

03081
10
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y
DE POSGRADO DEL

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

"ESTUDIO DE LOS POTENCIALES SINÁPTICOS INDUCIDOS
POR LA 4-AMINOPIRIDINA EN NEURONAS
NEOESTRIATALES DE LA RATA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
PRESENTA:
EL MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
JORGE LUIS VALENTE FLORES HERNANDEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F. SEPTIEMBRE, 1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

RESUMEN

Los experimentos de esta tesis fueron realizados en neuronas "espinosas medianas" del neostriado de la rata utilizando registros intracelulares y fijación de corriente en rebanadas cerebrales mantenidas *in vitro* y sumergidas en solución fisiológica.

El objetivo principal de la tesis fue el de lograr un arreglo experimental que nos permitiera evaluar la liberación de neurotransmisor por métodos electrofisiológicos, caracterizar esta liberación y evaluar posibles mecanismos moduladores. En particular, la acción de la dopamina en el neostriado está poco estudiada y pensamos que podría estar implicada. Esto implicó registrar la actividad sináptica espontánea y la facilitada por la 4-amino-piridina (4-AP). En condiciones basales esta actividad es de baja frecuencia (alrededor de un potencial sináptico por segundo; 1 s^{-1}). Pero cuando se agrega el bloqueador de conductancias de potasio 4-AP a dosis micromolares ($100 \mu\text{M}$), la frecuencia de aparición de los potenciales sinápticos se incrementa a valores promedio de 8 s^{-1} .

El neostriado fue el núcleo escogido pues no tiene transmisión glutamatérgica intrínseca. De esta manera, toda actividad excitadora glutamatérgica proviene de fibras aferentes cuyos somas se sitúan fuera del núcleo, y que en nuestro caso fueron excluidos de la preparación. La actividad sináptica observada en estas condiciones resultó ser dependiente de conductancias de sodio y de calcio, pues fue bloqueada con tetrodotoxina (TTX) o cadmio (Cd). Lo que sugiere que depende del disparo de potenciales de acción en fibras o terminales aferentes.

Los potenciales sinápticos resultaron ser tanto GABAérgicos (i.e., bloqueados con bicuculina) como glutamatérgicos (bloqueados por la combinación de CNQX y APV). Lo que quiere decir que en presencia de bicuculina nos quedamos con la transmisión glutamatérgica extrínseca, proveniente de las vías cortico-estriatal y cortico-talámica.

En estas condiciones, $100 \mu\text{M}$ de 4-AP permitieron registrar una frecuencia promedio de potenciales sinápticos de 4 s^{-1} . Esto es, la mitad de la transmisión en presencia de 4-AP únicamente. Además, encontramos que el agonista del receptor dopaminérgico D2, quinpirole ($10 \mu\text{M}$), es capaz de reducir la frecuencia de aparición de estos potenciales sin cambiar: a) la resistencia de entrada, b) el potencial de membrana, o c) el umbral de disparo de la célula postsináptica. Resultados que aunados a las características de la preparación (fibras aferentes aisladas de sus somas de origen) nos permiten sugerir fuertemente que la acción del quinpirole está mediada por receptores presinápticos en las fibras o botones aferentes.

SUMMARY

The experiments of this thesis were done in "medium spiny" neurons of the rat neostriatum using intracellular recordings and current-clamp conditions in *in vitro* brain slices totally submerged in physiological saline.

The principal goal of this thesis was to achieve an experimental set-up that would allow to record transmitter release by electrophysiological methods, to characterize this release, and to evaluate possible modulating mechanisms. In particular, dopamine's action in the neostriatum has been little studied and we thought it could be involved. This implied to record synaptic activity both spontaneous and facilitated by 4-aminopyridine (4-AP). In control conditions, spontaneous release is of low frequency (about one synaptic potential per second; 1 s^{-1}). However, in the presence of the potassium conductance blocker 4-AP at micromolar doses ($100\ \mu\text{M}$), the frequency of recording synaptic potentials increased to mean values of 8 s^{-1} .

The neostriatum was chosen due to the fact that it lacks intrinsic glutamatergic transmission. In this way, all excitatory glutamatergic activity comes from external afferent fibers whose somata is located outside the nucleus, and which in the present case, were excluded from the preparation. The synaptic activity observed in these conditions came to be dependent upon sodium and calcium conductances because it was blocked by tetrodotoxin (TTX) or cadmium (Cd). Thus suggesting that it depends on the firing of action potentials by the afferent terminals or fibers.

Recorded synaptic potentials were both GABAergic (i.e., blocked by bicuculline) and glutamatergic (blocked by a combination of CNQX and APV). This means that in the presence of bicuculline we are left with extrinsic glutamatergic transmission coming from corticoestriatal and corticothalamic pathways.

In these conditions $100\ \mu\text{M}$ 4-AP allowed to record a mean frequency of synaptic potentials of 4 s^{-1} . That is, half the activity in the presence of 4-AP only. Moreover, it was found that the dopaminergic D2 receptor agonist quinpirole ($10\ \mu\text{M}$) was able to reduce the frequency of recording these potentials without changing: a) input resistance, b) membrane potential, or c) firing threshold of the postsynaptic cells. These results together with the characteristics of the preparation (afferent fibers cut from their somata of origin) allow us to strongly suggest that the action of quinpirole is mediated through receptors located on presynaptic fibers or boutons.

Esta tesis fue realizada en los laboratorios 123-norte y 125-norte del Instituto de Fisiología Celular, en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo la dirección académica de la doctora en ciencias Elvira Galarraga P. y el doctor en ciencias José Bargas D.

Agradecimientos

Agradezco a José Bargas y Elvira Galarraga por su amistad, calma y apoyo que me brindaron durante la realización de esta tesis doctoral.

Agradezco

A los doctores

Jorge Aceves Ruiz

José Vargas Díaz

Arturo Hernández Cruz

Marcia Hiriant Urdanivia

Ana María López Colomé

Ricardo Tapia Ibarquengoytia

Por sus consejos en la edición final de esta tesis.

Dedico esta tesis:

A

Angélica Vidal Montoya, Jorge Valente Flores Vidal
y recientemente a Laura Angélica Flores Vidal

mi esposa e hijos
por compartir mi vida.

A

Estelina Hernández Albarrán y Valente Flores Aguilar

mis padres
por darme el apoyo durante el desarrollo de mis estudios.

A

Adriana, Martha, Alma, Claudia, Susana y Ruth

mis hermanas
por apoyarme en todo momento

A

Beatriz, Julieta, Leova, Verónica, Olga y José
mi otra familia

A

la familia Espinola Martínez
mi familia adoptiva

A

Gloria, Elizabeth, Serafín, Ricardo, Alfonso,
Gerardo y Celia, y a Víctor y Angélica
los amigos de siempre.

A

Xochitl, Alejandra, Carmen,
Arturo, Juan Carlos, Dagoberto y Salvador
Por su amistad y continuas enseñanzas en el laboratorio.

ÍNDICE

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	5
INTRODUCCIÓN	7
I El neocóstriado	8
I.I.- Anatomía y fisiología del neocóstriado	8
I.II.- Las aferentes al neocóstriado	11
I.II.1. Tipos de aferentes	11
I.II.2.- Las sinapsis rápidas y lentas	13
I.II.3.- Origen de las sinapsis glutamatérgicas al neocóstriado	15
I.II.4.- Origen de las sinapsis gabaérgicas al neocóstriado	15
II Neuronas del neocóstriado	16
II.I La neurona principal	16
II.I.1.- Características generales	16
II.I.2.- Aferentes sinápticas sobre las neuronas espinosas medianas	18
II.I.3.- Tipos de neuronas espinosas medianas	19
II.I.4.- Electrofisiología de las neuronas espinosas medianas	19
II.II Las interneuronas	21
II.II.1.- La interneurona gigante colinérgica	21
II.II.2.- Las interneuronas medianas no espinosas	22
III La transmisión sináptica	25
III.I.- Aspectos generales	25
III.II.- Aspectos morfológicos de la sinapsis química	25
III.II.1.- La presinapsis	25
III.II.2.- La postsinapsis	28
III.III.- Aspectos funcionales de la sinapsis química	29
III.IV.- La teoría cuántica de la transmisión sináptica	32
III.IV.1.- Algunos aspectos de la teoría cuántica de la transmisión sináptica en el sistema nervioso periférico	32
III.IV.2.- La teoría cuántica en el sistema nervioso central	34
III.V.- Técnicas para incrementar experimentalmente la transmisión sináptica	38
Revisión publicada en la Revista Biomédica, 1993, Vol 4: pags 141-151	38
IV. La modulación de la transmisión sináptica	39
IV.I.- La modulación presináptica	39
IV.II.- La modulación postsináptica	39
IV.III.- La modulación sináptica por dopamina	40

OBJETIVOS	43
METODOLOGÍA	44
RESULTADOS	47
Sección 1.- Anatomía de las neuronas espinosas medianas.	48
Sección 2.- Electrofisiología de la neurona espinosa mediana	49
Sección 3.- "Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP". Journal of Neurophysiology, Vol. 72 No. 5 1994, pp 2246-2256.	55
Sección 4.- "Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons" Enviado y recibido para revisión y publicación en Journal of Neurophysiology	57
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	65

Lista de Abreviaturas:

2-APV	Ácido 2(-)-2-amino-fosfonoaléxico
4-AP	4-aminopiridina
AMPA	Ácido α -metil-3-hidroxi-5metil-4-oxazole propiónico
Bic	Bicuculina
Cd ²⁺	Cadmio
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
GABA	γ -aminobutirato
Glu	Glutamato
NMDA	N-metil-D-aspartato
PPE	Potenciales de placa excitadores
PSE	Potenciales sinápticos espontáneos
TTx	Tetrodotoxina

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La presente tesis será organizada de la siguiente manera:

En la Introducción presento una revisión de los conceptos básicos y actualizados para el entendimiento de esta tesis. En esta revisaré las características anatómico-fisiológicas relacionadas con las neuronas neostriatales de la rata haciendo énfasis en las neuronas espinosas medianas y las relaciones funcionales del neostriado con otros núcleos cerebrales.

Posteriormente revisaré los conceptos relacionados con la transmisión sináptica, comparando la transmisión periférica (unión neuromuscular y sistema endócrino) con la transmisión en el sistema nervioso central. Asimismo, ahondaré en el concepto de transmisión sináptica cuántica en el sistema nervioso central.

Tomando en consideración que la frecuencia de registro de potenciales sinápticos en las neuronas espinosas medianas neostriatales es muy bajo, cuando estas son estudiadas *in vitro* (rebanadas de estriado), en esta tesis utilicé la 4-aminopiridina (4-AP) para incrementar dicha actividad. Por lo tanto, realicé una revisión sobre el mecanismo de acción actualmente aceptado de la acción de las aminopiridinas. Dicha revisión fue publicada en Revista Biomédica en 1993 (Flores-Hernández, 1993).

Como última parte de la introducción revicé el papel de la dopamina como de neuromodulador presináptico de la actividad sináptica glutamatérgica cortico-estriatal.

Los Objetivos de esta tesis son presentados en la sección correspondiente.

Los Métodos son presentados en tres partes. En la primera presento en forma breve una sección de Métodos y Materiales, la segunda y tercera son presentadas en la sección de métodos dentro de cada artículo de los dos artículos de ésta tesis.

Los Resultados son divididos en 4 secciones.

En la primera sección abordo de manera general las características anatómicas de las neuronas espinosas medianas.

En la segunda sección presento las características electrofisiológicas de las neuronas espinosas medianas.

La tercera sección se presenta la caracterización de los potenciales sinápticos inducidos por la 4-AP registrados en las neuronas espinosas medianas del neostriado de la rata. Este trabajo fue publicado con el título "Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP" en Journal of Neurophysiology, volumen 72, No. 5 en 1994.

En la cuarta y última sección presento el efecto de la dopamina sobre la transmisión sináptica glutamatérgica. Este trabajo es presentado como un artículo cuyo título es "Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons" el cual fue enviado a revisión para publicación en la misma revista.

En la Discusión se incluyen todas las secciones presentadas en los resultados.

Finalmente, en las Conclusiones enumero las conclusiones a las que llegué durante el desarrollo de la presente tesis.

INTRODUCCION

En la presente tesis se estudiarán los potenciales sinápticos espontáneos (**PSEs**) cuya frecuencia es incrementada por la 4-aminopiridina (**4-AP**), un bloqueador de conductancias de potasio, en una población de neuronas cerebrales: las neuronas "espinosas medianas" del neocórtex de la rata.

Cuando las neuronas espinosas medianas del neocórtex son mantenidas *in vitro* (rebanada), en condiciones normales, muestran una baja frecuencia de aparición de los PSEs (< 1 Hz). Cuando se agrega 4-AP en dosis micromolares la frecuencia de aparición de PSEs es incrementada. Esto es, la 4-AP aumenta la liberación espontánea de neurotransmisores. Los PSEs pueden ser separados farmacológicamente empleando los antagonistas específicos para los receptores a neurotransmisores de acción rápida (e.g. GABA y glutamato). Los PSEs cuya frecuencia es incrementada por la 4-AP son bloqueados por **TTX** o **cadmio**, por lo tanto son dependientes de los impulsos nerviosos que activan conductancias de calcio. Además, son bloqueados completamente por la combinación de **bicuculina (BIC)**, **CNOX** y **2-APV**. Las amplitudes promedio de los PSEs corresponden a la activación de un solo sitio activo por evento y concuerdan con el **cuanto** para Glu y GABA descrito en sinapsis cerebrales.

En vista de que en presencia de bicuculina se pueden separar los potenciales sinápticos glutamatérgicos inducidos por la 4-AP, es posible estudiar el efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la frecuencia de aparición de potenciales sinápticos, esto es, sobre la liberación espontánea de neurotransmisores medida electrofisiológicamente. En esta tesis estudiaremos el tipo de receptores a dopamina que media este efecto presináptico modulador.

La Introducción tocará los siguientes puntos:

- 1.- Anatomía funcional del neocórtex (NE) y su papel en la fisiología de los ganglios basales.
- 2.- Las neuronas del NE, principalmente la neurona espinosa mediana.
- 3.- La teoría cuántica de la transmisión sináptica en el sistema nervioso central.
- 4.- La 4-aminopiridina como una herramienta para incrementar la actividad sináptica.
- 5.- Los mecanismos moduladores presinápticos de la transmisión; el papel de la dopamina.

I. EL NEOESTRIADO

I.1.- ANATOMÍA Y FISIOLÓGIA DEL NEOESTRIADO

El núcleo caudado-putamen o neostriado (NE) es una estructura subcortical que forma parte de los ganglios basales (ver figura 1.). En la mayoría de las especies de vertebrados este núcleo es el más prominente de las estructuras subcorticales telencefálicas. Se localiza en el cerebro anterior de reptiles, aves y mamíferos. En mamíferos superiores el neostriado se divide en los núcleos caudado y putamen los cuales se encuentran separados por la cápsula interna, que es formada por las fibras corticales descendentes (ver figura 2). En mamíferos inferiores las fibras descendentes están dispersas y no forman la cápsula interna por lo que dan al núcleo un aspecto de rallado (*estriado*) cuando este es observado en un corte sagital. No posee una organización laminar como las cortezas cerebral, cerebelar o hipocámpica.

El NE ha sido relacionado con funciones motoras (DeLong, 1990). Estas observaciones se han basado en los estudios de enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington. Asimismo, el NE se ha relacionado con la generación de movimientos voluntarios (Brooks, 1986; Wilson, 1990b). Sin embargo, no se sabe como el NE contribuye a la generación de estos movimientos. Se ha reportado que los déficits motores son dependientes de contexto (Wickens, 1993). Un movimiento que no puede realizarse en unas

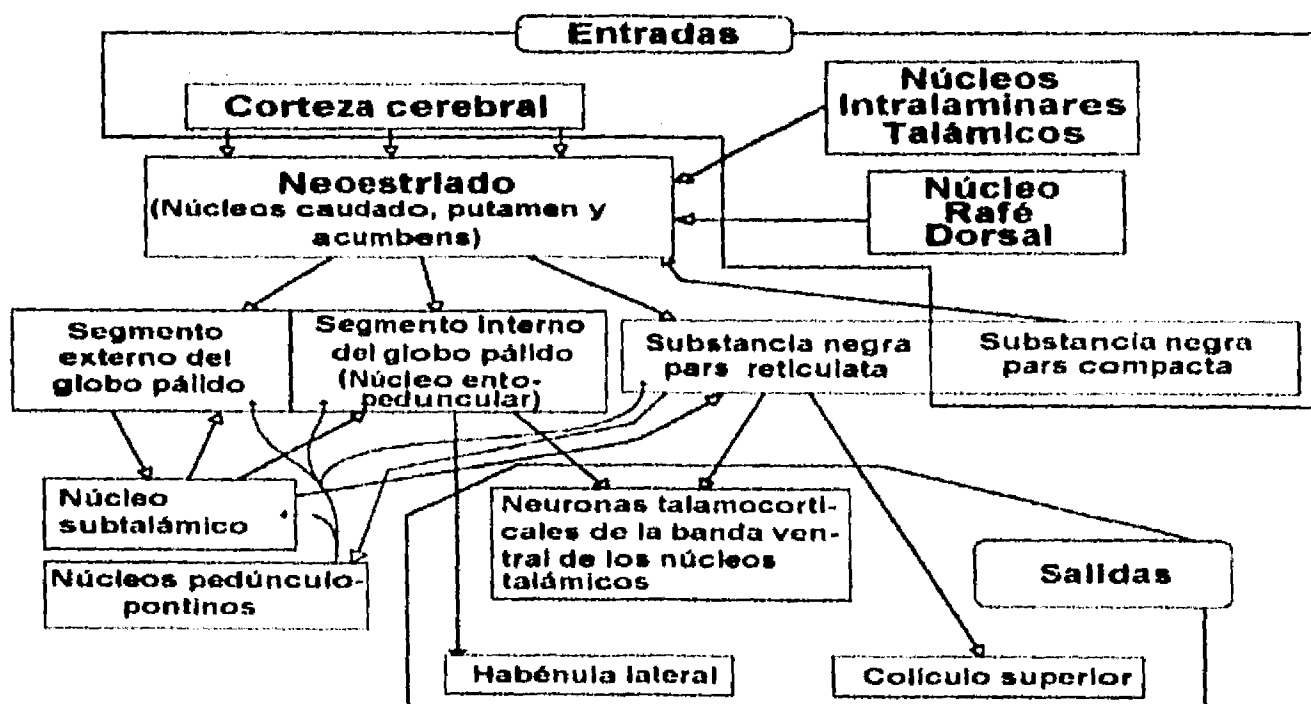


Figura 1. Relación del neostriado con otras regiones cerebrales.

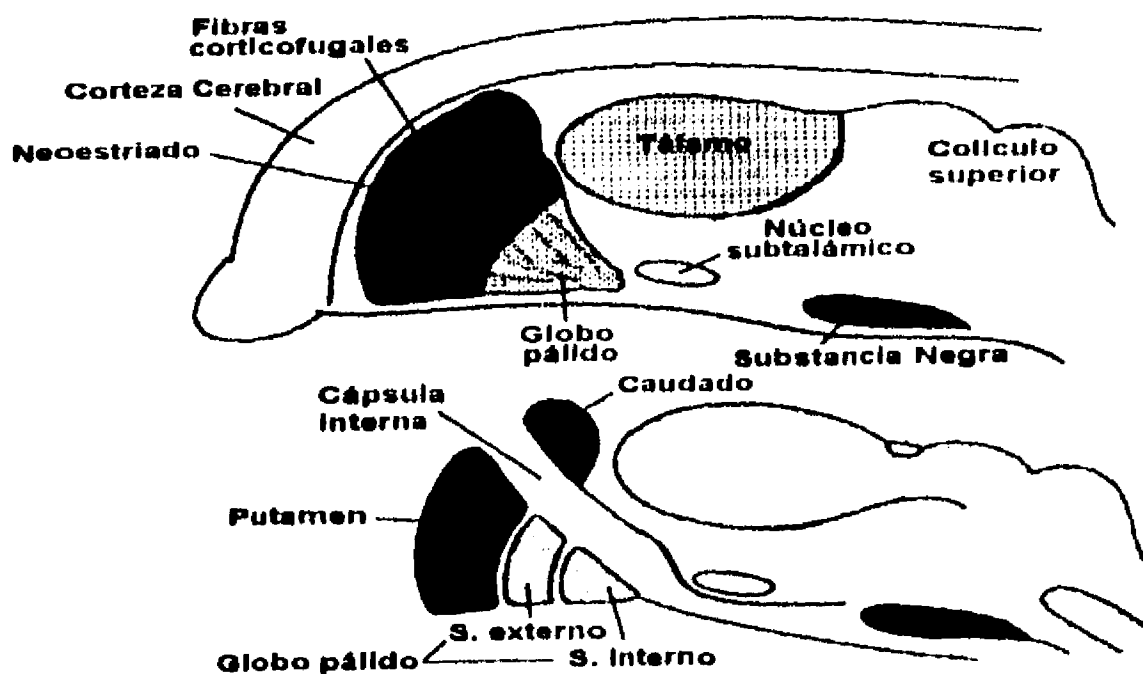


Figura 2. Localización del neostriado. Arriba. El NE en mamíferos inferiores presenta un aspecto estriado en el cual las estrias son formadas por las fibras descendentes corticales que atraviesan el NE. Abajo. En mamíferos superiores las fibras descendentes corticales se unen formando la cápsula

circunstancias puede ser ejecutado en otras. Es decir, la habilidad de realizar movimientos permanece intacta, pero en algunas circunstancias éstos no pueden ser realizados con la misma energía o rapidez. La entrada dopaminérgica mesencefálica al NE es indispensable para el control de las funciones de los ganglios basales a través de las vías cortico-estriato-palido-talámico-corticales. La disminución en la concentración de dopamina en el NE produce la enfermedad de Parkinson, que lleva a la pérdida del movimiento normal y a los déficits cognoscitivos del tipo de los producidos por la interferencia con el funcionamiento del lóbulo frontal. Un exceso de dopamina en NE puede causar movimientos anormales como coreas, distonias y tics, e incluso desordenes del pensamiento (Marsden, 1992).

La aparición de movimientos anormales seguidos a la lesión del neostriado llevó a la conclusión de que la función normal del neostriado estaba relacionada con el control del movimiento (Laursen, 1963; Delgado, 1979).

Actualmente, el neostriado es considerado por algunos autores como vías en paralelo organizadas macroscópicamente que participan en el procesamiento de información desde áreas corticales y talámicas funcionalmente relacionadas (Alexander y Crutcher, 1990a, 1990b; Mitchell *et al.*, 1991; Marsden, 1992; Hoover y Strick, 1993). La información que fluye a través de esas vías es procesada en el NE, pasa a las estaciones de salida de los ganglios basales. Esta información es enviada al mesencéfalo, así como regresada a través de vías directas e indirectas a distintas regiones del tálamo y la corteza. Han sido definidos cinco vías paralelas por los que fluye la información a través del NE y son presentados en la tabla 1.

FALLA DE ORIGEN

TABLA 1. ORGANIZACIÓN DE LAS AFERENTES CORTICALES AL NE						
CIRCUITO	PREFRONTAL DORSOLATERAL	ORBITOFRONTAL LATERAL	OCULOMOTOR	MOTOR		LÍMBICO
REGIÓN CEREBRAL	Corteza prefrontal dorsolateral Corteza parietal posterior y área premotora arqueada	Corteza orbitofrontal lateral	Campos oculares frontales	Área suplementaria motora Corteza premotora Corteza Sensoriomotora		Área cingulada anterior
REGIÓN ESTRIATAL	Caudado dorsal	Caudado ventromedial	Caudado	Putamen		NE ventral
REGIÓN PALIDAL	Interno	Interno	Interno	Externo	Interno	Ventral
REGIÓN NIGRAL	Reticulada	Reticulada	Reticulada		Reticulada	
				(Núcleo subtalámico)		
REGIÓN TALÁMICA	Ventral anterior región parvocelular Medial dorsal región magnocelular	Ventral anterior región magnocelular Medial dorsal región magnocelular	Mediodorsal pars multiformis Ventral anterior región magnocelular Ventral anterior región parvocelular	Ventre lateral pars oralis Ventre lateral pars medialis Ventral anterior región parvocelular Centromedial		Mediodorsal pars magnocelular Medial dorsal región parvocelular
REGIÓN DE SALIDA	?	?	Colículo superior Formación reticular pontina paramediana	Tallo cerebral Médula espinal		Corteza de asociación límbica

Cuadro modificado de Alexander *et al.*, 1986 y Marsden, 1992

Por el contrario, otros autores han propuesto que la información cortical ingresa al estriado en un patrón absolutamente convergente. Esta convergencia es llevada a cabo por la sobreposición de islas de terminales axónicas cortico-estriatales (Percheron y Filion, 1991).

