ATP es sintetizado en la terminal nerviosa presináptica, el cual es almacenado en vesículas sinápticas para protegerlo de la degradación. Esta sustancia, se encuentra en las vesículas sinápticas junto con neurotransmisores como la Ach y la NA. El ATP es liberado por procesos dependientes de Ca^{2+} en cantidades estequiométricas con el principal neurotransmisor, o bien, como el principal neurotransmisor en ciertos sitios dentro del SNC (Inoue, K., 1995, Inoue, K. *et al.*, 1996). Extracelularmente, el ATP es hidrolizado por medio de las ecto-5'-ATPasas y por la ecto-5'-nucleotidasas (Ziganshin, A.U , 1995).

Sin embargo, es posible que el ATP liberado al medio extracelular *per se*, pueda estimular a receptores específicos y transmitir la información a las neuronas generando un cambio en la conducta neuronal y/o en la respuesta de estas células a neurotransmisores que se emplean durante la comunicación sináptica, sin la necesidad de su hidrólisis para llegar hasta adenosina. Con esto se abre la posibilidad de que el ATP pueda proteger las funciones cerebrales de la sobre estimulación mediada por mensajeros químicos.

1.6 Planteamiento del problema

Con base a los antecedentes mostrados, en el presente trabajo planteamos realizar un análisis de los efectos de sustancias neuromoduladoras como el IFN- α y el ATP, sobre la comunicación sináptica de las neuronas. Para ello hemos tomado como modelo de comunicación sináptica el que presentan las células piramidales de la región CA1 del hipocampo y las fibras colaterales de Schaffer. En esta sinápsis se evaluó el efecto que ambos neuromoduladores, presentan sobre la actividad sináptica de las neuronas piramidales, por medio de registro de microelectrodo. Analizando la sinápsis a nivel presináptico y postsináptico, así como, el tipo de receptor al cual cada una de estas sustancias se une y la segunda mensajería involucrada en la respuesta inducida por esta unión. En otras palabras, se analizó el mecanismo por el cual ambas sustancias pueden ejercer sus efectos sobre la actividad neuronal. Estos resultados, nos darán información que nos permita conocer el tipo de relación que existe entre el glutamato, principal neurotransmisor en el hipocampo, y sustancias capaces modular la comunicación neuronal. De esta forma, el análisis básico que realizamos en este trabajo nos situará en el contexto general en el que el ATP por una parte y el IFN- α por la otra, pueden ser consideradas como sustancias neuromoduladoras y tener una idea más cercana a la posible función que estas sustancias puedan tener en condiciones fisiológicas.

1.7 Justificación

La presencia de un gran número de neuromoduladores ha sido comprobada, en diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos dentro de varias estructuras del SNC. Por ejemplo, durante procesos inflamatorios y neurodegenerativos, la concentración de citocinas, específicamente IFN- α se ve considerablemente aumentada en sitios como hipocampo, hipotálamo, corteza y puente. Por otro lado, en procesos de isquemia cerebral e hipoxia, la concentración de ATP y adenosina se ven dramáticamente elevadas. Un aumento en la concentración de cada una de estas sustancias y su correlación con signos y síntomas observados tanto en pacientes que reciben terapia con citocinas, como en modelos *in vitro*, evidentemente sugiere una interacción directa de estas sustancias con los elementos neuronales y sinápticos que regulan ciertas actividades.

Con el análisis de los efectos del IFN- α y el ATP sobre la comunicación sináptica de las neuronas piramidales de CA1 en hipocampo, pretendemos determinar el mecanismo por el cual ambas sustancias pueden llevar a cabo sus efectos protectores en el caso del ATP y los efectos colaterales del IFN- α sobre el SNC durante la terapia inmunológica de varias enfermedades. El conocimiento de estos mecanismos, nos ayudarán para comprender la fisiología de la neuromodulación en sitios como el hipocampo, durante procesos fisiológicos y patológicos en el humano. Permittiéndonos también, una amplia gama de posibilidades terapéuticas en las cuales los efectos colaterales sean menores, o puedan ser controlados, a la par de la generación de efectos deseados para proteger la actividad del SNC.

2. Hipótesis

2.1. Hipótesis generales

- A) El IFN- α modifica la comunicación sináptica de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo mediada por glutamato, en la que se involucra a receptores no-NMDA, y la activación de cinasas de la tirosina, sin alterar las propiedades eléctricas de la membrana
- B) El ATP inhibe la liberación de glutamato, a través de su interacción con receptores independientes a los descritos para adenosina, localizados en la terminal presináptica de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo

3. Objetivos

3.1 Objetivos generales

Para el caso del IFN- α .

- a) Investigar los efectos y analizar el mecanismo de acción del IFN- α , sobre la transmisión sináptica en las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo *Hipótesis de trabajo* Las citocinas modulan las funciones neuronales mediante la regulación de la transmisión sináptica y de corrientes iónicas específicas implicadas en este proceso
- b) Describir y caracterizar el efecto del IFN- α sobre los EPSPs eIPSPs generados por la estimulación química y eléctrica de las neuronas piramidales del hipocampo. *Hipótesis de trabajo* las citocinas inhiben la liberación de los neurotransmisores que median tales potenciales (glutamato, GABA)
- c) Describir y caracterizar el efecto del IFN- α sobre el LTP inducido en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, por la estimulación tetánica de los axones

colaterales de Schaffer *Hipótesis de trabajo*. las citokina inhiben la liberación de glutamato y la interacción con sus receptores a nivel postsináptico.

- d) Describir y analizar los efectos del IFN- α sobre el LTD inducido en las neuronas piramidales del hipocampo, por una estimulación eléctrica de larga duración y baja frecuencia en los axones colaterales de Schaffer. *Hipótesis de trabajo* las citokinas están involucradas en la activación de segundas mensajerías dependientes de Ca^{2+} intracelular y de la actividad de proteínas de la cinasa.

Para el caso del ATP

- e) Caracterizar los efectos del ATP, adenosina y de varios de sus análogos, sobre la liberación sináptica de glutamato en neuronas hipocampales de la región CA1 *Hipótesis de trabajo* el ATP puede inhibir la liberación de glutamato de forma más potente que sus análogos
- f) Determinar si los efectos provocados por el ATP sobre la liberación de glutamato, se llevan a cabo a nivel presináptico o postsináptico. *Hipótesis de trabajo*: el ATP inhibe la liberación de glutamato por su interacción con receptores específicos a nivel presináptico
- g) Determinar las características farmacológicas del receptor sobre el cual el ATP actúa para inducir sus efectos sobre la liberación de glutamato *Hipótesis de trabajo*: el ATP *per se*, activa receptores purinérgicos específicos capaces de inhibir la liberación de glutamato
- h) Analizar el papel de las proteínas G sobre los efectos presinápticos del ATP en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo *Hipótesis de trabajo*: los efectos del ATP sobre las neuronas piramidales se lleva a cabo por su interacción con receptores $\text{P}_{2\gamma}$ acoplados a proteínas G.

IV.- METODOLOGÍA

1. Preparación de las rebanadas de hipocampo (región CA1)

Las rebanadas hipocampales fueron obtenidas de ratas Sprague Dawley macho, de 21 a 22 días de edad, con un peso promedio de 50 a 70 g, mantenidas en condiciones constantes de temperatura ($\sim 23^{\circ}\text{C}$) y con acceso *ad libitum* al alimento y agua

Los animales fueron decapitados e inmediatamente después, con el uso de unas tijeras se cortó la piel del cráneo a lo largo de la línea media del mismo. El hueso del cráneo se rompió usando unas pinzas "rongueur". La dura madre fue eliminada con la punta de una navaja de bisturí, siguiendo la línea media del cerebro y replegándose hacia cada uno de los lados. Con una espátula pequeña de vidrio se levantó suavemente el cerebro de la cavidad craneal, cortando cuidadosamente los nervios ópticos y craneales.

El cerebro fue colocado en un baño de solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) a 4°C estabilizada con una mezcla de O_2 y CO_2 al 95% y 5% respectivamente. El objetivo de esta maniobra fue el de reducir la demanda de oxígeno por parte de las células y dar al cerebro la suficiente firmeza para cortar las rebanadas. Posteriormente, el cerebro fue colocado ventralmente hacia arriba, en una caja de Petri con gasas empapadas con LCRA, de éste se formó un bloque, contando la parte anterior del cerebro a la altura del quiasma óptico y por la parte posterior a la altura del cerebelo. Este bloque, se fijó con una capa delgada de cianoacrilato (superglue) a la base de la cámara de un vibrotomo (Campden Instruments, LTD). Por detrás del bloque de cerebro se colocó un trozo de silgar que sirvió de soporte al tejido mientras era rebanado (Fig. 4)

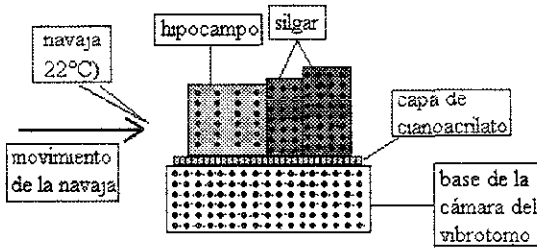


Figura 4. Esquema que muestra la disposición de la cámara del vibrotomo para obtener las rebanadas del hipocampo con un grosor de 400 μm

Las rebanadas se obtuvieron por cortes coronales del cerebro, la dirección de estos cortes tuvieron un sentido rostro-caudal. Generalmente las dos primeras rebanadas del hipocampo fueron desechadas, para asegurar uniformidad en el grosor de las rebanadas siguientes. El grosor de las rebanadas de hipocampo fue de 400 μm en la mayoría de los experimentos y de 300 μm en el caso de los estudios realizados con toxina pertusis. La duración de todo este proceso, desde que se sacrificó al animal hasta la obtención de las rebanadas fue de ~ 5 min. Las rebanadas fueron mantenidas sobre una malla de nylon y sumergidas en la solución de LCRA a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) y con burbujeo constante de O_2 y CO_2 al 95% y 5% respectivamente, mientras eran utilizadas para los registros.

2 Cámara de registro

Para mantener a las rebanadas de hipocampo en condiciones fisiológicas durante el registro, se utilizó una cámara de registro, localizada en un bloque de acrílico (4.1 X 3.2 X 1.2 cm). En la parte central del bloque de acrílico, se encuentra la cámara con un diámetro de 1.3 cm, 0.4 cm de profundidad y una capacidad de 1 mL. La cámara cuenta en su parte inferior, con una entrada para la solución de LCRA, con la cual se perfundi6 a la rebanada. También cuenta con un canal, el cual tiene la funci6n de conducir el LCRA hasta una aguja de succi6n. Esta aguja se encuentra a 1.5 cm de la c6mara dentro de un peque6o pozo para evitar al m6ximo la vibraci6n originada por la succi6n. Dentro de la c6mara se coloc6 a la rebanada, la cual descansaba sobre una malla de nylon. La rebanada se fij6 mec6nicamente con la ayuda de un marco de platino el cual posee tres hilos de nylon en posici6n paralela.

El LCRA que perfunde la rebanada, llega a la c6mara de registro por medio de una presi6n constante ejercida por la fuerza de gravedad. La soluci6n se mantenía en un frasco Mariotte colocado a 60 cm de la c6mara y equilibrada con una mezcla de O₂ al 95% y CO₂ al 5%, y mantenida a una temperatura de 36 ± 5°C. La soluci6n que se encontraba en contacto con la rebanada era mantenida en un rango de temperatura de 35 a 36°C, la cual se media durante todo el registro. La velocidad de flujo de la perfusi6n fue de 1.5 a 2 mL/min.

Una rebanada de hipocampo a la vez fue colocada dentro de la c6mara de registro. Todos los f6rmacos analizados, fueron aplicados por perfusi6n. Debido a que la respuesta presináptica no sufri6 desensibilizaci6n al IFN- α , ATP y sus an6logos, éstos fueron aplicados en forma de dosis acumulativas.

En algunos experimentos, se aplicó glutamato, NMDA y GABA, por medio de una inyección de presión. En este caso, se utilizaron pipetas de borosilicato de vidrio (de 3 a 6 mm de diámetro en la punta) llenas con la solución a probar, glutamato (5 mM, pH 7.4) y NMDA (10 μ M, pH 7.4) y aplicando presión a través de la pipeta (generalmente de 140 kPa durante 100 a 160 ms) para expulsar algunos nanolitros de esta solución sobre la capa de células piramidales de la región de CA1 del hipocampo. Para evitar efectos indeseables debidos al goteo de las soluciones contenidas en la pipeta, ésta fue siempre colocada aproximadamente a 500 μ m del lugar de la expulsión, siendo aproximada al sitio deseado para su aplicación, justo antes de la aplicación de las sustancias. Las aplicaciones de glutamato se realizaron en células en las cuales se fijó el potencial de membrana a -100 mV y las aplicaciones de NMDA se realizaron cuando las células eran profundidas con solución de LCRA libre de Mg^{2-} y al potencial de membrana basal.

3. Registro de la actividad eléctrica de las neuronas piramidales

Los registros intracelulares fueron realizados utilizando microelectrodos llenos con una solución de KCl 3 M, con una resistencia de 40-60 M Ω . El potencial de membrana fue medido con un preamplificador Axoclamp-2A (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). La salida de este preamplificador se conectó a un osciloscopio (TDS 210, Tektronics), para observar las señales registradas, las cuales se grabaron y almacenaron para su posterior análisis en una computadora PC, con la ayuda de los programas previamente instalados Axotape y pClamp (Axon Instruments). Un registro intracelular de las células piramidales de CA1 fue juzgado satisfactorio si el potencial de membrana era mayor o igual a ≥ -55 mV y la amplitud de los potenciales de acción fue ≥ 60 mV. Los potenciales postsinápticos excitadores mediados por glutamato (gEPSPs) fueron evocados por

pulsos eléctricos (20-100 μ s), aplicados con una frecuencia de 0.1 Hz a las fibras colaterales de Schaffer, usando un electrodo bipolar de tungsteno de 20 μ m de diámetro (cubierto con teflón). En presencia de 30 μ M picrotoxina, se registró el promedio de 5 gEPSPs consecutivos para cada condición experimental y se calculó la media de la amplitud. Para minimizar los cambios en la amplitud de los gEPSP dependientes de voltaje y la generación de potenciales de acción, el potencial de membrana se fija a -100 mV, por medio de la inyección de corriente hiperpolarizante. La resistencia de entrada y la constante de tiempo fueron medidas de los potenciales electrofisiológicos. Inducidos por la inyección intracelular de pulsos de corriente constante (-100 pA de amplitud y 100 ms de duración) aplicada cuando el potencial de membrana está en reposo.

Después de que la amplitud de los gEPSPs fue estable por 20 min, la corriente hiperpolarizante se retiró para poder inducir tanto el LTP como el LTD. Para inducir el LTP utilizamos dos pulsos eléctricos con una frecuencia de 100 Hz (tren) y una duración de 1 s, aplicado a las fibras colaterales de Schaffer a intervalos de 10 s. Después de la estimulación tetánica, el potencial de membrana fue fijado con la aplicación de corriente hiperpolarizante a -100 mV y registrados los gEPSPs durante periodos de 40 a 120 min. El LTD fue inducido por medio de una estimulación eléctrica de 5 Hz de frecuencia y con una duración de 5 min aplicada en las fibras colaterales de Schaffer.

4. Soluciones y fármacos

Todos los registros se realizaron utilizando una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) a una temperatura de 35-36°C. La composición de la solución de LCRA fue (en mM): 124 NaCl, 5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.4 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 de glucosa. Con una

osmolaridad de entre 290 a 310 mOsm/Kg y la cual siempre fue equilibrada con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂, para alcanzar un pH de 7.4

Los fármacos utilizados fueron siguientes: Interferón alfa recombinante humano (IFN- α -2b, INF- α , Schering-Plough), ácido N-metil-D-aspartato (NMDA, Sigma), ácido D-2-amino-5-fosfonovalerato (APV, RBI, Natick,MA), L-glutamato (Sigma), picrotoxina (RBI; Natick,MA), ácido kinurenico (Sigma) y genisteína (RBI, Natick,MA). La solución de genisteína (50 mM) fue preparada con dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma)

Adenosina (RBI; Natick,MA), las sales disódicas de: adenosina 5'-monofosfato (AMP, Sigma), adenosina 5'-difosfato (ADP, Sigma), adenosina 5'-trifosfato (ATP, Sigma), sal de litio de α,β -metilen adenosina 5'-trifosfato (α,β -metilen-ATP, Sigma), sal de litio de β - γ -metilen adenosina 5'-trifosfato (β - γ -metilen-ATP, Sigma) y sal de tetralitio de adenosina 5'-O-3-tiotrifosfato (ATP- γ -S, Sigma), sal disódica de 2-metiltioadenosina 5'-trifosfato (2-Me-S-ATP, Sigma), sal disódica de uridina 5'-trifosfato (UTP, Sigma), sal sódica de guanidina 5'-trifosfato (GTP, Sigma), sal sódica de suramin (0.01-1 M, FBA, Germany), reactivo Blue-2 (Basilen Blue E-36, Sigma), ácido 2'-4'-disulfónico-6-azofenil-piridoxalfosfato sódico (PPADS, RBI), toxina pertusis (PTx, Sigma), N-metilenmaleimida (NEM, Sigma), 2-Cloroadenosina (CADO, RBI), 8-ciclopentilteofilina (CPT, RBI), 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX, RBI), deaminasa de la adenosina (AD, RBI) Se prepararon soluciones "stock" de 0.1 a 10 mM con agua nanopura para todas las sustancias o con etanol (CPT y DPCPX) antes de disolver los fármacos en la solución de LCRA. Las soluciones "stock" de ATP, ADP y AMP fueron preparadas siempre 15 min antes de los experimentos. Todas las soluciones "stock" fueron mantenidas a -4°C durante el resto del día y utilizadas el mismo día de su preparación. Todas las demás soluciones "stock" fueron mantenidas a -20°C

5. Análisis de resultados

Cada maniobra experimental fue repetida en 5 a 20 neuronas (n). Para disminuir la variabilidad de nuestros resultados experimentales, siempre que fue posible las respuestas controles y experimentales se realizaron en la misma neurona. Las observaciones que presentaron una mayor variabilidad, se repitieron en un número mayor de células. Utilizamos la prueba de *t* de Student no pareada, para evaluar las diferencias entre los valores promedio obtenidos de dos grupos diferentes de células. Por otra parte, utilizamos también la *t* de Student pareada para evaluar las diferencias de los valores promedio obtenidos de las mismas células. Las diferencias estadísticamente significativas, se consideraron utilizando una curva gaussiana de doble cola con una $p \leq 0.05$. Es importante mencionar que el criterio de viabilidad celular que seguimos para realizar los registros de las células penetradas fueron los siguientes: 1) la magnitud y estabilidad del potencial de membrana, 2) el umbral, amplitud y la forma de los potenciales de acción espontáneos o provocados y 4) la naturaleza de la respuesta postsináptica provocada por la estimulación presináptica.

V.- RESULTADOS

1. Observaciones generales

Los resultados que se presentan fueron obtenidos de 260 células piramidales de la región CA1 del hipocampo. Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas son muy similares a aquellas previamente publicados usando técnicas de registro como patch-clamp y registros intracelulares (Edwards, F A, 1989, Malinow, R, 1986; Mendoza-Fernández, V, *et al.*, 2000). La media del potencial de membrana fue de 63 ± 4 mV (con un rango de -55 a 68 mV), una media de la resistencia de entrada de 54 ± 9 M Ω (con un rango de 34 a 67 M Ω) y una media en la constante de tiempo de 14 ± 1.2 ms (con un rango de 11 a 116 ms). La media de la amplitud de los potenciales de acción fue de 74 ± 4 mV (con un rango de 64 a 86 mV), la cual fue medida al potencial de membrana basal.

A menos que se señale una condición diferente, el uso de 30 μ M de un antagonista de receptores a GABA_A, picrotoxina nos permitió bloquear los potenciales sinápticos mediados por estos receptores. Estos potenciales se registraron como depolarizaciones al potencial membrana de registro (-100 mV) debido a la alta concentración de iones cloro dentro del electrodo de registro (2 M KCl). En 50 experimentos analizados, la perfusión de picrotoxina disminuyó la amplitud de los potenciales sinápticos rápidos en un promedio de $42 \pm 5\%$ de su valor control.

Para evaluar los efectos de IFN- α sobre los potenciales sinápticos rápidos mediados por GABA, usamos ácido kinurenico (100 μ M) para bloquear los receptores de glutamato ionotrópicos. El ácido kinurenico redujo la amplitud de los potenciales sinápticos en un promedio de $62 \pm 3\%$ ($n=9$), en relación con su valor control.

2. Efectos del Interferon- α (IFN- α) sobre la transmisión sináptica del hipocampo
a. Efectos del IFN- α sobre la excitabilidad de las células piramidales de CA1

La perfusión de IFN- α (300 U/ml) durante 30 min no tiene efecto sobre el potencial de membrana basal de la neuronas piramidales. Los valores controles y experimentales fueron 63 ± 1 y 62 ± 1 mV, respectivamente ($n=12$). El IFN- α no altera tampoco la relación de voltaje-corriente, lo que indica que la resistencia de entrada de la célula no se ve alterada por la presencia de la citokina (Fig 5). La forma del potencial de membrana ni la frecuencia de disparo se vio modificada por la aplicación del IFN- α , como muestra la figura y el cuadro I ($n=5$).

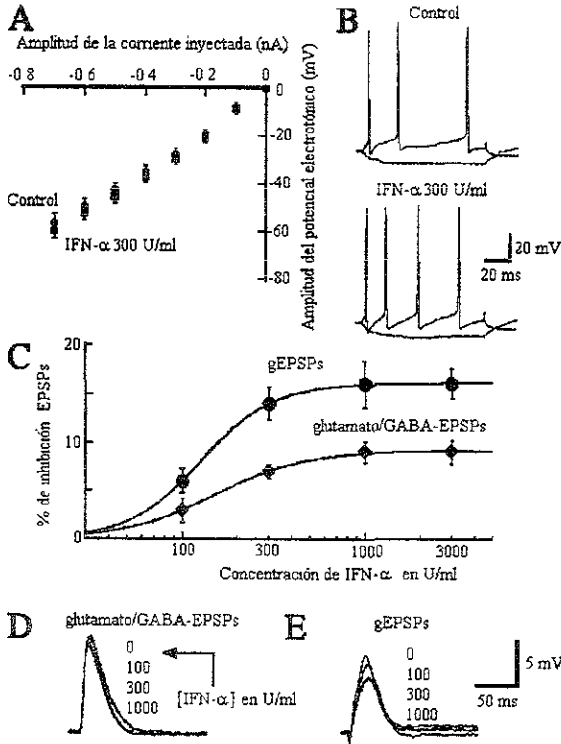


Figura 5 El IFN- α inhibe los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) en las neuronas piramidales de CA1, sin afectar significativamente el potencial de membrana basal o la resistencia de entrada. **A**, Muestra la relación voltaje-corriente (V/I) antes y en presencia de IFN- α . Los símbolos representan la media \pm E. S. ($n=5$). La resistencia de entrada de la célula, fue calculada de la relación V/I , mostrando valores de 57 ± 2 y 61 ± 2 $M\Omega$ antes y en presencia de IFN- α , respectivamente. **B**, Potenciales electrotrónicos inducidos por la aplicación de pulsos de corriente entrante y saliente de 100 pA con una duración de 100 ms, antes (trazos superiores) y en la presencia de IFN- α (trazos inferiores). La duración, amplitud y número de espigas inducidas por los pulsos depolarizantes no fueron modificadas por la citokina (ver tabla I). **C**, Curvas que muestran la relación concentración-respuesta de los efectos de inhibición del IFN- α sobre los EPSPs control (glutamato/GABA, $n=6$) y los EPSPs mediados por glutamato (gEPSPs; $n=7$). Estos efectos fueron dependientes de la concentración con una concentración inhibidora 50 (IC50) de 151 U/ml e 148 U/ml, respectivamente. En **D** y **E** se muestran registros representativos realizados 30 min después de haber hincado la perfusión de las concentraciones indicadas de IFN- α . gEPSPs se registró en presencia de $30 \mu\text{M}$ de picrotoxina.