Por otro lado, Parent y colaboradores (1993, 1995), sugieren que no hay tal convergencia de información y que esta es finamente segregada formando múltiples representaciones en sus proyecciones al segmento externo del globo pálido y a la región reticulada de la sustancia negra.

El papel que juega el NE en el funcionamiento cerebral es definido como un proceso de desinhibición en el cual la activación del NE produce una inhibición de las neuronas del globo pálido y de la sustancia negra. Las neuronas de estos núcleos se caracterizan por tener actividad tónica inhibitoria sobre sus núcleos blanco. Los núcleos blanco del globo pálido y la sustancia negra reticulada son los talámicos, los del colículo superior y los pedúnculo pontinos. Cuando las neuronas nigrales y palidales son inhibidas por las aferentes neocorticales, disminuye la inhibición tónica producida por éstas (desinhibición) aumentando de este modo la actividad en los núcleos blanco (Chevalier y Deniau, 1990; Chevalier *et al.*, 1984, 1985; Deniau y Chevalier, 1985).

El NE es modulado, entre otros transmisores, por la dopamina, la acetilcolina y la serotonina. En la región dorsal del NE se ha propuesto que la dopamina contribuye a la coordinación sensoriomotora durante el desarrollo de una respuesta en una serie de procesos preparatorios para respuestas predefinidas (Marsden, 1992). En la región ventral la dopamina influencia el impacto de un estímulo relacionado con una recompensa (Robbins y Everitt, 1992; Marsden, 1992). La actividad colinérgica es intrínseca al NE y es producida por las neuronas gigantes no espinosas (Wilson, 1990). La serotonina se origina en los núcleos del rafe dorsal (Levoie y Parent, 1990).

I.II LAS AFERENTES AL NEOESTRIADO

I.II.I Tipos de aferentes

Las entradas corticales glutamatérgicas que llegan al NE surgen principalmente de las áreas sensoriales, motoras y de asociación. Las entradas glutamatérgicas corticales convergen con entradas, también glutamatérgicas, que se originan en los núcleos intralaminares talámicos, con entradas dopaminérgicas que surgen desde la sustancia negra (parte compacta) y con entradas serotoninérgicas que se originan en núcleo del rafe dorsal (Parent, 1990).

Los estudios realizados con leucoaglutinina *Phaseolus vulgaris* (PHA-L, por sus siglas en inglés) han mostrado que las fibras aferentes de corteza arborizan en el NE con el patrón definido por Cajal como axodendrítico cruciforme (Ramón y Cajal, 1909, 1911; Wilson, 1990; Fox, et al., 1971). El término cruciforme se refiere a que las fibras viajan a través del núcleo cruzando sobre las dendritas de distintas neuronas, haciendo sinapsis con éstas a su paso (*en passant*) (Fox et al., 1971; Di Figlia et al., 1978).

Una fibra cruza los campos dendríticos de muchas neuronas, pero no hace muchas sinapsis con una neurona en particular. Mediante registros electrofisiológicos, Mori et al., (1994) calcularon que cada aferente deja en promedio de uno a dos botones en cada neurona postsináptica. Mediante técnicas anatómicas Wilson (1994) calculó que cada aferente cortico-estriatal puede presentar no más de tres o cuatro contactos sobre cada neurona espinosa mediana. En general, las sinapsis se realizan en las espinas dendríticas (aprox. 80 %)(Xu et al., 1991). Aunque todavía no existen estudios anatómicos detallados, este patrón parece estar presente tanto por las entradas corticales como por las talámicas. Ambas aferentes parecen ser glutamatérgicas (Wilson, 1990). Sin embargo, Wilson (1994) muestra dos tipos de aferentes corticales mediante la técnica de la biocitina. Faltan estudios más detallados para saber si alguna aferente deja más de 2 botones en una neurona. Aunque queda claro que sí hay diferencias entre las aferentes.

Las aferentes de las cortezas parietal, occipital, frontal, temporal y límbica terminan en zonas que se extienden longitudinalmente dentro del NE pequeñas subregiones asociadas funcionalmente con áreas corticales (Yeterian y Van Hoesen, 1978; Parthasarathy et al., 1992; Parent, 1990; Marsden, 1992).

Estudios realizados con técnicas de marcado muestran que una pequeña porción de corteza cerebral proyecta a grandes regiones del NE con dirección rostro-caudal (Wilson, 1990; Parent 1990). Muchas aferentes corticales convergen sobre una misma población neuronal. No existe un control

exclusivo de alguna de las cortezas sobre alguna región del NE en particular (Parent, 1990). Sin embargo, cabe señalar que regiones funcionalmente relacionadas de la corteza proyectan sus fibras a grandes regiones del NE guardando cierta organización topográfica. En monos se ha observado que la corteza sensorimotora proyecta al núcleo putamen donde una representación somatotópica de la pierna, brazos y cara ocurre en forma de bandas arregladas oblicuamente (Parent, 1990). En contraste, las áreas asociativas de las cortezas prefrontal, temporal, parietal y cingulada proyectan principalmente al núcleo caudado. Finalmente, las áreas corticales límbica y paralímbica proyectan a regiones ventrales del NE que incluyen al núcleo accumbens, las capas profundas del tubérculo olfatorio y las partes ventrales del caudado y del putamen (Parent, 1990).

Pese a que el NE parece ser un núcleo homogéneo a nivel macroscópico, a nivel microscópico es histológicamente heterogéneo. Estudios histoquímicos han mostrado compartimentos bioquímicamente especializados (Graybiel, 1990).

Existen regiones pobres en la actividad de las enzimas acetil-colinesterasa y tirosina hidroxilasa, así como en los péptidos somatostatina o calbindina, pero que muestran muchos receptores a opiáceos tipo μ (encefalinas) y sustancia P. Estas regiones son denominadas "estriosomas", las cuales tienen el diámetro cercano al reconocido para las columnas corticales (30-100 μ M; Graybiel *et al.*, 1990). Los receptores muscarínicos M1 están particularmente concentrados en los estriosomas (Hirsch, 1989). Se calcula que los estriosomas son el 20 % del volumen estriatal (Graybiel *et al.*, 1991), están embebidos en una región a la cual se le denominó "matriz", que muestra mayor actividad de acetil-colinesterasa y mayor histofluorescencia relacionada con el sistema catecolaminérgico (dopamina) (Hirsch *et al.*, 1989; Desban *et al.*, 1989; Olson *et al.*, 1972; Graybiel, 1990; Gerfen, 1992a y b, Groves, 1995; Divac, 1983; Jiménez-Castellanos y Graybiel, 1989). De este modo los estriosomas que inicialmente fueron descubiertos en mono y humano, corresponden a los "parches" de receptores a opiáceos encontrados en la rata (Graybiel y Radsdale, 1978; Herkenham y Pert, 1981; Donoghue y Herkenham, 1986). Existen diferencias tanto intra- como inter-especie entre varios marcadores del estriosoma (Graybiel *et al.*, 1981). Estudios de reconstrucción tridimensional han mostrado que las regiones ricas en inmunoreactividad a encefalinas forman una red tridimensional que se extiende a través del caudado de la rata y del humano (Groves *et al.*, 1995, 1988; Manley *et al.*, 1991).

El sistema dopaminérgico inerva preferencialmente tanto a la matriz como a los estriosomas, sin embargo, el grupo A9 inerva preferencialmente al estriosoma, mientras que el grupo A8 inerva a la matriz (El sistema catecolaminérgico en el sistema nervioso central se ha nombrado con la letra A y los núcleos A8 y A9 son núcleos dopaminérgicos localizados en el área tegmental ventral y la parte compacta de la sustancia negra) (Kemel *et al.*, 1992; Parent, 1990; Penny *et al.*, 1986a; Kawaguchi *et al.*, 1989). Las regiones corticales prefrontal, insular y amigdalina inervan a los estriosomas, mientras que las cortezas sensorial, motora y el giro cingulado inervan preferencialmente a la matriz. Los estriosomas proyectan principalmente a la zona compacta de la sustancia negra mientras que la matriz dirige sus proyecciones al pálido y a la parte reticulada de la sustancia negra (Jiménez-Castellanos y Graybiel, 1989).

Sólo parte (alrededor del 50%) de las entradas corticales que llegan a las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas poseen una entrada dopaminérgica (Freund *et al.*, 1984).

Se ha propuesto que ciertas clases de interneuronas, por ejemplo las neuronas que contienen somatostatina, pueden servir para comunicar los diferentes compartimentos estriatales (Gerfen, 1984).

También se han relacionado a las entradas corticales al NE con su origen laminar mas que regional. Así, las regiones infragranulares (capa 4 o granular), principalmente la capa V y VI, proyectan a los estriosomes, mientras que las capas supragranulares, capas II y III, dirigen sus axones a la matriz (Arikuni y Kubota, 1986; Gerfen, 1984, 1990).

Las entradas talámicas, nigrales y amigdalinas comparten de manera general el mismo patrón de arborización que las entradas corticales. A la fecha no existen estudios anatómicos que diluciden con detalle las semejanzas y diferencias en los patrones de inervación de los distintos tipos de aferentes al NE.

Sin embargo, para la interpretación de nuestros resultados tomaremos en cuenta dos puntos de lo que se ha dicho: 1) que una fibra aferente hace de uno a 4 contactos sinápticos con una neurona postsináptica, y 2) que la mayor parte si no es que todas de las entradas excitatorias rápidas ("fast ligand gated") son glutamatérgicas.

De las aferentes mencionadas sólo las glutamatérgicas y las serotoninérgicas pueden activar receptores acoplados directamente a un canal (receptores-canal), generando respuestas sinápticas rápidas (con duración del orden de milisegundos). El receptor 5-HT₃ está acoplado a un canal permeable a cationes monovalentes (Na⁺/K⁺) (Saudou y Hen, 1994). No obstante, sólo se han descrito potenciales sinápticos mediados por este receptor en cultivos de NE (Jackson, 1982). Las sinapsis excitatorias rápidas generadas por glutamato son las más comunmente encontradas en el NE (Cepeda *et al.*, 1992a, 1992b; Herrling, 1985; Wilson, 1990; Graybiel, 1990).

Estudios de microscopía electrónica han mostrado la existencia de botones inmunorreactivos a la hidroxilasa de la tirosina (enzima marcadora de vías catecolaminérgicas -dopamina-) (Freund *et al.*, 1984; Smith y Bolam, 1990; Wilson, 1990; Herrling, 1985). Estos botones son clasificados por Pickel *et al.*, (1981), como del tipo I.

En la rata (Arluison y De La Manche, 1980; Soghomonian *et al.*, 1989), gatos (Calas *et al.*, 1976) y monos (Pasik *et al.*, 1982, 1984), las entradas serotoninérgicas se originan en los núcleos del rafé y establecen varicosidades que forman sinapsis asimétricas (usualmente indicadoras de actividad excitadora) sobre las espinas dendríticas y en sus astas en ratas. Del total de varicosidades serotoninérgicas dentro del NE, sólo del 10 al 15 % presentan una típica unión sináptica. El efecto de la serotonina sobre el NE no es claro y puede ser mediado por al menos 13 tipos de receptores (Saudou y Hen, 1994, Teitler y Herrick-Davies, 1994).

I.II.2.- Las sinapsis rápidas y lentas

La acción sináptica puede activar directamente receptores-canal, permitiendo el flujo de carga iónica a favor de su gradiente electroquímico. Por otro lado, la acción sináptica puede activar receptores que no están acoplados directamente con un canal iónico, sino que están ligados a sistemas de

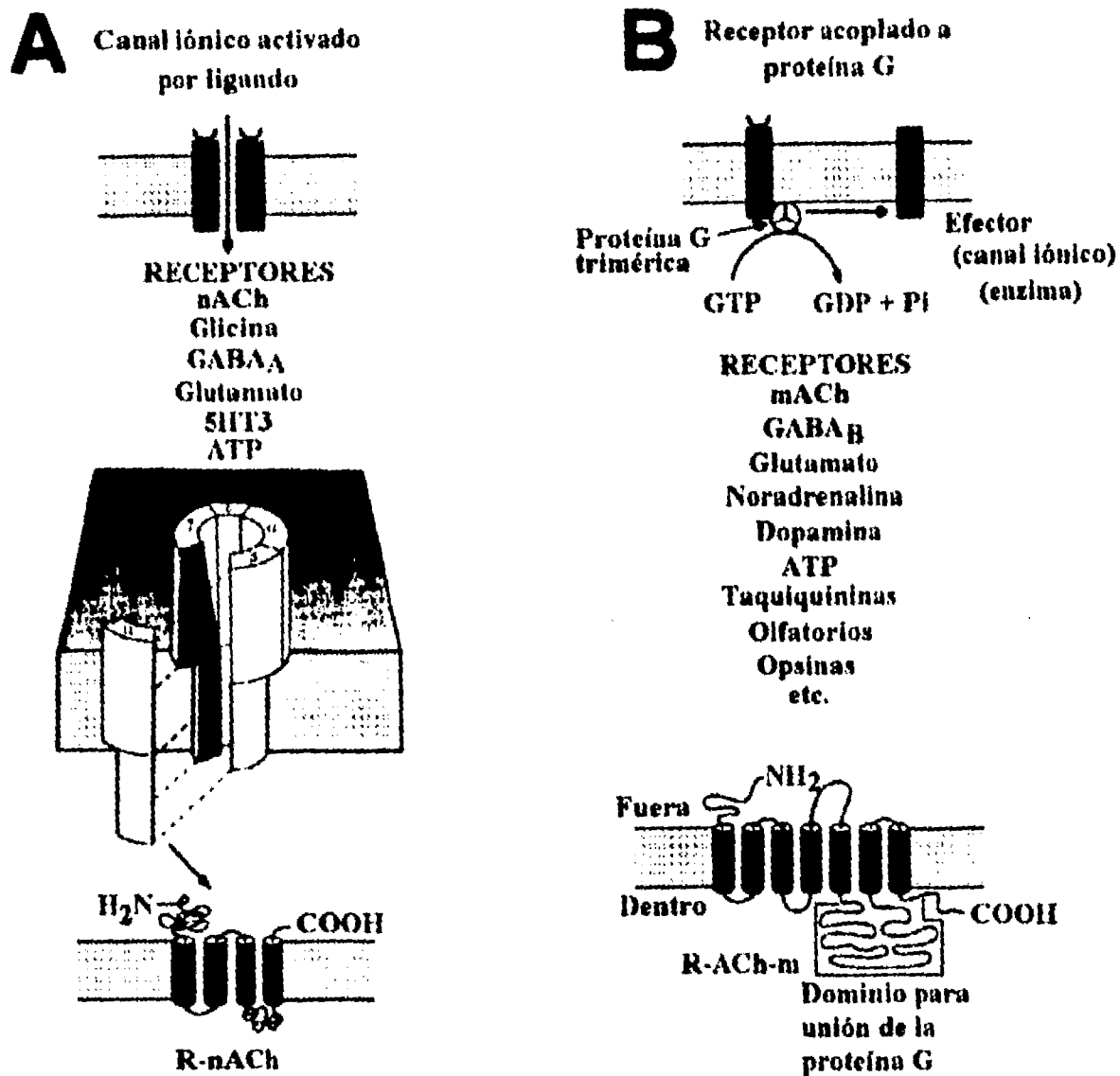


Figura 3. Tipos de sinapsis. A. Sinapsis rápidas son mediadas por receptor-canal. B. Sinapsis lentas o Neuromodulación. Los receptores pueden ser sinápticos o extrasinápticos. Pueden utilizarse otras cadenas de segundos mensajeros aparte de las proteínas G.

transducción transmembranal acoplados a las proteínas G u otros sistemas de mensajería intracelular (ver figura 3).

Una diferencia entre los dos mecanismos anteriores es su temporalidad. Mientras que la activación de los canales acoplados a un receptor es llevada a cabo en menos de 2 ms, produciendo los potenciales sinápticos típicos de alrededor de 30 ms, la activación de las proteínas G genera cambios en el potencial de membrana, con duración mayor a 30 ms (Hille, 1992). También pueden no generarse cambios en el potencial de membrana sino sólo en el mecanismo de disparo.

I.II.3.- Origen de las sinapsis glutamatérgicas al neostriado.

Las aferentes corticoestriatales son bilaterales y se originan, en la rata y el mono, de células piramidales concentradas en la capa V (McGeorge y Faull, 1989), distribuyéndose en espacios de cientos de micrómetros entre una célula piramidal y otra (Jones *et al.*, 1977). En el gato la mayoría de las neuronas corticales de proyección al NE se localizan en las capas II y III, con una minoría en las capas V y VI (Royce, 1982, 1984, Arikuni y Kubota, 1986; Gerfen, 1984, 1990).

En todas las especies estudiadas, las aferentes cortico-estriatales glutamatérgicas forman la mayoría de sus contactos con las espinas de neuronas espinosas medianas. Las sinapsis cortico-estriatales se forman en la cabeza de las espinas. Se ha calculado que la cantidad de contactos generados por cada fibra aferente es de 1 a 2 botones por cada neurona espinosa mediana (Mori *et al.*, 1994; Wilson, 1994).

Otras aferentes glutamatérgicas son las tálamo-estriatales que se originan principalmente en los núcleos intralaminares centromediano (29 %), parafascicular (12 %) (Royce, 1982, 1987; Royce *et al.*, 1984), y secundariamente en los núcleos de la línea media (Meredith y Wouterlood, 1990), además de núcleos de relevo como el ventral anterior, el ventral lateral, el lateroposterior, el mediodorsal y los núcleos pulvinares (Beckstedt, 1984a y 1984b; Parent *et al.*, 1983).

Aunque el 80 % de las sinapsis sobre las dendritas de las neuronas estriatales son Gray tipo I y glutamatérgicas, también hay sinapsis Gray tipo II gabaérgicas (Kemp y Powell, 1971, Xu *et al.*, 1991). Se ha descrito que algunas de las entradas talámicas contienen péptidos neuroactivos como: sustancia P, colecistokina, péptido vasoactivo intestinal (VIP) y el péptido relacionado con la calcitonina (Parent, 1986; Sugimoto 1984).

I.II.4.- Origen de las sinapsis gabaérgicas al neostriado.

Hasta hoy se piensa que la actividad gabaérgica es principalmente producida por las interacciones entre las mismas neuronas principales o de proyección, las neuronas espinosas medianas. El axón de las neuronas principales genera colaterales antes de salir del núcleo (Somogyi, 1981; Preston, 1980). Las colaterales se restringen a la vecindad de la neurona (de 0.25 mm de radio) (Wilson, 1990;), y hacen sinapsis simétricas con la cabeza y troncos de las espinas dendríticas de las neuronas vecinas (Preston, 1980, Kita y Kitai, 1988; Pasik *et al.*, 1988). Sin embargo, Jaeger *et al.* (1994) han descrito que dicha inhibición lateral es débil o inexistente cuando la buscaron a través de registro electrofisiológico intracelular de neuronas vecinas. Las sinapsis simétricas también se pueden localizar en las regiones proximales de las dendritas, en el soma y en el segmento inicial del axón (Wilson y Groves, 1980; Aronin *et al.*, 1986). Últimamente se ha descrito un segundo tipo de interneuronas gabaérgicas que son inmunoreactivas a la cal-retinina, proteína que une calcio (Kubota, 1993).

Otra interacción gabaérgica es producida por interneuronas "medianas no espinosas". Estas neuronas presentan inmunoreactividad a la parvalbúmina, y sus axones terminan en el dominio somatodendrítico proximal de las neuronas espinosas de proyección (Kita *et al.*, 1990; Somogy *et al.*, 1981; Preston, 1980; Kita y Kitai, 1988; Groves, 1995).

II. NEURONAS DEL NEOESTRIADO

El NE está constituido por diferentes tipos neuronales: neuronas principales o de proyección, y de neuronas locales o interneuronas. Se han propuesto diferentes clasificaciones (Chang *et al.*, 1982; DiFiglia *et al.*, 1976; Fox, 1971; Yelnik *et al.*, 1991).

En ratas la relación entre neuronas de proyección e interneuronas es de 9:1 (Chang *et al.*, 1982) mientras que en primates es de 3:1 (Graveland y DiFiglia, 1985).

II.1 LA NEURONA PRINCIPAL O DE PROYECCIÓN

En esta tesis nos ocuparemos principalmente de este tipo neuronal, en el cual realizamos la mayor parte de nuestros registros electrofisiológicos.

II.1.1.- Características generales

De la población total de neuronas del NE, las neuronas principales o de proyección son la mayoría (90 - 95% en la rata). La neurona principal es llamada **espinosa mediana** debido al tamaño de su soma (10 a 20 μm) y a la gran cantidad de espinas que cubren sus dendritas. Del soma surgen troncos dendríticos de 2-3 μm de diámetro. El soma y las dendritas primarias están usualmente libres de espinas. Los troncos primarios se dividen a los 10-30 μm de su origen y pueden ramificarse 1 ó 2 veces. **La figura 4** muestra una representación de una neurona espinosa mediana.

Kemp y Powell, en 1971, consideraron a las neuronas espinosas medianas como interneuronas. Posteriormente, utilizando la técnica de marcado retrogrado con peroxidasa de rábano, Grofová (1975) mostró que las neuronas espinosas medianas proyectan sus axones hacia fuera del NE, considerándose entonces como neuronas de proyección. Las neuronas espinosas medianas son GABAérgicas (Precht y Yoshida, 1971; Fisher *et al.*, 1986; Kita y Kitai, 1988; Pasik *et al.*, 1991) y coliberan varios neuropéptidos como dinorfina, sustancia P y encefalinas (Graybiel, 1990). Dichos péptidos no se encuentran por igual en todas las neuronas. Las encefalinas están presentes principalmente en las neuronas espinosas medianas que proyectan hacia el globo pálido. Por el contrario, la sustancia P y la dinorfina están más concentradas en las neuronas que proyectan a la sustancia negra (Graybiel, 1990). La neurona espinosa mediana presenta generalmente de 25 a 60 ramas dendríticas finales (Wilson, 1983) que irradian en todas direcciones, cubriendo un campo esférico con diámetro de 0.3 a 0.5 mm. Las espinas se encuentran a partir de las dendritas secundarias y

La densidad de espinas decae a cerca de la mitad en la punta de las dendritas (Wilson, 1983). El axón de las neuronas espinosas medianas presenta un segmento inicial bien definido que surge del soma o de una dendrita primaria. El axón principal emite varias colaterales antes de dejar la vecindad (500 μm) del soma y dichas colaterales dan origen a una arborización colateral local que hace contactos sinápticos con las neuronas vecinas (Preston *et al.*, 1980).

Las neuronas espinosas medianas de ratas adultas muestran poco acople eléctrico medido por el paso de colorante (e. g. biocitina, amarillo lucifer, etc.) hacia células vecinas. Sin embargo, cuando se estudian en animales neonatos se observa un aumento en la frecuencia de registros con acople electrotonico (Walsh *et al.*, 1989 "dye coupling")

El número de axones eferentes del NE ha sido estimado en varias especies (Verhaart, 1950; VonBonin y Shariff, 1951). El número de neuronas en el NE (Caudado-Putamen) humano es del orden de 100 millones. La densidad calculada es de 11,000 neuronas por milímetro cúbico (Schröder *et al.*, 1975).

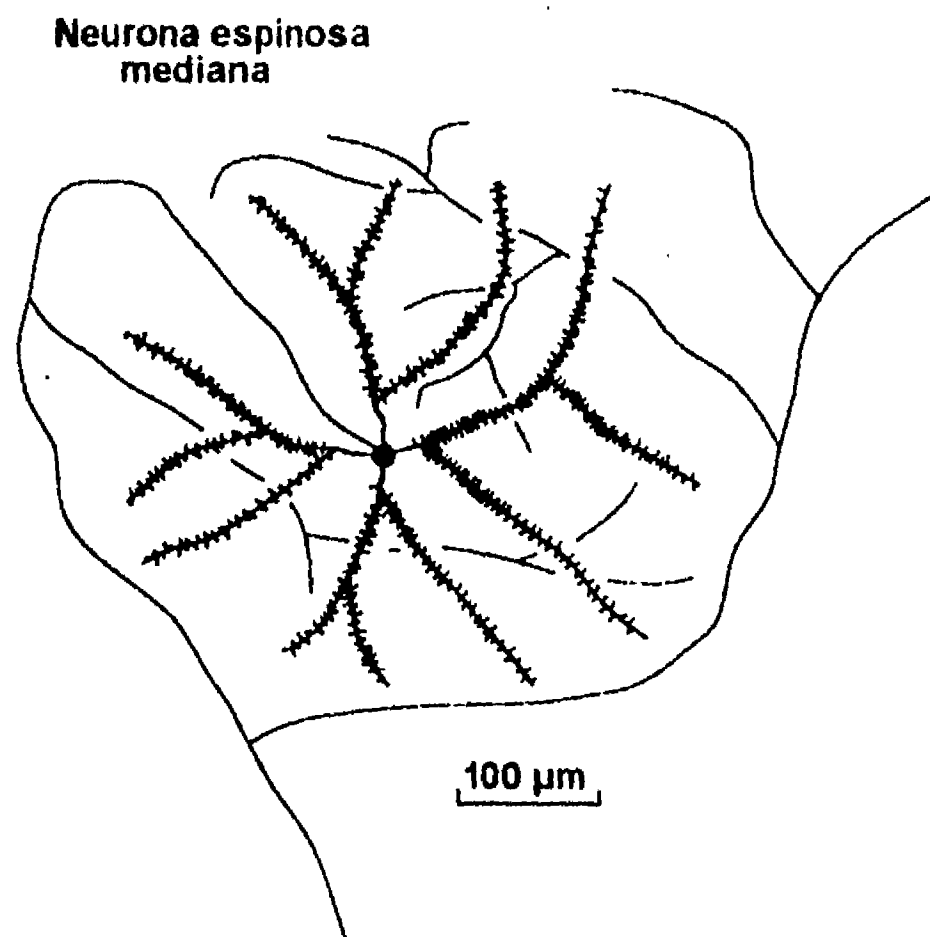


Figura 4. Representación de la anatomía de una neurona espinosa mediana.

PA... ..

II.1.2.- Aferentes sinápticas sobre la neurona espinosa mediana

Las neuronas espinosas medianas reciben la mayoría de las interacciones sinápticas aferentes al NE. Las entradas glutamatergicas que surgen de corteza cerebral y de tálamo inervan principalmente a estas neuronas, principalmente en las espinas dendríticas de región distal. Las entradas dopaminérgicas se originan en la sustancia negra parte compacta y en el área ventral tegmental (VTA), realizando contactos sinápticos con los cuellos de un 10 % de las espinas dendríticas que presentan botones glutamatergicos, y con los troncos dendríticos (Bouyer *et al.*, 1984). La figura 5 muestra la organización de las aferentes a las neuronas espinosas medianas. Las interacciones dopaminérgicas han sido localizadas sobre las neuronas espinosas medianas de la siguiente manera (Freund *et al.*, 1984) :

- 1.- 59 % sobre espinas dendríticas (tomando en cuenta que sólo se forman en el 10 % de las espinas),
- 2.- 35 % sobre troncos de espinas dendríticas y dendritas, y
- 3.- 6 % sobre cuerpos celulares.

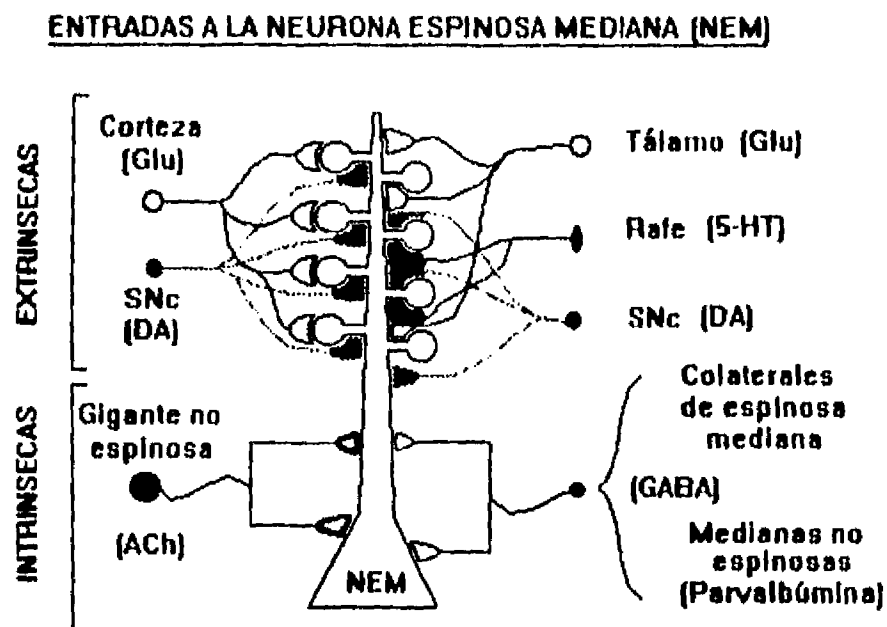


Figura 5. Localización de las aferentes a la neurona espinosa mediana.

Independientemente de los agentes neuroactivos localizados, sólo se ha encontrado actividad sináptica rápida de tipo receptor/canal para glutamato y GABA en ratas adultas (Seabrock *et al.*, 1991, Wilson, 1990). No obstante, Misgeld y Dietzel, en 1989, encontraron actividad colinérgica de tipo nicotínico en neuronas neostriatales en cultivo. Sin embargo, hasta la fecha este dato no ha sido confirmado.

II.1.3.- Tipos de neuronas espinosas medianas.

Al menos dos tipos de fibras eferentes del NE pueden ser identificadas en la rata, las cuales surgen de neuronas espinosas medianas (Beckstead y Cruz, 1986; Jiménez-Castellanos y Graybiel, 1989). Un tipo de fibras da un axón que arboriza principalmente en el segmento externo del globo pálido. El otro tipo proyecta poco a esta estructura, yendo principalmente al segmento interno (núcleo entopeduncular en la rata) y a la sustancia negra reticulada (Chang *et al.*, 1981). En el globo pálido y en la sustancia negra, los axones de las neuronas espinosas medianas arborizan en un patrón muy característico denominado axodendrítico longitudinal (Parent *et al.*, 1984).

Existe una población de neuronas espinosas que presentan axón largo y son denominadas por Pasik *et al.*, (1991) como "espinosa II" y que se caracterizan en el mono por la presencia de menor densidad de espinas, pero a lo largo de todo el árbol dendrítico, incluyendo las dendritas proximales y, ocasionalmente, el soma. Algunas de estas neuronas son positivas a sustancia P.

Con base en sus proyecciones axónicas obtenidas al llenar las neuronas intracelularmente con biocitina, se ha clasificado a la neurona espinosa mediana en 3 subtipos (Kawaguchi *et al.*, 1990b):

Tipo I: células que proyectan solo al globo pálido.

Tipo IIa: células que proyectan al globo pálido, al núcleo entopeduncular y a la parte reticulada de la sustancia negra.

Tipo IIb: células que proyectan al globo pálido y la sustancia negra pero no al núcleo entopeduncular.

Con base en las respuestas electrofisiológicas al estímulo pareado de aferentes corticales, Nisenbaum y Berger (1992a y 1992b; Berger *et al.*, 1987) propusieron dos tipos de neuronas neoestriatales. Estos resultados concuerdan con el modelo presentado por nuestro laboratorio en el cual una subpoblación de neuronas espinosas recibe una entrada inhibitoria por parte de una población de interneuronas gabaérgicas (también marcadas por la presencia de parvalbúmina) (Galarraga *et al.*, 1990).

II.1.4.- Electrofisiología de la neurona espinosa mediana

En registros realizados in vivo, las neuronas espinosas medianas presentan un patrón temporal de disparo característico: son silentes la mayor parte del tiempo y presentan un potencial de membrana en reposo de alrededor de -80 mV (Wilson, 1992). Ocasionalmente, pueden presentar una despolarización prolongada en forma de rampa ("depolarizing shifts") que dura de 0.5 a 3 segundos, después de la cual la neurona se vuelve nuevamente silente (Wilson, 1992, 1994). Estas despolarizaciones son de origen sináptico, muy probablemente comandadas por la corteza cerebral (Wilson, 1990), y dan origen a trenes de potenciales de acción. Al estado de reposo se le denominó "down state" y al estado despolarizado ocasional se le denominó "up state". La frecuencia del tren de potenciales de acción rara vez pasa de los 40 Hz y no es rítmico (Kita *et al.*, 1985a). La figura 6 muestra una gráfica de la función voltaje - corriente de una neurona espinosa mediana registrada en condiciones in vitro.

Cuando la neurona espinosa mediana es registrada *in vitro* ($[K^+]_o = 3$ mM) el potencial de membrana en reposo es generalmente mas negativo ($\bar{X} \pm SEM$): -84 ± 1 mV (n=24). Las neuronas son

silentes y los potenciales de acción tienen fase positiva de entre 5 y 20 mV (Kawaguchi, 1993; Kita *et al.*, 1984, 1985c; Galarraga *et al.*, 1994; Bargas *et al.*, 1988).

En el caso de las neuronas espinosas medianas la resistencia de entrada (R_N) registrada *in vivo* es de 10 - 20 M Ω (Sugimori *et al.*, 1978) e *in vitro* en rebanadas es de 58 ± 4 M Ω con una variabilidad de 20 - 97 M Ω , medidos a -70 mV (Bargas *et al.*, 1988; Galarraga, 1994), lo que se explica porque en la rebanada la actividad sináptica decae. La resistencia de entrada decrece cuando se incrementa la polarización de la membrana. En sentido despolarizante, R_N aumenta de manera continua en todo el intervalo subumbral, excepto en los últimos 10 mV. A esto se le llamó rectificación entrante. Contribuyendo a la rectificación en dirección despolarizante, se activa una conductancia despolarizante sensible al voltaje.

La constante de tiempo determinada en reposo es de 10 a 15 ms. La longitud electrotonica calculada es de 1.5 a 1.8 constantes de espacio (λ). Ambas variables son sensibles al voltaje y disminuyen en paralelo con el aumento de R_N cuando la célula se despolariza (Bargas *et al.*, 1988; Wilson, 1994)

Las neuronas espinosas *in vitro* en rebanadas presentan pocos potenciales sinápticos espontáneos, alrededor de 1 evento cada segundo (Galarraga *et al.*, 1987; Flores-Hernández *et al.*, 1994). Sin embargo, la frecuencia de registro de potenciales sinápticos espontáneos puede ser aumentada experimentalmente después de denervar de fibras dopaminérgicas, mediante la inyección de la 6-hidroxidopamina en la parte compacta de la sustancia negra, o después de agregar 4-aminopiridina (4-AP), o aumentar la concentración exterior de K^+ . El efecto de la denervación dopaminérgica dura varios meses, lo cual sugiere una influencia tónica inhibitoria de la inervación dopaminérgica sobre las entradas sinápticas a las neuronas estriatales (Galarraga *et al.*, 1987).

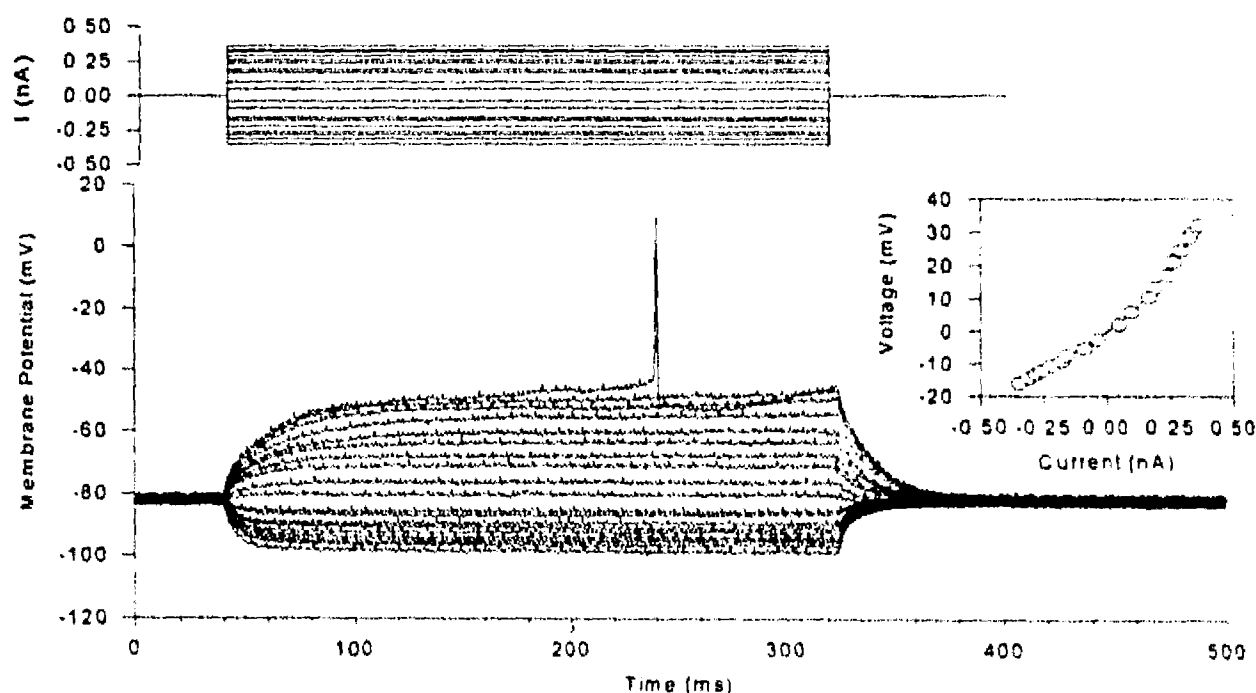


Figura 6. Registro electrofisiológico de una neurona espinosa mediana. Relación Voltaje vs corriente.

In vitro, los potenciales sinápticos inhibitorios (gabaérgicos) tienen un potencial de inversión de entre -57 a -62 mV (Misgeld *et al.*, 1979a, 1979b, 1980 y 1982; Kita *et al.*, 1985b), que es positivo con respecto al potencial de reposo (~84 mV), provocando que los potenciales sinápticos gabaérgicos registrados en neuronas espinosas medianas *in vitro* sean despolarizantes (Misgeld *et al.*, 1982). Esto sucede en muchas neuronas cerebrales (Schofield, 1978; Brown y Schofield, 1979), donde los potenciales inhibitorios gabaérgicos son hiperpolarizantes respecto del potencial umbral, pero no respecto del potencial de reposo.

Con la técnica de gigasello (Kawaguchi, 1993), las neuronas espinosas tienen una R_N entre 150 y 200 M Ω . Es curioso que esta misma R_N puede obtenerse con microelectrodos en presencia de bloqueadores de conductancias al potasio tales como el Ba²⁺ (datos no publicados), los cuales abaten la rectificación entrante antes mencionada. En la configuración de gigasello también se pierde dicha rectificación.

II.II INTERNEURONAS

Estudios con la técnica de Golgi han mostrado neuronas no espinosas en el NE (DiFiglia *et al.*, 1976; Bolam *et al.*, 1986). Se han descrito cuatro tipos de interneuronas que comienzan a ser caracterizadas tanto funcional como morfológicamente (Wilson, 1990).

II.II.1- Interneurona gigante no espinosa

Célula no espinosa II de DiFiglia *et al.* (1976; Bolam *et al.*, 1986, Wilson, 1990), inmunorreactiva a ChAT.

Aunque su número es pequeño (menos del 5 % del total), sus arborizaciones axónicas son muy grandes y densas dando una rica inervación colinérgica en el NE (Wilson, 1990). Pese a las pocas neuronas, la acción colinérgica en el NE es de gran importancia. El NE posee el 80% de la acetilcolina cerebral (Mc Geer y McGeer, 1978). Diversos agonistas y antagonistas colinérgicos inespecíficos se han usado para tratamientos de patologías de los ganglios basales como son la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington (Wilson, 1990).

Las neuronas colinérgicas son fusiformes o multipolares y miden de 20 a 50 μm en el diámetro menor y de 50 a 60 μm en el mayor, (Armstrong *et al.*, 1983). Se han encontrado en los núcleos caudado, putamen y accumbens.

Unas pocas dendritas surgen desde el soma y se ramifican en forma radiante. Algunas dendritas se extienden de 500 a 750 μm del soma. El axón surge de los troncos dendríticos y puede ser mielinizado en las regiones cernacas al soma. La mielina se pierde cuando se reduce el diámetro axónico, lo cual ocurre en las de múltiples bifurcaciones. Estas producen un plexo denso de finas ramas que llenan la región del campo dendrítico, esto es casi 1 mm. Normalmente no abandonan el NE. Las interneuronas colinérgicas se distribuyen preferencialmente en áreas de rica inmunoreactividad a sustancia P (Martone *et al.*, 1993).

Las neuronas gigantes presentan actividad espontánea lenta y tónica (3-10/seg). La resistencia de entrada y la constante de tiempo son mayores que los registrados en las neuronas espinosas medianas, y muestran una relación corriente - voltaje no lineal (Wilson *et al.*, 1990; Jiang y North, 1991).

Estas neuronas presentan postpotenciales prolongados y una rectificación entrante debido, probablemente, a la corriente H (I_H), una conductancia de potasio (Kawaguchi, 1993; Jiang y North, 1991). Estas neuronas producen disparos únicos o de baja frecuencia debido a que el postpotencial limita el disparo repetitivo. La figura 7 muestra la reconstrucción anatómica de la interneurona gigante no espinosa -colinérgica-.

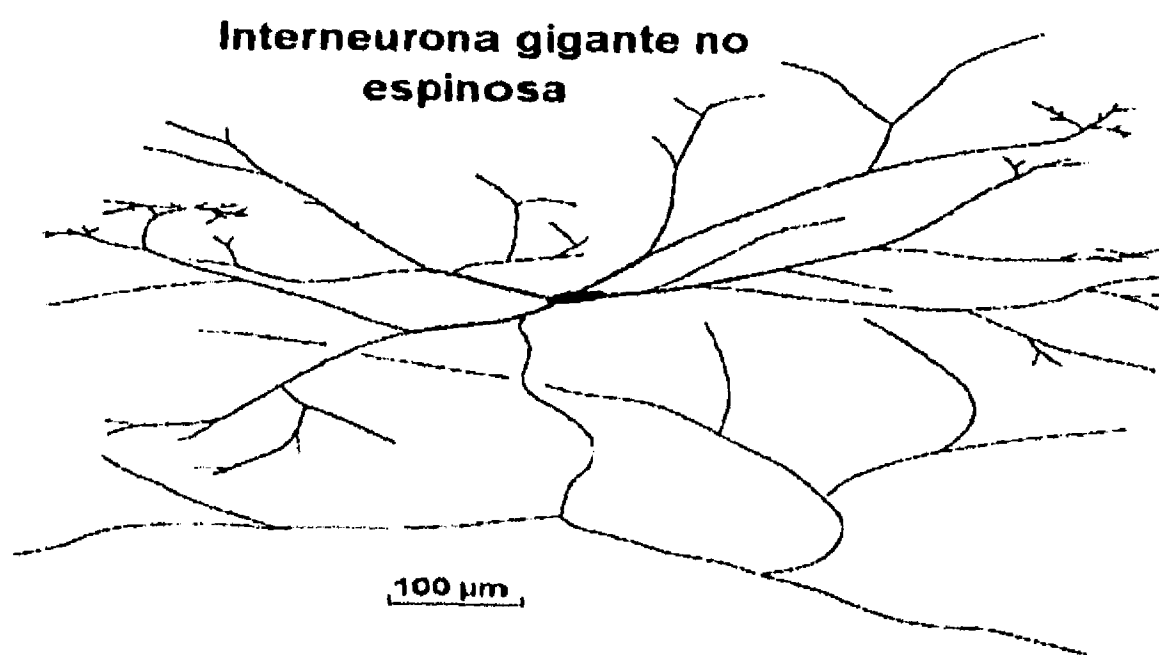


Figura 7. Representación anatómica de una neurona gigante no espinosa.

Se ha encontrado que las neuronas colinérgicas reciben preferencialmente entradas talámicas a la porción proximal de las dendritas desde el núcleo parafascicular (Kawaguchi, 1993).

La actividad colinérgica en el NE es originada en estas neuronas. Estas forman contactos sinápticos y no sinápticos en el soma y las dendritas proximales de las neuronas espinosas (Misgeld, 1980; Cuello y Sofroniew, 1984).

En cuanto a las terminales peptidérgicas, se han encontrado terminales que contienen sustancia P en contacto con neuronas colinérgicas (Bolam *et al.*, 1986).

1.11.2.- Interneuronas medianas no espinosas.

Estas neuronas son GABAérgicas y son usualmente divididas en tres categorías.

La primera corresponde a las neuronas sin espinas del tipo I de la clasificación de DiFiglia (1976) y V de Chang *et al.*, (1982). Estas neuronas presentan inmunoreactividad a GABA y contienen

parvalbúmina (Kubota *et al.*, 1993). Representan alrededor del 1 % de la población total del NE. La mayoría de las células son de mediano tamaño, esto es, con somas de tamaño semejante al de las espinosas medianas. El soma es redondeado y liso, con dendritas escasamente espinosas y que raramente cubren el diámetro que cubren las espinosas. Las dendritas usualmente son lisas con prominentes varicosidades. Sólo existe un dato de la resistencia de entrada de estas neuronas usando microelectrodos (esta tesis, Flores-Hernández *et al.*, 1994): $PM_r = -79$ mV, $R_N = 78$ M Ω , $\tau_m = 9.8$ ms, $L = 1.1$. En comparación, la técnica de gigasello arroja una R_N de 86 ± 38 M Ω (Kawaguchi, 1993). La figura 8 muestra una representación anatómica de la interneurona mediana no espinosa -gabaérgica/parvalbúmina-. Su patrón temporal de disparo es en ráfagas rítmicas de alta frecuencia. Estas ráfagas no surgen de un potencial despolarizante como es el caso de las neuronas talámicas o piramidales (Kawaguchi, 1993).

**Neurona mediana no espinosa con
dendritas varicosas**

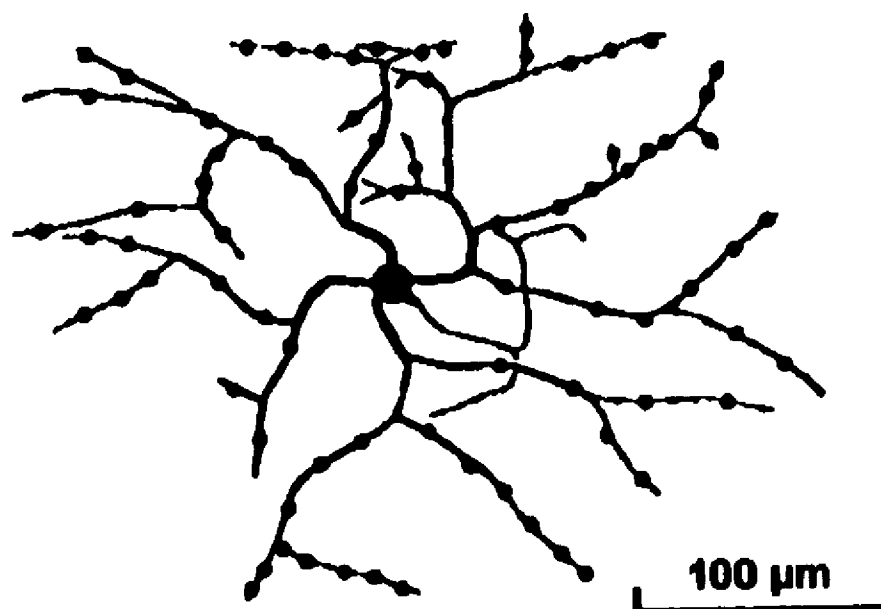


Figura 8. Representación anatómica de una neurona mediana no espinosa. Esquema anatómico de la neurona mediana no espinosa. Esta interneurona se caracteriza por la presencia de numerosas varicosidades en las dendritas.

El segundo tipo de interneuronas no espinosas medianas corresponde a las neuronas no espinosas III de DiFiglia (DiFiglia *et al.*, 1972) y a las neuronas III/IV de Chang (Chang *et al.*, 1982). Presentan inmunoreactividad a somatostatina y al neuropéptido Y. Son GABAérgicas y están asociadas con la enzima nicotinamida adenin-dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-diaforasa), enzima relacionada con el metabolismo del óxido nítrico (NO) (Kubota *et al.*, 1993). Una característica morfológica es la existencia de algunos apéndices semejantes a espinas y unas finas terminaciones dendríticas en forma de penacho. **La figura 9** muestra un esquema de la anatomía de la interneurona mediana no espinosa tipo III.