Tratamiento	Control	IFN- α
Duración (ms)	1.59 \pm 2	1.59 \pm 3 (NS)
Amplitud (mV)	83 \pm 2	82 \pm 2 (NS)
Número de espigas inducidas por un pulso de 100 ms	4 \pm 0.5	5 \pm 0.2 (NS)
Velocidad de inicio del potencial de acción (V/s)	234 \pm 46	228 \pm 21 (NS)
Velocidad de caída del potencial de acción (V/s)	101 \pm 9	91 \pm 5 (NS)

Cuadro I. Parámetros (media \pm E.S ; n=5) de los potenciales de acción inducidos por la aplicación intracelular de pulsos de corriente entrante, en las neuronas de CA1 antes (control) y en presencia de IFN- α (300 U/ml). Los cambios observados fueron no significativos (N.S.)

b. Efectos del IFN- α sobre los potenciales sinápticos mediados por glutamato y GABA

La perfusión de IFN- α (300 U/ml) presenta un pequeño efecto inhibitor (9 \pm 3%) sobre los glutamato/GABA-EPSPs. Las figuras 5C y 5D muestran el efecto de diferentes concentraciones acumulativas de IFN- α sobre estos EPSPs (IC₅₀=151 U/ml). El efecto inhibitor del IFN- α se observó en todas las neuronas analizadas (n=6), el cual fue irreversible. Como se mencionó antes, estos EPSPs fueron mediados por glutamato y GABA, decidimos investigar el efecto de inhibición del IFN- α sobre cada uno de estos componentes. La perfusión de esta citokina no presentó efecto sobre los EPSPs mediados por GABA, los cuales fueron registrados en presencia de 100 μ M de ácido kinurenico e inhibido por 30 μ M de picrotoxina. Este tipo de EPSPs fue completamente inhibido siempre por picrotoxina en una concentración de 30 μ M.

Los EPSPs mediados por glutamato (gEPSPs) fueron inhibidos por el IFN- α en forma dependiente de la concentración con una $IC_{50}=148$ U/ml, presentando una inhibición máxima del $16\pm 2\%$ (Fig 5C y 5E, n=7) El efecto de inhibición del IFN- α inició aproximadamente entre los 6 y 10 min y el máximo de efecto se alcanzó entre los 20-25 min después de iniciar la perfusión del IFN- α Este efecto fue irreversible incluso después del lavado del fármaco durante 30-60 min (n=6) Los gEPSPs fueron registrados en presencia de 30 mM de picrotoxina y fueron bloqueados por ácido kinurenico (100 μ M) El efecto inhibitor del IFN- α (300 U/ml, n=4) sobre los gEPSPs se previno por el pretratamiento por 10 min de las rebanadas con genisteina (100 μ M, datos no mostrados), la cual inhibe específicamente la actividad de la cinasa de la tirosina en el tejido hipocampal (O'Dell, T J , 1991)

El IFN- α también, redujo la depolarización inducida por la aplicación de glutamato (Fig 6, panel superior) La media de los valores controles fue de 16 ± 3 mV y en presencia de IFN- α estos fueron de 11 ± 3 mV ($P<0.01$; n=4) Sin embargo, el IFN- α , no modificó la depolarización inducida por la aplicación local de NMDA (n=6, Fig 6, panel inferior) Estos resultados indican que por lo menos en parte, los efectos de inhibición del IFN- α sobre los gEPSPs es a nivel postsináptico y que envuelve canales asociados a receptores NMDA y a proteínas con actividad de cinasas de la tirosina

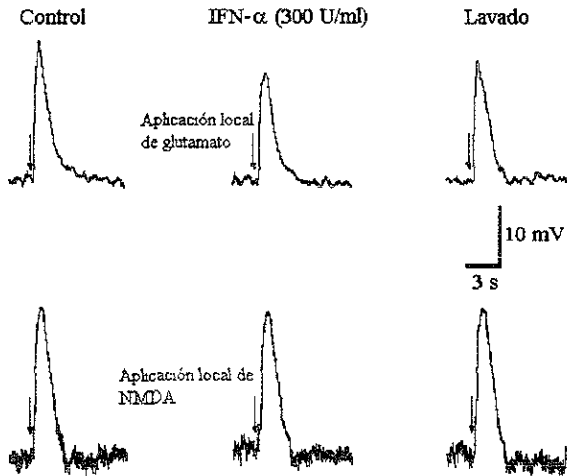


Figura 6. El IFN- α inhibe la depolarización inducida por glutamato pero no la depolarización inducida por NMDA. La inyección por presión de glutamato (5 mM, panel superior) o NMDA (10 mM, panel inferior) se realizó al tiempo que indican las flechas. Las depolarizaciones fueron registradas antes (control), 20 min después de iniciada la perfusión de IFN- α y 20 min después de discontinuar el fármaco por el lavado de la citokina. Observaciones similares a las mostradas fueron obtenidas en cuatro (panel superior) y seis (panel inferior) experimentos idénticos. En estos experimentos sólo una neurona por rebanada fue registrada. Los experimentos de glutamato fueron realizados en células a las cuales se le fijó el potencial de membrana a -100 mV por medio de la aplicación de corriente. Los experimentos de NMDA se realizaron en un medio extracelular libre de Mg^{2+} y al potencial de membrana basal.

c. Acciones del IFN- α sobre la plasticidad sináptica del hipocampo

Después de la estimulación tetánica, se observó un incremento en la amplitud de los gEPSPs ($196 \pm 6\%$ en comparación con los registros controles, $n=5$) registrados a los 5 minutos después de la estimulación (Fig. 7A). Una vez que se alcanzó el máximo valor, se observó una caída transitoria en la amplitud de los EPSPs, la cual ocurrió entre los 10 a 15 min. Después de este tiempo, se registraron gEPSPs estables en amplitud ($170 \pm 7\%$ con respecto al grupo control) que fueron registrados durante todo el tiempo de registro (más de dos horas). De acuerdo con otros autores

(Nicoll, R.A. *et al*, 1988), nosotros denominamos a la primera porción de esta respuesta como potenciación de corto término (STP) y a la segunda parte como potenciación de largo término (LTP). La generación del LTP fue prevenida por la presencia del ácido D-2-amino-5-fosfonovalerato APV (ver más adelante), lo que indica que éste proceso está mediado por canales asociados a receptores NMDA, como se ha descrito previamente (Malenka, R.C., 1994, Malenka, R.C. y Nicoll, R.A., 1999)

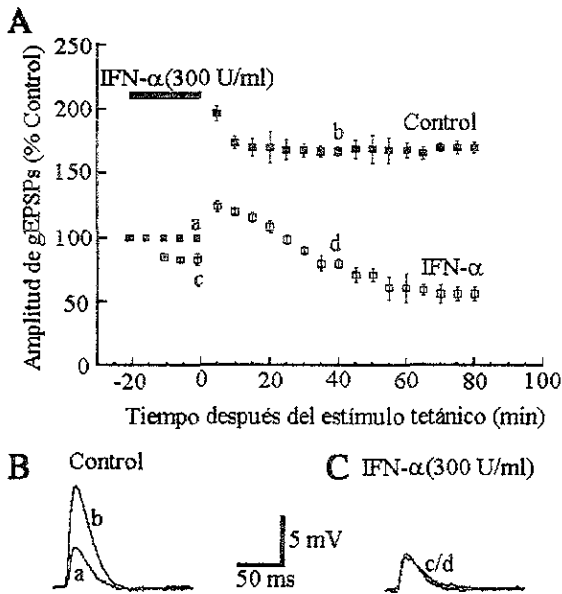


Figura 7. El IFN- α previene la potenciación de largo término en las neuronas de la región CA1. A, amplitud relativa de los gEPSPs tomados antes y después de la estimulación tetánica, la cual se aplicó al tiempo 0. Los símbolos representan la media \pm E S de 5 neuronas control (sin tratamiento) y cinco neuronas tratadas con IFN- α . Sólo una neurona por rebanada fue registrada. El IFN- α se aplicó antes y durante la estimulación tetánica, como lo indica la barra. La estimulación tetánica consistió en dos trenes de un seg de duración cada uno, aplicado con una frecuencia de 100 Hz y con un intervalo de 10 seg entre los dos trenes. B, gEPSPs registrados de dos neuronas diferentes, tomados antes y después de la estimulación tetánica a los tiempos indicados por las letras.

La perfusión del IFN- α (300 U/ml) durante 20 min antes de la estimulación tetánica, previene la fase de mantenimiento del LTP, mientras que el STP permanece sin cambios (Fig. 7) El promedio de la amplitud de los gEPSPs alcanzado durante el STP fue de $124 \pm 4\%$ de la amplitud control. Después del STP, la amplitud de los gEPSPs, disminuyó y se mantuvo al 56 ± 5 por debajo de los registros control, lo que indica que el IFN- α muestra una depresión de estos potenciales.

La aplicación del IFN- α después del STP (Fig 8, $n=4$) también inhibe la fase de mantenimiento del LTP. Incluso, en presencia de esta citokina la amplitud de los gEPSPs alcanzada en la siguiente etapa fue de aproximadamente el 60% más comparada con los registros control. Este efecto no se observó cuando la solución de IFN- α fue hervida durante 30 min, antes de realizar el experimento (Fig 8, $n=4$)

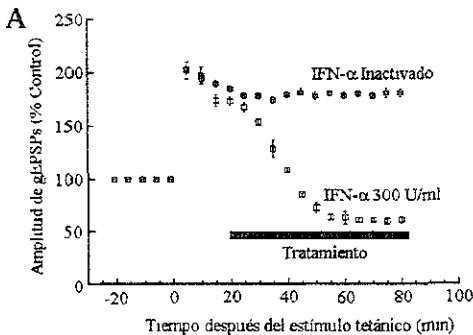
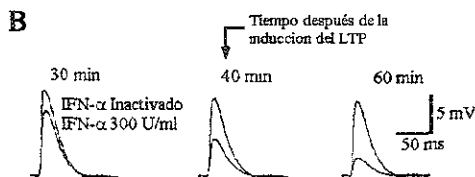


Figura 8. El IFN- α inhibe la potenciación de largo término en la región CA1. A, amplitud relativa de los gEPSPs tomada antes y después de la estimulación tetánica (ver métodos) que se aplicó al tiempo 0. Ambos tratamientos fueron iniciados durante la fase de mantenimiento del LTP, como se indica por la barra. Los símbolos representan el valor promedio \pm E S de cuatro neuronas tratadas con IFN- α o cuatro neuronas tratadas con IFN- α inactivado con calor. Sólo se registró una neurona por rebanada. B, registros representativos de los gEPSPs obtenidos de dos neuronas diferentes tratadas con la solución de IFN- α o con la solución de IFN- α inactivado por calor.



La estimulación tetánica, también potencio la depolarización inducida por la aplicación de glutamato exógeno (Fig 9, n=4) pero esta potenciación fue menor que la observada en los gEPSPs (Fig 7A) La aplicación de esta citokina también inhibió esta potenciación (Fig 9, n=4) sugiriendo que el IFN- α tiene un efecto inhibitor sobre el LTP, en parte a nivel postsináptico.

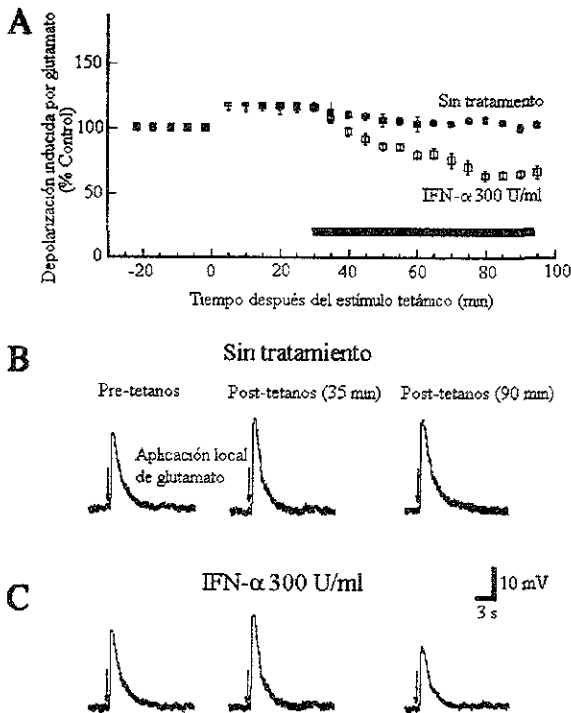


Figura 9. El IFN- α inhibe la depolarización potenciada por la aplicación de glutamato exógeno. **A**, amplitud relativa de la depolarización inducida por la aplicación de glutamato antes y después de la estimulación tetánica aplicada al tiempo 0, registrada en neuronas de la región de CA1. Los símbolos representan el valor promedio \pm E.S. de cuatro neuronas sin tratamiento y cuatro neuronas tratadas con IFN- α . El IFN- α se aplicó en el tiempo indicado por la barra. Sólo una neurona fue registrada por rebanada. **B** y **C** son las depolarizaciones típicas inducidas en dos diferentes neuronas, una sin tratamiento y la otra con tratamiento de IFN- α . Estas depolarizaciones fueron registradas antes y después de la estimulación tetánica a los tiempos indicados.

El pre-tratamiento de las rebanadas con 100 μM de genisteína previene el efecto inhibitorio del IFN- α sobre la fase de mantenimiento del LTP (Fig 10; n=5) De acuerdo con observaciones previas, esta concentración de genisteína per se no tiene efectos sobre el LTP cuando es aplicada después de la fase STP

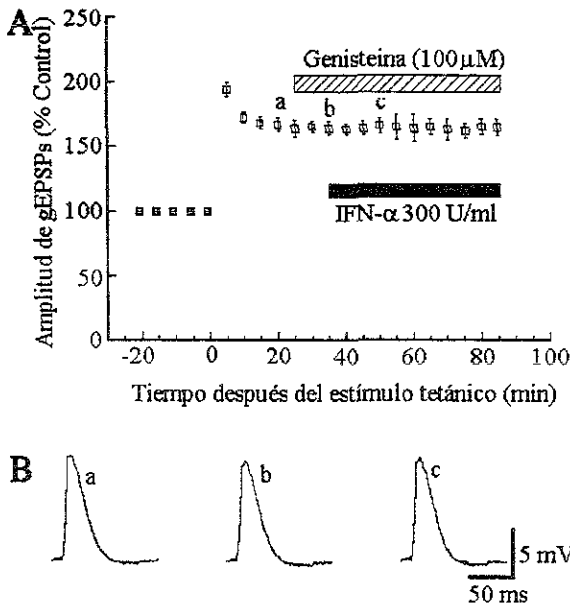


Figura 10. La genisteína (100 μM) previene el efecto inhibitorio del IFN- α sobre el LTP. **A**, amplitud relativa de los gEPSPs antes y después de la estimulación tetánica dada al tiempo 0. El IFN- α fue aplicado después de la estimulación tetánica como indica la barra sólida. Los símbolos representan el valor promedio \pm E.S. de cinco neuronas. Solo una neurona se registro por rebanada. **B**, gEPSPs típicos registrados de una neurona a los tiempos indicados por las letras

Como era esperado, la inhibición de los receptores NMDA con APV (50 μM), aplicado durante la estimulación tetánica previno el LTP, mientras que el STP permaneció (Fig 11A, n=4) Este tratamiento también previno los efectos del IFN- α sobre los gEPSPs. La aplicación de APV después

del STP no tiene efecto sobre la fase de mantenimiento del LTP ni sobre los efectos inhibidores del IFN- α sobre el LTP (Fig 11B; n=4). El APV por sí sólo no tiene efecto sobre la amplitud de los gEPSPs registrados en condiciones controles (antes del estímulo tetánico, Fig 11A) o sobre el STP (Fig 11B) indicando la participación nula de los receptores NMDA para la generación de los gEPSPs durante estas condiciones.

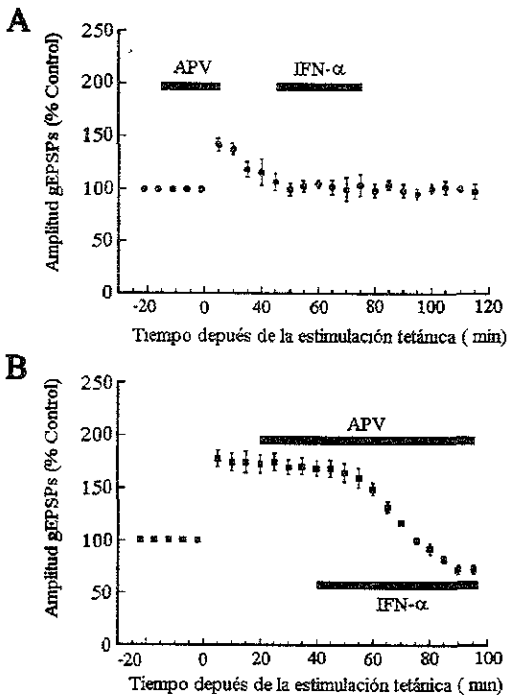


Figura 11. La inhibición de los receptores NMDA durante la fase de mantenimiento del LTP no afecta el efecto inhibitor del IFN- α sobre el LTP. **A**, la perfusión de APV (50 μ M) durante la estimulación tetánica previene el LTP, pero no el STP. Después del STP, IFN- α no altera los gEPSPs. **B**, la perfusión de APV (50 μ M) después de la inducción del LTP no modifica el efecto inhibitor del IFN- α sobre el LTP. Los símbolos representan el promedio de la amplitud de los gEPSPs registrados \pm E.S. de cuatro neuronas en **A** y **B**, sólo se registró una neurona por rebamada.

Después de aplicar una estimulación tetánica de baja frecuencia (ver métodos) se observó una disminución en la amplitud de los gEPSPs, la cual duro todo el tiempo de los registros (60 min). Este fenómeno bien caracterizado se conoce como depresión de largo término (LTD) (Malenka, R C, 1994, Laezza, F 1999). La Fig 12 muestra que la amplitud de los gEPSPs durante la fase estable del LTD fue levemente reducida por la aplicación de IFN- α (n=4).

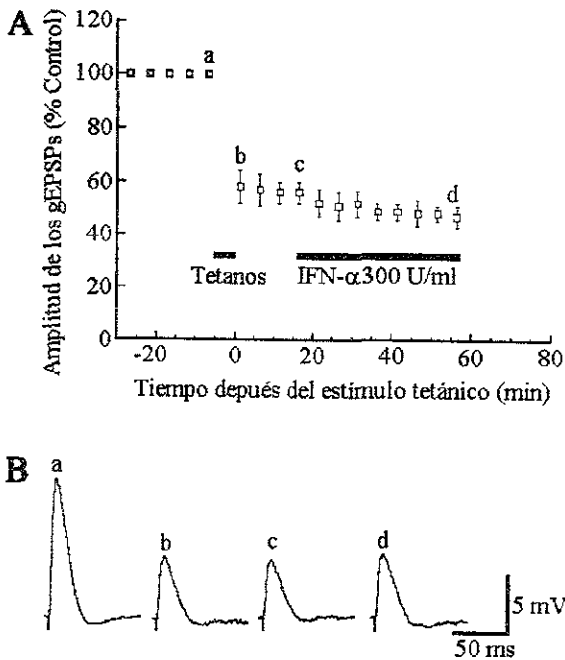


Figura 12. El IFN- α no modifica el LTD. A, amplitud relativa de los gEPSPs antes y después de la estimulación tetánica de baja frecuencia indicada por la barra de la izquierda. Los símbolos son el valor promedio \pm E S de cuatro neuronas. Sólo se registro una neurona por rebanada. El estímulo tetánico de baja frecuencia consistió en un tren de 5 min de duración y 5 Hz de frecuencia. B, se muestran los gEPSPs registrados en un experimento típico de las neuronas piramidales de CA1, tomados a los tiempos indicados por las letras.

3. Efectos del ATP sobre la transmisión sináptica del hipocampo

a. Efectos del ATP y varios análogos sobre los potenciales postsinápticos excitadores mediados por glutamato (gEPSPs)

La perfusión de ATP y varios de sus análogos disminuyó la amplitud y la duración de los gEPSPs ortodróxicos en todas las neuronas analizadas, siendo este efecto dependiente de la concentración (1-300 μM , Fig 13). Los siguientes valores de IC_{50} (en μM) fueron calculados para varios compuestos que se comportan como agonistas totales. AMP, 4.1 ± 0.2 , ATP- γ -S, 5.4 ± 0.8 ; ATP, 6.3 ± 0.9 , adenosina, 13 ± 0.7 , ADP, 15.4 ± 1.2 β - γ -metilen-ATP, α - β -metilen-ATP, 2-Me-S-ATP, GTP, y UTP sólo inducen una respuesta parcial, ya que, una concentración máxima sólo induce de un 30 a un 50% de la máxima inhibición observada con ATP. La IC_{50} para estos compuestos fue (en μM): 17.3 ± 0.3 , 7.1 ± 1.2 , 8.9 ± 1.2 , 12.4 ± 1.5 , y 8.3 ± 1.0 , respectivamente (Fig 13). Para evitar variaciones en la respuesta de célula a célula, los efectos de ATP (1-100 μM) y adenosina (1-300 μM) fueron comparados siempre en la misma neurona piramidal ($n=6$). En tales experimentos, los valores para la IC_{50} de estos agonistas fueron de 6.3 ± 0.9 y 13.0 ± 0.7 μM , respectivamente. Las curvas de concentración respuesta de estos experimentos no se muestran. La explicación más simple para estas observaciones es que el ATP y la adenosina inhiben los gEPSPs a través de diferentes sitios receptores.

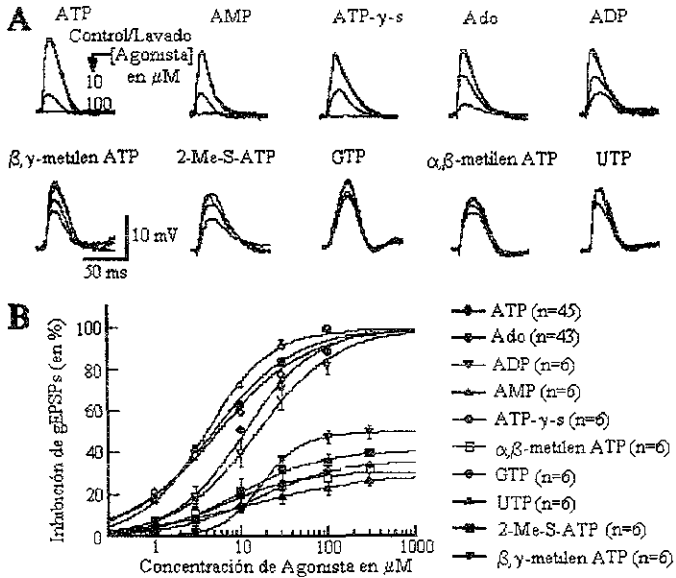


Figura 13. Efectos inhibitorios del ATP y varias sustancias análogas sobre los gEPSPs inducidos por un estímulo eléctrico de las neuronas de hipocampo en la región CA1. Note que ATP, AMP y ATP- γ -s son más potentes que la adenosina. Trazos de los gEPSPs registrados intracelularmente en 10 neuronas diferentes, antes (control), en presencia de 10 y 100 μM de las sustancias indicadas y después de removerlas (lavado). Los efectos inhibitorios de estos compuestos fueron completamente reversibles en tiempos que van de 5 a 10 min. Es importante hacer notar que los trazos del registro control y del registro durante el lavado de las sustancias están superpuestas y el trazo más bajo siempre fue tomado en presencia de 100 μM de cada sustancia. Sólo en el caso del UTP el trazo tomado en presencia de una concentración de 10 μM se encuentra sobre los trazos control y de lavado. La gráfica muestra el porcentaje de inhibición de los gEPSPs inducido por diferentes concentraciones de nucleótidos. Los símbolos representan el valor promedio \pm E S del número de neuronas indicado (n). Las líneas representan el ajuste matemático a una curva sigmoidea. Los gEPSPs fueron medidos al mismo potencial de membrana (-100 mV) en presencia de picrotoxina (30 μM).

La dependencia de tiempo de los efecto de inhibición del ATP y la adenosina sobre los gEPSPs se muestra en la Fig 14. El efecto inhibitor del ATP y sus análogos presenta las siguientes características de cinética se observa dentro de los 60 seg después de llegar el agonista a la cámara de registro, alcanzando el máximo de efecto aproximadamente a los 4 min Efecto completamente reversible después de los 8 min de discontinuar la aplicación del agonista La respuesta de inhibición no se ve modificada por la aplicación repetida o prolongada del agonista (10-15 min) de concentraciones máximas Además, respuestas similares pueden obtenerse de la aplicación de concentraciones únicas o acumulativas, de tal forma, que no se observaron evidencias de des-sensibilización inducida por los fármacos

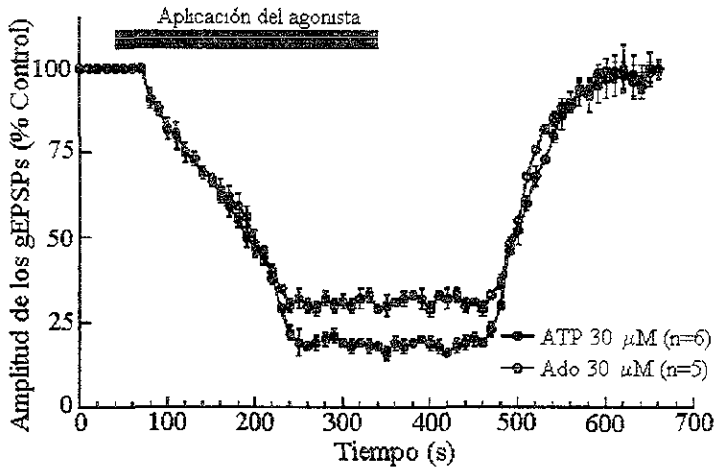


Figura 14. Curso temporal de las acciones inhibitorias del ATP y la adenosina (Ado) sobre los gEPSPs, expresado como el porcentaje de su amplitud al tiempo 0. El agonista es aplicado como indica la barra. Los símbolos son el promedio \pm E.S. del número de neuronas (n) de la región de CA1.

Contrariamente a los efectos del ATP sobre los gEPSPs, el ATP ($100\mu\text{M}$) no afectó la depolarización inducida por la aplicación local de glutamato exógeno (5 mM ; Fig 15). Así que, la depolarización inducida por glutamato fue de $14.8\pm 1.2\text{ mV}$ y $14.6\pm 1.2\text{ mV}$, antes y en presencia de ATP, respectivamente ($n=5$). En la misma neurona, esta concentración de ATP inhibe completamente los gEPSPs evocados ortodrómicamente, los cuales presentan un valor promedio de $14.3\pm 1.6\text{ mV}$. Este resultado muestra que el ATP inhibe los gEPSPs por medio de una acción a nivel presináptica.

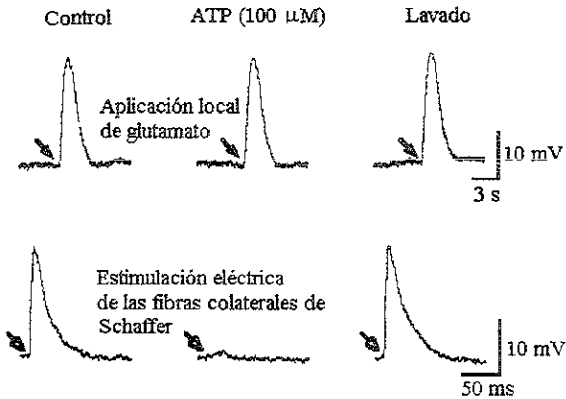


Figura 15. Depolarización de membrana inducida por la aplicación de glutamato (panel superior), antes (Control) y en presencia de ATP y después de eliminar al agonista del medio extracelular (Lavado). En el panel inferior se muestra los gEPSPs registrados antes, en presencia y después de la eliminación del ATP por lavado de la rebanada. Observaciones similares fueron obtenidas en cuatro experimentos.

b. Efectos de los antagonistas de receptores purinérgicos sobre la inhibición de los gEPSPs mediada por ATP

Para una mejor caracterización de los receptores que se encuentran mediando los efectos de inhibición sobre los gEPSPs inducidos por ATP, decidimos investigar los efectos del suramin (100 μM) y PPADS (30 μM) sobre la inhibición de los gEPSPs mediada por ATP. Ambas sustancias antagonizan los efectos del ATP en varios tejidos (Fredholm *et al.*, 1994, Evans *et al.*, 1992, Silinsky and Gerzanich, 1993; Silinsky *et al.*, 1990). Sin embargo, en el hipocampo estas sustancias no modificaron los gEPSPs ni alteraron los efectos inhibitorios del ATP sobre los gEPSPs (Fig. 16). Otro antagonista de receptores P₂, como lo es el Reactive blue 2 (30 μM , Fredholm *et al.*, 1994), tampoco modificó los efectos inhibidores de una concentración de 1 mM de ATP. En estos experimentos, el porcentaje de inhibición inducido por el ATP fue de $19 \pm 1\%$ (n=4), antes y en presencia del antagonista.

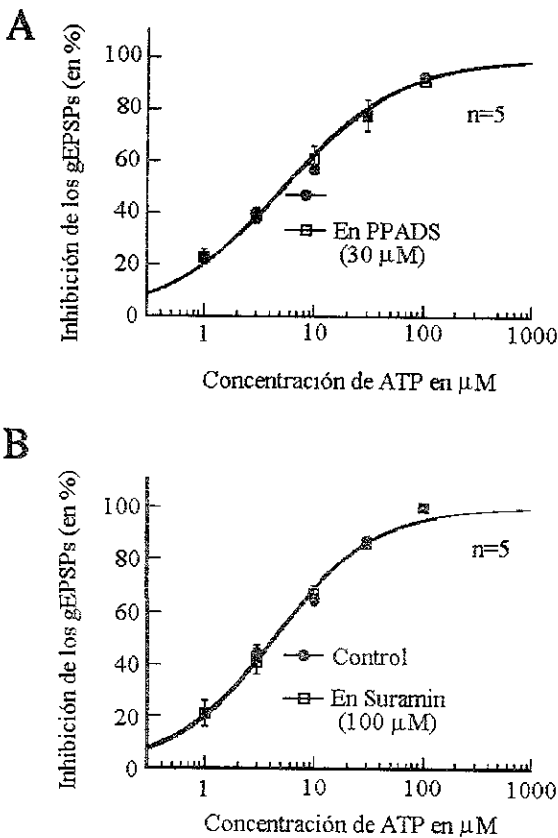


Figura 16. Dos antagonistas a receptores P2, PPADS (30 μM) y suramin (100 μM), no alteran los efectos inhibitorios del ATP sobre los gEPSPs. Los símbolos representan el valor promedio \pm E.S. de datos obtenidos en el número indicado de neuronas piramidales de CA1 del hipocampo (n). Las líneas representan el ajuste matemático a una curva sigmoidea.

Nosotros también examinamos los efectos del 8-ciclopentilteofilina (CPT), la cual es una sustancia capaz de bloquear la inhibición presináptica inducida por adenosina o ATP observada en neuronas entéricas (Barajas-López *et al.*, 1995). Cuando el CPT fue administrado solo, éste no modificó la amplitud de los gEPSPs. Sin embargo, el CPT desplazó las curvas concentración-respuesta para

ATP hacia la derecha de forma paralela, sin alterar la eficacia de este nucleótido (Fig 17A,B). El efecto del CPT fue dependiente de la concentración. El análisis de Schild de estos resultados (Fig 17C) nos permitió calcular una constante de disociación al equilibrio (K_D) con un valor de 4 nM y una pendiente (0.82 ± 0.16), la cual no es significativamente diferente de la unidad, lo que nos indica que el CPT actúa como un antagonista competitivo sobre los efectos del ATP. La 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX, 30 nM), otra sustancia derivada de la teofilina, bloquea los efectos inhibidores del ATP (10 μ M). Los efectos inhibidores del ATP fueron 67 ± 3.5 y $3 \pm 1.5\%$, antes y en presencia de DPCPX ($n=4$, $P \leq 0.01$). Efectos similares han sido reportado previamente para el DPCPX por Cunha *et al* (1998). Como se esperaba, la concentración de 10 nM de CPT también movió hacia la derecha la curva concentración-respuesta para CADO (un agonista a adenosina) (Fig 17D,E). La IC_{50} para CADO fue de 478 y de 1595 nM antes y en presencia de 10 nM de CPT, respectivamente. Además, asumiendo un antagonismo de tipo competitivo, podemos calcular una K_D de 4.3 nM para CPT sobre los receptores activados por CADO.

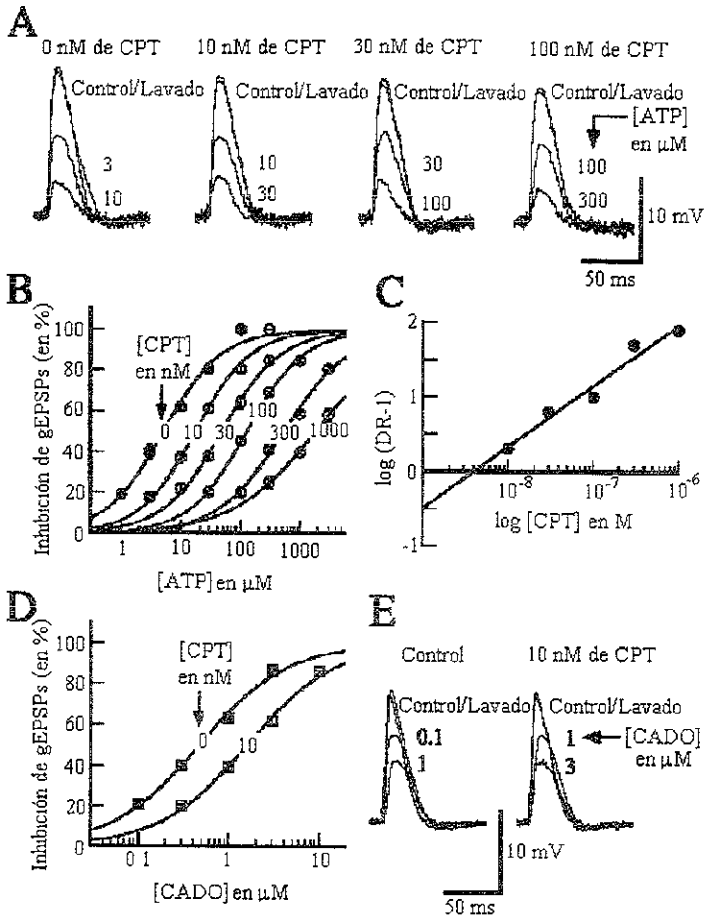


Figura 17. 8-ciclopentilteofilina (CPT) antagoniza la inhibición de los gEPSPs inducida por el ATP, así como la inducida por 2-cloroadenosina (CADO). **A**, efecto del ATP sobre los gEPSPs registrados en la misma neurona en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de CPT. **B**, curvas concentración respuesta de los efectos de ATP obtenidos en ausencia y presencia de cinco concentraciones diferentes de CPT. Los símbolos representan el valor promedio \pm E.S. de los datos obtenidos en cinco neuronas. Las líneas representan el ajuste matemático a una curva sigmoidea. **C**, La curva de Schild se obtuvo a partir de la gráfica mostrada en **B**. **D**, curva concentración respuesta para los efectos de 2-cloroadenosina (CADO) obtenidos en la ausencia ($\text{IC}_{50}=478$ nM) y en la presencia de 10 nM de CPT ($\text{IC}_{50}=1595$ nM). Los símbolos representan el valor promedio \pm E.S. de seis neuronas. **E**, efecto del CADO sobre los gEPSPs registrados de la misma neurona en ausencia y presencia de 10 nM de CPT. Es importante notar que los registros control y de lavado se encuentran superpuestos en los paneles **A** y **E**.

c. El catabolismo del ATP se requiere para sus acciones presinápticas?

La Fig 18 panel superior muestra las curvas concentración respuesta para los efectos inhibitorios del ATP sobre los gEPSPs en la misma neurona piramidal de CA1 (n=6) en ausencia y presencia de la enzima adenosina deaminasa (AD), la cual convierte la adenosina a su metabolito inactivo inosina. La perfusión de esta enzima (2 U/ml) se inició 30 min antes de aplicar el ATP y se mantuvo todo el tiempo que duro la perfusión de ATP. Estos experimentos se realizaron con soluciones "stock" de ATP (10 mM) que fue pre-incubada con AD a una concentración de 10 U/ml por un tiempo de 1-6 hrs. Encontramos que la perfusión de AD *per se*, incrementa la amplitud de los gEPSPs en un 18±1% del valor de los registros control. Sin embargo, AD no alteró la inhibición mediada por ATP de los gEPSPs (Fig 18, panel superior). Cuando los experimentos control fueron realizados con adenosina en lugar de ATP, AD bloqueo completamente los efectos de inhibición mediada por adenosina sobre los gEPSPs (n=3, resultados no mostrados).

La Fig 18 panel inferior muestra los efectos inhibitorios del ATP sobre los gEPSPs en ausencia y presencia de 100 µM α,β-metilen ADP, un potente (K_i = 6 nM) inhibidor ecto-5' nucleotidasa (Naito and Lowenstein, 1985). La perfusión de este inhibidor se inició 30 minutos antes de iniciar la de ATP y se mantuvo durante todo el tiempo de perfusión del ATP. α,β-metilen ADP *per se* provocó una pequeña pero significativa (9±1.0%, P<0.01; n=5) inhibición de los gEPSPs, sin embargo, no alteró el efecto mediado por ATP sobre estos mismos potenciales. Partiendo del hecho de que suramin, PPADS y reactive blue 2, bien caracterizados como antagonistas de receptores P₂, presentan también actividad como inhibidores de las ectonucleotidasas en varios tejidos (Ziganshyn *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996a) y como se describió antes, no tienen ningún efecto sobre las

acciones inhibitorias del ATP. Estos resultados concuerdan con aquellos descritos en párrafos anteriores y sugieren que el efecto de inhibición mediado por el ATP sobre los gEPSPs no son debidos al catabolismo del ATP.

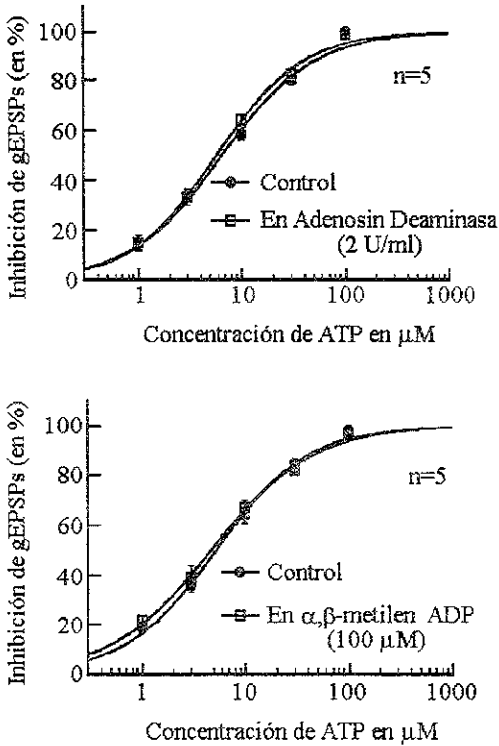


Figura 18. Ni la inhibición de la actividad de las ectonucleotidasas (con α,β -metilen ADP, 100 μ M, panel superior) ni remover la adenosina extracelular (con adenosin deaminasa 2U/ml; panel inferior) modifica los efectos inhibitorios del ATP sobre los gEPSPs. Los símbolos representan el valor promedio \pm E. S. de los datos obtenidos en el número indicado (n) de neuronas piramidales de CA1 del hipocampo. Las líneas continuas representan el ajuste matemático a una curva sigmoidea.

d. Papel de las proteínas de unión a nucleótidos de guanina en los efectos del ATP

Estudios previos han mostrado que la actividad presináptica de la adenosina en el hipocampo es resistente a la toxina pertusis (PTx, Fredholm *et al.*, 1989; Stratton *et al.*, 1989) Los efectos de la PTx sobre la actividad presináptica del ATP se desconoce en el hipocampo En células adrenales cromafines (Kim *et al.*, 1997), sin embargo, esta toxina previene los efectos inhibidores del ATP sobre la exocitosis y sobre las corrientes de calcio En este trabajo, investigamos la posibilidad de que la PTx pueda presentar un efecto diferencial sobre las acciones presinápticas que tienen la adenosina y el ATP en el hipocampo.

Rebanadas de hipocampo de rata fueron incubadas por periodos de 12 a 20 hrs a temperatura ambiente en LCRA (incubación control) o en LCRA más PTx (500 ng/ml y 5 ng/ml) Los periodos largos de incubación, per se no afectan el potencial de membrana, los potenciales de acción, la amplitud de los gEPSPs, ni los efectos inhibitorios del ATP y adenosina (Fig 19A,B y Cuadro II) En las rebanadas pretatadas con PTx, las curvas concentración respuesta para ATP y adenosina fueron significativamente desplazadas hacia la derecha. Este efecto fue mayor para la respuesta mediada por ATP que la mediada por adenosina, por lo que ATP se muestra menos potente que adenosina Después del tratamiento de las rebanadas con 5 µg/ml de PTx, la adenosina se comportó como un agonista completo y la curva concentración respuesta para ATP fue bifásica, con una porción casi horizontal entre las concentraciones de 10 y 30 µM En este punto, nosotros investigamos la hipótesis de que la primera porción de la curva era mediada por la interacción del ATP sobre receptores específicos, mientras que la segunda porción era el resultado del metabolismo del ATP a adenosina En apoyo de esta hipótesis y de acuerdo con nuestras observaciones, el efecto

del ATP es más sensible a PTx que el inducido por adenosina, encontramos que. 1) ATP- γ -s induce una respuesta parcial, produciendo un máximo de efecto similar al inducido por el rango de concentraciones que van de 10 a 30 μ M de ATP y 2) la segunda parte de la curva concentración respuesta de ATP, observada a concentraciones mayores de 100 μ M, es completamente inhibida por la adición de AD (2 U/ml; Fig 19A).

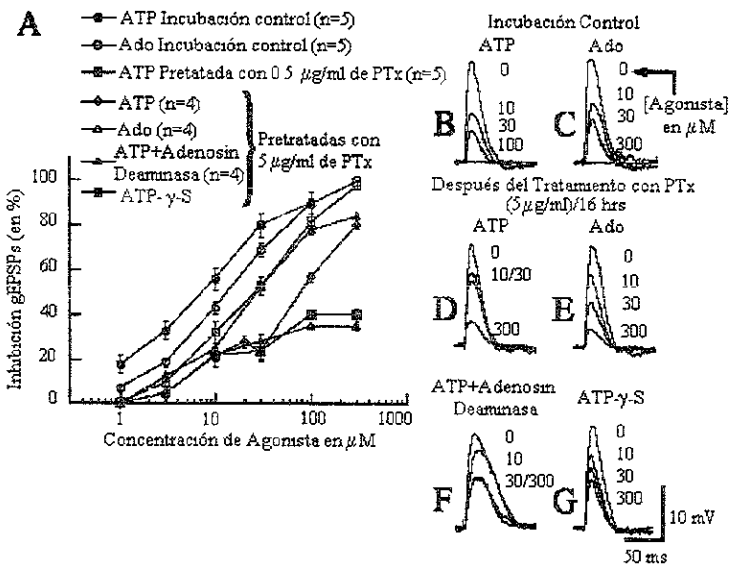


Figura 19. Los efectos inhibitorios del ATP sobre los gEPSPs fueron más sensibles al tratamiento de toxina pertusis (PTx) que los efectos mediados por adenosina (Ado). Cuando las rebanadas fueron tratadas con 0.5 μ g/ml de PTx durante un periodo de 12 a 20 hrs la curva concentración respuesta a ATP fue desplazada hacia la derecha. Después de que las rebanadas fueron tratadas con una concentración más grande de PTx (5 μ g/ml/12-20 hrs), la curva se volvió bifásica. La segunda porción de la curva fue inhibida por la adición de Adenosin Deaminasa (2U/ml) presentando al ATP como un agonista parcial, mientras que la adenosina siguió siendo un agonista completo (ver Tabla II). Los símbolos representan el valor promedio \pm E.S. de los datos obtenidos en el número de neuronas indicado (n). Estos fueron interpolados por líneas. Es importante notar que en el panel F los trazos fueron tomados en presencia de 30 y 300 μ M ATP se encuentra sobre puestos.

Grupo	Agonista		
	ATP	Ado	ATP-g-S
Control	84±2% (n=45)	73±1% (n=42)	79±2% (n=6)
Incubación Control (12-20 hrs.)	80±3% (n=5) NS	71±3% (n=5) NS	—
PTx 0.5 mg/ml/12-20 hrs	53±4% (n=5) ***	—	—
PTx 5 mg/ml/12-20 hrs	23±4% (n=4) ***	53±2% (n=4) ***	24±1% (n=4) ***

Cuadro II. Efecto de inhibición (en %) de 30 mM de ATP, Adenosina (Ado) y ATP-g-s sobre los gEPSPs en neuronas de CA1. La pre incubación de la rabanadas de hipocampo en LCRA con toxina pertusis (PTx) inhibe significativamente la respuesta se estos agonistas, mientras que la incubación control en LCRA no presenta modificación sobre estos parámetros. Los datos fueron tomados de las curvas concentración respuesta mostradas en la figura 1 y 8. Los resultados están expresados en valor promedio ± E.S. Utilizamos la prueba t de Student no pareada para evaluar las diferencias significativas entre los promedios de los grupos control y experimental, ***P<0.005

Investigamos también los efectos de N-metilenmaleimida (NEM), sustancia capaz de desacoplar proteínas G de varios receptores (Smith and Harden, 1984; Shapiro *et al.*, 1994, Wu *et al.*, 1992). Los efectos inhibidores del adenosina y ATP, fueron disminuidos significativamente (P<0.001) por el tratamiento de NEM (100 µM; por 1 h) El efecto inducido

por NEM fue irreversible y no nos permitió distinguir entre los efectos del mediados por ATP y adenosina en la transmisión sináptica Fig 20

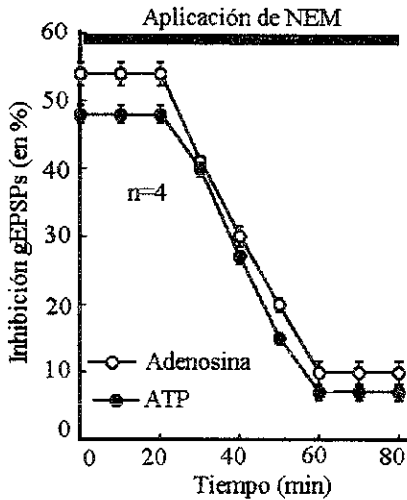


Figura 20. N-etilmaleimida (NEM, 100 μ M) disminuye significativamente los efectos inhibitorios de adenosina (13 μ M) y de ATP (6 μ M) sobre la amplitud de los gEPSPs. Este efecto se inició ~30 min. después de iniciar la perfusión de NEM y alcanzó el máximo efecto ~60 min. La inhibición observada 60 min. después de iniciar el tratamiento de NEM fue significativamente menor comparada con la inhibición al tiempo 0. Los símbolos representan el valor promedio \pm E.S. obtenido de el número de neuronas indicadas (n). Las líneas fueron interpoladas entre los símbolos.

VI.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

a) *Discusión y conclusiones sobre IFN- α .*

En el presente estudio, el IFN- α recombinante humano inhibe el LTP y los gEPSPs en la región CA1 del hipocampo. Este efecto fue independiente de cambios en la excitabilidad neuronal, los receptores NMDA y el LTD. Otro hallazgo fue que la inhibición del LTP por el IFN- α desenmascara al LTD. Lo que indica que la estimulación tetánica de alta frecuencia, usada para inducir el LTP activa las cascadas bioquímicas para el LTP y el LTD.

Nuestras observaciones indican que el IFN- α inhibe a los receptores NMDA que median el LTD en la región CA1 del hipocampo. El LTP registrado aquí fue inducido por medio de una estimulación tetánica de alta frecuencia, la cual ha sido ampliamente usada por otros grupos de investigación, para inducir el LTP mediado por receptores NMDA (O'Dell, T.J. *et al.*, 1991; Bellinger, F.P., *et al.*, 1993), con una duración superior a las dos horas, el cual fue bloqueado por antagonistas de receptores NMDA como el APV, sustancia que no puede prevenirlo una vez que el LTP ha sido establecido, como se ha reportado ampliamente por otros autores (Collingridge, G.L., *et al.*, 1983, Wigstrom, H. y Gustafsson, B., 1986; Hrabetova, S. y Sacktor, T.C., 1997). Finalmente, IFN- α previene y revierte este tipo de LTP pero no afecta los gEPSPs si APV esta presente durante la estimulación tetánica.