No existen reportes electrofisiológicos de esta neurona con microelectrodos. Con la técnica de gigasello su $R_N \sim 638 \pm 245 \text{ M}\Omega$ (Kawaguchi, 1993). Su disparo depende del potencial de membrana. Puede ser tónico si el potencial de reposo es de $\sim 60 \text{ mV}$, o bien en ráfagas sobre potenciales despolarizantes de tipo transitorio cuando el potencial de membrana es de $\sim 75 \text{ mV}$.

El tercer tipo de interneurona presenta GABA como neurotransmisor y es asociado con la presencia de una proteína que une calcio, llamada calretitina. Este tipo de interneurona es de tamaño mediano (mide alrededor de $18 \mu\text{m}$) (Kubota *et al.*, 1993).

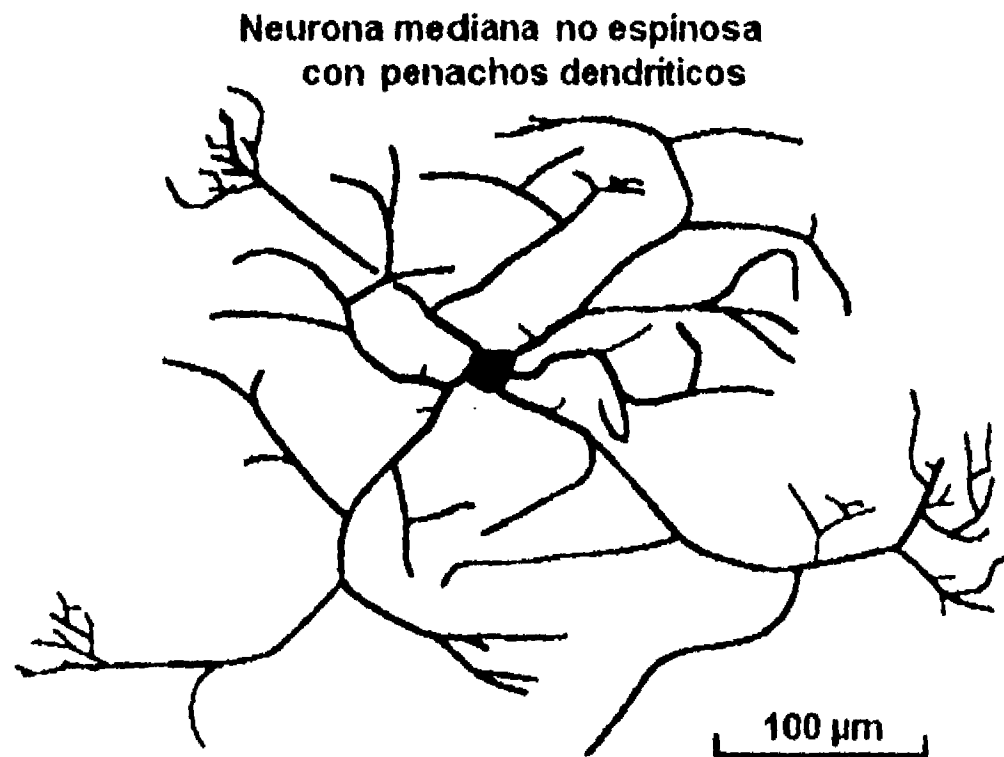


Figura 9. Esquema de una neurona mediana no espinosa. Esta población de interneuronas se caracteriza por la presentar en los extremos de las dendritas unas estructuras en forma de penachos.

III LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

III.I ASPECTOS GENERALES

Fue Charles Sherrington, en 1906, quien acuñó el término sinapsis (del griego "synapsis", unión), con el cual definió la existencia de una zona de comunicación interneuronal que podría explicar el retardo en la respuesta de un arco reflejo. Se definió así por primera vez la sinapsis en términos fisiológicos, mientras que Santiago Ramón y Cajal, en su doctrina de la neurona de 1905-1911 (Pappas y Waxman, 1972; Kandel *et al.*, 1991) se refirió a ella desde el punto de vista morfológico, basándose en observaciones obtenidas con las técnicas argénticas.

Existen dos tipos de comunicación sináptica. Una es eléctrica, mediada por uniones comunicantes (gap junctions), y que permite una comunicación directa entre los citoplasmas de las células presináptica y postsináptica. El segundo tipo es la sinapsis química en la cual la célula presináptica se comunica con la postsináptica mediante la liberación de sustancias que actúan sobre receptores específicos en la membrana postsináptica.

Esta tesis se restringirá al estudio de la sinapsis de tipo químico.

III.II ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE LA SINAPSIS QUÍMICA

El proceso de la transmisión sináptica química es básicamente un fenómeno secretorio, donde la sustancia secretada tiene como blanco la región postsináptica de otras neuronas o células. La sinapsis está constituida por tres regiones, a saber: la presinapsis, el espacio intersináptico y la postsinapsis.

III.II.1.- LA PRESINAPSIS.

La terminal presináptica contiene mitocondrias, cuerpos multivesiculares y algunos elementos tubulares de retículo endoplásmico, así como las vesículas sinápticas, las cuales son las estructuras más características, que junto con el material electrodensito cercano a las membranas pre- y postsinápticas dan a la zona de contacto una apariencia asimétrica (Bodian, 1972). La **figura 10** muestra una presinapsis con sus componentes relacionados.

Las vesículas se pueden encontrar concentradas cerca del componente membranal presináptico (Pappas y Waxman, 1972). Se ha comprobado que éstas contienen el transmisor químico. Del Castillo y Katz (1954 y 1955), demostraron que la acetilcolina puede ser liberada de manera cuántica y de manera dependiente de la entrada de iones calcio a través de canales de calcio sensibles a voltaje. Estos canales se dividen, dependiendo del umbral de activación, en canales de bajo y de alto umbral, estos últimos son los relacionados con el proceso de liberación de transmisores vesiculados desde la presinapsis (Tareilus y Breer, 1995). Se ha intentado clasificar las terminales sinápticas por diferentes características: el área, la forma, etc. Existen dos clasificaciones de sinapsis que son aceptadas de manera general: la clasificación de Gray en 1959 (Akert *et al.*, 1972), que las divide en Gray I y II. Donde las de tipo I son consideradas excitadoras, presentan una condensación densa en la membrana postsináptica, contienen principalmente vesículas esféricas ó de tipo S, y el espacio sináptico es más amplio que en las del tipo II. Las sinapsis del tipo II presentan condensaciones de igual espesor en las membranas pre y postsinápticas, contienen

vesículas alargadas y el espacio sináptico es muy reducido. Se postula que son inhibitorias, pues Uchizono (1965, 1967) por un lado e Iwasaki y Florey (1969) por el otro las correlacionaron con las sinapsis gabaérgicas en el acocil y la langosta.

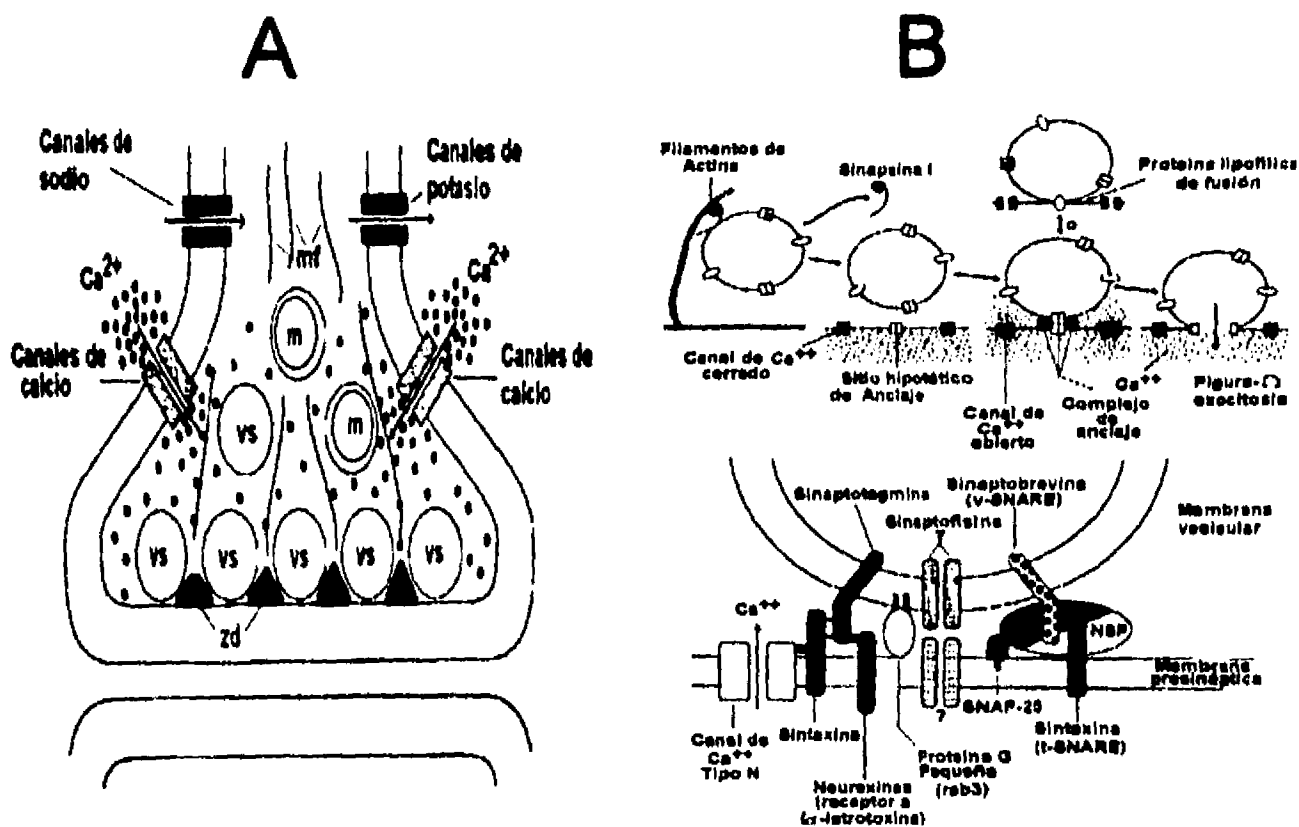


Figura 10. Anatomía de la terminal presináptica. A. Componentes principales de la terminal presináptica, canales iónicos en la membrana presináptica, vesículas sinápticas (vs), mitocondrias (m), zonas densas (zd) y microfilamentos (mf). B. Componentes presinápticos asociados con el mecanismo de fusión vesicular y liberación de transmisores.

Con las observaciones a microscopía electrónica se observa que las vesículas sinápticas no están dispersas al azar, sino que están concentradas en una región específica. La llegada al sitio de su liberación no es por simple movimiento browniano, como proponían del Castillo y Katz en 1957, sino que están asociadas a la vecindad de la membrana donde existe una mayor densidad óptica. Cuando Couteaux introdujo la técnica del ácido fosfotúngstico (para el teñido negativo de proteínas contráctiles de músculo y neuronas), descubrió que dicha densidad correspondía a una serie de barras densas localizadas en la superficie interna de la membrana. A partir de las especializaciones antes mencionadas (vesículas sinápticas y zonas de densidad presináptica), definió la zona activa para describir la región especializada y restringida dentro de la terminal presináptica, donde el neurotransmisor es liberado (Kandel y Schwartz, 1991).

Actualmente con el advenimiento de las técnicas de biología molecular se ha llegado a conocer más acerca de la estructura de la terminal presináptica y de los componentes moleculares que la constituyen. Los estudios se han realizado en células cromafines y vesículas colinérgicas del órgano eléctrico de la raya. Se han encontrado series de 15 a 20 proteínas diferentes que regulan el ciclo de vida

de la vesícula sináptica (ver la figura 11). En diferentes tipos neuronales pueden encontrarse diferentes isoformas de los mismos tipos de proteína vesicular (Zimmermann, 1993).

La cuantificación del contenido de transmisores en diferentes especies de raya eléctrica sugiere que pueden haber 200,000 moléculas de acetilcolina dentro de una vesícula colinérgica de 84 nm de diámetro (Whittaker y Zimmerman, 1974). Por comparación, en los gránulos cromafines existen cerca de 3,000,000 moléculas de adrenalina (Ver Zimmerman, 1993). Esto resulta en cerca de 880 mM de acetilcolina en las vesículas colinérgicas de la raya eléctrica y cerca de 500 mM de noradrenalina en los gránulos cromafines de bovino (Zimmerman, 1993). Además de transmisor, en la vesícula sináptica se puede encontrar ATP a concentraciones que alcanzan los 100 mM, además de polifosfatos de diadenosina y zinc. Se calcula que existen 30,000 iones Ca^{2+} en la vesícula colinérgica y 3 veces más en los gránulos cromafines (Zimmermann, 1993).

En el caso de las vesículas colinérgicas obtenidas del sistema nervioso central y periférico de mamíferos (diámetro ~ 45 nm), estas contienen cerca de 2,000 moléculas de acetilcolina por vesícula (Zimmerman, 1993). Cabe señalar que esta cantidad correlaciona con los estimados electrofisiológicos del cuanto de transmisor que es de 1,000 - 6,000 (Trimble *et al.*, 1991; Zimmermann, 1993) y que concuerda con las 10,000 moléculas de acetilcolina para formar un potencial de placa miniatura de 1.5 mV (Kuffler y Yoshikami, 1975). Estudios realizados por Riveros y colaboradores han mostrado a través de diferentes técnicas que la vesícula sináptica glutamatérgica del sistema nervioso central contiene alrededor de 3,640 moléculas de glutamato (Riveros *et al.*, 1986).

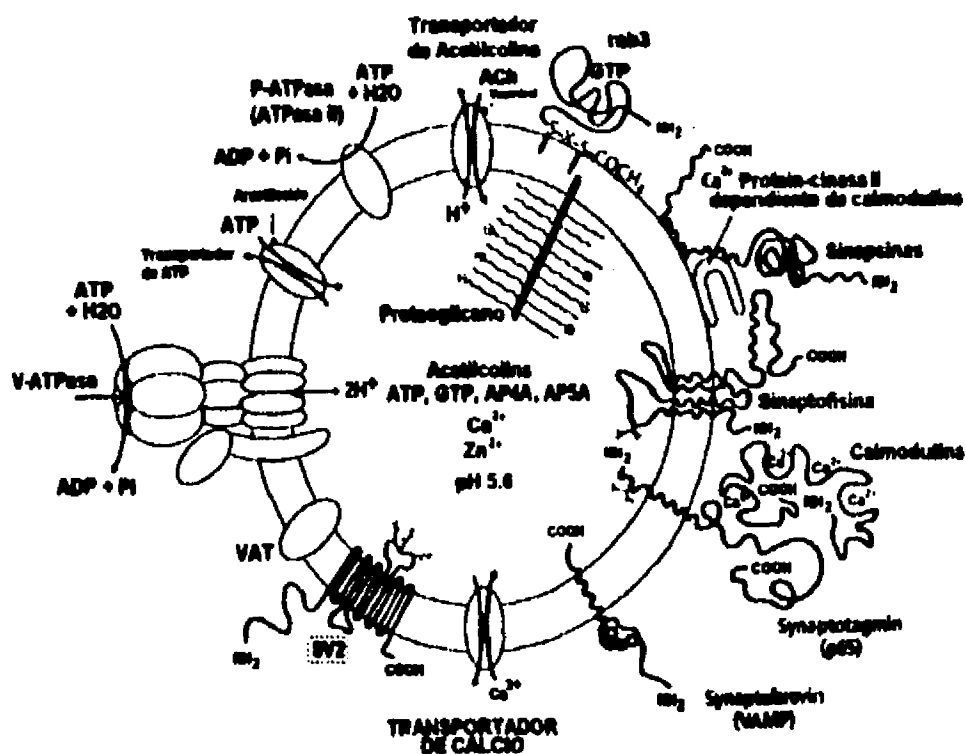


Figura 11. Estructura bioquímica de la vesícula sináptica.

ATP: Trifosfato de adenosina. **ADP:** Difosfato de adenosina. **GTP:** Trifosfato de guanosina. **AP4A** y **AP5A:** polifosfatos de adenosina

III.II.2.- LA POSTSINAPSIS

Aunque no se describen estructuras morfológicamente específicas para la región postsináptica, como las vesículas en el caso de la región presináptica, es frecuente encontrar asociada a la membrana postsináptica una zona de material denso citoplásmico, y en ocasiones, cisternas subsinápticas, el aparato espinal dendrítico (característico de la sinapsis de tipo axodendrítica), cuerpos multivesiculares y especializaciones micropinocitóticas (Pappas y Waxman, 1972).

La especialización más importante de la región postsináptica no puede ser identificada fácilmente a nivel morfológico como se ha hecho para la estructura presináptica, sino a un nivel bioquímico. Esta especialización bioquímica es el **receptor** de neurotransmisores liberados al espacio sináptico desde la presinapsis. Sólo en algunos casos, y con ayuda de técnicas como la criofractura y la difracción de rayos X, se ha podido observar el receptor para la acetilcolina (Kandel y Schwartz 1991b) (ver figura 12). Se ha calculado que en la unión neuromuscular los receptores están agrupados en una matriz geométrica, con una densidad de 10,000 receptores por μm^2 y cada receptor tiene cerca de 8 nm de diámetro (Kandel *et al.*, 1991c). Lo que quiere decir que el transmisor liberado por una vesícula colinérgica de la placa neuromuscular no basta para saturar los receptores en una unión neuromuscular.

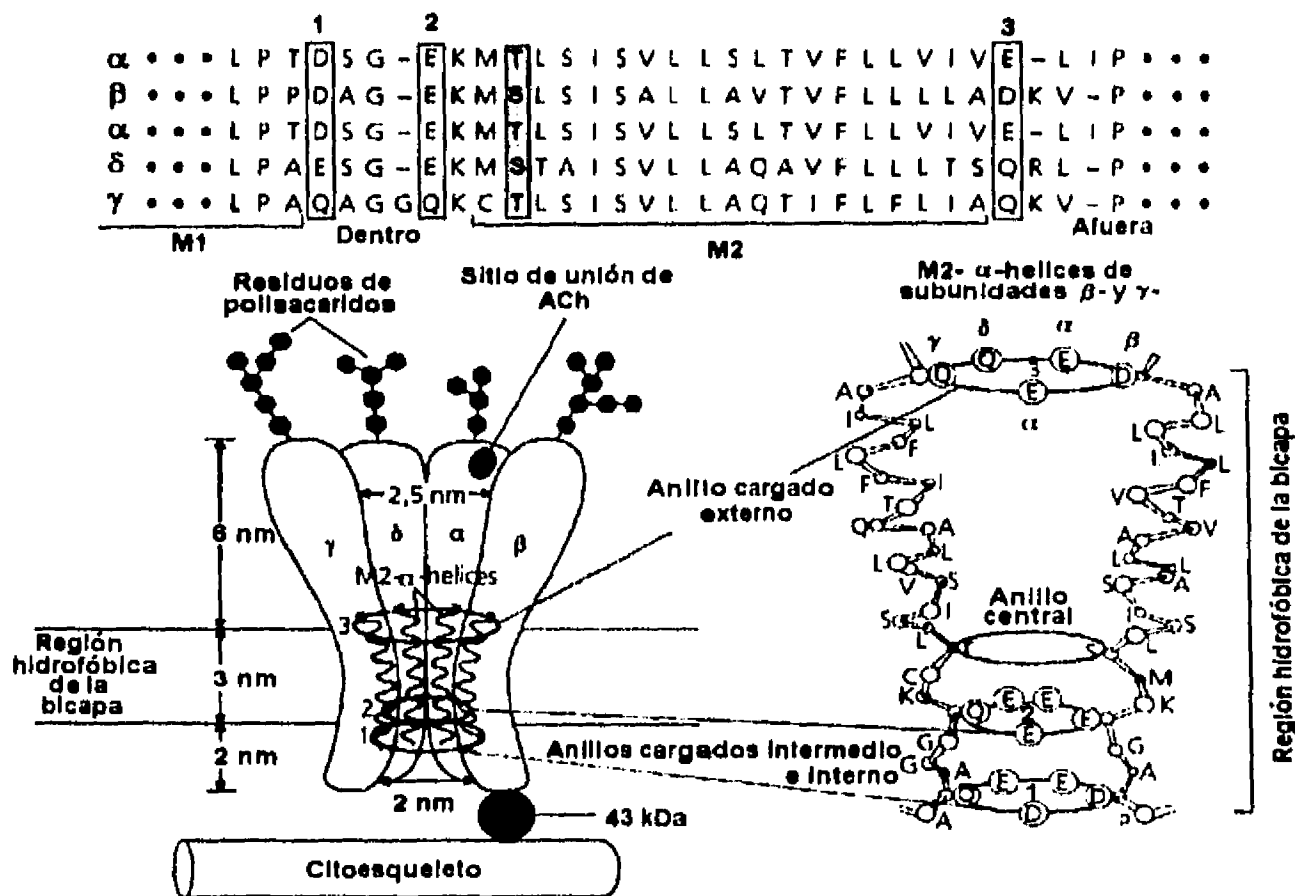


Figura 12. Estructura de bioquímica de un receptor a neurotransmisor. Ejemplo: Receptor nicotínico de acetilcolina.

III.III ASPECTOS FUNCIONALES DE LA SINAPSI QUÍMICA.

El estudio de la transmisión sináptica se remonta a los estudios de Du Bois Raymond quien en 1848 postuló la existencia de una sustancia excitadora como causante de la contracción muscular. Ahora sabemos que esta sustancia es la acetilcolina actuando sobre receptores tipo nicotínico en la placa neuromuscular. Son rápidos ya que están directamente acoplados a un canal ("fast ligand gated channels").

Se ha observado que la liberación de transmisores depende de calcio. Katz y Miledi (1967, 1968 y 1972) propusieron la "hipótesis del calcio" (Augustine *et al.*, 1987; Smith y Augustine, 1988, Trimble, 1991). Recientemente se describió que diferentes canales de calcio median la liberación de transmisores provocada por despolarización en los ganglios simpáticos de mamífero (Gonzalez-Burgos *et al.*, 1995). Cuando la despolarización es producida por un aumento en la concentración externa de potasio (alto potasio) la liberación es reducida por la toxina de la araña *Agelenopsis aperta* o FTX (funnel-web toxin) que bloquea los canales tipo P y por la toxina del caracol marino *Conus geograffus*, ω -conotoxina GVIA, que bloquea los canales tipo N (Gonzalez-Burgos *et al.*, 1995). La liberación no es afectada por bloqueadores de canales tipo L. En contraste, cuando son activados por un potencial de acción, ésta es bloqueada por la FTX (canales tipo P), y sólo ligeramente bloqueada por altas concentraciones de ω -conotoxina GVIA, o de ω -agatoxina VIA (Gonzalez-Burgos *et al.*, 1995). Hallazgos similares se han encontrado en otros tipos de sinapsis (Zimmerman, 1994), dependiendo del tipo de estimulación la liberación dependerá de diferentes tipos de canal de calcio.

De manera general se han clasificado las sinapsis rápidas que usan canal-receptor en excitadoras e inhibitorias. En las primeras, el efecto del transmisor produce un acercamiento del potencial de membrana al umbral de disparo del potencial de acción. En las segundas, el mediador produce un alejamiento del umbral de disparo y, por tanto, se disminuye la excitabilidad de la neurona que recibió dicho agente (Kandel y Schwartz, 1991).

El potencial de equilibrio del ión cloro en las neuronas espinosas medianas es más positivo (e.g., de ~ -57 a -62 mV) que el potencial de reposo (Kita *et al.*, 1985b; Seabrock *et al.*, 1991; Misgeld *et al.*, 1982); por lo que en condiciones de reposo (≥ -80 mV) el neurotransmisor inhibitorio (GABA) produce un potencial sináptico despolarizante. Sin embargo, cuando las neuronas disparan espontáneamente (umbral de ~ -45 mV), estos potenciales sinápticos, efectivamente, inhiben el disparo (Misgeld *et al.*, 1982).

Las sustancias que han sido aceptadas como neurotransmisores rápidos en el sistema nervioso porque activan un receptor-canal (ionotrópicos) son presentadas en la tabla 2.

La actividad colinérgica ionotrópica es mediada exclusivamente por los receptores-canal de tipo nicotínico. Estos sólo han sido encontrados en neuronas embrionarias disociadas y cultivadas de neocórtex (Misgeld y Dietzel, 1989).

En cuanto a las aferentes serotoninérgicas existen hasta el momento 4 familias con un total, hasta 1993, de 13 receptores a serotonina (Teitler y Herrick-Davies, 1994). Las familias se han

clasificado por el tipo de transducción utilizado (Saudou y Hen, 1994). Sólo un tipo de ellas activa un receptor-canal (es ionotrópica).