Varias de nuestras observaciones indican que la depresión de los gEPSPs inducida por el IFN- α en las rebanadas que han sido estimuladas con un estímulo tetánico, es mis similar al LTD. Primero, la magnitud de esta depresión es similar a la observada durante el LTD inducido una

estimulación de baja frecuencia. Segundo, dicha depresión se observó durante todo el tiempo de registro (mayor a una hora, después de la estimulación tetánica). Finalmente, la depresión inducida por el IFN- α , en la fase de mantenimiento del LTP, fue bloqueada por la presencia de antagonistas a receptores NMDA, como lo es el APV durante la estimulación tetánica. Esta sustancia ha sido mostrada previamente como bloqueador clásico de la fase de mantenimiento del LTP y del LTD (Gean, P.W y Lin, J.H., 1993; Hrabetova, S y Sacktor, T.C, 1997). Estas observaciones implican que se están activando dos cascadas bioquímicas, una responsable del LTP y la otra del LTD con la misma estimulación tetánica usada para inducir el LTP.

La hipótesis de que el IFN- α bloquea el LTP por medio de la inhibición de los receptores NMDA, proviene del hecho de que la apertura del canal del receptor NMDA juega un papel importante en la inducción del LTP en la región CA1 del hipocampo (D'Arcangelo, G, *et al.*, 1991). Sin embargo, nuestras observaciones, descartan esta hipótesis y demuestran que las acciones inhibitorias del IFN- α sobre el LTP son resistentes a bloqueadores de receptores NMDA. Primero, IFN- α también inhibe la fase de mantenimiento del LTP, la cual se sabe es resistente a bloqueadores de receptores NMDA. Segundo, ni esta fase del LTP, ni los efectos inhibitorios del IFN- α sobre el LTP fueron modificados por la presencia de APV, un bloqueador de receptores NMDA. Finalmente, la depolarización inducida por la aplicación de NMDA exógeno tampoco se modifica en presencia de IFN- α . Esta última observación está de acuerdo con hallazgos previos en los que el IFN- α induce una pequeña reducción en las

corrientes inducidas por NMDA en neuronas de hipocampo en cultivo (D'Arcangelo, G , *et al.*, 1991)

Por otra parte, la hipótesis de que el IFN- α bloqueé el LTP e inhiba los gEPSPs a través de un mecanismo que involucra la actividad de una cinasa de la tirosina, se desprende del hecho que esta citokina se una a un receptor acoplado a una cinasa de la tirosina, para ejercer sus efectos biológicos (Patterson, P.H. y Nawa, H , 1993, Rothwell, N.J. y Relton, J.K., 1993) En el presente trabajo, nosotros mostramos que la genisteina bloquea el efecto del IFN- α , para apoyar dicha hipótesis. Estudios previos, muestra que la genisteina puede bloquear la actividad de la cinasa de la tirosina en la región CA1 sin afectar la actividad de las principales enzimas con actividad cinasa presentes en el hipocampo, como son la PKA y PKC (O'Dell, T.J *et al* , 1991) En el presente estudio, nosotros observamos que el tratamiento con genisteina no modifica la fase de mantenimiento del LTP, lo que implica que la actividad de las cinasa A y C no es inhibida, partiendo de que es ampliamente conocido que su actividad es requerida para la fase de mantenimiento del LTP (O'Dell, T.J. *et al* , 1991; Malenka, R.C y Nicoll, R.A., 1999) Además, los efectos de la genisteina están mediados por la inhibición de la actividad de la cinasa de la tirosina.

Por lo menos dos observaciones indica que el IFN- α inhibe los gEPSPs por un mecanismo que involucra receptores AMPA y KA. Primero, IFN- α no modifica la depolarización inducida por la aplicación de NMDA exógeno, ni los gEPSPs controles, ni los gEPSPs registrados durante

la fase de mantenimiento del LTP son modificados por el APV, un antagonista de receptores NMDA bien conocido. Sin embargo, los gEPSPs son totalmente bloqueados por el ácido kinurenico, un antagonista de los receptores ionotrópicos a glutamato. Los efectos inhibitorios del IFN- α son, por lo menos en parte, postsinápticos como lo indica el hecho de que las depolarización potenciada y no potenciada, inducidas por la aplicación de glutamato exógeno fueron inhibidas por la aplicación de esta citokina.

La estimulación tetánica potencia la depolarización inducida por la aplicación local de glutamato exógeno, pero esta depolarización es más chica en amplitud comparada con la amplitud de los gEPSPs. Se sabe que el LTP está restringido al circuito sináptico que recibe el estímulo tetánico (Lynch, G.S., *et al.*, 1977) lo que puede explicar las diferencias en estas potenciaciones. De esta forma, el efecto del glutamato aplicado de forma exógena puede producir efectos a través de los receptores localizados en la membrana de las células que se encuentre en las regiones que no fueron estimuladas durante la aplicación del tatanos. En conclusión, el IFN- α inhibe los potenciales sinápticos mediados por receptores no NMDA, vía una acción postsináptica que involucra la inhibición de la actividad de la cinasa de la tirosina, efecto que no involucra la alteración de la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1. Esta inhibición es de larga duración después de haber inducido el LTP. Nuestras observaciones también indican que la estimulación tetánica de alta frecuencia, usada para inducir el LTP, puede activar también la cascada metabólica responsable del LTD. Esta

posibilidad debe ser considerada en estudios en los cuales se analiza la correlación de la actividad bioquímica y la plasticidad sináptica en el hipocampo.

b) Discusión y conclusiones sobre ATP

Nuestro principal hallazgo es que los nucleótidos pueden inhibir directamente la liberación sináptica de glutamato en las terminales sinápticas de las neuronas de la region CA1 hipocampo. La evidencia de que los efectos del ATP estasn mediados a través de su metabolito adenosina fue abservada sólo cuando se usaron altas concentraciones de ATP y sólo después del tratamiento con PTx. Este efecto parece estar mediado por receptores P2Y (receptores acoplados a proteínas G), los cuales tienen propiedades farmacológicas similares a aquellos descritos en neuronas periféricas, los cuales previamente fueron denominados como purinoreceptores (P3).

El catabolismo del ATP no se requiere para la inhibición presináptica inducida por ATP.

La hidrólisis del ATP a adenosina no se requiere para la inhibición de los gEPSPs inducida por ATP en la región CA1 del hipocampo. Primero, ATP, AMP y ATP- γ -s son más potentes que adenosina. Segundo, las curvas concentración respuesta para ATP y ATP- γ -s no fueron diferentes significativamente, partiendo del hecho de que ATP- γ -s es hidrolisado más lentamente que el ATP en las rebanadas de hipocampo (Cunha *et al.*, 1998). Tercero, inhibidores del α,β -metilen ADP (Naito and Lowenstein, 1985), suramin, PPADS, y reactivo blue 2 (Ziganshin *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996a) no modificaron el efecto del ATP. Finalmente, AD bloquea el efecto de la adenosina, como era de esperarse, pero no modifico

los efectos inducidos por el ATP. Estos resultados indican que la hidrólisis del ATP a adenosina no se requiere para observar los efectos inhibidores del ATP sobre los gEPSPs y que los nucleótidos *per se* son los responsables de los efectos sobre la transmisión sináptica. Nuestros resultados apoyan la idea de que el ATP actúa a través de su propio receptor.

La degradación de ATP a adenosina ocurre en nuestras rebanadas, como previamente fue reportado por Cunha et al. (1998). Esto sin embargo, fue sólo evidente en las rebanadas pretratadas con PTx, cuando la curva concentración respuesta fue bifásica, la segunda fase de esta curva (observada con concentraciones $\geq 100 \mu\text{M}$) donde es completamente bloqueada por AD. Después del tratamiento con PTx, el ATP provoca una inhibición máxima de los gEPSPs de sólo el 40% en presencia de esta enzima, apoyando la idea de que la segunda fase de esta curva parece estar mediada por la producción de adenosina a partir del ATP. De acuerdo con esta interpretación, la curva concentración respuesta para ATP-g-s (un análogo del ATP lentamente degradable) no presenta la segunda fase AD bloquea el efecto de la adenosina exógena y la segunda fase de la curva concentración respuesta del ATP (después del tratamiento con PTx) demuestran que la actividad y la difusión de esta enzima en nuestra preparación biológica. Todas estas observaciones, y aquellas discutidas anteriormente sugieren que el metabolismo del ATP a adenosina ocurre en las rebanadas de cerebro, pero que este hecho no es requerido normalmente para observar las acciones inhibitoras del ATP sobre los gEPSPs

La falta de efecto de la AD y la α,β -metilen ADP sobre los efectos del ATP no concuerdan con los reportados por Cunha *et al.*, (1998), quien encontró que estas dos sustancias previenen el efecto del ATP sobre los gEPSPs. Estas discrepancias, pueden ser el resultado de diferencias en los protocolos experimentales. Por ejemplo, ellos registraron a 30°C mientras que nosotros registramos en un rango de 35-36°C. La temperatura podría afectar la disponibilidad de adenosina fuera de las células por la modificación no sólo de su producción sino también de su transporte. Otra diferencia es que nosotros realizamos registros intracelulares mientras que estos autores registraron extracelularmente. Nosotros registramos y analizamos el efecto de los nucleótidos, en neuronas con características estándar a las células piramidales de CA1, por ejemplo, con potenciales de membrana mayores a -55 mV potenciales de acción con una amplitud de ≥ 60 mV. En contraste durante los registros extracelulares, la actividad neuronal es realmente el promedio de varias espigas. Nosotros siempre medimos los gEPSPs al mismo valor de potencial de membrana, alrededor del potencial de equilibrio de potasio, para evitar cambios en la actividad sináptica. Ya que cambios en el potencial de membrana sin fijación debidas a la actividad postsináptica de cualquier maniobra experimental puede afectar indirectamente la transmisión sináptica, la cual no es evaluada durante los registros extracelulares. Finalmente, nosotros realizamos nuestros experimentos en presencia de picrotoxina para evitar la transmisión sináptica mediada por receptores GABA_A, a diferencia de Cunha *et al.*, (1998).

Ross et al, (1998) reportó evidencias experimentales apoyando la hipótesis de que el AMP es la sustancia que se encontraba mediando los efectos del ATP sobre la actividad epileptiforme en la región de CA3 del hipocampo de rata. Aquí mostramos que tanto el AMP y el ADP también inhiben los gEPSPs, lo que indica que estos metabolitos también pueden contribuir a las acciones del ATP.

La inhibición presináptica inducida por ATP está mediada por receptores acoplados a proteínas G, los cuales son diferentes a aquellos activados por adenosina.

Varias observaciones indican que los efectos de los nucleótidos sobre los gEPSPs están mediados por receptores acoplados a proteínas G. Primero, la cinética del efecto de los nucleótidos que es relativamente lenta y la falta de desensibilización que presentan los nucleótidos e sus efectos. Segundo la incapacidad del suramin y PPADS para afectar los efectos inducidos por el ATP. Estos antagonistas, se consideran como bloqueadores de los receptores P2X (ionotrópicos) en neuronas de hipocampo, (Pankratov *et al.*, 1998, Baljit *et al.*, 1999). Algunos receptores homoméricos P2X formados por P2X4 o P2X6 no son sensibles a suramin ni a PPADS, sin embargo, evidencias recientes sugieren que la subunidad P2X4 no es el subtipo primario del receptor P2X en neuronas hipocampales (Baljit *et al.*, 1999). Tercero, el efecto presináptico del ATP fue inhibido por PTx y NEM, sustancias que pueden alterar las respuestas mediadas por varios receptores acoplados a proteínas G (Smith and Harden, 1984, Shapiro *et al.*, 1994, Barajas-López *et al.*, 1996, Wu *et al.*, 1992). Los receptores a nucleótidos acoplados a proteínas G, son los receptores P2Y, de acuerdo a la nomenclatura actualmente usada (Abbracchio and Burnstock 1994, Fredholm *et al.*, 1994).

La PTx afectó más los efectos presinápticos del ATP y del ATP- γ -s, que aquellos inducidos por adenosina. Incluso, adenosina se mostró más potente que los primeros nucleótidos después del tratamiento con PTx. Esto indica que las proteínas G que median las acciones del ATP son diferentes de las que median las acciones presinápticas de la adenosina. Estas observaciones podrían también implicar que estos nucleótidos están activando receptores diferentes a los de adenosina

Las acciones presinápticas de adenosina en las neuronas del hipocampo se cree que están mediadas por la activación de receptores A₁ (Dunwiddie and Fredholm, 1989; Scholz and Miller, 1991, Fredholm, 1990, Fredholm *et al.*, 1989). Algunos efectos de adenosina mediados por este receptor son sensibles a los efectos de la PTx (Barajas-López *et al.*, 1996, Dolphin and Prestwich, 1985, Scholz and Miller, 1992; Silinsky *et al.*, 1990) pero no en todas las preparaciones (Barajas-López *et al.*, 1996; Broad *et al.*, 1993, Fredholm *et al.*, 1989). Nosotros encontramos que los efectos presinápticos de la adenosina sólo disminuyen un porcentaje bajo cuando se emplean concentraciones altas de PTx (5 μ g/ml) y cuando se emplean aplicaciones relativamente largas (16 h). De acuerdo con nuestro estudio, análisis previos han encontrado que las acciones presinápticas de los nucleótidos son fuertemente resistentes a PTx (Fredholm *et al.*, 1989, Stratton *et al.*, 1989). Incluso, la inyección intrahipocámpal de PTx puede prevenir el efecto de la adenosina en rebanadas de hipocampo, sólo cuando se aplican ≥ 1 μ g y sólo cuando esta aplicación se realiza de 3 a 8 días antes de medir los efectos de adenosina (Stratton *et al.*, 1989). En preparaciones de neuronas de

hipocampo en cultivo, 250 ng/ml de PTx pueden prevenir significativamente los efectos presinápticos de agonistas de receptores A1 (Scholz and Miller, 1991), lo que sugiere que la difusión de la PTx a la región subcelular donde se encuentra localizados los receptores a adenosina puede ser diferente en la rebanada, comparada con su disposición en el cerebro integro. Nuestras observaciones de que los efectos del ATP y el ATP- γ -s son preferentemente más afectados por la PTx que las acciones de adenosina sugieren que los receptores a los nucleótidos y los de adenosina en el hipocampo están localizados en diferentes regiones subcelulares. Otra explicación alternativa, es que la cantidad de receptores a adenosina en la rebanada y en el cerebro intacto es más grande que la existente para los nucleótidos, por lo tanto los receptores a adenosina serían menos sensibles a PTx.

El receptor presináptico de ATP es sensible a análogos de teofilina.

El receptor a nucleótidos presente en las fibras colaterales de Schaffer (presente estudio) tiene propiedades farmacológicas similares a aquellos P3-purinoreceptores (ver introducción). Así, CPT se caracterizó como un antagonista competitivo y potente ($K_D=4$ nM) de los receptores que median el efecto de ATP sobre los gEPSPs. Esta K_D es virtualmente la misma para CPT descrita para receptores A1 de adenosina (Fredholm *et al.*, 1994; Dunwiddie and Fredholm, 1989). Debido a las razones discutidas anteriormente, es poco probable que el ATP este actuando a través de receptores de adenosina y además, creemos que el CPT no es una herramienta adecuada para distinguir entre los receptores presinápticos activados por

adenosina y por ATP en la sinápsis hipocampal, como ya se había notado previamente en las neuronas de la submucosa (Barajas-López *et al.*, 1995). Tomando en cuenta que los receptores descritos aquí son activados por nucleótidos, parecen estar unidos a una proteína G (debido a que son PTx y NEM sensibles) y debido a que son sensibles a derivados de teofilina, nosotros proponemos clasificarlos como receptores P2Y teofilina sensibles.

La sensibilidad a PTx, también sugiere que ATP puede inhibir los gEPSPs por una disminución en las corrientes de calcio y/o en la actividad de la adenilato ciclasa. Esta hipótesis esta basada en el hecho de que se sabe que PTx tiene como blancos especifica mente a las proteínas Gi y Go, las cuales inhiben la activación de la adenilato ciclasa y a los canales de calcio, respectivamente (ver Hille, 1992). De acuerdo con esta hipótesis los receptores de ATP pueden inhibir las corrientes de calcio, exocitosis (Lim *et al.*, 1997), y la actividad de la adenilato ciclasa. La presencia de receptores P2 insensibles a suramin y acoplados de forma inhibitoria con la adenilato ciclasa ya ha sido reportado en hepatocitos (Tomura *et al.*, 1992) y en células PC12 (Murayama *et al.*, 1998).

Sobre el receptor P2Y sensible a teofilina presente en las terminales nerviosas de la región CA1 del hipocampo, los siguientes nucleótidos α,β -metilen-ATP, β,γ -metilen ATP, UTP, GTP, y 2-Me-S-ATP parecen ser menos efectivos que ATP. Dentro de los agonistas completos, podemos hablar del siguiente orden de potencia. AMP = ATP = ATP- γ -S > adenosine = ADP. Antagonistas de receptores P2 como suramin, PPADS y reactive blue 2,

fueron inactivos sobre este tipo de receptor. Además presentan el mismo perfil farmacológico de aquellos descritos en neuronas de la submucosa (Barajas-López *et al.*, 1995).

En conclusión, las fibras presinápticas en la región CA1 del hipocampo expresan receptores a ATP cuya activación inhibe la liberación presináptica de glutamato. Estos receptores parecen pertenecer a la familia de receptores P2Y (acoplados a proteínas G), los cuales son sensibles a los derivados de teofilina.

VIII.- BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Abbraccio, M.P. y Burnstock, G., (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?. [Review] *Pharmacology & Therapeutics* 64: 445-475
- Adams, F., Quesada, J.R.; Guttermann, J.V. Neuropsychiatric manifestations of human leukocyte interferon therapy in patients with cancer. *JAMA*. 252:938-941, 1984.
- Amaral, D.G. y Witter, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation. A review of anatomical data *Neuroscience.*, 3,31 (1989) 571-591.
- Andersen, P. Synaptic integration in hippocampal CA1 pyramids. In *Progress in Research*, (J. Storm-Mathisen, J. Zimmer y O.P. Ottersen, Eds.), Elsevier Science Publishers B V, 83, (1990) 215-222.
- Baljit, S.K., Proctor, W.R., Dunwiddie, T.V., Labarca, C. y Lester, H.A., (1999) Allosteric Control of Gating and Kinetics at P2X4 Receptor Channels *J Neurosci*. 19 7289-7299
- Barajas-López, C., Surprenant, A y North, R.A., (1991) Adenosine A₁ and A₂ receptors mediate presynaptic inhibition and postsynaptic excitation in guinea pig submucosal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258. 490-495.
- Barajas-López, C., Muller, M.J., Prieto-Gómez, B y Espinosa-Luna, R., (1995) ATP inhibits the synaptic release of acetylcholine in submucosal neurons *J Pharmacol. Exp Ther* 274 1238-1245
- Barajas-López, C., Peres, A.L y Espinosa-Luna, R., (1996) Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons *Am J Physiol* 271 C264-C275
- Bean, B.P. y Friel, D.D., ATP-activated channels in excitable cells. In *Ion channels*, Vol 2 (Narahashi, T., ed) pp 169-203 Plenum Publishing Corp New York, 1990
- Bellinger, F.P., Madamba, S and Siggins, G.R., Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus, *Brain Res.*, 19,628 (1993) 227-234
- Bliss, T.V.P. y Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path *J. Physiol (London)*, 232 (1973) 331-356
- Bocci, V., Central nervous system toxicity of interferons and other cytokines [Review], *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 2 (1988) 107-118
- Broad, R.M., McDonald, T.J., y Cook, M.A., (1993) Adenosine and 5-HT inhibit substance P release from nerve endings in myenteric ganglia by distinct mechanisms *Am. J Physiol* 264 G454-G461
- Brown, T.H. y Zador, A.M. In *The synaptic organization of the brain. Molecular*, (ed J.E. Chad y H.V. Wheal), Chapter 11, Hippocampus, p.p 346-388. IRL Press at Oxford University Press, (1991).
- Burnstock, G., (1990): Overview. Purinergic mechanisms. *Ann. NY Ac. Sci* 603: 1-18.
- Burnstock, G. y Kennedy, C., A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent. *Circ Res* 58 (1985) 319-391.

- Cajal, S Ramón y *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertèbre*. Paris Maloine
- Chen, B.C., Lee, C.M. y Lin, W.W., (1996a) Inhibition of ecto-ATPase by PPADS, suramin and reactive blue in endothelial cells, C6 glioma cells and RAW 264.7 macrophages *Br J. Pharmacol.* **119** 1628-1634
- Chen, W., Wieraszko, A, Hogan, M.V., Yang, H.A., Kornecki, E. y Ehrlich, Y.H., (1996b) Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation *Proc Natl Acad. Sci USA* **93**. 8688-8693.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J and McLennan, H., Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus, *J. Physiol (Lond)*, **334** (1983) 33-46.
- Collo, G., North, R.A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E, Neidhart, S., Suprenant, A. y Buell, G., Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels *J. Neurosci.*, **16** (1996) 2495-2570
- Cunha, R.A, Ribeiro, J.A. y Sebastião, A.M., (1994) Purinergic modulation of the evoked release of [³H]acetylcholine from hippocampus and cerebral cortex of the rat: role of the ectonucleotidases. *Eur. J Neurosci* **6**: 33-42
- Cunha, R.A, Sebastiao, A.M. y Ribeiro, J.A., (1998) Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors *J Neurosci* **18** 1987-1995
- D'Arcangelo, G, Grassi, F, Ragozzino, D., Santoni, A, Tancredi, V. and Eusebi, F, Interferon inhibits synaptic potentiation in rat hippocampus, *Brain Res*, **564** (1991) 245-248.
- Dafny, N., Is interferon-alpha a neuromodulator? *Brain Res Rev*, **26** (1998) 1-15
- Dale, H.H. Pharmacology and nerve endings, *Proc R Soc Med* **28** (1935) 319-332.
- Dalziel H.H y Westfall, D.P (1994) Receptors for adenine nucleotides and nucleosides subclassification, distribution, and molecular characterization. [Review]. *Pharmacol Rev* **46** 449-466.
- Dolphin, A.C y Prestwich, S.A, (1985) Pertussis toxin reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release *Nature* **316** 148-150
- Dunwiddie T.V y Fredholm, B.B (1989) Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249**. 31-37
- Dunwiddie, T.V, Diao, L y Proctor, W.R. (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus *J Neurosci.* **17** 7673-7682
- Edwards, F.A., Konnerth, A, Sakmann, B y Takahashi, T. (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* **414** 600-612.
- Edwards, F.A., Gibb, A.J y Colquhoun, D, (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system *Nature* **359** 144-147

- Eizirik, D L ; Cagliero, E. Interleukin-1 beta induces the expression of an isoform of nitric oxide synthase in insulin-producing cells, wich is similar to that observed in activated macrophages. *FEBS Lett* 308 249-252,1992.
- Elenkov, I J ; Kovacs, K. Presynaptic inhibitory effect on TNF-alpha on the release of noradrenaline in isolated median eminence *J Neuroimmunol* 41:117-120,1992
- El-Moatassim, C., Dornand, J. y Mani, J C., Extracellular ATP and cell signalling, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1134 (1992) 31-45.
- Evans, R.J., Derkach, V y Surprenant, A., (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357: 503-505.
- Forsyth, K M , Bjur, R.A y Westfall, D P , (1992) Nucleotide modulation of norepinephrine release from sympathetic nerves in the rat vas deferens *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256 821-826
- Fredholm, B.B y Dunwiddie, T V., (1988) How does adenosine inhibit transmitter release? [Review] *TIPS* 9. 130-134
- Fredholm, B.B., Proctor, W , Van der Ploeg, I y Dunwiddie, T V., (1989) In vivo pertussis toxin treatment attenuates some, but not all, adenosine A₁ effects in slices of the rat hippocampus *Eur J Pharmacol* 172: 249-262
- Fredholm B B , (1990) Adenosine A₁-receptor-mediated inhibition of evoked acetylcholine release in the rat hippocampus does not depend on protein kinase C. *Acta Physiol. Scand* 140. 245-255.
- Fredholm, B B , Abbracchio, M.P , Burnstock, G., Daly, J W., Harden, T.K , Jacobson, K H., Leff, P y Wilhams, M., (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors [Review]. *Pharmacol Rev.* 46. 143-156.
- Gean, P W and Lin, J H , D-2-amino-5-phosphonovalerate blocks induction of long-term depression of the NMDA receptor-mediated synaptic component in rat hippocampus, *Neurosci Lett* , 158 (1993) 170-172
- Gaillard, T, Mulsch, A Regulation by prostaglandin E2 of citokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages. *Biol Chemm. Hopp. Seyler.* 373 897-902, 1992.
- Hammond, C Cellular and Molecular Neurobiology Academic Press, p 453, 1996
- Henderson, G Pharmacological analysis of synaptic transmission in brain slice In *Electrophysiology. Part II: Synaptic transmission* (Wallis, D.I., ed), Cardiff, UK, pp. 89-107, (1992).
- Hille, B. Ionic channels of excitable membranes, Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 1992.
- Hofman, F M ,, *Citokines in central nervous system disease* In: Goetz, E.J ; Spector, N.H Eds. *Neuroimmune Networks: Physiology of Diseases* Alan R. Liss Inc., p.p. 65-71, 1989.
- Hrabetova, S. and Sacktor, T C., Long-term potentiation and long-term depression are induced through pharmacologically distinct NMDA receptors, *Neurosci. Lett.*, 226 (1997) 107-110.
- Inoue, K . The functions of ATP receptors in the hippocampus , *Pharmacological Res*, 38 (1998)5 324-331.