- 1.- Familia 5-HT₁ disminuyen la actividad de la adenilato ciclasa,
- 2.- Familia 5-HT₂ activan la fosfolipasa C (PLC),
- 3.- Familia 5-HT₃ activan conductancias de Na⁺ y K⁺, y
- 4.- Familia 5-HT₄ activan la adenilato ciclasa.

Transmisor	Tipo de receptor		Función	Canal selectivo a:	
Acetilcolina	Nicotínico		excitadora	Na ⁺ y K ⁺	
Acido γ -Aminobutírico	GABA _A , GABA _C		inhibidora	Cl ⁻	
ATP	P _{2x} purinoceptor		excitadora	Na ⁺ , K ⁺ y Ca ⁺⁺	
Glicina	Glicina		inhibidora	Cl ⁻	
Glutamato	NMDA		excitadora	Na ⁺ , K ⁺ y Ca ⁺⁺	
	No NMDA o AMPA/CN QX	Kainato			Na ⁺ y K ⁺
		Quiscualato A ionotrópico			
Serotonina	5HT ₃		excitadora	Na ⁺ y K ⁺	

La actividad gabaérgica rápida es mediada por los receptores-canal tipo A.

Los receptores de glicina al igual que los GABA_A y los GABA_C son receptores asociados a un canal permeable a cloro. Estos canales presentan varios subestados de conductancia. El receptor a glicina predomina en la médula espinal. Los receptores GABA_B no son canales y activan proteínas G. Además de los receptores GABA_A y los GABA_B se ha encontrado un receptor ionotrópico llamado GABA_C que es insensible a la bicuculina, bloqueador específico de los receptores GABA_A (Cutting *et al.*, 1991; Feigenspan y Bormann, 1994).

Las acciones glutamatérgicas son mediadas principalmente por 5 tipos de receptor. La mayor actividad glutamatérgica es mediada por dos tipos de receptor, a kainato y a AMPA/quiscualato. Son muy similares y no son afectados por N-metil-d-aspartato (NMDA). Por esto se les denomina en conjunto como receptores no NMDA o receptores AMPA, debido a que ambos presentan afinidad por el agonista AMPA (ácido α -metil-3-hidroxi-5metil-4-oxazole propiónico) y activan directamente conductancias catiónicas (Na⁺ y K⁺) del orden de los 20 pS (Kandel y Schwartz, 1991). El tercer tipo de receptor de glutamato es un receptor que es activado por n-metil d-aspartato (NMDA). Este receptor

presenta conductancias catiónicas del orden de los 50 pS. Este receptor es bastante permeable a calcio, además de Na⁺ y K⁺. En condiciones de reposo del potencial de membrana, este canal es bloqueado por el catión Mg²⁺. Sólo cuando la despolarización es suficientemente prolongada el Mg²⁺ es expulsado y la corriente es activada (Kandel y Schwartz, 1991). El cuarto tipo es denominado L-AP4, este es reconocido por el agonista l-aminofosfano-butirato. Una familia de receptores son los Glu_G, Q_p o metabotrópicos, de los cuales se conocen 7 subtipos que actúan mediante proteínas G (Fagg y Massieu, 1991, Westbrook, 1994).

Además de los transmisores antes mencionados ha sido reportada actividad purinérgica (ATP) a través del receptor-canal P_{2x} (Edwards *et al.*, 1992; Bean, 1992; Zimmermann, 1994).

La **tabla 3** muestra las características electrofisiológicas unitarias de cada receptor-canal.

Tabla 3. EVENTOS UNITARIOS DE LOS RECEPTORES-CANAL					
RECEPTOR	TIPO	IÓN	CANAL		REFERENCIA
			Conductancia (pS)	Corriente unitaria (pA)	
Acetilcolina	Nicotínico	Na ⁺ /K ⁺ +Ca ²⁺	50.00	2.70	Takeuchi <i>et al.</i> , 1960, 1963 a y b, Zimmermann, 1993
			30-50	3-5	Sakmann, 1992
			20 a 27 (23.5)	2.70	Ballivet, 1988
GABA	A	Cl ⁻	10, 17 y 28	0.94	Bormann <i>et al.</i> , 1987 Edwards <i>et al.</i> , 1990
			9 a 22	5 a 10.90	Krazewsky, 1992
Glicina	Gly	Cl ⁻	10, 17 y 28	1.50	Bormann <i>et al.</i> , 1987
Glutamato	AMPA	Na ⁺ /K ⁺	20.00	1.1	Zimmermann, 1993
	NMDA	Na ⁺ /K ⁺ +Ca ²⁺	50.00	1.8	Zimmermann, 1993
	Kainato	Na ⁺ /K ⁺	20.00	1.0	Zimmermann, 1993
	QUIS ionotrópico	Na ⁺ /K ⁺	20.00	1.1	Zimmermann, 1993
Serotonina	5HT ₃	Na ⁺ /K ⁺	?	?	Zimmermann, 1993
ATP	P _{2x}	Na ⁺ /K ⁺ +Ca ²⁺	?	?	Benham y Tsien, 1987; Nakazawa <i>et al.</i> , 1990; Edwards <i>et al.</i> , 1992; Edwards, 1994 y Bean, 1992

Dale postuló la existencia de uno, y sólo un neurotransmisor por terminal, o más generalmente, por neurona (Principio de Dale). Actualmente se mantiene este principio si se toma en consideración a los neurotransmisores que actúan sobre receptores-canal, a los cuales se les denomina neurotransmisores sinápticos. Además se reconoce la coexistencia de péptidos neuromoduladores con neurotransmisores clásicos en las células nerviosas (Lundberg y Hokfelt, 1983). A todo transmisor sináptico se le conocen

receptores neuromodulatorios (que activan proteínas G y tienen acciones indirectas sobre las conductancias iónicas). Sin embargo, hay neuromoduladores modulatorios a los que se les ha encontrado receptor acoplado directamente a un canal iónico, como ejemplo están las catecolaminas y diversos péptidos. Incluso, sus receptores no son necesariamente sinápticos, esto es, pueden estar lejos del botón presináptico de liberación, o incluso en neuronas distantes.

En el caso de las neuronas espinosas medianas se ha observado la coexistencia de péptidos con la descarboxilasa del ácido glutámico, enzima de síntesis del GABA. Esta coexistencia depende de la proyección de la neurona (Besson *et al.*, 1991; Graybiel, 1990).

III.IV LA TEORÍA CUÁNTICA DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

III.IV.1- ALGUNOS ASPECTOS DE LA TEORÍA CLÁSICA DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO

Cuando Del Castillo y Katz (1954) estudiaron la placa neuromuscular observaron que aparecían cambios espontáneos (sin estímulo) en el potencial de membrana que no se observaron a 2 mm de distancia de la placa terminal. A estos cambios les llamaron potenciales de placa excitadores miniatura (**ppem**). Ellos notaron que la amplitud de estos potenciales era de alrededor una centésima parte de un potencial de placa completo. Estos eventos aparecen aún en presencia de tetrodotoxina (TTX, toxina bloqueadora de canales de sodio sensibles a voltaje -potencial de acción), por lo que son eventos independientes de la liberación producida por potenciales de acción. La amplitud de estos potenciales mostró una media que es de 400 μ V, alrededor de una distribución normal.

Como podemos ver en la **figura 13**, cuando los potenciales sinápticos son provocados por estimulación eléctrica de las fibras nerviosas que inervan a los músculos se observa que la amplitud de los potenciales de placa inducidos por la estimulación varía gradualmente. Pero si el experimento es repetido en presencia de bajas concentraciones de calcio y altas concentraciones de magnesio, se encuentra: que la amplitud de los potenciales sinápticos disminuye y que la relación entre las amplitudes de los potenciales de placa ya no es gradual. Los cambios son ahora discretos o por saltos. Incluso, puede haber fallas.

Cuando se realiza un histograma de amplitudes de los potenciales de placa provocados en bajo calcio, se encuentra una distribución multimodal. La distancia entre pico y pico es igual a la amplitud mínima, e igual a la amplitud promedio de los potenciales de placa miniatura ($\sim 400 \mu$ V). La amplitud de los picos subsiguientes es un múltiplo de la amplitud mínima.

Estas observaciones sirvieron de base para decir que la actividad sináptica estaba producida por la suma de "paquetes" de transmisor liberado, y que la mínima amplitud en el histograma de amplitudes era la unidad cuántica o cuanto de liberación. Se calculó que un cuanto era debido a la acción de más o menos 10,000 moléculas de acetilcolina que deberían ser liberadas en cada paquete para producir dicho evento elemental o cuántico (Del Castillo y Katz, 1954, 1955; Fatt y Katz, 1950, 1951, 1952; Katz y Miledi, 1972; Liley, 1956).

Con los estudios realizados sobre la transmisión sináptica de tipo colinérgico en la placa neuromuscular, se relacionó al cuanto con el evento de la fusión de una vesícula sináptica y la liberación del neurotransmisor contenido en ésta al espacio intersináptico, y su posterior unión a los receptores-canal post-sinápticos.

Con los estudios anatómicos se encontraron vesículas asociadas con sitios "activos" en las terminales de la placa neuromuscular (Werning y Stirner, 1977; Trimble *et al.*, 1991). Estos sitios activos podrían corresponder al número de sitios disponibles de liberación (parámetro "n" de la teoría cuántica).

Por otro lado, se demostró que cada potencial de placa excitador (PPE) es formado por 1×10^6 moléculas de acetilcolina en la placa neuromuscular (Acheson, 1958 y Rosenblueth, 1950). Tomando en consideración esta información, se confirmó que un PPE está formado por alrededor de 100 pmpe. Con los estudios de la densidad de corriente unitaria de los canales nicotínicos en la placa neuromuscular se calculó que en la postsinápsis existen cerca de 10,000 receptores por μm^2 (Kandel, 1991c).

Las primeras estimaciones del tamaño del cambio en la conductancia de un evento elemental derivaron de mediciones y análisis de ruido. Suponiendo un cambio de conductancia de la forma de un pequeño pulso cuadrado del orden de 30 a 50 pS y una duración de unos pocos milisegundos (Katz y Miledi, 1972; Anderson y Stevens, 1973), se calculó que la amplitud de una corriente elemental en la placa neuromuscular es de 3-5 pA (Sakmann, 1992).

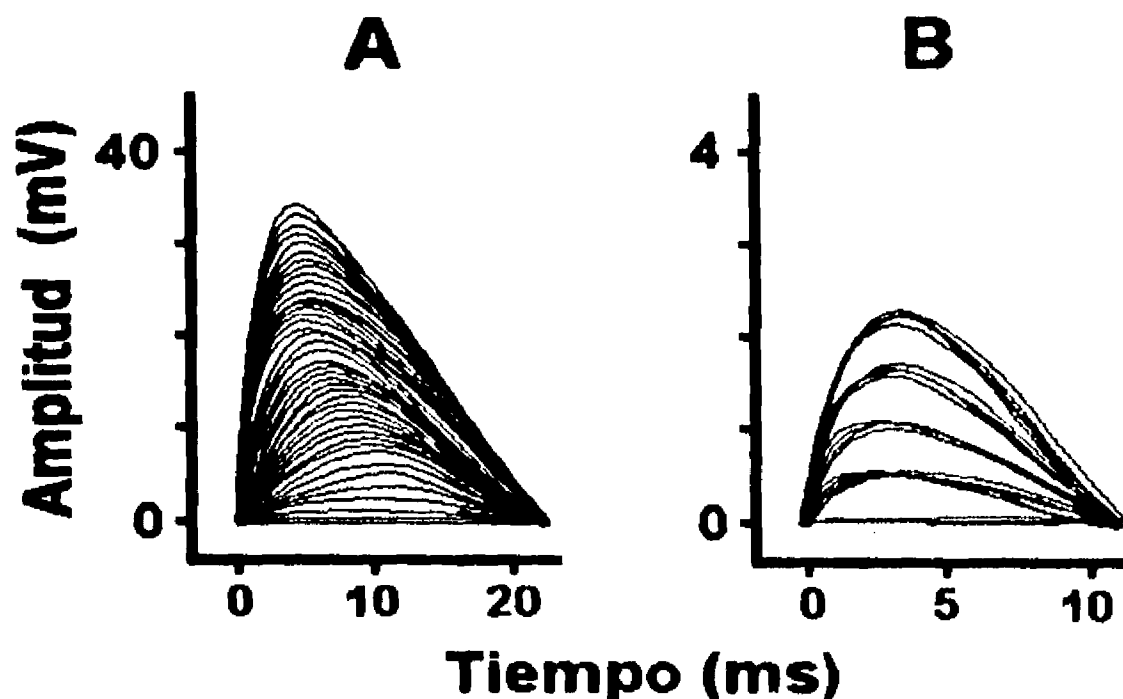


Figura 13. Gráfica de potenciales sinápticos. A. Potenciales sinápticos en la placa neuromuscular. Note que las amplitudes se distribuyen en un continuo. B. Potenciales sinápticos en el sistema nervioso central o en la placa neuromuscular bajo condiciones de bajo calcio y alto magnesio.

Con los datos anteriores es evidente que la amplitud de un potencial de placa depende de cuantos sitios de liberación son activados y cuantas vesículas son liberadas. Cada sitio libera una cantidad finita y más o menos uniforme de moléculas transmisoras que entran en contacto con los receptores en la membrana postsináptica. En el caso de la placa neuromuscular es evidente que el potencial miniatura es producido por la activación de un número finito de receptores, pero éste es mucho menor que el número de receptores localizados en la placa neuromuscular. El incremento en la intensidad de estimulación puede producir que más sitios activos liberen más paquetes de transmisor produciéndose, de este modo, potenciales sinápticos cuya amplitud varía dependiendo del número de sitios activados al mismo tiempo.

III.IV.2.- LA TEORÍA CUÁNTICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En el caso del sistema nervioso central la cantidad de receptores asociados a un sitio activo es mucho menor que en la placa neuromuscular. Se ha calculado a través de técnicas electrofisiológicas que estos son del orden de 5 a 50 receptores por botón presináptico (Redman, 1990; Sakmann, 1992; Bekkers, 1994).

Estudios realizados en las sinapsis la sobre las motoneuronas espinales han mostrado que cada fibra la forma de 2 a 5 (con media de 3.8) (Brown y Fyffe, 1981) o de 3 a 18 (con media de 7) (Burke, 1979) botones presinápticos sobre cada motoneurona. Incluso se ha demostrado la acción de un solo botón sináptico en el hipocampo que produce una corriente sináptica inhibitoria de alrededor de 10 pA (Arancio *et al.*, 1994).

Registros de corrientes postsinápticas inhibitorias (CPSIs) de células granulares del giro dentado, aunadas al registro de corrientes unitarias (de un sólo canal), demostraron la naturaleza cuántica de las CPSIs, mediadas por GABA (Edwards, 1990). Se mostró que el tamaño del cambio de conductancia ocurrida durante una CPSI cuántica es relativamente pequeño (del orden de 100 a 200 pS produciendo una corriente de ~ 20 pA), con respecto de las corrientes generadas en la placa neuromuscular. Esto sugiere que sólo un pequeño número de canales (20-40) son activados por la liberación de un cuanto de neurotransmisor; puesto que cada canal genera una corriente unitaria de ~1pA y un cambio de conductancia de 10 a 25 pS (Sakmann *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1990; Busch y Sakmann, 1990; Sakmann, 1992).

Kraszewski y Grantyn, 1992, estudiando neuronas cultivadas del colículo superior de la rata, a un potencial de mantenimiento de -80 mV (y un potencial de equilibrio de Cl⁻ de -12 mV), encontraron que las amplitudes de las corrientes postsinápticas miniatura fueron de 7 a 10 pA, lo que sugiere la activación de 5 a 15 canales de cloro por cada cuanto de GABA liberado (Finch, 1990).

Entre las sinapsis musgosas de las células granulares de cerebelo y las fibras, se caracterizó el componente de las corrientes excitatorias postsinápticas miniatura que fue de 20 ± 6 pS, por lo que se propone que cada evento unitario es producido por la activación de alrededor de 5 receptores-canal de NMDA.

Otro estudio realizado en el giro dentado mostró que la corriente cuántica es de 7 a 20 pA. Las corrientes unitarias estudiadas indicaron que una corriente cuántica representa la apertura de menos de 30 receptores-canal de GABA_A (Edwards *et al.*, 1990).

Usando fijación de corriente en el hipocampo, la amplitud del cuanto fue de $131 \pm 29 \mu\text{V}$. Tomando en cuenta esta amplitud, junto con el curso temporal promedio del potencial sináptico excitatorio y el valor de la resistencia de entrada de las neuronas piramidales del área CA1 (de $25 \text{ M}\Omega$), la carga que alcanza el soma por un sólo cuanto de transmisor es de 80 fC , que concuerda con el valor propuesto por Bekkers y Stevens (1989) de $50\text{-}100 \text{ fC}$. Esto representa la apertura de $30 - 110$ canales.

La variabilidad en las amplitudes de las corrientes sinápticas miniatura surge de la variabilidad del sitio activo (Bekkers *et al.*, 1990).

Tomando en cuenta que las vesículas contienen alrededor de 4000 moléculas de glutamato (Riveros, 1986), requiriendo 2 moléculas para la activación de un receptor-canal, la vesícula contiene mas que suficiente cantidad de transmisor como para saturar totalmente los receptores postsinápticos enfrente del sitio de liberación (Larkman *et al.*, 1991). Por lo que, a diferencia del sistema nervioso periférico, de manera general podemos decir que en el sistema nervioso central el cuanto ya no está dado por la vesícula sináptica, sino por la cantidad de receptores en la región postsináptica (Redman, 1990; Sakmann, 1992; Sakmann *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1990).

Aunado a lo anterior se sabe que la estructura de los botones sinápticos varía en los diferentes tipos de sinapsis. Por ejemplo, la estructura de "cáliz" (complejo olivar superior; Forsythe, 1994), o el botón grande (en las células de Mauthner; Korn y Faber, 1990), podrían contener varios sitios activos de liberación. Sin embargo, los botones sinápticos típicos (sinapsis Ia- motoneurona, sinapsis corticoestriatales, etc.), probablemente sólo contengan un sitio activo de liberación. En la motoneurona, se ha visto que la distribución discreta de amplitudes corresponde al número de botones presinápticos de la aferente estimulada (Redman, 1990). Esta distribución de amplitudes es similar en el hipocampo (Edwards *et al.*, 1990), por lo que se ha llegado a proponer que en muchas sinapsis centrales, un cuanto de liberación es provocado por un botón sináptico (un cuanto= un boton) (Redman, 1990; Sakmann, 1992; Sakmann *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1990).

Si cada aferente corticoestriatal forma de 1 a 2 botones, máximo 4 (Wilson, 1994), y la amplitud del cuanto es de $\pm 20 \text{ pA}$ (Mori *et al.*, 1994), concluimos que es muy probable que en el NE se cumpla lo anterior, por lo que la amplitud unitaria en fijación de corriente debe ser alrededor de 1 mV ($I \cdot R = V$; $20 \text{ pA} \cdot 50 \text{ M}\Omega \sim 1 \text{ mV}$) y menor de 1 mV si tomamos en cuenta el decaimiento electrotonico ($L = 1.6$). Esto significa que el disparo de una sola aferente dará como resultado la aparición de potenciales con amplitudes múltiples de esta cifra y que difícilmente sobrepasarán los 4 mV .

III.V TÉCNICAS PARA INCREMENTAR EXPERIMENTALMENTE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

Existen varios métodos mediante los cuales se puede incrementar la probabilidad de aparición de potenciales o corrientes sinápticas espontáneas, esto es, no producidas por la estimulación de las fibras aferentes. Los más conocidos son: incremento en la temperatura (Carlson *et al.*, 1982), despolarización con potasio, utilización de soluciones hiperosmóticas (i.e., manitol, McBain y Dingledine, 1992), alcohol (Brosius *et al.*, 1992), tetraaminoacridina, α -latrotoxina (toxina de la araña viuda negra) (Petrenko *et al.*, 1991, 1993), polarización eléctrica y sustancias como las aminoquinolinas (Molgó, 1982a, 1982b; Thesleff, 1983) o las aminopiridinas (Thesleff, 1980, 1983; Heuser *et al.*, 1979).

Las aminopiridinas, como la 4-aminopiridina (4-AP) y la 3,4-diaminopiridina facilitan el influjo de calcio a concentraciones en la que se ha observado un incremento de la liberación de neurotransmisores, sin llegar a las concentraciones necesarias para bloquear el canal de potasio tipo A (I_A) (Lundh y Thesleff, 1977; Lundh, 1978; Thesleff, 1980; Rogawsky y Barker, 1983; Kita *et al.*, 1985a; Hong y Chang, 1990). En 1982, Tapia y Sitges proponían una posible participación de la 4-aminopiridina en la liberación espontánea de neurotransmisores a través de una interacción directa con conductancias de calcio. Asimismo, en experimentos *in vitro* (sinaptosomas) Tapia y colaboradores encontraron que la 4-aminopiridina facilita la unión del calcio asociado a la neurotransmisión con la membrana de los sinaptosomas (Tapia *et al.*, 1985), pues se demostró que la 4-AP facilita la entrada de Ca^{2+} en sinaptosomas (Arzate *et al.*, 1986; Agoston, 1983). Tapia y Sitges (1982) encontraron que la 4-AP induce un incremento dependiente de Ca^{2+} en la liberación espontánea de neurotransmisores en sinaptosomas, que posteriormente explicaron por un posible efecto facilitador de la 4-AP en la membrana sinaptosomal sobre el acoplamiento funcional de la entrada de Ca^{2+} con la secreción (Tapia *et al.*, 1985). En experimentos *in vivo* en los cuales se ha administrado 4-AP (5 mg/kg, i.p.) en la rata y el ratón, se ha encontrado que esta droga produce crisis convulsivas tónico-clónicas generalizadas. Dichas convulsiones pueden explicarse por un aumento de la transmisión sináptica excitadora (Fragoso-Veloz y Tapia, 1992). Estos resultados son apoyados por los datos presentados por Morales-Villagrán y Tapia, (1995) en los que encuentran que la 4-AP incrementa preferencialmente la liberación de glutamato. Estos resultados también apoyan la propuesta de que la 4-AP produce un aumento de la actividad espontánea (glutamatérgica) en sistema nervioso central que lo hace susceptible de convertirse en un foco epileptogénico (Pasantes-Morales *et al.*, 1987).

Ahora se sabe que la 4-AP bloquea canales de potasio con diferentes dependencias de voltaje y tiempo (Rudy, 1988).

Las acciones de la 4-AP sobre canales de potasio pueden ser divididas en tres categorías (Yao y Tseng, 1994).

- 1.- Bloqueo en el estado de cerrado. Corriente saliente transitoria (I_A) en miocitos ventriculares y melanotropos, y a concentraciones milimolares el rectificador retardado en el axón gigante de

calamar. Para esos canales la 4-AP bloquea a voltajes de membrana negativos al voltaje de activación. La 4-AP se disocia de estos canales por despolarización de la membrana, cuando son abiertos (Campbell et al., 1993).

- 2.- Bloqueo en el estado abierto. Corriente I_A en células GH_1 , el rectificador retardado I_K en linfocitos B y en el nervio ciático, y la corriente de potasio regulada por ATP ($I_{K(ATP)}$) en el músculo esquelético.

Además, la 4-AP también bloquea la I_D o I_A lenta a concentraciones micromolares ($K_D \sim 30 \mu M$ en hipocampo; Storm, 1988, y $K_D \sim 120 \mu M$ en el NE; Surmeier et al., 1993).

- 3.- Bloqueo dependiente de un estado mezclado. Corriente I_A en neuronas centrales de molusco y en miocardio. Para estos canales el bloqueo por la 4-AP ocurre tanto a potenciales de membrana negativos e inicialmente después de la apertura del canal, y la disociación ocurre durante despolarización prolongada.

Por otro lado se ha reportado que la 4-AP estimula la fosforilación de la proteína presináptica B-50 (GAP43) (Heemskerk et al., 1990) vía cambios en el contenido de calcio libre intracelular por un mecanismo dependiente de sodio extracelular (Heemskerk et al., 1991).

Con la anterior introducción a los efectos de la 4-AP presento una revisión de los mecanismos de acción de la 4-AP basados en información actualizada.

REVISIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA 4-AMINOPIRIDINA A LA LUZ DE UN TIPO DE CONDUCTANCIAS DE POTASIO DESCUBIERTO RECIENTEMENTE. (Flores et al., 1993)

Además, publicaciones recientes demuestran la acción de la 4-AP sobre conductancias de potasio a dosis micromolares, en las terminales nerviosas, como el trabajo de Forsythe (1994) que realiza un análisis electrofisiológico en las terminales presinápticas del núcleo medial del cuerpo trapezoidal, conocidas como calix de Held (Forsythe, 1994), o en las terminales del ganglio ciliar (Yawo y Momiyama, 1993). Por lo estas nuevas evidencias dejan claro que la acción de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores depende del bloqueo de corrientes de potasio en las terminales.

Rev Biomed, Vol 4, No 3. Pags. 141-151: Julio-Septiembre 1993.

Revisión de los mecanismos de acción de la 4-Amino-Piridina a la luz de un tipo de conductancias de potasio descubierto recientemente.

Jorge V Flores-Hernandez, Juan C Pineda, Elvira Galarraga, José Bargas*

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D F., México

RESUMEN.

Se revisa el mecanismo de acción de las aminopiridinas, fármacos que a pesar de haber sido caracterizados químicamente hace más de dos décadas, todavía no hacen su entrada en firme a la terapéutica médica. Esto se debe a sus acciones colaterales convulsivantes y a la falta de conocimientos básicos sobre su mecanismo de acción. Recientemente se ha descubierto una familia de conductancias a potasio en neuronas cerebrales de mamífero que es bloqueada por la 4-aminopiridina a concentraciones micromolares. La acción

sobre canales dependientes del voltaje a estas dosis, impide disociar los efectos de la droga sobre la conducción nerviosa, de aquellos efectos sobre la transmisión sináptica. Sin embargo, a las dosis usadas *in vitro*, pueden obtenerse efectos perceptibles sobre el potencial de acción sin grandes efectos colaterales de tipo convulsivo. Esto invita a realizar nuevos ensayos clínicos.

Palabras clave: Aminopiridina, potasio, transmisión sináptica

* Solicitud de sobrescritos

José Bargas, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Casdo Postal 70-253 UNAM, México, D.F. 04510, México

SUMMARY.

A REVIEW OF THE MECHANISMS OF ACTION OF 4-AMINO-PYRIDINE AT THE LIGHT OF SOME RECENTLY DISCOVERED POTASSIUM CONDUCTANCES. The mechanism of action of aminopyridines is reviewed. In spite of being chemically characterized more than two decades ago, these drugs have not firmly entered medical therapeutics. This is due to their convulsant collateral actions and the lack of basic knowledge about their mechanism of action. A recently discovered family of potassium conductance channels in mammalian brain neurons is blocked by 4-amino-pyridine at micromolar concentrations. Action upon voltage-dependent channels at these concentrations impedes the dissociation of the action of these drugs between those occurring on nerve conduction and those occurring on synaptic transmission. Nevertheless, at doses used *in vitro*, perceptible effects upon action potentials can be obtained without important convulsant collateral actions. This invites to devise new clinical trials.

key words: Aminopyridine, potassium, synaptic transmission.

INTRODUCCION.

Las aminopiridinas (APs) constituyen una familia de compuestos con la habilidad de aumentar la transmisión sináptica y la conducción nerviosa. Los análogos son mono- o di-amino-piridinas. Las mono-amino-piridinas activas son las 2-, 3- y 4-AP. Las di-amino-piridinas activas son las 2,3-, 2,6-, y 3,6-DAP. De todas ellas, las de mayor actividad biológica son la 4-AP y la 3,4-DAP (1). Análogos recientes incluyen a la tetrahidroaminoacridina (THA)(2). En esta revisión nos referiremos principalmente a la 4-AP, que es la más estudiada, pero sus acciones son comunes a todas las APs

Los efectos de las APs tienen importancia clínica y terapéutica pues experimentos en animales demuestran que mejoran la conducción en nervios desmielinizados y no mielinizados (3-9) y potencian la transmisión sináptica (10-18). Lo que ha llevado a ensayos clínicos en humanos con esclerosis múltiple (19-22) o animales con patología desmielinizante degenerativa (23). También se ha ensayado en patologías degenerativas como la enfermedad de Alzheimer (24), y patologías neuromusculares incluida la intoxicación botulínica (1,25-31).

Las APs también despiertan interés desde el punto de vista fisiopatológico pues son drogas convulsivantes (17,32-36). Ya sea *in vitro* o *in vivo*, la administración de 4-AP es seguida por aumento de la liberación de transmisores (Figura 1) (15,17,37-46) con el consiguiente aumento de la transmisión sináptica (10,11,14,15,17,18,27) (Figura 2.1C). A esto siguen descargas epileptiformes de grupos neuronales en diversos núcleos (17,18,33,34,47). Por lo que las APs se utilizan en modelos químicos experimentales de epilepsia (17,18,32,36,47-52). Estos modelos resultan de interés pues las drogas que previenen la descarga epileptiforme son los derivados de las fenitoínas y no los antagonistas al receptor glutamatérgico o los agonistas del ácido -aminobutírico (52).

Está claro entonces que las APs tienen efectos terapéuticos deseables, pero sus efectos colaterales, i.e., convulsiones, son altamente indeseables. Hasta hoy no se sabe que tanto pueden disociarse los efectos sobre la conducción nerviosa, que resultan terapéuticos en las patologías de conducción y desmielinizantes (5,19-23), de los efectos sobre la transmisión sináptica. A estos últimos se les atribuye los efectos convulsivantes (1,11,17,36). Los ensayos clínicos se contradicen entre sí (21,22,24), por lo que se necesitan más estudios de tipo básico y experimentación animal así como ensayos en pacientes. Por otro lado, los efectos sobre la transmisión sináptica también serían terapéuticos en enfermedades de tipo neuromuscular tales como la **miastenia gravis** (1,25-31). Pero ¿puede

Mecanismos de la 4-Amino-piridina

aumentarse la transmisión sináptica sin causar convulsiones? (22,31)

El que se logre desarrollar análogos de las APs con las acciones benéficas, como la conducción en nervios con diversos grados de desmielinización, y que al mismo tiempo tuvieran mínimos efectos colaterales de tipo convulsivante (31,53), depende de si ambas acciones son sobre substratos distintos o de si las mejoras apreciables en conducción o transmisión requieran de menor dosis que la necesaria para producir convulsiones.

Actualmente se tiene una idea más o menos clara de como actúan las APs para aumentar la conducción nerviosa, pero todavía no está claro el mecanismo mediante el cual aumentan la transmisión sináptica. En este artículo revisaremos las hipótesis más importantes.

MECANISMOS DE ACCION DE LAS APs.

Las APs son bloqueadores selectivos de canales de potasio dependientes de voltaje (refs. en: 54-56). Sin embargo, las concentraciones requeridas varían de preparación a preparación. La razón es que existe una gran familia de canales de potasio sensibles al voltaje y que participan en la repolarización del potencial de acción y en los mecanismos de disparo y conducción (refs. en: 54,55,57). No todos estos tipos de canal se encuentran en todas las membranas axónicas y neuronales. Por ejemplo, en los nervios mielinizados del mamífero la conducción se debe principalmente a la membrana de los nodos de Ranvier (58,59). En esta se encuentran canales de sodio y canales de fuga encargados de despolarizar y repolarizar respectivamente la membrana durante la conducción saltatoria. En el nodo no hay canales de potasio dependientes del voltaje. Estos sólo se encuentran en la región internodal escondidos bajo la gruesa capa de mielina (59). En las enfermedades desmielinizantes, parte de estos canales quedan al descubierto alterando la conducción propia de esas fibras, lo que produce un corto circuito del potencial

de acción (PA) (3,4,6,9,58). Esto explica el retardo o el bloqueo en la conducción y el déficit motor (3,4,58). Si estos canales de potasio se bloquean farmacológicamente (e.g., con 4-AP), se impide el corto circuito del PA, se retarda la repolarización del mismo y se aumenta su duración; no sólo en axones sino también en las neuronas mismas (Figura 2.2) (3,4,55,60,61). Ambos efectos, mejoran la conducción nerviosa y explican los efectos terapéuticos de las APs en las enfermedades desmielinizantes (21,58).

Sin embargo, si la duración del PA permanece aumentada al llegar a las terminales nerviosas (62-64), se debe de producir un aumento de la entrada de calcio en dicha membrana. El bloqueo de la corriente saliente produce un aumento de la corriente entrante (45,62,65,66). Esto a su vez aumenta la liberación de neurotransmisor, y por lo tanto, de la transmisión sináptica (27,39,64,66,67). En otras palabras, una hipótesis postula que el aumento de la transmisión se debe a las mismas causas que producen aumento de la conducción, i.e., bloqueo de corrientes de potasio (2,63,64). Según esta hipótesis es difícil separar ambos efectos pues el mismo substrato sirve para que la droga produzca sus efectos tanto en la conducción como en la transmisión. Pero al aumento en la transmisión sináptica se deben, en gran parte, las acciones colaterales epileptogénicas (1,11,17,68).

Múltiples reportes en la literatura describen el aumento en la liberación de transmisores después de administrar 4-AP (e.g., 15,17,37-46,69). También se describen aumentos de los potenciales sinápticos, tanto inhibitorios como excitatorios (1,11,13-17,70,71), potenciales sinápticos gigantes o despolarizaciones prolongadas (Figura 2.1C,D) (13,15,17,18,33,34,71,72), descargas epileptiformes (10,33,34,36,67) y aumento en la frecuencia de potenciales sinápticos espontáneos (Figura 1) (2,15-17,33,34,71). Gran parte de estos efectos, en particular la producción de descargas epileptiformes, acontecen a concentraciones micromolares (menos de 100 μ M) de 4-AP o sus análogos (13,16,17,34).

Ahora bien, hasta hace poco se sabía que se

necesitan concentraciones milimolares de 4-AP para bloquear las conductancias de potasio que alargan el PA y mejoran la conducción (Figura 2.2C,D) (54,55). Mientras que sólo se necesitan concentraciones micromolares para producir aumento de la liberación de transmisor (glutamato, γ -aminobutirato y acetil-colina) (15,17,37-46,69). Así, menos de 100 μ M de 4-AP bastan para aumentar la transmisión sináptica en rebanadas, sinaptosomas cerebrales o la unión neuromuscular (16,37-39,70,73-75). Esto es, se ha pensado que se necesita menos concentración para afectar la transmisión que para mejorar la conducción. Por lo tanto, primero se obtendrían los efectos colaterales (convulsiones) y luego la mejora en la conducción. Desde este punto de vista, usar la 4-AP en enfermedades de la conducción no se justifica.

Para explicar esta disociación de efectos a concentraciones micromolares, aparecieron hipótesis alternativas que atribuyen los efectos sobre la transmisión sináptica a acciones directas sobre la entrada de calcio a las terminales (27,76,77) o a acciones sobre el mecanismo de acople excitación-liberación (43,44). Ciertas evidencias preliminares parecen apoyar estas hipótesis que disocian los efectos sobre la transmisión de los efectos sobre la conducción. Por ejemplo, la disociación entre la magnitud de la despolarización y la entrada de calcio (75,77), los efectos diferenciales sobre la modulación presináptica (40,69,74), las diferentes acciones del calcio en la liberación excitotóxica o en la citoplasmática (37,42), el hecho de que diferentes análogos como la 3,4-AP o la tetrahidroaminocridina (THA) sean más efectivos para aumentar la transmisión o la conducción, con menores efectos colaterales de tipo convulsivo (2,31), el hallazgo de que la 4-AP no sólo actúa sobre canales dependientes de voltaje sino también sobre canales dependientes del metabolismo (78,79), y ciertas acciones sinérgicas entre 4-AP y agonistas glutamatérgicos para producir corriente entrante espontánea (e.g., 14).

Sin embargo, ninguna de estas evidencias aporta datos concluyentes. Los diferentes

experimentos y enfoques no permiten llegar a una conclusión definitiva. Por mencionar un ejemplo, los experimentos sobre la corriente de calcio (77) no se han hecho con 4-AP a concentraciones micromolares, y faltan relaciones dosis-respuesta comparativas en la mayoría de los estudios citados.

Por el otro lado, ya se sabe que la 4-AP a dosis micromolares sí afecta corrientes de potasio dependientes del voltaje, como se verá a continuación. Esto apoya la hipótesis de la no separación de efectos.

EFFECTOS SOBRE CANALES DE POTASIO.

Hasta hace poco, las corrientes transitorias de potasio de la familia I_A se consideraban las más sensibles a la 4-AP. La acción se ejerce a concentraciones milimolares ($IC_{50} \approx 2-3$ mM) (refs. en: 55,57,61). Estas corrientes de potasio participan en la repolarización de los PAs y su bloqueo alarga las espigas en muchos tipos de neurona cerebral (55,57,61). Además, la corriente I_A determina en gran medida la frecuencia de disparo, de forma que si se le bloquea aumenta la frecuencia produciéndose más liberación de transmisor para el mismo estímulo (refs. en: 57,60,61).

Sin embargo, en el mamífero en general, la 4-AP no es efectiva para bloquear las corrientes persistentes de potasio, las cuales son preferencialmente bloqueadas con tetraetilamonio, caribdotoxina, noxiustoxina y otros compuestos similares (refs. en: 80,54). Las APs tampoco son efectivas para bloquear las corrientes de potasio dependientes del calcio intracelular (54,55). Por lo que parece claro que a dosis milimolares las APs bloquean cierto tipo de conductancias a potasio y no otras.

La pregunta es si hay conductancias de potasio que sean bloqueadas por la 4-AP a concentraciones micromolares iguales a las requeridas para aumentar la transmisión sináptica (15,17,37-46,69). La respuesta es que este tipo de conductancia ha sido recientemente descubierto y caracterizado (81-84).

Mecanismos de la 4-Amino-piridina

Se trata de conductancias que se activan rápidamente en la región umbral del potencial de membrana, se inactivan lentamente, y pueden ser bloqueadas con concentraciones micromolares de 4-AP ($IC_{50} \approx 30 \mu M$) (82,83). A estas corrientes se les ha denominado I_{ν} (82) o I_{ν} lentas (81). Mas interesante resulta que esta familia de conductancias se asemeja a las encontradas en axones mielinizados de vertebrados no mamíferos (88) y en axones no mielinizados (86,87). Por lo que podría tratarse de canales similares si es que hay cierta conservación filogenética.

Experimentos recientes en nuestro laboratorio muestran que las concentraciones necesarias para producir aumento en la frecuencia de potenciales sinápticos espontáneos en regiones cerebrales como el núcleo caudado son menores a $50 \mu M$ (e.g., $10 \mu M$ de 4-AP en la Figura 1). A concentraciones de $50 \mu M$ aparecen simultáneamente un retardo perceptible en la última parte de la repolarización del PA (Figura 2 1D) y una ligera potenciación de los potenciales sinápticos (Figura 2 2D). Probablemente ambos son efecto de bloquear la

corriente I_{ν} (83). Actualmente hacemos experimentos para comprobarlo.

Por lo anterior, hay que concluir que este nuevo tipo de conductancias a K^+ no nos permite separar los efectos sobre la transmisión sináptica de los efectos sobre la conducción. Aunque si se obtiene un aumento en la transmisión (Figura 1) sin que haya gran potenciación de la respuesta ortodrómica (Figura 2 1). Esto podría explicar por que hay mejoría clínica en pacientes con esclerosis múltiple, a dosis relativamente pequeñas, y sin efectos colaterales graves (21,22). Sin embargo, es justo decir que las concentraciones micromolares de 4-AP en núcleos como el hipocampo, ya producen descarga epileptiformes *in vitro* (e.g., 17,36).

CONCLUSION.

La evidencia hasta el momento, apunta a que es imposible separar los efectos de las APs sobre

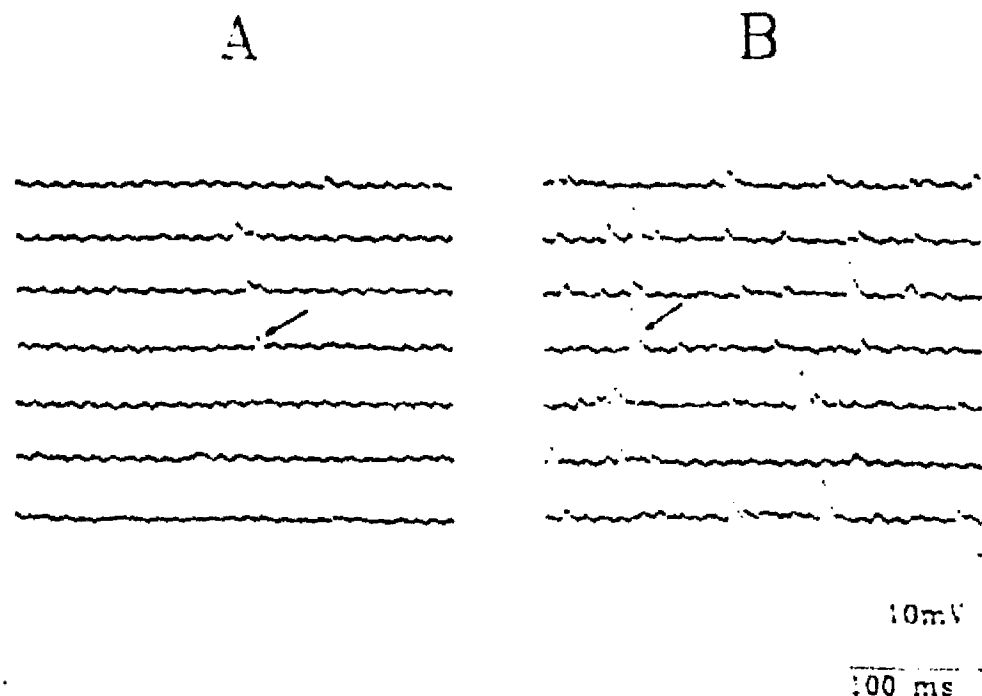


Figura 1. Aumento en la frecuencia de potenciales sinápticos espontáneos después de $10 \mu M$ de 4-AP. A: En condiciones control sólo se observan escasos eventos sinápticos espontáneos (flecha), que apenas destacan del ruido basal. B: Después de perfundir con $10 \mu M$ de 4-AP, es obvio el aumento en la frecuencia de potenciales sinápticos espontáneos de amplitud variable (flecha). Registro intracelular. Núcleo caudado de rata *in vitro*.

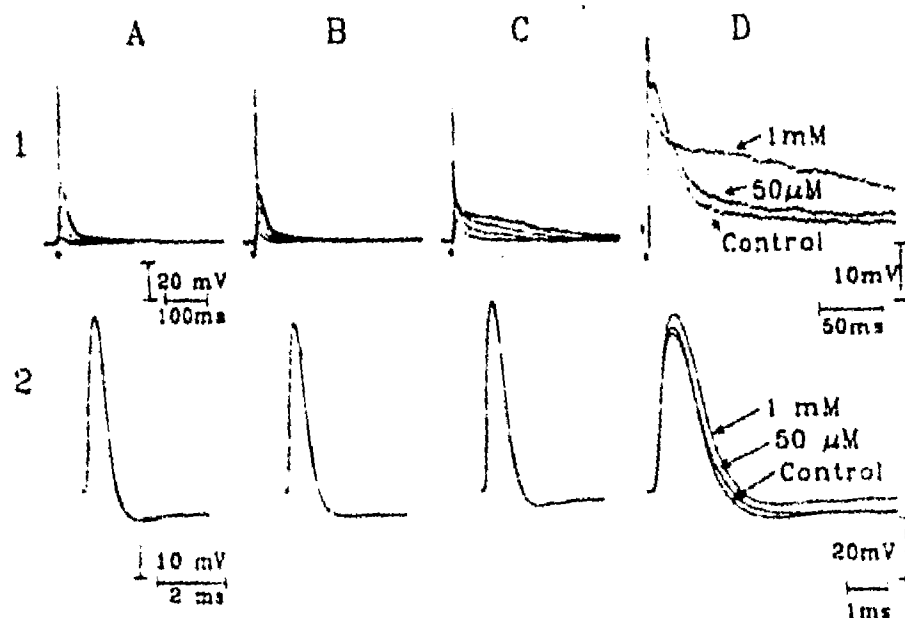


Figura 2. Efectos de la 4-AP sobre la estimulación ortodrómica y el potencial de acción en una neurona del núcleo caudado. 1. Estimulación ortodrómica. 2. Potencial de acción. 1A: Potenciales sinápticos provocados con estimulación ortodrómica de diferentes intensidades hasta llegar al umbral de disparo de un potencial de acción. 1B: Igual que en A, después de perfundir con 50 mM de 4-AP. 1C: Igual que en A y B, después de perfundir con 1 mM de 4-AP. Observe la potenciación de los potenciales sinápticos. 1D: Sobreposición de las tres respuestas umbral de A a C. Observe que el efecto de 50 mM de 4-AP sobre la transmisión sináptica provocada es mínimo. 2A-C: Potenciales de acción en la misma neurona a las mismas concentraciones de 4-AP. 2D: Sobreposición de los potenciales de acción. Observe que se registran cambios mínimos en la repolarización del PA con 50 mM de 4-AP. 1 mM ya produce efectos obvios. Registro intracelular. Núcleo caudado de rata *in vitro*.

canales de potasio, el potencial de acción y la conducción nerviosa, de los efectos sobre la transmisión sináptica y las descargas de tipo epileptiforme. La pieza de evidencia fundamental descansa en el hallazgo reciente de conductancias a potasio bloqueadas por 4-AP a concentraciones micromolares. Sin embargo, estos cambios se logran a concentraciones de 4-AP que no modifican sustancialmente la estimulación sináptica provocada (ortodrómica), y las descargas epileptiformes son restringidas a algunos núcleos como el hipocampo. Esto sugiere que se deben de realizar más ensayos clínicos con dosis menores de 4-AP, siempre y cuando estemos alerta de los efectos colaterales en sujetos susceptibles.

RECONOCIMIENTOS.

Este trabajo fue financiado por DGAPA-UNAM.

REFERENCIAS.

- 1.- Thesleff S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 1980; 5: 1413-1419.
- 2.- Griffith W H, Sim J A. Comparison of 4-aminopyridine and tetrahydroaminoacridine on basal forebrain neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1990, 255: 986-993.