- Inoue, K., Koizumi, S y Ueno, S., Implications of ATP receptors in brain functions *Progress in Neurobiol.* 50 (1996) 483-492.
- Kandel, ER Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality In Principles of neural science (E.R. Kandel y J.H. Schwartz eds.) New York Raven Press, pp.243-255, (1995)
- Laezza, F., Doherty, JJ and Dingledine, R., Long-term depression in hippocampal interneurons: joint requirement for pre- and postsynaptic events. *Science*, 285 (1999) 1411-1414
- Lawrence, G.M Interleukin-1 augments gamma-aminobutyric acid A receptor function in *Brain. Mol. Pharmacol.* 39 105-108, 1991.
- Lim, W., Kim, S.J., Yan, H.D. y Kim, J., (1997) Ca²⁺-channel-dependent and -independent inhibition of exocytosis by extracellular ATP in voltage-clamped rat adrenal chromaffin cells *Pflügers Arch.* 435 34-42
- Lynch, G.S., Dunwiddie, T. and Gribkoff, V., Heterosynaptic depression a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature*, 266 (1977) 737-739
- Malenka, R.C., Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD, *Cell*, 78 (1994) 535-538
- Malenka, R.C and Nicoll, R.A., Long-Term Potentiation—A Decade of Progress?, *Science*, 285 (1999) 1870-1874
- Mahnow, R y Miller, J.P., (1986) Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. *Nature* 320: 529-530.
- Madison, D.V Whole-cell voltage-clamp techniques applied to the study of synaptic function in hippocampal slices In Cellular neurobiology. A practical approach: Part II Whole-cell recording and isolation of ionic currents (Chad, J y Wheal, H., eds.) Bassett Cres, UK. Pp 137-149, (1993)
- Mayford, M., Wang, J, Kandel, ER y O'Dell, T.J CaMKII regulates the frequency response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP, *Cell*, 81 (1995) 891-904
- Murayama, T, Yakushi, Y, Watanabe, A y Nomura, Y (1998) P2 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in PC12 cells *Eur. J Pharmacol* 348 71-76.
- Mendoza-Fernandez, V., Andrew, R.D and Barajas-López, C., ATP inhibits the synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293 (2000) 172-179.
- Minc-Glonb, D., Tsarfaty, I. Expression of inducible nitric oxide synthetasa by neurons following exposure to endotoxin and cytokine *Br. J. Pharmacol.* 112 720-722, 1994.
- Naito, Y y Lowenstein, J.M., (1985) 5'-Nucleotidase from rat heart membranes Inhibition by adenne nucleotides and related compounds. *Biochem J.* 226. 645-651
- Nicoll, R.A., Kauer, J.A and Malenka, R.C., The current excitement in long-term potentiation, *Neuron*, 1 (1988) 97-103

- O'Dell, T.J., Kandel, E.R. and Grant, S.G., Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors, *Nature*, 353 (1991) 558-560
- Oliet, H.R.S., Malenka, R.C. y Nicoll, R.A., Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells, *Neuron*, 18 (1997) 969-982.
- Pankratov, Y., Castro, E., Miras-Portugal, M.T. y Krishtal, O., (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 10 3898-3902
- Patterson, P.H. and Nawa, H., Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity, *Cell*, 72 Suppl (1993) 123-137.
- Perry, V.H., Bell, M.D., Brown, H.C. and Matyszak, M.K., Inflammation in the nervous system., *Curr. Op. Neurobiol.*, 5 (1995) 636-641
- Plata-Salaman, C.R., Immunoregulators in the Nervous System, *Neurosci Biobehav. Rev.*, 15 (1991) 185-215
- Plata-Salaman, C.R. y French-Mullen, J.M. interleukin-1 beta depresses calcium currents in CA1 hippocampal at pathophysiological concentrations. *Brain. Res. Bull.* 29: 221-223, 1992.
- Prieto-Gomez, B., Reyes-Vazquez, C. and Dafny, N., Differential effects of interferon on ventromedial hypothalamus and dorsal hippocampus, *J Neurosci Res.*, 10 (1983) 273-278
- Ross, F.M., Brodie, M.J. y Stone, T.W., (1998) Adenosine monophosphate as a mediator of ATP effects at P1 purinoceptors *Br J Pharmacol* 124 818-824.
- Rothwell, N.J. and Reiton, J.K., Involvement of Cytokines in Acute Neurodegeneration in the CNS, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 17 (1993) 217-227
- Sarnat, H.B. y Netsky, M.G. Evolution of the nervous system. New York. Oxford University Press, (1981)
- Satoh, T. y Nakamura, S. Induction of neuronal differentiation in PC 12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin-6 *Mol Cell Biol* 8: 3546-3549, 1988
- Shen, K.Z. y North, R.A. Excitation of rat locus coeruleus neurons by adenosine 5'-triphosphate ionic mechanism and receptor characterization. *J Neurosci* 13 (1993) 894-899.
- Shepherd, G.M., *Neurobiology*, Second edition, New York. Oxford university press, pp 145-176, (1988).
- Scholz, K.P. y Miller, R.J., (1991) Analysis of adenosine actions on Ca^{2+} currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *J. Physiol. (Lond)* 435 373-393.
- Scholz, K.P. y Miller, R.J., (1991) Inhibition of quantal transmitter release in the absence of calcium influx by a G-protein-linked adenosine receptor at hippocampal synapses. *Neuron*. 8. 1139-1150
- Shapiro, M.S., Wollmuth, L.P. y Hille, B., (1994) Modulation of Ca^{2+} channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *J. Neurosci* 14: 7109-7116

- Shinozuka, K., Bjur, R.A. y Westfall, D.P., (1988) Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* **338**: 221-227
- Silinsky, E.M. y Ginsborg, B.L. (1983) Inhibition of acetylcholine release from preganglionic frog nerves by ATP but not adenosine. *Nature* **305**: 327-328
- Silinsky, E.M., Hunt, J.M., Solsona, C.S. y Hirsh, J.K., (1990) Prejunctional adenosine and ATP receptors. *Ann. NY Ac Sci* **603**: 324-333.
- Silinsky, E.M. y Gerzanich, V., (1993) On the excitatory effects of ATP and its role as a neurotransmitter in coeliac neurons of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* **464**: 197-212.
- Smith, M.M. y Harden, T.K. (1984) Modification of receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in NG108-15 neuroblastoma X glioma cells by n-ethylmaleimide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **228**: 425-433.
- Stevens, C.F. Quantal Release of neurotransmitter and long-term potentiation, *Cell* **72/Neuron**, **10** (Suppl.), (1993) 55-66.
- Stratton, K.R., Cole, A.J., Pritchett, J., Eccles, C.U., Worley, P.F. y Baraban, J.M., (1989) Intrahippocampal injection of pertussis toxin blocks adenosine suppression of synaptic responses. *Brain Res.* **494**: 359-364.
- Taylor, S.J. Tseng, M.T. Eds. *Brain Slices: Fundamentals, Applications and Implications* (Karger, Basel 1987) Cof. Louisville, Ky, p 189, 1986.
- Tomura H., Okajima, F. y Kondo, Y., (1992) Discrimination between two types of P2 purinoceptors by suramin in rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **226**: 363-365
- Von Kugelgen, I., Schoffel, E. y Starke, K., (1989) Inhibition by nucleotides acting at presynaptic P₂-receptors of sympathetic neuro-effector transmission in the mouse isolated vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* **340**: 522-532
- Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B.F. y Burnstock, G., Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* **324** (1993) 219-225
- Wigstrom, H. and Gustafsson, B., Postsynaptic control of hippocampal long-term potentiation, *J de Physiol.*, **81** (1986) 228-236
- Wu Y.N., Yang, Y.C. y Wagner, P.D., (1992) Modification of chromaffin cells with pertussis toxin or N-ethylmaleimide lowers cytoskeletal F-actin and enhances Ca²⁺-dependent secretion. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 8396-8403
- Ziganshin, A.U., Ziganshina, L.E., Bodin, P., Bailey, D. y Burnstock, G., (1995) Effects of P2-purinoceptor antagonists on ecto-nucleotidase activity of guinea-pig vas deferens cultured smooth muscle cells. *Biochemistry & Molecular Biology International* **36**: 863-869

Research report

Interferon- α inhibits long-term potentiation and unmasks a long-term depression in the rat hippocampus

Victor Mendoza-Fernández, R. David Andrew, Carlos Barajas-López*

Department of Anatomy and Cell Biology, Botterell Hall, Ninth Floor, Queen's University, Kingston, Ontario K7L 3N6, Canada

Accepted 15 August 2000

Abstract

Interferons (IFN) appear to have various neuromodulatory actions. Here, we characterized the actions of IFN- α on the electrophysiological properties of CA1 hippocampal neurons using intracellular recordings. Superfusion of this cytokine did not alter the resting membrane potential, cell input resistance, action potentials, nor GABA-mediated fast synaptic potentials. IFN- α inhibited glutamate-mediated excitatory postsynaptic potentials (gEPSPs) and reversed or prevented long-term potentiation (LTP) induced by high-frequency tetanic stimulation. IFN- α reduced gEPSP amplitude far below its control value. Only a short-term potentiation (STP) was observed when either IFN- α or D-2-amino-5-phosphonovalerate (APV; NMDA receptor antagonist) were present during tetanic stimulation. After this STP in presence of APV, IFN- α had no effect on gEPSPs. APV had no effect on LTP when applied after tetanic stimulation and did also not prevent IFN- α effect on LTP. Genistein (a tyrosine kinase inhibitor) or heat inactivation prevented IFN- α effects. IFN- α also decreased the depolarization induced by local application of glutamate but did not modify those induced by NMDA. Similarly, IFN- α reversed the potentiation (induced by tetanic stimulation) of glutamate-induced depolarizations. IFN- α did not affect long-term depression (LTD) induced by low-frequency tetanic stimulation. In conclusion, IFN- α -induced inhibition of LTP is, at least in part, mediated by a postsynaptic effect, by tyrosine kinase activity, and by non-NMDA glutamate receptors. Inhibition of LTP by IFN- α unmasks LTD which is induced by the same high-frequency tetanic stimulation. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Theme: Excitable membranes and synaptic transmission

Topic: Long-term potentiation pharmacology

Keywords: Long-term potentiation; Long-term depression; Interferon- α ; Hippocampus; Electrophysiology; Synapse

1. Introduction

Interferons are well-known immunomodulators that are released from various types of cells during viral infections. In the brain, these and other cytokines can be synthesized and released by glial and neuronal cells [18,19,22]. In addition, various neurological side effects are common during IFN- α therapy including: fever, anorexia, fatigue, behavioral changes, alteration of sleep patterns, mood alterations, and impaired learning and memory. These observations suggest that these cytokines directly affect the central nervous system [2,5,20]. In agreement, interferons affect specific neuronal properties in peripheral and central

nervous systems indicating a neuromodulatory role for these cytokines [2,5,20].

The effects of interferon- α (IFN- α) on the hippocampal electrical activity was first reported by Prieto-Gómez et al. [21], who found that the microiontophoretic application of IFN- α produced an increase of the action potential frequency in dorsal hippocampal neurons. This suggests the hypothesis that IFN- α modulates the excitability of hippocampal neurons. Later D'Arcangelo et al. [4] found that rat IFN- α inhibits long-term potentiation (LTP) in the CA1 hippocampal region and decreases, at relatively high concentrations, basal synaptic transmission.

LTP and long-term depression (LTD) are two well-known experimental models of neural plasticity in the CNS which are thought to play a role in memory [11–13]. The biochemical cascades that support these changes in synaptic strength have been recently reviewed [11,12]. It is

*Corresponding author. Tel.: +1-613-533-2861, fax: +1-613-533-2566.

E-mail address: barajasc@meds.queensu.ca (C. Barajas-López).

generally accepted that activation of several kinases are essential for the development of LTP and this is seen with stimuli that produce relatively high concentrations of intracellular calcium. An increase in the activity of several protein phosphatases, on the other hand, appear to be part of the biochemical events responsible for LTD, which is induced with stimuli that produce a low to moderate increase in the intracellular calcium concentration. A relatively low-frequency stimulation of the glutaminergic fibres that innervate CA1 neurons is known to induce LTD, whereas their stimulation at higher frequency induces LTP.

In the present study, we characterized the effects of IFN- α on the electrophysiological properties of CA1 neurons using intracellular recordings. Our evidence indicates that this cytokine inhibits specifically LTP and glutamate excitatory postsynaptic potentials without LTD, membrane excitability, or synaptic potentials mediated by GABA_A-receptors.

2. Materials and methods

Rat hippocampal slices were prepared as previously described [14]. After decapitation, the brain was quickly removed, and a block of tissue containing the hippocampus was prepared and placed in an ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) with the following composition (in mM): 124 NaCl, 5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.4 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose. Coronal slices were cut with a vibratome (Campden Instruments) at 400 μ m and were incubated at room temperature in aCSF bubbled with 95% O₂/5% CO₂ mixture.

2.1 Intracellular recordings

A single slice was placed in the recording chamber and superfused continuously with heated (34–35°C) aCSF at 1.5–2.5 ml/min. Intracellular recordings were made with glass micropipettes filled with 2 to 3 M KCl (resistance 40–60 M Ω). Membrane potential was measured with an Axoclamp-2A preamplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). The output of this preamplifier was displayed on an oscilloscope (TDS 210, Tektronics) and recorded with a PC and Axotape or pClamp software (Axon Instruments). An intracellular impalement of a CA1 pyramidal cell was judged satisfactory if the resting membrane potential was \approx -55 mV and action potentials were \geq 60 mV in amplitude. Glutamate-mediated excitatory postsynaptic potentials (gEPSPs) were evoked by an electrical pulse (20–100 μ s) applied at 0.1 Hz to the Schaffer collateral-commissural afferents, using a bipolar electrode made by twisting tungsten wires of a diameter of 20 μ m (Teflon-coated). In the presence of 30 μ M picrotoxin, five consecutive gEPSPs were averaged in each experimental condition and the mean amplitude was calculated. To minimize voltage-dependent changes in gEPSP amplitude and overriding actions potentials, the membrane potential

was held at -100 mV by injecting hyperpolarizing current. Cell input resistance and time constant were measured from electrotonic potentials induced by intracellular injection of constant current pulses (-100 pA and 100 ms) applied at the resting membrane potential. After the gEPSP amplitude was stable for 20 min, the hyperpolarizing current was removed and either LTP or LTD was induced. For LTP two 1-s trains of electrical pulses (100 Hz) were applied to the Schaffer collateral-commissural afferents at an interval of 10 s. After this tetanic stimulation, the membrane potential was again current-clamped to -100 mV and gEPSPs recorded over the next 40–120 min. LTD was induced by 5 Hz stimulation to the Schaffer collateral-commissural afferents for 5 min.

Unless otherwise stated, drugs were applied by superfusion. Because IFN- α responses did not desensitize, this cytokine was applied at progressively higher concentration to obtain the concentration-response curve. In some experiments, one pipette (tip diameter 3–6 μ m) was filled with glutamate (5 mM, pH 7.4) or NMDA (10 μ M, pH 7.4) and a few nanoliters of these solutions were pressure ejected (typically 160 psi for 10–250 ms) onto CA1 stratum radiatum. To avoid leakage effects the pipette tip was always placed \approx 500 μ m from the ejection site and advanced to the desired position just prior to ejection. Glutamate application was carried out in cells current clamped at -100 mV. NMDA application was performed in extracellular medium without Mg²⁺ and at resting membrane potential.

2.2. Drugs

The following drugs were used: human recombinant IFN- α 2b (IFN- α , Schering-Plough), *N*-methyl-D-aspartate (NMDA, Sigma), D-2-amino-5-phosphonovalerate (APV; RBI, Natick, MA), L-glutamate (Sigma), picrotoxin (RBI), kynurenic acid (Sigma), and genistein (RBI). Stock solution of genistein (50 mM) was prepared with DMSO whereas stock solutions of all other drugs were prepared in nanopure water and kept at 4 °C. NMDA was applied using a Mg²⁺-free aCSF to prevent NMDA channel block.

2.3. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E. The paired Student's *t*-test was used to evaluate differences between mean values obtained in the same cell, whereas the unpaired Student's *t*-test was used to compare data collected from different cells, two-tailed *P* values \leq 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. General observations

Results were obtained from 110 CA1 pyramidal cells

Electrophysiological properties of these neurons were similar to those published previously using patch-clamp and intracellular recordings [6,13,14]. The mean resting membrane potential was -61 ± 2 mV (range, -56 to -65 mV), mean cell input resistance was 50 ± 7 M Ω (range, 35–65 M Ω), and mean time constant was 13 ± 0.9 ms (range, 11–14 ms). The mean action potential amplitude was 72 ± 3 mV (range, 64–85 mV) as measured at resting membrane potential.

Unless otherwise stated, 30 μ M of the GABA_A receptor

antagonist picrotoxin was used to block synaptic potentials mediated by these receptors. These potentials were reversal (depolarizing) at -100 mV due to the high concentration of chloride ions inside the recording electrode (2 M KCl). In 40 analyzed experiments, picrotoxin superfusion diminished the amplitude of fast synaptic potentials to an average of $41 \pm 4\%$ from its control values.

To evaluate IFN- α effects on the GABA-mediated fast synaptic potential, kynurenic acid (100 μ M) was used to block glutamate ionotropic receptors. Kynurenic acid

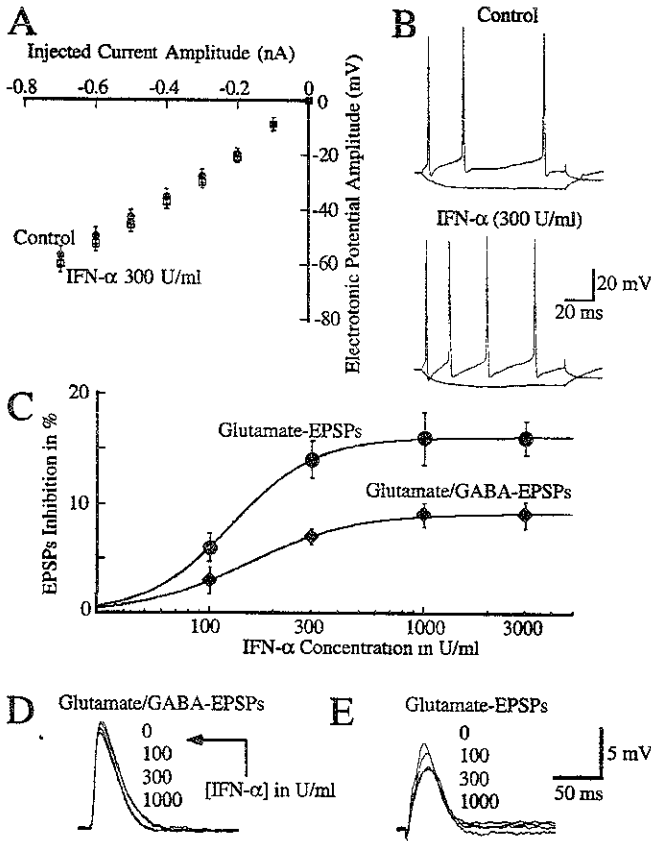


Fig. 1 IFN- α inhibited the excitatory postsynaptic potential (EPSP) in CA1 pyramidal neurons without significantly affecting the resting membrane potential or the cell input resistance. (A) Voltage-current (V/I) relationships before and in the presence of IFN- α . Symbols are mean \pm SE ($n=5$). The cell input resistance, calculated from these V/I relationships, was 57 ± 2 and 61 ± 2 M Ω before and in the presence of IFN- α , respectively. (B) Electrotonic potentials induced by application of outward and inward current pulses of 100 pA with a duration of 100 ms, before (upper tracings) and then in the presence of IFN- α (lower tracings). Duration, amplitude, and number of spikes induced by depolarizing pulses were not significantly modified (see Table 1). (C) Concentration-response curves to show the inhibitory effects of IFN- α on control (glutamate/GABA; $n=6$) and glutamate-EPSPs ($n=7$). These effects were concentration dependent with an IC_{50} of 151 U/ml and IC_{50} of 148 U/ml, respectively. Examples of such recordings are shown in D and E, recorded 30 min after starting the superfusion of the indicated concentrations of IFN- α . Glutamate-EPSPs were recorded in the presence of 30 μ M of picrotoxin.

diminished the amplitude of the synaptic potentials to an average of $62 \pm 3\%$ ($n=9$) of control values

3.2. IFN- α effects on the excitability of CA1 pyramidal cells

Superfusion of IFN- α (300 U/ml) for 30 min had no effect on the resting membrane potential of pyramidal neurons. Control and experimental values were -63 ± 1 and -62 ± 1 mV, respectively ($n=12$). IFN- α failed also to alter the voltage-current relationships indicating that cell input resistance is not altered by this cytokine (Fig. 1A; $n=5$). The action potential waveform was also not modified by the presence of this cytokine, as shown in Fig. 1B and Table 1 ($n=5$).

3.3. IFN- α effects on the fast postsynaptic potentials mediated by glutamate and GABA

Superfusion of IFN- α (300 U/ml) had a small ($9 \pm 3\%$) inhibitory effect on EPSPs mediated by both GABA and glutamate (see below). Fig. 1C and D show the effect of different cumulative concentrations ($IC_{50}=151$ U/ml) of IFN- α on these EPSPs. This inhibitory effect was present in all tested neurons ($n=6$) and irreversible.

Because these EPSPs, as mentioned above, were mediated by both glutamate and GABA, we investigated

Table 1

Parameters (means \pm S.E., $n=5$) of the action potentials induced by the intracellular application of inward current pulses, in CA1 neurons before (Control) and then in the presence of IFN- α (300 U/ml)^a

Treatment	Control	IFN- α
Duration (ms)	1.59 ± 0.2	1.59 ± 0.3
Amplitude (mV)	83 ± 2	82 ± 2
Number of spikes evoked by a 100-ms pulse	4 ± 0.5	5 ± 0.2
Rate of rise of the onset (V/s)	234 ± 46	228 ± 21
Rate of rise of the offset (V/s)	101 ± 9	9 ± 5

^a The observed changes were not significant

which component was inhibited by IFN- α . Superfusion of this cytokine had no effect on the GABA-mediated EPSP, which was recorded in the presence of 100 μ M kynurenic acid and abolished by 30 μ M picrotoxin. This EPSP was always completely inhibited by 30 μ M picrotoxin.

The glutamate mediated EPSP (gEPSP) was inhibited by IFN- α in a concentration-dependent manner with an $IC_{50}=148$ U/ml and a maximal inhibition of $16 \pm 2\%$ (Fig. 1C and E; $n=7$). The onset of this inhibition was between 6 and 10 min and reached a maximum about 20–25 min after starting the superfusion of IFN- α . This was not reversible even after 30–60 min of washing ($n=6$). gEPSPs were recorded in the presence of 30 μ M picrotoxin and were abolished by 100 μ M kynurenic acid. The inhibitory effect of IFN- α (300 U/ml; $n=4$) on the gEPSP was prevented by pre-treating for 10 min the slices with

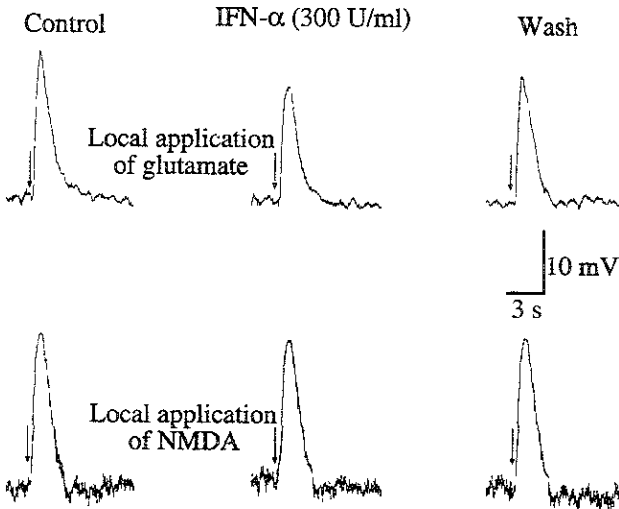


Fig. 2. IFN- α inhibits the depolarization induced by glutamate but did not by NMDA. Pressure ejection of glutamate (5 mM, upper panel) or NMDA (10 μ M, lower panel) was at the time indicated by arrows. Depolarization was recorded before (Control), 20 min after adding IFN- α , and after 20 min of IFN- α wash-out. Similar observations were obtained in four (upper panel) and six (lower panel) identical experiments. Only one neuron per slice was recorded. Glutamate experiments were carried out in cells current clamped at -100 mV. NMDA experiments were performed in extracellular medium without Mg^{2+} and at resting membrane potential.

100 μ M genistein (not shown) which specifically inhibits tyrosine kinase activity in hippocampal tissue [16].

IFN- α (300 U/ml) also reduced the depolarization induced by local application of glutamate (Fig. 2A). Control values were 16 ± 3 mV and in presence of IFN- α these were 11 ± 3 mV ($P < 0.01$; $n = 4$). IFN- α , however, did not modify the depolarization induced by local application of NMDA ($n = 6$, Fig. 2B). These observations indicate that at least part of the inhibitory effect of IFN- α on the gEPSP is at the postsynaptic level involving non-NMDA channels and tyrosine kinase activity

3.4 IFN- α actions on synaptic plasticity in the hippocampus

Following tetanic stimulation a twofold increase in the gEPSP amplitude ($196 \pm 6\%$ of control values; $n = 5$) was observed, with the first recording performed 5 min after

stimulation (Fig. 3A). After reaching its maximal values, a transitory decay in EPSP amplitude was observed during the first 10–15 min. After that, stable potentiated gEPSPs ($170 \pm 7\%$ of control values) were observed for as long as they were recorded (up to 2 h). In accordance with others [15], we will to the first portion of this response as short-term potentiation (STP) and to the second portion as the maintenance phase of long-term potentiation (LTP). This potentiation was prevented by the presence of APV (see below) indicating that it is mediated by NMDA channels, as it has been previously described [11,12].

Superfusion of IFN- α (300 U/ml) for 20 min before tetanus prevented the maintenance phase of LTP but a STP was still observed (Fig. 3). The average gEPSP amplitude reached during the peak of STP was $124 \pm 4\%$ of control values. After STP, the EPSP amplitude decreased and was maintained at $56 \pm 5\%$ of control values indicating that IFN- α unmasked a depression of this potential.

Application of IFN- α after STP (Fig. 4; $n = 4$) also

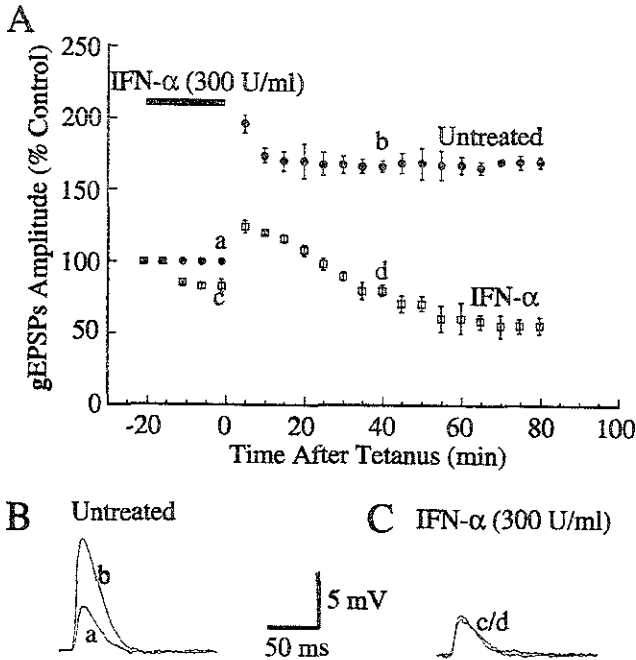


Fig. 3 IFN- α prevents long-term potentiation in neurons of the CA1 region. A, relative amplitude of glutamate mediated excitatory postsynaptic potential (gEPSP) taken before and after tetanic stimulation at time 0 (arrow). Symbols are mean \pm S.E. of five untreated and five IFN- α treated neurons. Only one neuron per slice was recorded. IFN- α was applied before and during tetanic stimulation, as indicated by the bar. Tetanic stimulation consisted of two pulse-trains of 1 s each, applied at 100 Hz, and with a 10-s interval between trains. (B) Typical gEPSPs of two different neurons taken before and after tetanic stimulation, at the times indicated by letters.

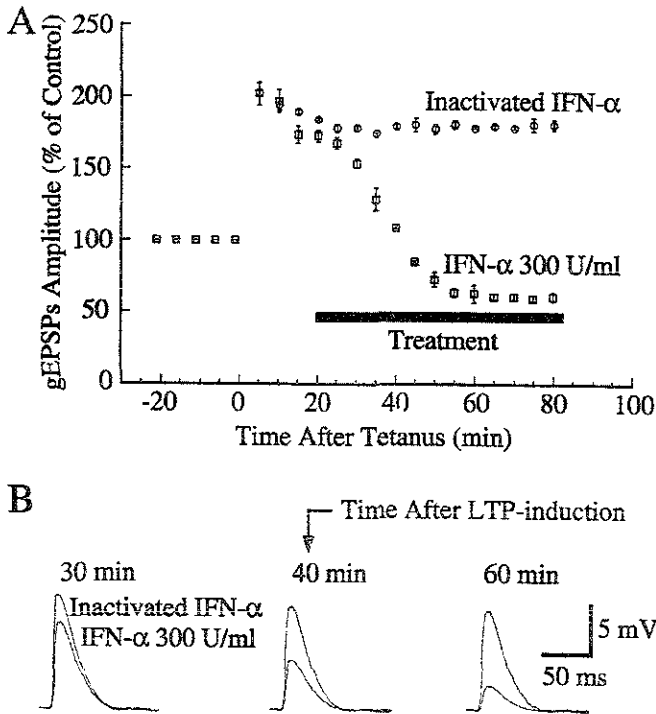


Fig. 4 IFN- α inhibits long-term potentiation in CA1 region. (A) Relative amplitude of glutamate-mediated excitatory postsynaptic potentials (gEPSPs) taken before and after tetanic stimulation (see Section 2) at time 0 (arrow). Both treatments were started during the maintenance phase of LTP, as indicated by bar. Symbols are mean \pm S.E. of four IFN- α -treated neurons or of four neurons treated with heat-inactivated IFN- α -solution. Only one neuron per slice was recorded. (B) Typical gEPSPs from two different neurons treated with either heat-inactivated IFN- α -solution or with 300 U/ml of IFN- α , recorded at the indicated times.

inhibited the maintenance LTP. Indeed, in the presence of this cytokine the gEPSP amplitude reached a new steady-state value of only \sim 60% of the control values. This effect was abolished by boiling IFN- α solution for 30 min (Fig. 4; $n=4$).

Tetanic stimulation also potentiated the depolarization induced by pressure ejection of glutamate (Fig. 5; $n=4$) but this potentiation was smaller than that observed for gEPSPs (Fig. 3A). Application of this cytokine also reverted this potentiation (Fig. 5; $n=4$), suggesting that the IFN- α inhibitory effect on LTP is, at least in part, postsynaptic.

Pretreatment of brain slices with 100 μ M genistein prevented IFN- α inhibitory effects on the maintenance phase of LTP (Fig. 6; $n=5$). In agreement with previous observations [16], this concentration of genistein by itself did not modify LTP when it was added after STP.

As expected, inhibition of NMDA receptors with APV (50 μ M) during the tetanus stimulation prevented LTP but STP was still present (Fig. 7A, $n=4$). This treatment also prevented the effects of IFN- α on the gEPSPs. Application of APV after STP neither affected the maintenance phase of LTP nor the inhibitory effect of IFN- α on LTP (Fig. 7B; $n=4$). APV by itself did not alter the EPSP amplitude in control conditions (before tetanus; Fig. 7A) or after STP (Fig. 7B), indicating a null contribution of NMDA channels for these potentials during such conditions.

After applying a low-frequency tetanic stimulation (see Section 2) a decrease in gEPSP amplitude was observed, which lasted for as long as we recorded (60 min). This well-characterized phenomenon is long-term depression (LTD) [9,11]. Fig. 8 shows that the gEPSPs amplitude during the LTD steady state was only slightly reduced by superfusion of IFN- α ($n=4$).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

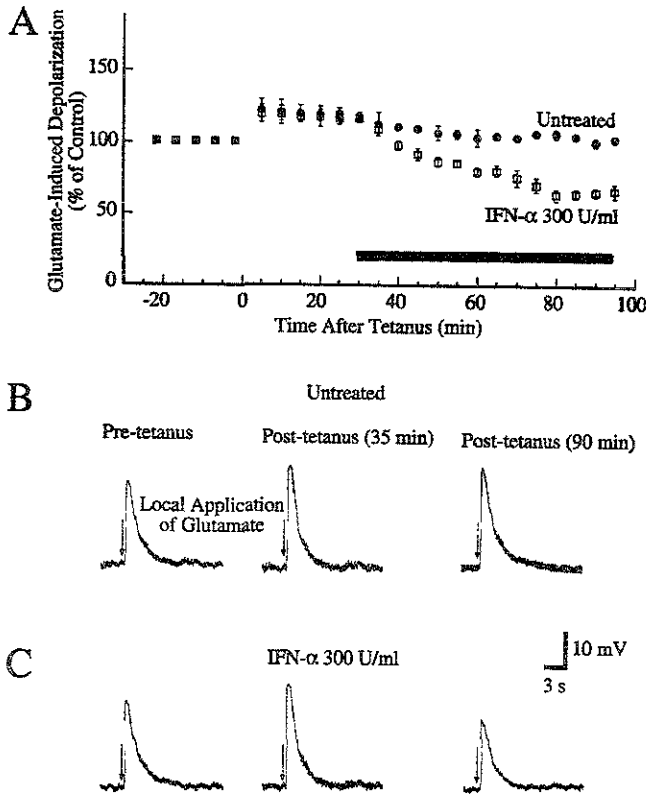


Fig. 5. IFN- α inhibits the potentiated depolarization induced by local application of glutamate. (A) Relative amplitude of the depolarization induced by local application of glutamate before and after tetanic stimulation at time 0, recorded in CA1 neurons. Symbols are mean \pm E. of four untreated and four IFN- α -treated neurons. IFN- α was applied as indicated by bar. Only one neuron per slice was recorded. (B,C) Typical glutamate-induced depolarizations from two different neurons, one untreated and one treated with IFN- α . These depolarizations were recorded before and after the tetanus, at the indicated times.

4. Discussion

In the present study, human recombinant IFN- α specifically inhibits LTP and gEPSP in CA1 region neurons of rat hippocampus slices. This effect was independent of changes in neuronal excitability, NMDA channels or LTD. Another finding is that inhibition of LTP by IFN- α unmasked LTD. This indicates that the high-frequency tetanic stimulation used to induce LTP activates biochemical cascades of both LTD and LTP.

Various observations made by us indicate that IFN- α inhibits the NMDA-receptor mediated LTP in CA1 hippocampus. Thus, the LTP recorded here was evoked by a

high tetanic stimulation widely used by others to induce a NMDA-receptor mediated LTP [1,16]; it lasted for as long as they were recorded (up to 2 h); it was prevented by blocking NMDA receptors with APV; and it could not be reverted by this antagonist once it had been established, as reported by others [3,8,23]. Finally, IFN- α prevented and reverted this LTP but did not affect the gEPSP if APV was present during the tetanic stimulation.

Several of our findings indicate that depression of gEPSPs induced by IFN- α in slices to which the high-frequency tetanic stimulation was applied, is actually LTD. First, the magnitude of this depression was similar to the LTD observed with low-frequency stimulation. Second,

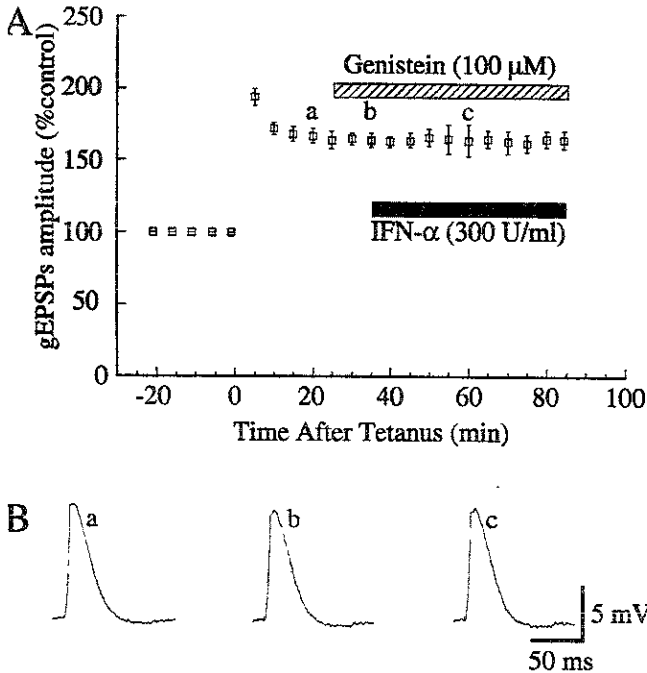


Fig. 6. Genistein (100 μ M) prevented the IFN- α -inhibitory effects on LTP (A) Relative amplitude of glutamate-mediated excitatory postsynaptic potentials (gEPSPs) before and after tetanic stimulation at time 0. IFN- α was applied before the tetanic stimulation, as indicated by bar. Symbols are mean \pm S.E. of five neurons. Only one neuron per slice was recorded. (B) Typical gEPSPs of one neuron taken at the time indicated by letters.

such a depression was seen for as long as our recordings lasted (>1 h after the tetanic stimulation). Finally, the depression induced by IFN- α at the maintenance phase of LTP, was prevented by the presence of the NMDA receptor antagonist APV during the tetanic stimulation. This substance has been previously shown to prevent both the maintenance phase of the LTP and LTD [7,8]. These observations would imply that both biochemical events responsible for LTP and LTD are activated by the same tetanic stimulation used here to evoke LTP.

That IFN- α might block LTP by inhibition of NMDA channels was suggested by the fact that opening of NMDA channels plays a central role in the induction of LTP in the CA1 hippocampal region [4]. Our observations, however, rule out this hypothesis and demonstrate that the inhibitory actions of IFN- α on LTP are independent of NMDA channels. First, IFN- α also inhibited the maintenance phase of the LTP, which is known to be resistant to NMDA channel blockers. Second, neither this LTP phase nor the inhibitory effect of IFN- α were modified by APV, a NMDA channel blocker. Finally, the NMDA-induced

depolarizations were also not modified by IFN- α . This last observation is in agreement with the previous finding that rat IFN induces only a small reduction of NMDA-activated currents in cultured embryonic hippocampal neurons [4].

That IFN- α blocks LTP and inhibits gEPSPs through a mechanism that involves tyrosine kinase activity is suggested by the fact that receptors to this cytokine are known to couple to a tyrosine kinase domain [17,22]. Here, we showed that genistein blocks these IFN- α effects further supporting this hypothesis. A previous study showed that genistein can block tyrosine kinase activity in the CA1 region without affecting the activity of other major protein kinases such as the A and C [16]. In the present study, we observed that genistein treatment does not alter the maintenance phase of the LTP, implying that activity of kinases A and C is not being inhibited since their activity is known to be required for the maintenance phase of LTP [12,16]. Therefore, genistein effects are more likely mediated by inhibition of the tyrosine kinase activity.

At least two observations indicate that IFN- α inhibits gEPSPs by a mechanism that involves AMPA/KA re-

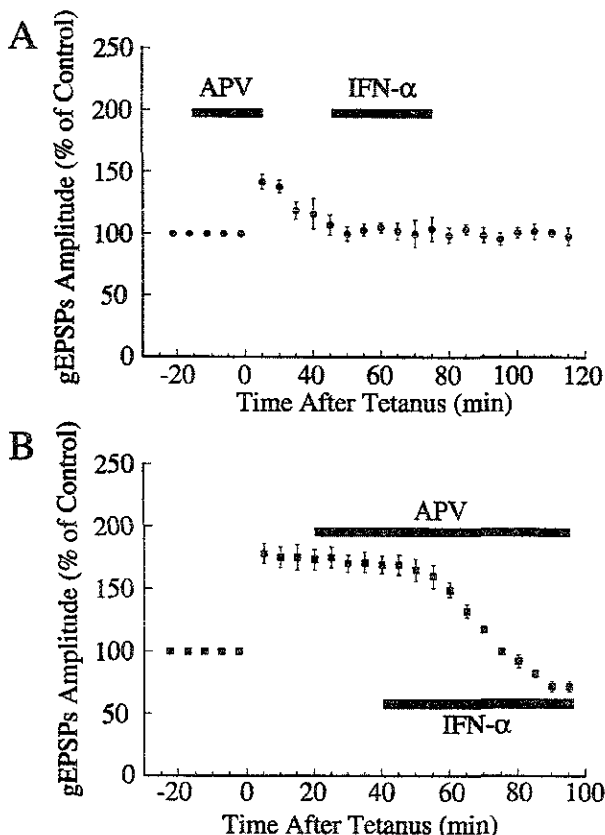


Fig. 7. Inhibition of NMDA channels during the maintenance phase of LTP did not affect the inhibitory effects of IFN- α on LTP. (A) Superfusion of APV (50 μ M) during the tetanus stimulation prevented LTP but a short-term potentiation (STP) was still noticed. After STP, IFN- α failed to alter the excitatory postsynaptic potentials (gEPSPs). (B) Superfusion of APV (50 μ M) after LTP induction did not affect IFN- α inhibitory effects on LTP. Symbols are mean \pm S.E. of four neurons in both A and B, only one neuron per slice was recorded.

ceptors. First, IFN- α does not modify the NMDA-induced depolarization and second, control gEPSPs or the gEPSPs recorded during the maintenance phase of LTP are not altered by APV, a well known NMDA receptor antagonist. gEPSPs are, however, totally abolished by the kynurenic acid, nonspecific antagonist of ionotropic glutamate receptors. The inhibitory effects of IFN- α are, at least in part, postsynaptic as indicated by the fact that the potentiated and non-potentiated glutamate-induced depolarizations were also inhibited by this cytokine.

Tetanic stimulation potentiates the depolarization induced by local application of exogenous glutamate but this potentiation is smaller than that observed for gEPSPs. LTP

is known to be restricted to inputs that received tetanic stimulation [10] and this could be the explanation for this difference in potentiation. Thus, exogenous glutamate could be mainly mediated by receptors located in membrane regions that have not been stimulated during the tetanic stimulation.

In conclusion, IFN- α inhibits specifically non-NMDA glutamate synaptic potentials, by a postsynaptic action that involves tyrosine kinase activity, and without altering the excitability of CA1 pyramidal neurons. This inhibition is larger after inducing LTP. Our observations also indicate that the high-frequency tetanic stimulation, used to induce LTP, can also activate the biochemical cascade responsible

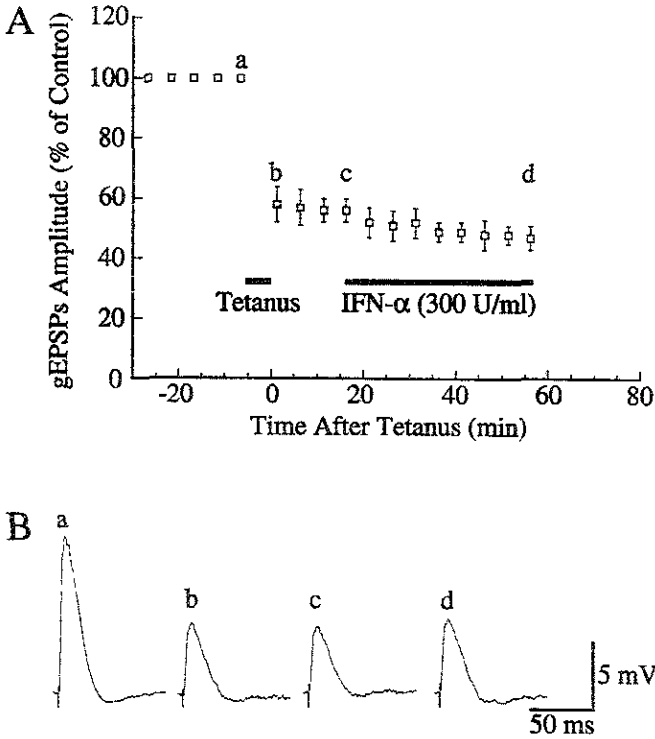


Fig 8 IFN- α did not modify LTD (A) Relative amplitude of glutamate mediated excitatory postsynaptic potentials (gEPSPs) before and after low-frequency tetanic stimulation indicated by the bar to the left (Tetanus). Symbols are mean \pm S.E. of four neurons. Only one neuron per slice was recorded. The low-frequency tetanic stimulation consisted of a 5-min duration train of electrical pulses at 5 Hz. (B) gEPSPs from a typical experiment recorded at the time indicated by lowercase letters.

for LTD. This possibility must be considered in studies designed to correlate biochemical and synaptic plasticity in the hippocampus.

Acknowledgements

This work was supported by the Medical Research Council of Canada and the CCFC. C.B.-L. was partially supported by the Ontario Ministry of Health (Career Scientist Award 04500).

References

- [1] F.P. Bellinger, S. Madamba, G.R. Siggins, Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus, *Brain Res* 628 (1993) 227–234.
- [2] V. Bocsi, Central nervous system toxicity of interferons and other cytokines (Review), *J. Biol. Regul. Homeostat. Agents* 2 (1988) 107–118.
- [3] G.L. Collingridge, S.J. Kehl, H. McLennan, Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus, *J. Physiol. (Lond)* 334 (1983) 33–46.
- [4] G. D'Arcangelo, F. Grassi, D. Ragozzino, A. Santoni, V. Tancredi, F. Eusebi, Interferon inhibits synaptic potentiation in rat hippocampus, *Brain Res* 564 (1991) 245–248.
- [5] N. Dafny, Is interferon-alpha a neuromodulator?, *Brain Res Rev* 26 (1998) 1–15.
- [6] F.A. Edwards, A. Konnerth, B. Sakmann, T. Takahashi, A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system, *Pflügers Arch* 414 (1989) 600–612.
- [7] T.W. Gean, J.H. Lin, D-2-Amino-5-phosphonopentanoate blocks induction of long-term depression of the NMDA receptor-mediated synaptic component in rat hippocampus, *Neurosci. Lett* 158 (1993) 170–172.
- [8] S. Hrabětová, T.C. Sacktor, Long-term potentiation and long-term depression are induced through pharmacologically distinct NMDA receptors, *Neurosci. Lett* 226 (1997) 107–110.