Mecanismos de la 4-Amino-piridina

- 3.- Bostock H, Sears T A, Sherratt R M. The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *J Physiol* 1981; 313: 310-315
- 4.- Bostock H, Sherratt R M, Sears T A. Overcoming conduction failure in demyelinated nerve fibers by prolonging action potentials. *Nature* 1978; 274: 385-387
- 5.- Eliasson S G, Monafo W W. Effects of 4-aminopyridine on protein phosphorylation in heat-blocked peripheral nerve. *J Neurol Sci* 1991; 105: 175-182.
- 6.- Kocsis J D, Ruiz J A, Waxman S G. Maturation of mammalian myelinated fibers: changes in action potential characteristics following 4-aminopyridine application. *J Neurophysiol* 1983; 50: 449-463
- 7.- Scholfield C N. Properties of K-currents in unmyelinated presynaptic axons of brain revealed by extracellular polarization. *Brain Res* 1990; 507: 121-128.
- 8.- Sherratt R M, Bostock H, Sears T A. Effects of 4-aminopyridine on normal and demyelinated mammalian nerve fibers. *Nature* 1980; 283: 570-572.
- 9.- Targ E, Kocsis J D. 4-aminopyridine leads to restoration of conduction in demyelinated rat sciatic nerve. *Brain Res* 1985; 328: 358-361
- 10.- Aram J A, Michelson H B, Wong R K. Synchronized GABAergic IPSPs recorded in the neocortex after blockade of synaptic transmission mediated by excitatory amino acids. *J Neurophysiol* 1991; 65: 1034-1041
- 11.- Buckle P J, Hass H L. Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J Physiol* 1982; 326: 109-122
- 12.- Gage P W, McArdle J J, Saint D A. Effects of butenadione monoxime on neuromuscular transmission. *Br J Pharmacol* 1990; 103: 251-256
- 13.- Hess G, Gustafsson B. Changes in field excitatory postsynaptic potential shape induced by tetanization in the CA1 region of the guinea-pig hippocampal slice. *Neuroscience* 1990; 37: 61-69.
- 14.- Jankowska E, Lundberg A, Rudomin P, Sykova E. Effects of 4-aminopyridine on transmission in excitatory and inhibitory synapses in the spinal cord. *Brain Res* 1977; 112: 387-392
- 15.- Kita T, Kita H, Kitai S T. Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res* 1985; 361: 10-18
- 16.- Otis T S, Mody I. Differential activation of GABA_A and GABA_B receptors by spontaneously released transmitter. *J Neurophysiol* 1992; 67: 227-235
- 17.- Perreault P, Avoli M. 4-aminopyridine-induced epileptiform activity and a GABA-mediated long-lasting depolarization in rat hippocampus. *J Neuroscience* 1992; 12: 104-115
- 18.- Rutecki P A, Lebeda F J, Johnston D. 4-aminopyridine produces epileptiform activity in hippocampus and enhances synaptic excitation and inhibition. *J Neurophysiol* 1987; 57: 1911-1924.
- 19.- Bever C T, Leslie J, Camenga D L, Panitch H S, Johnson K P. Preliminary trial of 3,4-diaminopyridine in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1990; 27: 421-427.
- 20.- Jones R E, Heron J R, Foster D H, Snolgar R S, Mason R J. Effects of 4-aminopyridine in patients with Multiple Sclerosis. *J Neurological Sci* 1983; 60: 353-362

21. - Stefoski D, Davies F A, Faut M, Schauf C L. 4-aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1987; 21: 71-77.
22. - Stefoski D, Davies FA, Fitzsimmons WE, Luskin S S, Rush J, Parkhurst G W. 4-aminopyridine in multiple sclerosis: prolonged administration. *Neurology* 1991; 41: 1344-1348.
23. - Blight A R, Toombs J P, Bauer M S, Widmer W R. The effects of 4-aminopyridine on neurological deficits in chronic cases of traumatic spinal chord injury in dogs: a phase I clinical trial. *J Neurotrauma* 1991; 8: 103-119.
24. - Wiseman E J, Jarvik L F. Potassium channel blockers: could they work in Alzheimer disease? *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1991; 5: 25-30.
25. - Agoston S, Van Weerden P, Broekert A. Effects of 4-aminopyridine in Eaton-Lambert syndrome. *Br J Anaesth* 1978; 50: 382-385.
26. - DePaiva A, Dolly J O. Light chain of botulinum neurotoxin is active in mammalian motor nerve terminals when delivered via liposomes. *FEBS Lett* 1990; 277: 171-174.
27. - Lundh H. Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. *Brain Res* 1978; 153: 307-318.
28. - Lundh H, Nilsson O, Rossen I. 4-aminopyridine - a new drug tested in the treatment of Eaton-Lambert syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1977; 40: 1109-1112.
29. - Lundh H, Nilsson O, Rossen I. Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1979; 42: 171-175.
30. - Murray N M F, Newsom-Davies J. Treatment with oral 4-aminopyridine in disorders of neuromuscular transmission. *J Neurol* 1981; 31: 265-271.
31. - Perry J A, Chang M. Sensitive trace-first liquid chromatographic determination of 4-aminopyridine in 3,4-diaminopyridine. *J Pharm Sci* 1990; 79: 437-439.
32. - Chesnut T J, Swann J W. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in immature hippocampus. *Epilepsy Res* 1988; 2: 187-195.
33. - Gean P W. The epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat amygdala slices: antagonism by non-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Brain Res* 1990; 530: 251-256.
34. - Muller W, Misgeld U. Inhibitory role of dentate hilus neurons in guinea-pig hippocampal slice. *J Neurophysiol* 1990; 64: 46-56.
35. - Schafer E W, Brunton R B, Cunningham D J. A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridines to birds and mammals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973; 26: 532-538.
36. - Voskuyl RA, Albus HA. Spontaneous epileptiform discharges in hippocampal slices induced by 4-aminopyridine. *Brain Res* 1985; 342: 54-66.
37. - Bernath S, Zigmund M J. Calcium independent GABA release from striatal slices: the role of calcium channels. *Neuroscience* 1990; 36: 677-682.
38. - Buyukuysal R L, Wurtman R J. 4-aminopyridine increases acetylcholine release without diminishing membrane phosphatidylcholine. *J Neurochem* 1990; 54: 1302-1309.
39. - Giniatullin R A, Khazipov R N. End plate currents with a physiological level of quantal secretion and after potentiation of the mediator

Mecanismos de la 4-Amino-piridina

- release by 4-aminopyridine. *Neurofiziologia* 1991, 23: 48-56. (En ruso, resumen en inglés)
- 40.- Herrero I, Miras-Portugal MT, Sanchez-Prieto J. Inhibition of glutamate release by arachidonic acid in rat cerebrocortical synaptosomes. *J Neurochem* 1991; 57: 719-721
- 41.- McMahon HT, Nicholls DG. Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: evidence for biphasic release and triggering by localized Ca^{2+} . *J Neurochem* 1991, 56: 86-94
- 42.- Santos MS, Rodriguez R, Carvalho AP. Effects of depolarizing agents on the Ca^{2+} -independent and Ca^{2+} -dependent release of [3H]GABA from sheep brain synaptosomes. *Biochem-Pharmacol* 1992, 44: 301-308.
- 43.- Tapia R, Sitges M. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res* 1982, 250: 291-299
- 44.- Tapia R, Sitges M, Morales E. Mechanism of calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res* 1985; 361: 373-382
- 45.- Vickroy TW, Schneider C J. Characterization of divalent cation-induced [3H]acetylcholine release from EGTA-treated rat hippocampal synaptosomes. *Neurochem Res* 1991, 16: 1175-1185.
- 46.- Vizi E S, van Dijk J, Foldes F F. The effect of 4-aminopyridine on acetylcholine release. *J Neural Transmission* 1977; 41: 265-274
- 47.- Szenté M, Brányi A. Mechanism of aminopyridine-induced ictal seizure activity in cat neocortex. *Brain Res* 1987, 413: 368-373
- 48.- Fueta Y, Avoli M. Pattern- and age-dependency of the antiepileptic effects induced by valproic acid in the rat hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 1991, 69: 1301-1304.
- 49 - Ives AE, Jefferys JG. Synchronization of epileptiform bursts induced by 4-aminopyridine in the in vitro hippocampal slice preparation. *Neurosci Lett* 1990, 112: 239-245.
- 50 - Kosobud A E, Crabbe J C. Genetic correlations among inbred strain sensitivities to convulsions induced by 9 convulsant drugs. *Brain Res* 1990, 526: 8-16.
- 51 - Noebels J L, Rutecki P A. Altered hippocampal network excitability in the hypernoradrenergic mutant mouse tottering. *Brain Res* 1990; 524: 225-230
- 52 - Yamaguchi S, Rogawsky M A. Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. *Epilepsy Res* 1992; 11: 9-16.
- 53.- Chaki S, Muramatsu M, Otomo S. Blockade of voltage-dependent Ca^{2+} efflux from rat brain synaptosomes by minaprine and tetrahydroaminoacridine. *Life Sci* 1991; 48: 2883-2890
- 54 - Kolb H A. Potassium channels in excitable and non-excitable cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990, 115: 51-91.
- 55 - Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 1988; 25: 729-749.
- 56 - Yeh J Z, Oxford G S, Wu C H, Narahashi T. Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane. *J Gen Physiol* 1976; 68: 519-535.
- 57 - Bargas J, Galarraga E, Surmeier D J. Neuronal networks of the mammalian brain have functionally different classes of neurons: suggestions for a taxonomy of membrane ionic conductances. En Rudomin P, Arbib M A, Cervantes-Pérez F, Romo

Rev Biomed, Vol 4, No 3, Pags. 141-151: Julio-Septiembre 1993.

- R. Eds., Springer Verlag, Berlin. 1993; pp 3-32
- 58.- Kocsis JD. Functional characteristics of potassium channels of normal and pathological mammalian axons. En: Ritchie JM, Keynes RD, Bolis L. ed., *Ion Channels In Neuroal Membranes* AR Liss ed. NY. 1986; 122-144
- 59.- Ritchie JM. The distribution of sodium and potassium channels in mammalian myelinated nerve. En: Ritchie JM, Keynes R D, Bolis L. ed., *Ion Channels In Neuroal Membranes* AR Liss ed. NY 1986; 122-144.
- 60.- Bargas J, Galarraga E, Aceves J. An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res* 1989; 75: 146-156.
- 61.- Rogawsky MA. The A-current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it? *TINS* 1985; 8: 214-219.
- 62.- Barrie AP, Nicholls DG, Sanchez-Prieto J, Sihra T S. An ion channel locus for the protein kinase C potentiation of transmitter glutamate release from guinea-pig cerebrocortical synaptosomes. *J Neurochem* 1991; 57: 1398-1404.
- 63.- Cheung DW. Synaptic transmission in the guinea-pig vas deferens: the role of nerve action potentials. *Neuroscience* 1990; 37: 127-134.
- 64.- Stjarne L, Stjarne E, Msghina M, Bao J X, K⁺ and Ca²⁺ channel blockers may enhance or depress sympathetic transmitter release via a Ca²⁺-dependent mechanism "upstream" of the release site. *Neuroscience* 1991; 44: 673-692.
- 65.- Katz B, Miledi R. Tetrodotoxin-resistant electrical activity in presynaptic terminals *J Physiol* 1969; 203: 459-487.
- 66.- Llinás R, Walton K, Bohr V Synaptic transmission in squid giant synapse after potassium conductance blockage with external 3- and 4-aminopyridine *Biophys J* 1976; 16: 83-86
- 67.- Molgo L, Lemeignan M, Lechat P Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction. *J Paharmacol exp Ther* 1977; 203: 653-663.
- 68 - Holsheimer J, Lopes da Silva FH Propagation velocity of epileptiform activity in the hippocampus. *Exp Brain Res* 1989; 77: 69-68.
- 69.- Torocsik A, Vizi ES. 4-aminopyridine interrupts the modulation of acetylcholine release mediated by muscarinic and opiate receptors. *J Neurosci Res* 1990; 27: 228-232
- 70.- Klapstein G J, Colmers W F. 4-aminopyridine and low Ca²⁺ differentiate presynaptic inhibition mediated by neuropeptide Y, baclofen and 2-chloroadenosine in rat hippocampal CA1 *in vitro*. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 470-474
- 71.- Segal M Repetitive inhibitory post-synaptic potential evoked by 4-aminopyridine in hippocampal neurons *in vitro*. *Brain Res* 1987; 285-293.
- 72.- Michelson HB, Wong R K. Excitatory synaptic responses mediated by GABA_A receptors in the hippocampus. *Science* 1991; 253: 1420-1423.
- 73.- Dolezal V, Wecker L. Modulation of acetylcholine release from rat striatal slices: interaction between 4-aminopyridine and atropine. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 258: 762-766.
- 74.- Fredholm BB. Differential sensitivity to blockade by 4-aminopyridine of presynaptic receptors regulating [3H]acetylcholine release from rat hippocampus. *J Neurochem* 1990; 54: 1386-1390.
- 75.- Heemskerk F M, Schrama L H, Ghijsen W E, De Graan P N, Lopes da Silva F H, Gispen W H

Mecanismos de la 4-Amino-piridina

- Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free Ca^{2+} concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J Neurochem* 1991, 56: 1827-1835.
- 76 - Lundh H, Thesleff S. The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 1977, 42: 411-412.
- 77 - Rogawsky MA, Barker JL. Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage-clamp in spinal neurons. *Brain Res* 1983, 280: 180-185.
- 78 - Honoré E, Lazdunski M. Two different types of channels are targets for potassium channel openers in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 1991, 287: 75-79.
- 79 - Inoue I, Ngase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K^{+} channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991, 352: 244-247.
- 80 - Dreyer F. Peptide toxins and potassium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990, 115: 93-136.
- 81 - McCormick DA. Functional properties of a slowly inactivating potassium current in guinea pig dorsal lateral geniculate relay neurons. *J Neurophysiol* 1991, 66: 1176-1189.
- 82 - Storm J F. Temporal integration by a slowly inactivating K^{+} current in hippocampal neurons. *Nature* 1988, 336: 379-381.
- 83 - Surmeier D J, Stefani A, Foehring RC, Kitai ST. Developmental regulation of a slowly inactivating potassium conductance in rat neostriatal neurons. *Neurosci Lett* 1989, 103: 331-337.
- 84 - Wu R L, Barish M E. Two pharmacologically and kinetically distinct transient potassium currents in cultured embryonic mouse hippocampal neurons. *J Neurosci* 1992, 12: 2235-2246.
- 85 - Cherubini E, Ben-Ari Y, Ito S, Krnjevic K. Persistent pulsative release of glutamate induced by N-methyl-D-aspartate in neonatal rat hippocampal neurones. *J Physiol* 1991, 436: 531-547.
- 86 - Jirounek P, Chardonens E, Brunet P C. Afterpotentials in non-myelinated nerve fibers. *J Neurophysiol* 1991, 65: 860-873.
- 87 - Kirchoff C, Leah JD, Jung S, Reeh PW. Excitation of cutaneous sensory nerve endings in the rat by 4-aminopyridine and tetraethylammonium. *J Neurophysiol* 1992, 67: 125-131.
- 88 - Dubois JM. Potassium currents in the frog node of Ranvier. *Prog Biophys Mol Biol* 1983, 42: 1-20.

FALLA DE ORIGEN

V MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

Entendemos por modulación el proceso por el cual se modifican las propiedades eléctricas de la membrana celular cambiando la capacidad de respuesta a los neurotransmisores rápidos que utilizan receptor-canal. Las señales bioquímicas producidas por varios receptores de membrana producen cambios en conductancias de potasio, de sodio o de calcio. Estas señales involucran segundos mensajeros citoplásmicos, cofactores, proteínas acopladas y enzimas que puede fosforilar canales iónicos cambiando, de este modo, las propiedades de la respuesta. El efecto modulador puede durar desde segundos hasta minutos. Si además tomamos en cuenta acciones en la expresión genética, los efectos moduladores pueden durar más tiempo.

La modulación puede ser producida tanto en la presinapsis como en la postsinapsis, y los métodos para determinarla son diferentes.

IV.I.- MODULACIÓN PRESINÁPTICA.

Esta forma de modulación implica el cambio en la excitabilidad de la terminal nerviosa cambiando la calidad del proceso de liberación de transmisores. La modulación presináptica puede ser producida por hiperpolarización o despolarización de la terminal nerviosa vía activación rápida o lenta de conductancias iónicas, por modificación de las conductancias de calcio necesarias para el proceso secretorio, por modificación en el nivel de fosforilación de proteínas del citoesqueleto en la terminal, las cuales facilitan el transporte de las vesículas sinápticas, y por la modificación de conductancias a potasio, cambiando la repolarización y/o la frecuencia de disparo y regulando así, cuánto calcio entra durante ese disparo.

La modulación puede ser mediada por autoreceptores al mismo neurotransmisor liberado en la presinapsis. En la mayoría de los casos, los autoreceptores inhiben la liberación del transmisor. También hay receptores a neurotransmisores liberados por células vecinas (homo o heteroreceptores). De manera general los receptores en la presinapsis inhiben la liberación, aunque también la pueden facilitar. Un ejemplo de facilitación presináptica es la producida por los autoreceptores muscarínicos M_2 localizados en el sistema periférico, hipocampo y NE (Vizi *et al.*, 1989).

IV.II.- MODULACIÓN POSTSINÁPTICA.

La modulación produce cambios en la excitabilidad de la membrana postsináptica. Un ejemplo es la inhibición postsináptica que es la llevada a cabo en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas. En este ejemplo, las varicosidades catecolaminérgicas forman contactos sinápticos con los cuellos de las espinas que reciben sinapsis glutamatérgicas. En este caso la dopamina inhibe los efectos producidos por las entradas corticales o talámicas. La modulación postsináptica puede ocurrir sin cambios en el potencial de membrana de la célula postsináptica, y sus efectos sólo detectarse al haber cambios en el patrón temporal del disparo. Estos cambios se deben a que una o más conductancias dependiendo del voltaje son afectadas por las cadenas de segundos mensajeros (Cepeda *et al.*, 1992c).

¿Cómo definir si un efecto sináptico es modulado pre- o post-sinápticamente?

La respuesta depende del tipo de estudio realizado. Cuando este es electrofisiológico, mediante registro intracelular, se pueden registrar potenciales sinápticos de tipo espontáneo o provocado. También se pueden observar las variaciones en el potencial de membrana y/o la resistencia de entrada de la neurona postsináptica. Si el agente modulador modifica la resistencia de entrada postsináptica podemos suponer un efecto postsináptico. O por otro lado, si no existen cambios en las propiedades de la neurona postsináptica y sólo observamos cambios en la frecuencia de aparición en el registro de los potenciales sinápticos espontáneos, podemos suponer un efecto presináptico. Cuando realizamos un histograma de amplitud de los eventos sinápticos espontáneos encontramos que presentan al menos un pico, el tamaño de éste depende de la resistencia de la membrana postsináptica. Si existe algún cambio postsináptico que modifique la resistencia se producirá un cambio en la amplitud media de los potenciales sinápticos espontáneos. Este método nos permite observar si existe o no un efecto en la postsinapsis y determinar si existe o no modulación presináptica.

IV.II.- LA MODULACIÓN SINÁPTICA POR DOPAMINA

En un estudio realizado por Galarraga *et al.*, (1987), se mostró que la denervación dopaminérgica producida por la inyección intranigral de 6-hidroxi-dopamina produce un incremento en la actividad sináptica espontánea registrada en el NE. Esta observación mostró que la dopamina mantiene una inhibición tónica sobre la actividad sináptica estriatal. Este hecho nos llevó a proponer que la actividad sináptica provocada por la 4-AP podía ser modulada presinápticamente por la dopamina.

Se ha encontrado evidencia anatómica de la interacción sináptica y no sináptica de terminales dopaminérgicas sobre dendritas (axo-dendriticas) y sobre terminales corticoestriatales (axo-axónicas), respectivamente (Bouyer *et al.*, 1984).

Hasta hace pocos años se pensó que las acciones de la dopamina eran mediadas por sólo dos tipos de receptor: D_1 y D_2 . El efecto de la dopamina mediante estos dos receptores ocurre principalmente a través del segundo mensajero adenosin-monofosfato cíclico (AMPC). Mientras la activación de los receptores D_1 estimula la formación del AMPC, la activación de los receptores D_2 la inhibe (Kebabian y Calne, 1979). Actualmente, con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, sabemos que la dopamina puede actuar a través de al menos 5 tipos de receptor acoplados a proteínas G, y denominados D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , y D_5 , y de los cuales los D_2 , D_3 y D_4 presentan dos variantes de empalme alternativo (splicing). Pero de acuerdo a su sensibilidad farmacológica, los receptores a dopamina siguen siendo clasificados en dos familias (Anderson *et al.*, 1990; Civally *et al.*, 1991; Sibley y Monsma, 1992; Schwartz *et al.*, 1992):

- 1.- La familia D_1 (D_1 y D_5 , o D_{1A} y D_{1B}) y
- 2.- la familia D_2 ($D_{2\text{corto}}$ (D_{2S}), $D_{2\text{largo}}$ (D_{2L}), $D_{3\text{corto}}$ (D_{3S}), $D_{3\text{largo}}$ (D_{3L}), y D_4).

Cada uno de estos receptores es encontrado en el NE (Sibley y Monsma, 1992; Jarvie y Caron, 1993; Surmeier *et al.*, 1993)

Estudios sobre la localización de los receptores dopaminérgicos han mostrado que la mayoría de los receptores D_1 se localizan en las neuronas neostriatales de proyección, y en los axones que proyectan de éstas, al núcleo entopeduncular y la parte reticulada de la sustancia negra (Altar y

Hauser, 1987). Además, existe una proteína (DARP-32), acoplada a un sistema de proteína G, con una distribución restringida a las neuronas espinosas medianas estriatales, que ha sido relacionada con el receptor D_1 (Hemmings *et al.*, 1987; Schiffmann *et al.*, 1990). La mayoría de los receptores D_2 están asociados con células estriatales y sus axones en el pálido. Los receptores D_2 están también asociados con las terminales corticoestriatales (Snyder y Goodman, 1980; Ariano *et al.*, 1989). Finalmente, prácticamente todos los receptores D_2 en la sustancia negra están asociados a las neuronas dopaminérgicas como autorreceptores (Altar y Hauser, 1987; Beckstead, 1988a, 1988b).

Pese a que se conoce bien la importancia de la dopamina en los ganglios basales, sus efectos fisiológicos en el NE siguen siendo controversiales.

De manera general se ha mostrado, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, que la activación de los receptores D_1 inhibe la frecuencia de disparo de las neuronas estriatales. Un ejemplo es la acción del agonista al receptor D_1 que inhibe la actividad espontánea, así como la descarga neuronal producida por la estimulación local o por glutamato aplicado microiontoforéticamente (Akaike, *et al.*, 1987; Calabresi 1987a, 1988a, 1988b; Hu y Wang, 1988; White, 1987; White y Wang, 1986; Cepeda, 1992c).

Existen resultados que han sugerido que la mayor parte de los efectos electrofisiológicos de la dopamina en el NE son inhibitorios (Bernardi *et al.*, 1984). Sin embargo, otros autores han reportado actividad de tipo excitatorio (Akaike *et al.*, 1987; Cepeda, 1992c). Además, se ha postulado un papel modulador de la dopamina sobre otros transmisores. Así la aplicación iontoforética de dopamina facilita la excitación inducida por glutamato y la inhibición producida por GABA, mientras que la frecuencia espontánea de disparo no se modifica (Chiodo y Berger, 1986). En estudios realizados con rebanadas de núcleo caudado humano, cuando se aplicó dopamina antes de N-metil-D-aspartato (NMDA), la amplitud de las despolarizaciones y el número de potenciales de acción producidos por este último fue incrementado. En contraste, la dopamina disminuyó la amplitud de las despolarizaciones y el número de potenciales de acción inducidos por glutamato y quisqualato (Cepeda *et al.*, 1992c). Además de los efectos sobre la modulación del sistema glutamatérgico, se han descrito efectos sobre la regulación de la liberación de acetilcolina (Consolo, *et al.*, 1993). Finalmente, hay datos de un efecto excitador de la dopamina sobre la liberación de GABA en la que puede estar involucrada una liberación dependiente de calcio (Bernath y Zigmond, 1989; Sandoval y Palermo-Neto, 1989; Floran *et al.*, 1990).

Por otro lado, se ha encontrado que la activación del receptor D_2 incrementa la frecuencia de los potenciales de acción espontáneos de neuronas estriatales (Akaike, 1987; Ohno *et al.*, 1985, 1986 y 1987). Estos efectos no fueron observados en los estudios realizados por Calabresi y cols. (Calabresi *et al.*, 1987a, 1988b). Además, Hu y Wang (1988) demostraron un débil efecto inhibitorio por quinpirole sobre la actividad de las neuronas estriatales. Ahora sabemos que las dos vías de salida del NE, (i. e. la estriato-palidal y la estriato-nigral) son diferencialmente moduladas por los receptores D_2 y D_1 respectivamente (Gerfen, 1992b).

Estudios realizados con ratas previamente tratadas con haloperidol mostraron el desarrollo de una supersensitividad a agonistas del receptor D_2 . La activación en esta condición indujo una potente inhibición de potenciales sinápticos excitadores mediados por glutamato. El tratamiento con haloperidol no modificó las propiedades intrínsecas de las neuronas estudiadas (Calabresi *et al.*, 1992). En este

contexto, estudios realizados con sinaptosomas estriatales muestran que la liberación de glutamato es regulada por activación de receptores D_2 (Maura *et al.*, 1988)

Existen trabajos en los que se muestra que los agonistas D_2 y D_1 producen efectos bifásicos dependientes de la dosis administrada (Shen *et al.*, 1992)

Estudios realizados sobre la excitabilidad del campo terminal cortico-estriatal en el NE han mostrado que la aplicación de anfetamina o apomorfina incrementa la corriente necesaria para producir una respuesta antidrónica en las neuronas piramidales de la corteza. Dicho efecto puede ser revertido por la aplicación de haloperidol o por el antagonista D_2 selectivo, sulpiride. Esto significa que la excitabilidad del campo terminal de la neurona cortico-estriatal disminuye en presencia de dopamina (García-Muñoz, 1991, 1994)

Sin embargo, la aplicación a bajas dosis del agonista D_2 específico, el quinpirole, no afectó la excitabilidad del campo terminal cortico-estriatal (García-Muñoz, 1991, 1994). A este respecto, Calabresi *et al.*, (1988a), mostraron efecto de agonistas D_2 cuando las ratas de las cuales obtuvieron sus rebanadas fueron previamente tratadas con reserpina

En estudios realizados bajo la técnica de "whole cell clamp," en neuronas estriatales, se ha mostrado que la activación de los receptores D_1 y D_2 modulan corrientes de sodio, de potasio y de calcio en las neuronas neostriatales (Surmeier y Kitai, 1993; Kitai y Surmeier, 1993; Surmeier *et al.*, 1995).