- [9] F. Laezza, J.J. Doherty, R. Dingledine, Long-term depression in hippocampal interneurons: joint requirement for pre- and postsynaptic events, *Science* 285 (1999) 1411–1414.
- [10] G.S. Lynch, T. Dunwiddie, V. Gribkoff, Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation, *Nature* 266 (1977) 737–739.
- [11] R.C. Malenka, Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD, *Cell* 78 (1994) 535–538.
- [12] R.C. Malenka, R.A. Nicoll, Long-term potentiation – a decade of progress?, *Science* 285 (1999) 1870–1874.
- [13] R. Malmow, J.P. Miller, Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation, *Nature* 320 (1986) 529–530.
- [14] V. Mendoza-Fernandez, R.D. Andrew, C. Barajas-Lopez, ATP inhibits the synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 (2000) 172–179.
- [15] R.A. Nicoll, J.A. Kauer, R.C. Malenka, The current excitement in long-term potentiation, *Neuron* 1 (1988) 97–103.
- [16] T.J. O'Dell, E.R. Kandel, S.G. Grant, Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors, *Nature* 353 (1991) 558–560.
- [17] P.H. Patterson, H. Nawa, Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity, *Cell* 72 (Suppl.) 123–137.
- [18] P.H. Patterson, H. Nawa, Neuronal differentiation factors cytokines and synaptic plasticity, *Cell* 72 (1993) 123–137.
- [19] V.H. Perry, M.D. Bell, H.C. Brown, M.K. Matyszak, Inflammation in the nervous system, *Curr. Opin. Neurobiol.* 5 (1995) 636–643.
- [20] C.R. Plata-Salamán, Immunoregulators in the nervous system, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15 (1991) 185–215.
- [21] B. Prieto-Gomez, C. Reyes-Vazquez, N. Dafny, Differential effects of IFN- α on ventromedial hypothalamus and dorsal hippocampus, *J. Neurosci. Res.* 10 (1983) 273–278.
- [22] N.J. Rothwell, J.K. Relton, Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17 (1993) 217–227.
- [23] H. Wigstrom, B. Gustafsson, Postsynaptic control of hippocampal long-term potentiation, *J. Physiol. (Paris)* 81 (1986) 228–236.

ATP Inhibits Glutamate Synaptic Release by Acting at P2Y Receptors in Pyramidal Neurons of Hippocampal Slices¹

ANEXO B

VICTOR MENDOZA-FERNANDEZ, R. DAVID ANDREW, and CARLOS BARAJAS-LOPEZ

Department of Anatomy and Cell Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

Accepted for publication December 20, 1999 This paper is available online at <http://www.jpep.org>

ABSTRACT

It has been proposed that extracellular ATP inhibits synaptic release of glutamate from hippocampal CA1 synapses after its catabolism to adenosine. We investigated the possibility that at least part of this effect is mediated by ATP itself acting on P2Y receptors. ATP and various analogs decreased the amplitude and duration of glutamate-mediated excitatory postsynaptic potentials in all tested neurons. This effect was reversible and concentration-dependent and had the following rank order of agonist potency: AMP = ATP > adenosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) > adenosine = ADP. α,β -Methylene ATP, β,γ -methylene ATP, 2-methylthioadenosine 5'-triphosphate, GTP, and UTP induced only a partial response. The depolarization induced by exogenous glutamate was not affected by ATP, indicating that this nucleotide acts presynaptically to inhibit glutamate-mediated excitatory postsynaptic potentials. Neither inhibition of ectonucleotidase activity with α,β -methylene ADP, suramin, or pyroaxalophosphate-6-

azophenyl-2',4'-disulfonic acid 4-sodium nor removal of extracellular adenosine (with adenosine deaminase) altered ATP effects. 8-Cyclopentyltheophylline competitively inhibited ATP effects, whereas P2 receptor antagonists (pyroaxalophosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid 4-sodium, suramin, and reactive blue 2) were ineffective. ATP effects were by far more sensitive to pertussis toxin (PTX) than those of adenosine. After PTX, adenosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) induced only a partial response, and ATP concentration-response curve was biphasic. The second phase of this curve was blocked by adenosine deaminase, implying that it is mediated by adenosine as a result of ATP catabolism. Under control conditions, however, catabolism of ATP is not required to explain its actions. In conclusion, ATP inhibits synaptic release of glutamate by direct activation of P2Y receptors that are PTX- and 8-cyclopentyltheophylline-sensitive.

ATP is a neuromodulator and neurotransmitter in the peripheral (Burnstock, 1990; Evans et al., 1992; Silinsky and Gerzanich, 1993) and central (Edwards et al., 1992; Pankratov et al., 1998) nervous systems. Various actions have been described for the extracellular ATP in hippocampal neurons, including the inhibition of synaptic transmission (Dunwiddie et al., 1997; Cunha et al., 1998), opening of ligand-gated channels (Pankratov et al., 1998; Baljit et al., 1999), and the phosphorylation of ecto-protein kinase proteins involved in long-term potentiation (Chen et al., 1996b). Recent experimental evidence indicates that ATP might be playing a role as a fast neurotransmitter in the CA1 hippocampal region (Pankratov et al., 1998).

Two types of purine extracellular receptors are widely recognized (Abbraccio and Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1994). P1 sites are adenosine receptors sensitive to theophylline derivatives and P2 sites are nucleotide receptors insensitive to theophylline derivatives. Nevertheless, nucleotide receptors sensitive to theophylline or its derivatives have been described in peripheral and central neurons (Silinsky and Ginsborg, 1983; Shinozuka et al., 1988; Forsyth et al., 1991; Cunha et al., 1994; Barajas-López et al., 1995). At this receptor, 1) P1 receptor agonists (adenosine or 2-chloroadenosine (CADO)) and ATP appear to be equipotent (but see Silinsky and Ginsborg, 1983; von Kügelgen et al., 1989; Barajas-López et al., 1995); 2) α,β -methylene ATP is a weak or an inactive agonist; and 3) ATP actions are blocked by antagonists of P1 receptors (theophylline analogs) rather than antagonists of the P2 receptors (suramin and reactive blue 2). Several studies proposed the name of P3-purinoreceptor for this pharmacological profile (Shinozuka et al., 1988; Forsyth et al., 1991; Dalziel and Westfall, 1994).

ATP can directly activate two types of P2 receptors, P2X and P2Y, in many different types of cells, including neurons. P2X receptors are ligand-gated ion channels, whereas P2Y are coupled via GTP-binding proteins (Burnstock, 1990; Ab-

Received for publication June 14, 1999.

¹This work was supported by the Medical Research Council of Canada. C.B.-L. was supported in part by the Ontario Ministry of Health (Career Scientist Award 04500).

ABBREVIATIONS: CADO, 2-chloroadenosine; 2-MeSATP, 2-methylthioadenosine 5'-triphosphate; ATP_{2S}, adenosine-5'-O-(3-thiotriphosphate); gEPSP, glutamate-mediated excitatory postsynaptic potential; PTX, pertussis toxin; PPADS, pyroaxalophosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid 4-sodium; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; NEM, N-ethylmaleimide; AD, adenosine deaminase; CPT, 8-cyclopentyltheophylline; DPCPX, 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine.

braccio and Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1994). ATP can also be hydrolyzed by nucleonidases extracellularly (Dunwiddie et al., 1997; Cunha et al., 1998), and products of its hydrolysis (ADP, AMP and adenosine) can influence neurons by interacting with specific receptors (Burnstock, 1990).

P1 receptors are found in nerve terminals in many regions of the central and peripheral nervous systems. Their activation inhibits the release of various neurotransmitters, including glutamate (Dolphin and Prestwich, 1985; Cunha et al., 1998), acetylcholine (Fredholm et al., 1989; Barajas-Lopez et al., 1991), norepinephrine (Fredholm et al., 1989; Barajas-Lopez et al., 1991; Forsyth et al., 1991), and peptides (Broad et al., 1993). Presynaptic ATP receptor activation also modulates neurotransmitter release in peripheral (Silinsky and Ginsborg, 1983; Shinozuka et al., 1988; Silinsky et al., 1990; Forsyth et al., 1991; Barajas-Lopez et al., 1995) and central (Fredholm and Dunwiddie, 1988; Dunwiddie and Fredholm, 1989; Cunha et al., 1994) neurons. In hippocampus, ATP inhibits the neuronal release of glutamate, but it is not clear whether such an action is mediated by the ATP metabolite adenosine acting on P1 receptors or by ATP activation of P2 receptors. In general, a recent study by Cunha et al. (1998) favors the first hypothesis, but at least two of their observations support the hypothesis that P2 receptors are present in nerve terminals and might mediate part of the inhibition. Specifically, ATP hydrolysis appears to be slower than its effects on glutamate release. Moreover its analog, adenosine-5'-O-(3-thio)triphosphate (ATP γ S) behaves as a full agonist despite its hydrolysis being only marginal. Based on these observations, we hypothesized that part of the ATP-induced presynaptic inhibition is mediated by P2 receptors. Therefore, the aim of the present study was to further characterize the receptors that mediate the inhibitory actions of ATP on the synaptic release of glutamate.

Materials and Methods

Slice Preparation. Rat hippocampal slices were prepared as previously described (Edwards et al., 1989). After decapitation, the brain was quickly removed, and a block of tissue containing the hippocampus was prepared and placed in an ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) with the following composition: 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 2.4 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, and 10 mM glucose. Coronal slices were cut with a vibratome (Camden Instruments, Ltd.) 400 μ m thick and were incubated at room temperature in aCSF bubbled with 95% O₂, 5% CO₂ mixture.

Intracellular Recordings. A single slice was then placed in the recording chamber and superfused continuously with heated (34–35°C) aCSF at 1.5 to 2 ml/min. Intracellular recordings were made with glass microelectrodes filled with 2 to 3 M KCl (resistance 40–60 M Ω). Membrane potential was measured with an Axoclamp-2A preamplifier (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). The output of this preamplifier was displayed on an oscilloscope (TDS 210; Tektronics) and recorded with a PC and Axotape or pClamp software (Axon Instruments). An intracellular impalement of a CA1 pyramidal cell was judged satisfactory if the membrane potential was \pm 55 mV and action potentials were \pm 60 mV in amplitude. Glutamate-mediated excitatory postsynaptic potentials (eEPSPs) were evoked by an electrical pulse (20–100 μ s) applied at 0.1 Hz to the Schaffer collateral-commissural afferents, using a bipolar electrode made by twisting tungsten wires of a diameter of 20 μ m (Teflon-coated). In the presence of 20 μ M picrotoxin, five consecutive eEPSPs were averaged under each experimental condition, and the mean ampli-

tude was calculated. To avoid changes in the amplitude of eEPSPs due to membrane potential changes and the generation of overlapping action potentials, the membrane potential was held constant near the potassium equilibrium potential (\approx -100 mV). Input membrane resistance and time constants were measured from electrotonic potentials induced by the intracellular injection of constant current pulses, which had an amplitude and a duration of \approx 100 pA and 100 ms, respectively, and were applied at the resting membrane potential.

Drugs were applied by superfusion, with the solution changed to one that differed only in its content of the drug. Because presynaptic responses were not desensitized, ATP and its analogs were applied in a cumulative fashion when concentration-response curves were obtained. In some cases, one pipette (tip diameter 3–6 μ m) was filled with glutamate solution (3 mM, pH 7.4), and a few nanoliters of this solution were pressure ejected (typically 160 psi for 10–250 ms) onto CA1 stratum radiatum. To avoid effects by leakage of the solution, the pipette tip was always placed \approx 500 μ m from the ejection site and advanced to the desired position just before ejection.

Some slices were incubated in culture dishes containing aCSF in the presence of either pertussis toxin (PTX, 0.25–5 μ g/ml) or its solvent for 16 h at room temperature in an atmosphere of 95% O₂, 5% CO₂. The slice was transferred to the recording chamber, and the effects of ATP, ATP γ S, or adenosine on the eEPSPs were measured.

Drugs. Adenosine, picrotoxin, pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2,4'-disulfonic acid 4-sodium (PTADS), GADO, 5-cyclohexyladenosine (CPT), suramin, and 1,3-dipropyl-8-cyclopropylxanthine (DPCPX) were obtained from Research Biochemicals Inc (Natick, MA). AMP, ADP, ATP, α - β -methylene ATP lithium salt (α , β -methylene ATP), β -methylene ATP lithium salt (β -methylene ATP), ATP γ S, 2-methylthioadenosine 5'-triphosphate disodium salt (2-Me-SATP), UTP, GTP, glutamate, PTX, N-ethylmaleimide (NEM), adenosine deaminase (AD), and Baselin Blue E-3G (reactive blue 2) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Stock solutions of 0.1 to 10 mM were made in either ethanol (CPT and DPCPX) or water (all other substances) before being dissolved in the physiological saline solution. ATP, ADP, and AMP stock solutions were prepared the day of the experiment and kept at -4°C. Stock solutions of suramin and adenosine were kept at -40°C. All other stock solutions were kept at -20°C.

Statistical Analysis. Results are expressed as mean \pm SE. The paired Student's *t* test was used to evaluate differences between mean values obtained in the same cell, whereas the unpaired Student's *t* test was used for the data collected from different cells; two-tailed *P* values of \geq 0.05 were considered statistically significant.

Results

General Observations. Results were obtained from 150 CA1 pyramidal cells. Electrophysiological properties of these neurons were similar to those published previously using patch-clamp and intracellular recordings (Malinow and Miller, 1986; Edwards et al., 1989). The mean membrane potential was -66 ± 1.6 mV (range, -55 to -76 mV), mean membrane input resistance was 46 ± 4.2 M Ω (range, 25–75 M Ω), and mean time constant was 11 ± 0.6 ms (range, 8.2–16.2 ms). The amplitude of action potentials recorded in pyramidal neurons in the CA1 region of rat hippocampus was 75 ± 1.7 mV (range, 60–80 mV) measured at resting membrane potential.

Unless otherwise stated, 30 μ M concentration of the γ -aminobutyric acid_A receptor antagonist (picrotoxin) was used to block the inhibitory postsynaptic potentials. These potentials were reversal (depolarizing) under our experimental conditions due to the high concentration of chloride ions inside the recording electrodes (2 M Cl⁻). Picrotoxin superfusion dimin-

ished the amplitude of the fast synaptic potentials to an average of $42 \pm 1.0\%$ from its control values.

Effect of ATP and Several Analogs on gEPSPs. Superfusion of ATP and various of its analogs decreased the amplitude and duration of orthodromic gEPSPs in all of the pyramidal neurons tested, and this effect was concentration-dependent (1–300 μM ; Fig. 1). The following IC_{50} values were calculated for several of these compounds that behaved as full agonists: $4.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for AMP, $5.4 \pm 0.8 \mu\text{M}$ for ATP, $6.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$ for ATP, $13 \pm 0.7 \mu\text{M}$ for adenosine, and $15.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$ for ADP. β - γ -Methylene ATP, α - β -methylene ATP, 2-MeSATP, GTP, and UTP induced only a partial response. A maximum concentration caused 30 to 50% of the maximum inhibition observed with ATP. The IC_{50} values for these compounds were 17.3 ± 0.3 , 7.1 ± 1.2 , 8.9 ± 1.2 , 12.4 ± 1.5 , and $8.3 \pm 1.0 \mu\text{M}$ respectively (Fig. 1). To avoid cell-to-cell variation, the effects of ATP (1–100 μM) and adenosine (1–300 μM) were compared in the same pyramidal neurons ($n = 5$). In such experiments, IC_{50} values for these agonists were 6.3 ± 0.9 and $13.0 \pm 0.7 \mu\text{M}$, respectively. The concentration-response curves for these experiments are not shown. The simplest explanation for these observations is that adenosine and ATP inhibit gEPSPs via different receptor sites.

The time dependence of ATP- and adenosine-induced inhibition of gEPSPs is shown in Fig. 2. This inhibitory effect of ATP and its analogs had the following kinetics: it was observed within 60 s after the arrival of the agonist to the recording chamber, reached maximum within 4 min, and completely reversed within 8 min after discontinuation of the

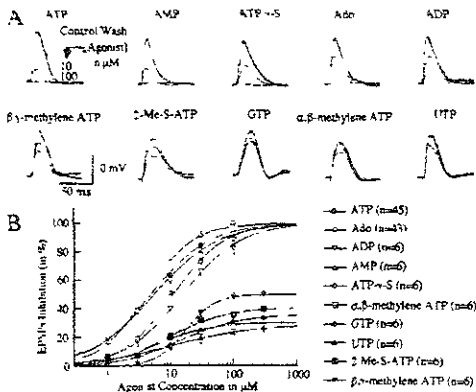


Fig. 1. Inhibitory effects of ATP and several other analog substances on electrically evoked gEPSPs of CA1 hippocampus. Note that ATP, AMP, and ATP- γ -S are more potent than adenosine (Ado). Traces of gEPSPs recorded intracellularly in 10 different neurons before (Control), in the presence of 10 and 100 μM concentrations of the indicated substances, and after their removal (Wash). The inhibitory effects of these compounds were completely reversed in 5 to 10 min. Note that the Control and Wash traces are superimposed and that the lowest trace is always that taken in the presence of a 100 μM concentration of each substance. For UTP only, the trace taken in 10 μM UTP is superimposed with the Control and Wash traces. Graph shows the percentage inhibition of gEPSPs induced by different concentrations of nucleotides. Symbols are mean \pm SE values of the indicated number of neurons (in parentheses). Lines were fitted by least-squares to sigmoidal curves. gEPSPs were measured at the same membrane potential (-100 mV) in the presence of picrotoxin (30 μM).

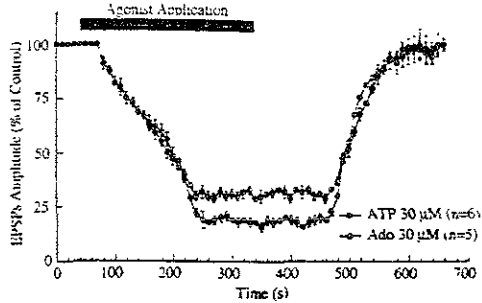


Fig. 2. Temporal course of ATP and adenosine (Ado) inhibitory actions on the amplitude of gEPSPs, expressed as a percentage of their amplitude at time 0. Agonists were applied as indicated by the bar. Symbols are mean \pm SE values of the indicated number (in parentheses) of CA1 neurons.

application. The inhibitory response was not modified during repeated or prolonged applications (10–15 min) of maximal concentrations. Furthermore, similar responses were obtained by their cumulative and noncumulative applications. Thus, no evidence of desensitization was observed.

Contrary to its effects on gEPSPs, ATP (100 μM) did not alter the depolarization induced by the local application of exogenous glutamate (5 mM; Fig. 3). Thus, the glutamate-induced depolarization was 14.8 ± 1.2 and $14.6 \pm 1.2 \text{ mV}$ before and in the presence of 100 μM ATP, respectively ($n = 5$). In the same neurons, this concentration of ATP completely inhibited the electrically evoked gEPSPs, which had a control value of $14.3 \pm 1.6 \text{ mV}$. These results show that ATP inhibits gEPSPs by acting at a presynaptic site.

Effects of Purine Receptor Antagonists on ATP-Mediated Inhibition of gEPSPs. To further characterize the receptors mediating the ATP-induced inhibition of gEPSPs, we investigated the effects of suramin (100 μM) and PPADS (30 μM) on ATP-mediated inhibition of gEPSPs. Both substances antagonize effects of ATP in several tissues (Silinsky et al., 1990; Evans et al., 1992; Silinsky and Gerzanich, 1993,

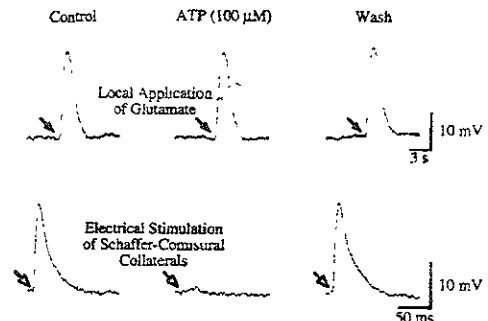


Fig. 3. Membrane depolarizations induced by pressure injection of glutamate (top), before (Control) and in the presence of ATP and after its removal from the extracellular medium. Bottom, gEPSPs recorded in the same neuron before, in the presence of, and after washing out ATP. Similar observations were obtained in four experiments.

Fredholm et al., 1994). In the hippocampus, however, these substances neither modified the gEPSPs nor altered the inhibitory effects of ATP on the gEPSPs (Fig. 4). Reactive blue 2 (30 μ M), another P2 receptor antagonist (Fredholm et al., 1994), also failed to alter the inhibitory effects of 1 μ M ATP. In these experiments, a 19 \pm 1% ($n = 4$) inhibition of the gEPSPs was induced by ATP before and in the presence of reactive blue 2.

We also examined the effects of CPT, which blocks the presynaptic inhibition induced by either adenosine or ATP in enteric neurons (Barajas-López et al., 1995). When administered alone, CPT did not alter the gEPSPs. However, CPT shifted the concentration-response curves to ATP to the right in a parallel fashion without altering the efficacy of this nucleotide (Fig. 5, A and B). This effect of CPT was concentration-dependent. Schild plot analysis of these results (Fig. 5C) yielded an estimated dissociation equilibrium constant (K_D) value of 4 nM and a slope (0.82 \pm 0.16) not significantly different from unity, indicating that CPT was acting as a competitive antagonist of the effects of ATP. DPCPX (30 nM), another theophylline derivative, also blocked the inhibitory effects of ATP (10 μ M). ATP inhibitory effects were 67 \pm 3.5 and 3 \pm 1.5% before and in the presence of DPCPX ($n = 4$; $P \leq 0.1$). Similar DPCPX effects were previously reported by Cunha et al. (1998). As expected, 10 nM CPT also shifted the CADO (adenosine receptor agonist) concentration-response curve to the right (Fig. 5, D and E). The IC_{50} values for CADO were 478 and 1595 nM before and in the presence of 10 nM CPT, respectively. Therefore, assuming a competitive antagonism, we can predict a K_D value of 4.3 nM CPT on CADO-activated receptors.

Is ATP Catabolism Required for ATP Presynaptic Actions? Figure 6A shows concentration-response curves for

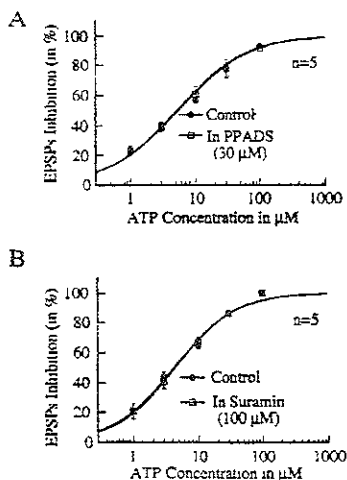


Fig. 4. Two well known P2 receptor antagonists, PPADS (50 μ M) and suramin (100 μ M), failed to alter the inhibitory effects of ATP on the gEPSPs. Symbols are mean \pm S.E. values of data obtained from the indicated number of CA1 neurons (n). Lines were fitted by least-squares to sigmoidal curves.

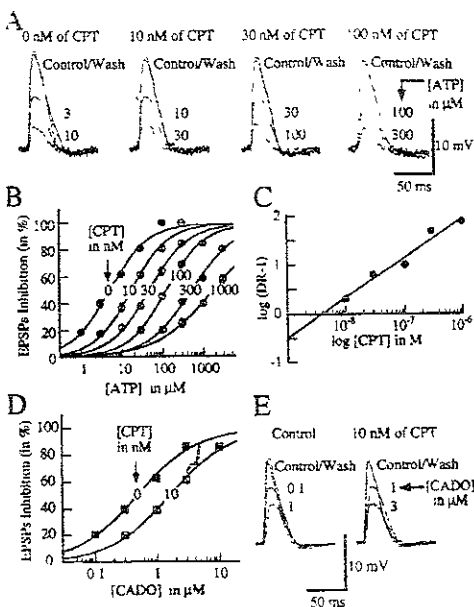


Fig. 5. CPT antagonizes the inhibition of the gEPSPs induced by ATP as well as that induced by CADO. A, effects of ATP on EPSPs recorded from the same neuron in the absence and then the presence of three different concentrations of CPT. B, concentration-response curves for ATP effects obtained in the absence and then the presence of five different concentrations of CPT. Symbols are mean \pm S.E. values of data obtained from five neurons. Lines were fitted by least-squares to sigmoidal curves. C, Schild plot derived from the curves shown in B. The slope of the Schild plot (fitted by linear regression) was 0.82 \pm 0.16. D, concentration-response curves for CADO effects obtained in the absence ($IC_{50} = 478$ nM) and then the presence of 10 nM CPT ($IC_{50} = 1595$ nM). Symbols are mean \pm S.E. of data obtained from six neurons. E, effects of CADO on EPSPs recorded from the same neuron in the absence and then in the presence of 10 nM CPT. Notice that in A and E, the Control and Wash traces are superimposed.

ATP inhibitory effects on gEPSPs in the same pyramidal neurons ($n = 6$) in the absence and presence of the enzyme AD, which converts adenosine to its inactive metabolite inosine. Superfusion of this enzyme (2 U/ml) was initiated 30 min before the addition of ATP and was maintained as long as the ATP superfusion. These experiments were performed with an ATP stock solution (10 mM concentration) that had been preincubated with 10 U/ml AD for 1 to 6 h. We found that AD superfusion by itself increased the gEPSP amplitude by 18 \pm 1% of its control values. AD, however, did not alter the ATP-mediated inhibition of these gEPSPs (Fig. 6A). When control experiments were performed with adenosine instead of ATP, AD completely abolished the adenosine-mediated inhibition of gEPSPs ($n = 3$; not shown).

Figure 6B shows the inhibitory effects of ATP on the gEPSPs in the absence and presence of 100 μ M α,β -methylene ADP, a potent ($K_i = 6$ nM) ecto-5'-nucleotidase inhibitor (Naito and Lowenstein, 1985). Superfusion of this inhibitor was initiated 30 min before ATP and maintained as long as the superfusion of ATP. α,β -Methylene ADP by itself caused

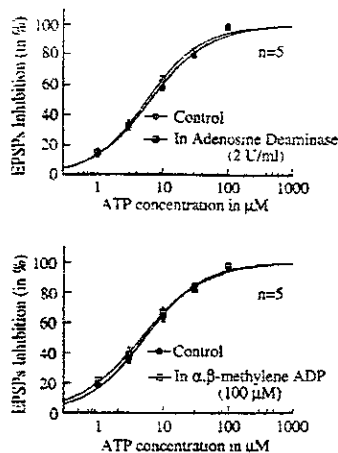


Fig. 6. Neither inhibition of the ectonucleotidase activity (with α,β -methylene ADP; 100 μM) nor removal of the extracellular adenosine (with 2 U/ml AD) altered the inhibitory effects of ATP on the gEPSPs. Symbols are mean \pm S.E. values of data obtained from the indicated number of CA1 neurons (n). Lines were fitted by least-squares to sigmoidal curves.

a small ($9 \pm 1.0\%$) but significant ($P < 0.1$, $n = 5$) inhibition of gEPSPs but did not alter ATP-induced inhibition of these synaptic potentials. Despite the fact that suramin, PPADS, and reactive blue 2 are better known as P2 receptor antagonists, they also inhibit ectonucleotidase activity in various tissues (Ziganshin et al., 1995; Chen et al., 1996a), and as described earlier, they did not modify the ATP effects. These results are in agreement with those described in the previous paragraph, and both suggest that the ATP-mediated inhibition of gEPSPs is not due to catabolism of ATP.

Role of G Proteins in ATP Actions. Previous studies found that presynaptic actions of adenosine in the hippocampus are quite resistant to PTX (Fredholm et al., 1989; Stratton et al., 1989). The effects of PTX on presynaptic actions of ATP are unknown in the hippocampus. In rat adrenal chromaffin cells (Kim et al., 1997), however, this toxin prevents the ATP inhibitory effects on exocytosis and calcium currents. Therefore, we investigated the possibility that PTX could have a differential effect on adenosine and ATP presynaptic actions in the hippocampus.

Slices of the rat hippocampus were incubated for 12 to 20 h in aCSF (incubation control) or in aCSF plus PTX (500 ng/ml and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The long incubation period per se did not significantly affect the membrane potential, action potentials, gEPSP amplitude, or inhibitory effect of ATP and adenosine (Fig. 7, A and B, and Table 1). In the slices pretreated with PTX, the concentration-response curves of ATP and adenosine were both significantly shifted to the right. This effect was greater for ATP than for adenosine such that ATP was less potent than adenosine. After treating the slices with 5 μg PTX, adenosine was a full agonist and the ATP concentration-response was biphasic, with a quasiflat portion between 10 and 30 μM . At this point, we investigated the hypotheses that the first portion of this curve was mediated

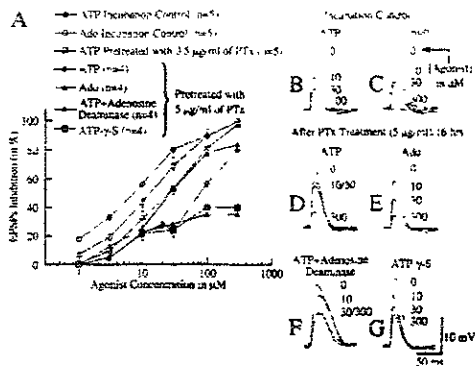


Fig. 7. ATP inhibitory effects on the gEPSPs were more sensitive to PTX treatment than those of adenosine (Ado). When the slices were treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PTX for 12 to 20 h, the ATP concentration-response curve was shifted to the right. After slices were treated with a larger concentration of PTX (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per 12 to 20 h), the curve became biphasic. The second portion of this curve was inhibited by the addition of AD (2 U/ml), turning ATP into a partial agonist. After PTX treatment, ATP γ S was only a partial agonist, whereas adenosine was still a full agonist (see also Table 1). Symbols are mean \pm S.E. values of data obtained from the indicated number of neurons (in parentheses). Lines were interpolated between the symbols. Notice that in F, traces taken in the presence of 30 and 300 μM ATP are superimposed.

TABLE 1
Inhibitory effect of 30 μM ATP, adenosine, or ATP γ S on the gEPSPs of CA1 neurons

Pretreatment of the hippocampus slices in the aCSF with PTX significantly inhibited the response to these agonists, whereas the sole incubation of the slices (incubation control group) in the aCSF did not modify it. These data were taken from the concentration-response curves shown in Figs. 1 and 8. Results are expressed as mean \pm S.E.

Group	Agonist		
	ATP	Adenosine	ATP γ S
Control	84 \pm 2 (n = 45)	78 \pm 1 (n = 42)	79 \pm 2 (n = 6)
Incubation control (12–20 h)	80 \pm 3** (n = 5)	71 \pm 3** (n = 5)	
PTX 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /12–20 h	58 \pm 4* (n = 5)		
PTX 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /12–20 h	23 \pm 4* (n = 4)	58 \pm 2* (n = 4)	24 \pm 1* (n = 4)

** $P = \text{NS}$. The unpaired Student's t test was used to evaluate differences between mean experimental and control mean values (* $P < 0.05$).

by ATP itself and the second portion was mediated by the metabolism of ATP to adenosine. In support of these hypotheses and consistent with the observation that ATP effects are more sensitive to PTX than those induced by adenosine, we found that 1) ATP γ S induced only a partial response, producing a maximal effect similar to that induced by 10 to 30 μM ATP, and 2) the second portion of the ATP concentration-response curve, observed at concentrations of ≥ 100 μM , was completely inhibited by the addition of AD (2 U/ml; Fig. 7A).

We also examined the effects of NEM, which can uncouple G proteins from several receptors (Smith and Harden, 1984; Wu et al., 1992; Shapiro et al., 1994). The inhibitory effects of both ATP and adenosine were significantly ($P < .001$) diminished (Fig. 8) by NEM treatment (100 μM , 1 h). The effect

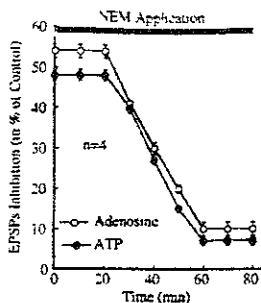


Fig. 8. NEM ($100 \mu\text{M}$) significantly decreased the inhibitory effects of adenosine ($13 \mu\text{M}$) and ATP ($6 \mu\text{M}$) on the gEPSPs. This effect began ~ 30 min after initiating NEM superfusion and reached its maximum after ~ 60 min. The inhibition observed 60 min after the start of NEM treatment was significantly ($P < 0.01$) lower than the control inhibition (time 0). Symbols are mean \pm S.E. of data obtained from the indicated number of neurons (n). Lines were interpolated between symbols.

induced by NEM was not reversible and did not distinguish between actions mediated by ATP and adenosine.

Discussion

Our main finding is that nucleotides can directly inhibit glutamate synaptic release in CA1 axon terminals of hippocampus. Evidence for ATP effects mediated through its metabolite adenosine were seen only at high concentrations of ATP and only after PTX treatment. This effect is likely mediated by P2Y receptors (nucleotide G protein-coupled receptors), which have similar pharmacological properties as those described in peripheral neurons and have previously been called P3 purinoceptors (see the Introduction).

ATP Catabolism Is Not Required for ATP-Induced Presynaptic Inhibition. We found that ATP hydrolysis to adenosine is not required for the ATP-induced inhibition of gEPSPs in the CA1 hippocampal region. First, ATP, AMP, and ATP γ S are more potent than adenosine. Second, the concentration-response curves for ATP and ATP γ S were not significantly different, despite the fact that ATP γ S is known to be hydrolyzed more slowly than ATP in hippocampal slices (Cunha et al., 1998). Third, the ectonucleotidase inhibitors α,β -methylene ADP (Naito and Lowenstein, 1985), suramin, PPADS, and reactive blue 2 (Ziganshin et al., 1995; Chen et al., 1996a) did not alter the effect of ATP. Finally, AD abolished the effect of adenosine as expected but did not alter the effects of ATP. Altogether, these results indicate that ATP hydrolysis to adenosine is not required for ATP inhibitory effects on the gEPSPs and that the nucleotides themselves are responsible for these effects. Our results support the idea that ATP acts through its own receptor.

ATP degradation to adenosine does occur in our slices, as previously reported by Cunha et al. (1998). This, however, was evident in the PTX-pretreated slices only when the ATP concentration-response curve was biphasic, with the second phase of this curve (observed with concentrations of $>100 \mu\text{M}$) being completely blocked by AD. After PTX treatment, ATP induced a maximum gEPSP inhibition of only $\sim 40\%$ in the presence of this enzyme, supporting the idea that the second phase of this curve appears to be mediated by the

production of adenosine. In agreement with this interpretation, the concentration-response curve for ATP γ S (a slow degradable ATP analog) lacks the second phase. The prevention by AD of the effect of exogenous adenosine and the second phase of the ATP concentration-response curve (after PTX treatment) demonstrates the activity and diffusion of this enzyme in our preparation. Altogether, these observations and those discussed in the previous paragraph suggest that ATP metabolism to adenosine occurred in the study brain slices but that this is not normally required for the inhibitory actions of ATP on the gEPSPs.

The lack of effects of AD and α,β -methylene ADP on the ATP actions disagrees with a report by Cunha et al. (1998), who found that these two substances prevented the ATP effects on the gEPSPs. These discrepancies may result from different experimental protocols. Thus, they recorded at 30°C , whereas we recorded at $35\text{--}36^\circ\text{C}$. The temperature might affect the availability of adenosine outside the cells by modifying not only its production but also its membrane transport. Another difference is that we recorded intracellularly, whereas Cunha et al. (1998) recorded extracellularly. We are sampling neurons with characteristics of a standard CA1 cell (i.e., a membrane potential larger than -55 mV and an action potential amplitude of >60 mV). Extracellular recordings, in contrast, measure average neuronal activity. To avoid voltage-dependent changes in the synaptic activity, we always measured the gEPSPs at the same membrane potential, around the potassium equilibrium potential. Changes in the unclamped resting membrane potential due to postsynaptic actions of any experimental maneuver could indirectly affect synaptic transmission, which is a concern during extracellular recordings. Finally, unlike Cunha et al. (1998), we also performed our recordings in the presence of picrotoxin to prevent the synaptic transmission mediated by γ -aminobutyric acid $_A$ receptors.

Ross et al. (1998) reported experimental evidence in favor of AMP mediating the inhibitory actions of ATP on epileptiform activity in the CA3 region of the rat hippocampus. Here, we showed that AMP and ADP also inhibit the gEPSPs, perhaps indicating that these metabolites could also contribute to ATP action.

ATP-Induced Presynaptic Inhibition Is Mediated by G Protein-Coupled Receptors That Are Different Than Those Activated by Adenosine. Various observations indicate that nucleotide actions on gEPSPs are mediated by receptors coupled to G proteins. The first observation is the relative slow kinetics and lack of desensitization of this nucleotide response. Second is the lack of effects of suramin and PPADS. These antagonists are known to block P2X (ionotropic) receptors in hippocampal neurons (Pankratov et al., 1998; Bajjt et al., 1999). Some homomeric P2X channels formed by either P2X4 or P2X6 are not sensitive to suramin or PPADS, but recent evidence suggests that P2X4 subunits are not the primary subtype of P2X receptor in hippocampal neurons (Bajjt et al., 1999). Third, the ATP presynaptic effects were inhibited by PTX and NEM, substances that can alter responses mediated by various G protein-linked receptors (Smith and Harden, 1984; Wu et al., 1992; Shapiro et al., 1994; Barajas-López et al., 1996). Nucleotide receptors coupled with G proteins are P2Y receptors, according to the current nomenclature (Abbracchio and Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1994).

ATP and the ATP γ S presynaptic effects were more affected by PTX than those induced by adenosine. Indeed, adenosine was more potent than these nucleotides after the PTX treatment. This indicates that the G proteins mediating A1 γ actions are different from those mediating adenosine presynaptic actions. These observations would also imply that these nucleotides are activating a different pool of receptors than adenosine.

Adenosine presynaptic actions in hippocampal neurons are thought to be mediated by the activation of A1 receptors (Dunwiddie and Fredholm, 1989; Fredholm et al., 1989; Fredholm, 1990; Schoiz and Müller, 1991), which are G protein-coupled receptors (Abbraccio and Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1994). Some adenosine effects mediated by these receptors are PTX-sensitive (Dolphin and Prestwich, 1985; Sitinsky et al., 1990; Schoiz and Müller, 1992; Barajas-López et al., 1996) but not in all preparations (Fredholm et al., 1989; Broad et al., 1993; Barajas-López et al., 1996). We found that adenosine presynaptic effects were only slightly decreased despite the large concentrations (5 μ g/ml) and the relative long applications (16 h) of PTX used here. Consistent with our findings, previous studies found that presynaptic actions of this nucleoside are highly resistant to PTX (Fredholm et al., 1989; Stratton et al., 1989). Indeed, intrahippocampal injections of PTX can prevent adenosine effects in hippocampal slices only when ≥ 1 μ g is injected and only when it is applied 3 to 8 days before adenosine effects are measured (Stratton et al., 1989). In culture preparations of hippocampal neurons, 250 ng/ml PTX can readily prevent presynaptic effects of A1 receptor agonists (Schoiz and Müller, 1991), which suggests that PTX diffusion to the subcellular region where adenosine receptors are located might be limited in the slice preparation or during intracerebral injections. Our observation that ATP and ATP γ S effects are more affected by PTX than adenosine actions suggests that nucleotide and adenosine receptors in the hippocampus are located in different subcellular regions. Another alternative explanation is that adenosine receptor pool in the slice and the intact brain is larger than the nucleotide receptor pool and therefore less sensitive to PTX.

ATP Presynaptic Receptors Are Sensitive to Theophylline Analogs. The nucleotide receptors present in the CA1 collateral fibers (present study) have similar pharmacological properties as P3-purinoceptors (see the Introduction). Thus, CPT was a potent ($K_D = 4$ nM) and competitive antagonist at the receptors that mediate the ATP effects on gEPSPs. This K_D value is virtually the same as that of CPT at A1 adenosine receptors (Dunwiddie and Fredholm, 1989; Fredholm et al., 1994). Because of the reasons discussed earlier, it is unlikely that ATP is acting via adenosine receptors, and therefore, we favor the alternative explanation that CPT cannot distinguish between presynaptic receptors activated by ATP and adenosine in hippocampal synapses, as previously noted in submucosal neurons (Barajas-López et al., 1995). Because the receptors described here are activated by nucleotides and appear to be G protein-linked (because they are PTX and NEM sensitive) and because they are sensitive to theophylline derivatives, we proposed to classify them as P2Y-theophylline-sensitive.

PTX sensitivity also suggests that ATP could be inhibiting the gEPSPs by decreasing calcium currents and/or adenylyl cyclase activity. This hypothesis is based on the fact that PTX

is known to specifically target G α_i and G α_o proteins, which activation inhibits adenylyl cyclase activity and calcium channels, respectively (see Hille, 1992). In agreement with this hypothesis, A1 γ receptors can inhibit calcium currents exocytosis (Lim et al., 1997), and adenylyl cyclase activity. The presence of P2 receptors insensitive to suramin and negatively coupled to adenylyl cyclase has also been reported in hepatocytes (Tomura et al., 1992) and PC12 cells (Murayama et al., 1998).

At these P2Y-theophylline-sensitive receptors of hippocampal nerve terminals, α, β -methylene ATP, β, γ -methylene ATP, UTP, GTP, and 2-MeS α ATP appear to be less effective than ATP. Full agonists have the following rank order of potency: AMP = ATP > ATP γ S > adenosine = α DP. Suramin and PPADS and reactive blue 2 (P2 receptor antagonists) were inactive on these receptors. Similar agonist profile was described in submucosal neurons (Barajas-López et al., 1995).

In conclusion, presynaptic fibers in the CA1 hippocampal region express ATP receptors whose activation inhibits synaptic release of glutamate. These receptors appear to be P2Y (G protein-coupled), which, however, are sensitive to theophylline derivatives.

References

- Abbraccio MP and Burnstock G (1994) Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Review 9 Pharmacol Ther* 64:445-475
- Rajit SK, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C and Lester HA (1994) Allosteric control of gating and kinetics at P2X α receptor channels. *J Neurosci* 18:7289-7299
- Barajas-López U, Müller MJ, Franco-Gómez B and Espinosa-Luna R (1995) ATP inhibits the synaptic release of acetylcholine in submucosal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 274:1233-1243
- Barajas-López U, Perez AI and Espinosa-Luna R (1996) Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *Am J Physiol* 271:C964-C975
- Barajas-López C, Surprenant A and North RA (1991) Adenosine A $_1$ and A $_2$ receptors mediate presynaptic inhibition and postsynaptic excitation in guinea pig submucosal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 258:490-495
- Broad RM, McDonald TJ and Cook MA (1993) Adenosine and 5-HT $_1$ inhibitor substance T release from nerve endings in myenteric ganglia by distinct mechanisms. *Am J Physiol* 264:G454-G461
- Burnstock G (1990) Overview: Purinergic mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 603:1-18
- Chen BC, Lee CM and Liu HW (1996a) Inhibition of ecto-ATPase by PPADS, suramin and reactive blue in endothelial cells, C6 glioma cells and RAW 264.7 macrophages. *Br J Pharmacol* 116:1628-1634
- Chen W, Wierzbicki A, Hogan MV, Yang HA, Korocic E and Ehrlich YH (1996b) Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9688-9693
- Cuñas RA, Ribeiro JA and Sebastião AM (1994) Purinergic modulation of the evoked release of [3 H]acetylcholine from hippocampus and cerebral cortex of the rat: Role of the ectonucleotidase. *Eur J Neurosci* 6:633-642
- Cuñas RA, Sebastião AM and Ribeiro JA (1996) Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ectonucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. *J Neurosci* 18:1957-1965
- Dalziel EH and Westfall DP (1994) Receptors for adenosine nucleotides and nucleotides: Subclassification, distribution, and molecular characterization (Review). *Pharmacol Ther* 46:445-466
- Dolphin AC and Prestwich S (1985) Purinergic tone reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release. *Nature Lond* 316:148-150
- Dunwiddie TV, Dial L and Proctor WR (1997) Adenosine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 17:7673-7682
- Dunwiddie TV and Fredholm BB (1989) Adenosine A1 receptors inhibit adenylyl cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 249:31-37
- Edwards FA, Gibb AJ and Colquhoun D (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature Lond* 359:144-147
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B and Takahashi T (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurons of the mammalian central nervous system. *Biophys J* 56:1000-1012
- Ernie RJ, Derach V and Surprenant A (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature Lond* 357:303-306
- Forrest EM, Dun RA and Westfall DP (1992) Nucleotide modulation of acetylcholine release from sympathetic nerves in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* 266:821-826

- Fredholm BB (1990) Adenosine A₁-receptor-mediated inhibition of evoked acetylcholine release in the rat hippocampus does not depend on protein kinase C. *Acta Physiol Scand* 140:343-349.
- Fredholm BB, Ahrensberg MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson EA, Leff P and Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Reviews Pharmacol Sci* 48:143-158.
- Fredholm BB and Dunwiddie TV (1985) How does adenosine inhibit transmitter release. *Review Fronts Pharmacol Sci* 5:120-124.
- Fredholm BB, Proctor W, van der Ploeg F and Dunwiddie TV (1989) In vivo purinergic transmission in the rat brain: some, but not all, mechanisms. A effects in slices of the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 172:249-262.
- Hille B (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Lim W, Kim SJ, Yan HD and Kim J (1997) Ca²⁺-channel dependent and independent inhibition of exocytosis by extracellular ATP in voltage-clamped rat adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch* 435:34-42.
- Mallouk R and Müller JP (1986) Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. *Nature (Lond)* 320:529-530.
- Matsuyama T, Terakura Y, Watanabe A and Nomura Y (1996) P2 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 348:71-78.
- Nara V and Lomax DA (1992) 5'-Nucleotidase from rat heart membranes: Inhibition by adenosine nucleotides and related compounds. *Biochem J* 226:645-651.
- Panikratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT and Kraushar O (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 10:3908-3909.
- Ross FM, Brodie MJ and Stone TW (1986) Adenosine monophosphate as a mediator of ATP effects at P₁ purinoceptors. *Br J Pharmacol* 124:818-824.
- Schorf KP and Miller RJ (1991) Analysis of adenosine actions on Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *J Physiol (Lond)* 433:373-383.
- Schorf KP and Miller RJ (1992) Inhibition of quantal transmitter release in the absence of calcium influx by a G-protein-linked adenosine receptor at hippocampal synapses. *Neurosci Biophys Lett* 115:1-5.
- Shapiro MS, Wollmuth LP and Hille B (1994) Modulation of Ca²⁺ channels by P2X-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14:7109-7116.
- Suzuzuka K, Byar RA and Weirfall DP (1980) Characterization of presynaptic purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery. *Neuropharmacology Arch Pharmacol* 9:221-227.
- Szilvsky EM and Gerasch V (1993) On the excitatory effects of ATP and its role as a neurotransmitter in cochlear neurons of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* 464:197-212.
- Szilvsky EM and Ginsberg BL (1983) Inhibition of acetylcholine release from preganglionic frog nerves by ATP but not adenosine. *Nature (Lond)* 305:217-218.
- Szilvsky EM, Hunt JM, Soloski CS and Hirsch JR (1990) Prejunctional adenosine and ATP receptors. *Ann NY Acad Sci* 603:324-323.
- Smith MM and Harden TK (1984) Modification of receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in NG108-15 neuroblastoma X glioma cells by n-ethylmaleimide. *J Pharmacol Exp Ther* 228:425-433.
- Srinivas ER, Cole AJ, Pritchett J, Eccles CU, Worley PF and Baraban JM (1989) Intrahippocampal injection of pertussis toxin blocks adenosine suppression of synaptic responses. *Brain Res* 494:359-364.
- Tomura H, Okuyama F and Kondo Y (1992) Differentiation between two types of P2 purinoceptors by suramin in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 220:363-365.
- Von Klugfeldt I, Schoffel E and Starke K (1988) Inhibition by nucleotides acting at presynaptic P₂-receptors of sympathetic neuro-effector transmission in the mouse isolated vas deferens. *Neuropharmacology Arch Pharmacol* 340:522-532.
- Wu YN, Yang YC and Wagner PD (1992) Modification of chromaffin cells with pertussis toxin or N-ethylmaleimide lowers cytoskeletal F-actin and increases Ca²⁺-dependent secretion. *J Biol Chem* 267:8396-8403.
- Zagladin AV, Zagladina LE, Bodin P, Bailey D and Baraschok G (1995) Effects of P2-purinoceptor antagonists on actin-nucleotide assembly of guinea-pig vas deferens cultured smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int* 36:863-869.

Send reprint requests to: Dr. Carole Baraschok, 9th Floor, Beller-Hill Hall, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6. E-mail: baraschoc@meds.queensu.ca