En virtud de que en esta tesis se pudo hacer una disección farmacológica de los potenciales post-sinápticos de tipo glutamatérgico en las neuronas espinosas medianas, se hace factible el estudio del efecto de los agonistas dopaminérgicos, tipo D_1 y D_2 , sobre dichos potenciales sinápticos espontáneos inducidos por la 4-aminopiridina.

OBJETIVOS

- 1.- El objetivo central de esta tesis es caracterizar los tipos de potenciales sinápticos inducidos por la 4-AP, mediante el uso de bloqueadores selectivos a los neurotransmisores en las neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado o neostriado de la rata.
- 2.- Caracterizar de manera general la anatomía y las propiedades electrofisiológicas de las neuronas espinosas medianas, comparando con los resultados ya descritos por otros autores y con la finalidad de identificar a las neuronas estudiadas en este trabajo.
- 3.- Estudiar los sistemas GABAérgico (receptor tipo A), glutamatérgico (receptores ionotrópicos tipo NMDA y No NMDA), y colinérgico (receptor nicotínico).
- 4.- En virtud de que tanto las aferentes corticales como las talámicas al neostriado son glutamatérgicas y la actividad intraestriatal es principalmente GABAérgica proponemos separar farmacológicamente la actividad glutamatérgica de la GABAérgica y/o colinérgica.
- 5.- El último objetivo es estudiar el efecto de la dopamina como modulador sobre el sistema glutamatérgico. En virtud de que la dopamina juega un papel modulador en el NE y suponiendo que se pueda separar la actividad glutamatérgica, proponemos estudiar el efecto de la activación del sistema dopaminérgico como modulador presináptico de la liberación de glutamato e investigar a través de qué tipo o tipos de receptores lleva a cabo esta acción. En este punto es necesario demostrar que la dopamina actúe presinápticamente, esto es que no modifique la propiedades postsinápticas.

METODOLOGIA

En experimentos de esta tesis fueron realizados en ratas Wistar adulta (mayor de 2 meses, de 120 - 130 g de peso). Las ratas se anestesiaron con éter y decapitadas. Se extrajo el cerebro y se obtuvieron rebanadas sagitales (400 μm), conteniendo el NE, mediante un vibratomo (Vibratome Pelco 101). El NE se disecó completamente de la corteza y otros núcleos.

El registro fue realizado con el método de rebanada sumergida mantenida entre 32 y 34°C. La cámara de registro empleada fue diseñada y construida previamente en el laboratorio.

La solución salina de perfusión fue (en mM): 125 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 Mg Cl₂, 2.0 CaCl₂, 25 NaHCO₃ y 11 glucosa (300 mOsm/l, pH 7.4, 30-34°C). La solución fue burbujeada con 95% O₂- 5% CO₂.

Los registros intracelulares se realizaron con micropipetas llenas, en la mayoría de los casos con biocitina (Sigma 1%) en 2 M de KCl, o sólo con 3 M de KCl. La resistencia de los electrodos osciló entre los 80 y 120 M Ω . La señal se amplificó con un amplificador "NeuroDATA" de una alta impedancia de entrada; con un circuito de puente activo para compensar la resistencia y la capacitancia del electrodo. La señal fue grabada previa digitalización ("Neurocorder") en cinta de video formato VHS.

Para asegurar que la neurona estudiada es una neurona espinosa mediana se realizó un protocolo de inyección de corriente y el registro del respectivo cambio del voltaje. Del análisis de la curva de voltaje vs corriente inyectada se obtuvo el valor de la resistencia de entrada (R_N) y del potencial de reposo. Se compararon estos datos junto con el análisis de la curva de carga y la curva de frecuencia vs corriente con los valores previamente publicados (siendo estos valores de alrededor de -80 mV y 50 M Ω (a los -70 mV), para el potencial de reposo y R_N respectivamente (Bargas *et al.*, 1988 y Galarraga *et al.*, 1994).

Todos los estudios realizados en esta tesis fueron con un potencial de membrana mantenido mediante inyección de corriente constante en el valor de -80 mV.

Posteriormente, a la comprobación que la neurona estudiada fue una identificada electrofisiológicamente como una neurona espinosa mediana, se realizó un registro control de 10 a 15 min. Éste registro fue tomado como control. Posteriormente se agregó a la perfusión la 4-AP y las diferentes drogas. El recambio de solución fue completado en 2 min. En varias células dosis micromolares de 4-AP indujeron una pequeña despolarización (de 2 a 5 mV). Esta despolarización fue corregida mediante la inyección de corriente continua. De este modo, la frecuencia, la amplitud de los potenciales sinápticos y la resistencia de entrada fueron monitoreados a un mismo potencial de membrana.

En condiciones control los potenciales sinápticos aparecieron espontáneamente con una frecuencia de alrededor de 1 evento cada segundo. La 4-AP indujo el incremento en la frecuencia de estos potenciales espontáneos. En la mayoría de los experimentos la resistencia de entrada fue monitoreada mediante un protocolo de corriente contra voltaje de 10 a 15 min después de la aplicación de una nueva droga con ayuda del programa para PC LAB-VIEW (National Instruments), o por la aplicación de un pulso de corriente de corta duración cada 10 segundos durante todo el experimento. Los registros

fueron digitalizados, almacenados en cinta VHS y analizados fuera del experimento con un osciloscopio digital y una computadora PC. Los registros fueron graficados durante el experimento usando un graficador de papel a baja velocidad de barrido (~ 1 cm/ min) (Gould modelo Easy Graf TA-240)

La frecuencia de los potenciales sinápticos espontáneos fue analizada con dos métodos: el primero consistió en el muestreo visual de 12 segundos cada minuto o, en el segundo caso, por la utilización de un discriminador de espigas que fue diseñado en el laboratorio. Este dispositivo utiliza la derivada del voltaje para detectar la fase de ascenso de un potencial sináptico, y mediante una ventana de discriminación cada evento es discriminado produciendo un pulso cuadrado tipo TTL que fue registrado con el programa INFING (Univ. de Puebla). INFING cuenta los eventos durante un predeterminado período de tiempo y los almacena en un archivo que es posteriormente analizado y graficado.

Además de la frecuencia se analizó la amplitud de los potenciales sinápticos y se realizaron histogramas de frecuencia de amplitudes los cuales fueron analizados con ayuda del programa estadístico SYSTAT.

Para poder demostrar que la modulación de la actividad sináptica por la activación de receptores D_2 es por mecanismos presinápticos es necesario comprobar que la activación de los receptores D_2 por acción del quinpirole no causa efectos a nivel postsináptico. En esta tesis utilicé dos métodos para probarlo.

Método 1. Medir la resistencia de entrada en el soma de las neuronas espinosas analizadas en presencia de 4-AP y bicuculina, considerado como fase control, y la medición de esta en presencia de quinpirole (10 μ M).

Método 2. Si la resistencia de entrada a nivel dendrítico fuera modificada por acción del quinpirole deberá haber un desplazamiento de la distribución de amplitudes de los potenciales sinápticos hacia valores menores en el caso de una baja en la resistencia, lo cual causa una disminución en la cuantificación de los sinápticos debido a que estos no pueden ser discernibles del ruido de fondo, o quedar por debajo del umbral para detección del discriminador de ventana. Por lo tanto la medición de la amplitud de un número significativo de potenciales sinápticos y su distribución deberá mostrar dicho cambio.

Después de cada experimento algunas neuronas fueron llenadas iontoforéticamente con biocitina utilizando el método descrito por Horikawa y Armstrong (1988). Las rebanadas conteniendo neuronas inyectadas fueron fijadas durante una noche en paraformaldehído 4%, ácido pícrico al 1% en amortiguador de fosfatos a pH 7.4. Las rebanadas fueron posteriormente infiltradas con sacarosa al 30 % y cortadas con un vibratomo a un grosor de 60 μ m. Las rebanadas fueron incubadas de 2 a 4 horas en una solución PBS conteniendo 0.2 % de triton-X-100, avidina y peroxidasa de rabano biotinilada (ABC-HRP, el equipo ABC de Vector) por 2 horas. Posteriormente reactivadas con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno para visualizar la HRP unida. Esto permitió la reconstrucción anatómica de las neuronas analizadas electrofisiológica e intracelularmente marcadas a través de microscopía óptica. Algunas neuronas fueron parcialmente reconstruidas utilizando el tubo para dibujo o cámara lúcida (instrumento adaptado al microscopio óptico).

Sustancias utilizadas:**4-aminopiridina (4-AP, SIGMA)****Tetrodotoxina (TTX, SIGMA)****Cloruro de Cadmio (CdCl₂, SIGMA)****Bicuculina (BIC, RBI)****6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, RBI)****Ácido D(-)-2-amino-fosfonoaléxico (APV, RBI)****Quinpirole (QUIN, RBI)****Sulpiride (SULP, RBI)****Mecamilamina (MEC, RBI)****ABC-KIT (Vector)**

Las drogas utilizadas fueron disueltas desde una solución madre en la solución salina de perfusión, a excepción del quinpirole y del sulpiride, que previamente se disolvieron en una solución 0.1 N de HCl.

RESULTADOS

Los resultados son presentados en cuatro secciones:

Las primeras dos secciones son presentadas con el propósito de identificar electrofisiológicamente que las neuronas estudiadas como neuronas espinosas medianas, de acuerdo con datos previamente publicados.

1a. sección. Reconstrucción representativa de las neuronas analizadas y visualizadas mediante la técnica de inyección iontoforética de biocitina durante el experimento.

2a. sección. Incluye la caracterización electrofisiológica de las neuronas espinosas medianas.

1.- Cuadro de resumen de las propiedades pasivas de las neuronas estudiadas.

Parámetros C_0 , C_1 , τ_0 , τ_1 , L y ρ .

2.- Registro y análisis de voltaje versus corriente.

3.- Registro y análisis de frecuencia versus corriente.

4.- Análisis de la curva de carga resultante de un pulso hiperpolarizante de baja intensidad.

5.- Efecto de la 4-AP sobre la resistencia de entrada de las neuronas espinosas medianas.

3a. sección. Incluye la caracterización de los potenciales sinápticos inducidos por la 4-aminopiridina. Estos resultados son presentados en el artículo publicado en la revista *Journal of Neurophysiology* de Noviembre de 1994, Vol. 72., No. 4., págs. 2246-2256.

4a. sección. Incluye el material de un artículo enviado a publicación. En este trabajo se presenta el efecto modulador de la dopamina a través de los receptores D_2 .

1a.- SECCIÓN

1.- Anatomía de las neuronas espinosas medianas.

De las 108 neuronas estudiadas 56 fueron llenadas con biocitina, reveladas mediante la técnica de diaminobezidina y posteriormente reconstruidas.

Las neuronas espinosas medianas se caracterizaron por presentar un soma pequeño de 18.5 ± 3.5 μm de diámetro mayor y 10.8 ± 1.9 de diámetro menor. Presenta de 3 a 15 troncos dendríticos. El axón se ramifica profusamente dentro del área dendrítica y dirigiendo una fibra finalmente hacia el globo pálido. Las dendritas presentan espinas dendríticas a partir de las ramas secundarias.

La figura 1 muestra la imagen reconstruida de 2 neuronas.

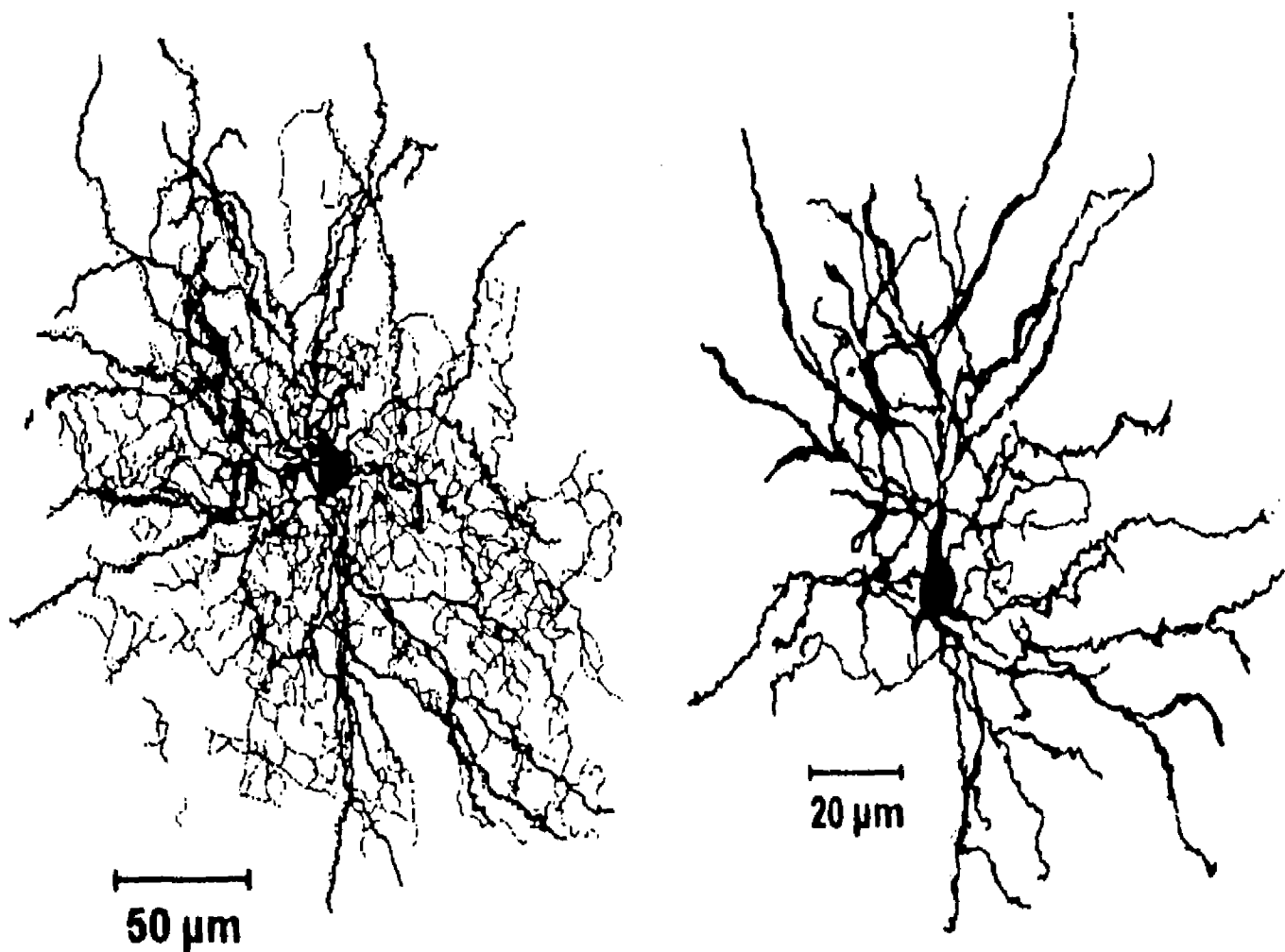


Figura 1. Muestra dos neuronas reconstruidas y analizadas electrofisiológicamente. Durante el experimento fueron llenadas con biocitina (1%) dentro del electrodo de registro y fueron reveladas con el método de diaminobencidina, en la neurona de la izquierda se muestran las colaterales axónicas.

2A.- SECCIÓN

2.- Propiedades pasivas de la neurona espinosa mediana.

Cuando se inyecta un pulso hiperpolarizante de baja intensidad se produce un cambio transitorio del voltaje de membrana. Este muestra las propiedades capacitivas o pasivas de la neurona estudiada y se conoce como curva de carga, la cual en el caso de las neuronas espinosas medianas estudiadas se ajusta a dos exponenciales. Tomando en consideración los parámetros obtenidos de la función de carga se calcularon los parámetros electrofisiológicos ρ y L , que son la relación de conductancia dendrítica/somática y la longitud electrofónica dada en constantes de espacio (λ), respectivamente. La tabla 1 presenta una muestra representativa de las propiedades pasivas de las neuronas analizadas.

Tabla 1. Propiedades pasivas representativas de las neuronas espinosas medianas. (media \pm desviación estándar, $n=16$). Pmr : Potencial de membrana en reposo. R_N : Resistencia de entrada. C₀ y C₁ , y Tau 0 y Tau 1 son parámetros y constantes de tiempo de la doble exponencial ajustados al transitorio de voltaje en la curva de carga. L : Longitud electrofónica (en constantes de espacio). ρ : relación de conductancia dendro-somática.							
Pmr (mV)	R_N (M Ω)	C₀ (mV)	C₁ (mV)	Tau 0 (ms)	Tau 1 (ms)	L	ρ
-83.6 \pm 1.0 (n=24)	41.8 \pm 14.0	1.5 \pm 0.6	0.7 \pm 0.4	16.4 \pm 9.1	4.6 \pm 3.2	1.3 \pm 0.4	1.3 \pm 0.6

La figura 2 muestra un análisis de la curva de carga de una neurona espinosa mediana.

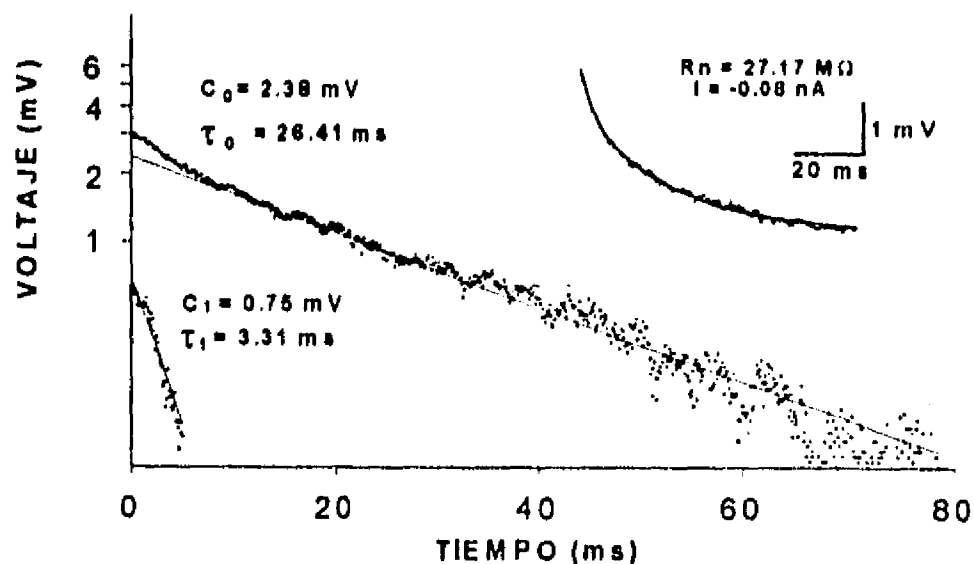


Figura 2. Extracción o "pelado" de exponenciales de la curva de carga en condición control. La figura principal muestra la graficación en logaritmo natural del voltaje versus el tiempo mostrando dos exponenciales y sus parámetros respectivos. En el inserto se muestra la curva de carga en voltaje contra tiempo.

3.- Función voltaje vs corriente.

Las neuronas espinosas medianas se caracterizan por presentar una rectificación entrante a todo lo largo de la función corriente-voltaje. Esta rectificación es denominada "anómala". En esta la resistencia incrementa con la despolarización de la membrana, mostrando una resistencia menor a potenciales hiperpolarizados y mayor a potenciales despolarizados. La resistencia puede medirse como la pendiente de la función corriente-voltaje (Jack et al, 1975) Contribuyendo a la rectificación anómala en los últimos 10 mV en la dirección despolarizante aparece una despolarización lenta sensible al voltaje que se observa como una rampa despolarizante en los registros de voltaje vs tiempo. En valores de hiperpolarización la rectificación anómala se opone a la hiperpolarización. La figura 3 muestra una curva de voltaje contra corriente representativa de las neuronas espinosas medianas.

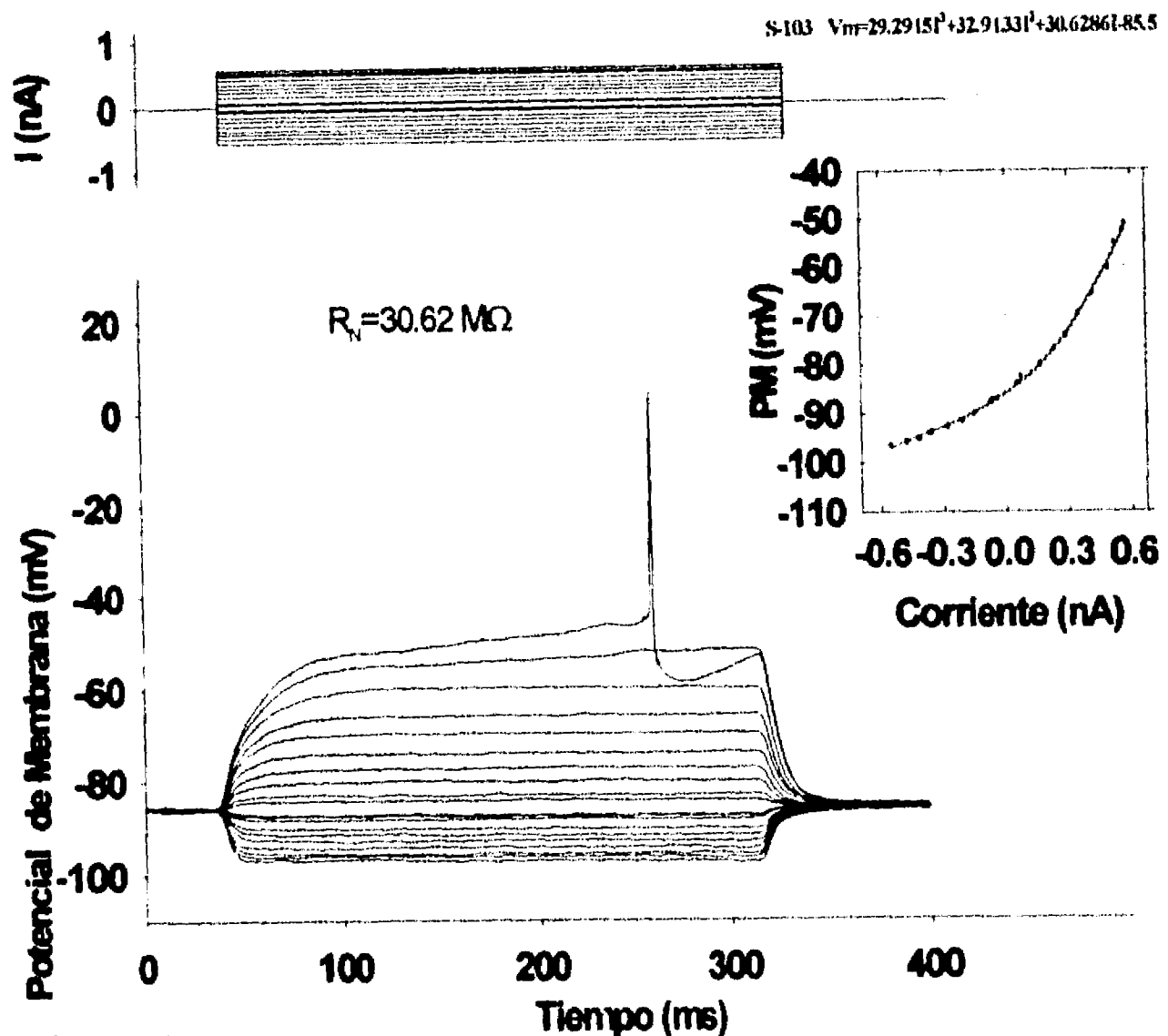


Figura 3. Función voltaje vs corriente característica de una neurona espinosa mediana. La gráfica superior muestra los pulsos rectangulares de corriente. La gráfica inferior muestra los transitorios de voltaje producidos por los pulsos de corriente. La gráfica de la derecha muestra la función voltaje contra corriente. Los valores de voltaje fueron tomados a los 300 ms y ajustados con un polinomio de tercer orden.

4.- Función Frecuencia vs. Corriente

Cuando se dan pulsos de corriente supraumbrales se producen disparos repetitivos con una frecuencia de potenciales de acción mayor al inicio de la aplicación de la corriente y que gradualmente disminuye (Fig. 4A). La figura 4B muestra la relación de intensidad de corriente contra frecuencia de disparo de potenciales de acción. Un promedio de los primeros 3 períodos muestra que la frecuencia incrementa casi linealmente con el aumento en la intensidad de corriente. Sin embargo, cuando se toma un promedio de los últimos 3 períodos estos muestran adaptación.

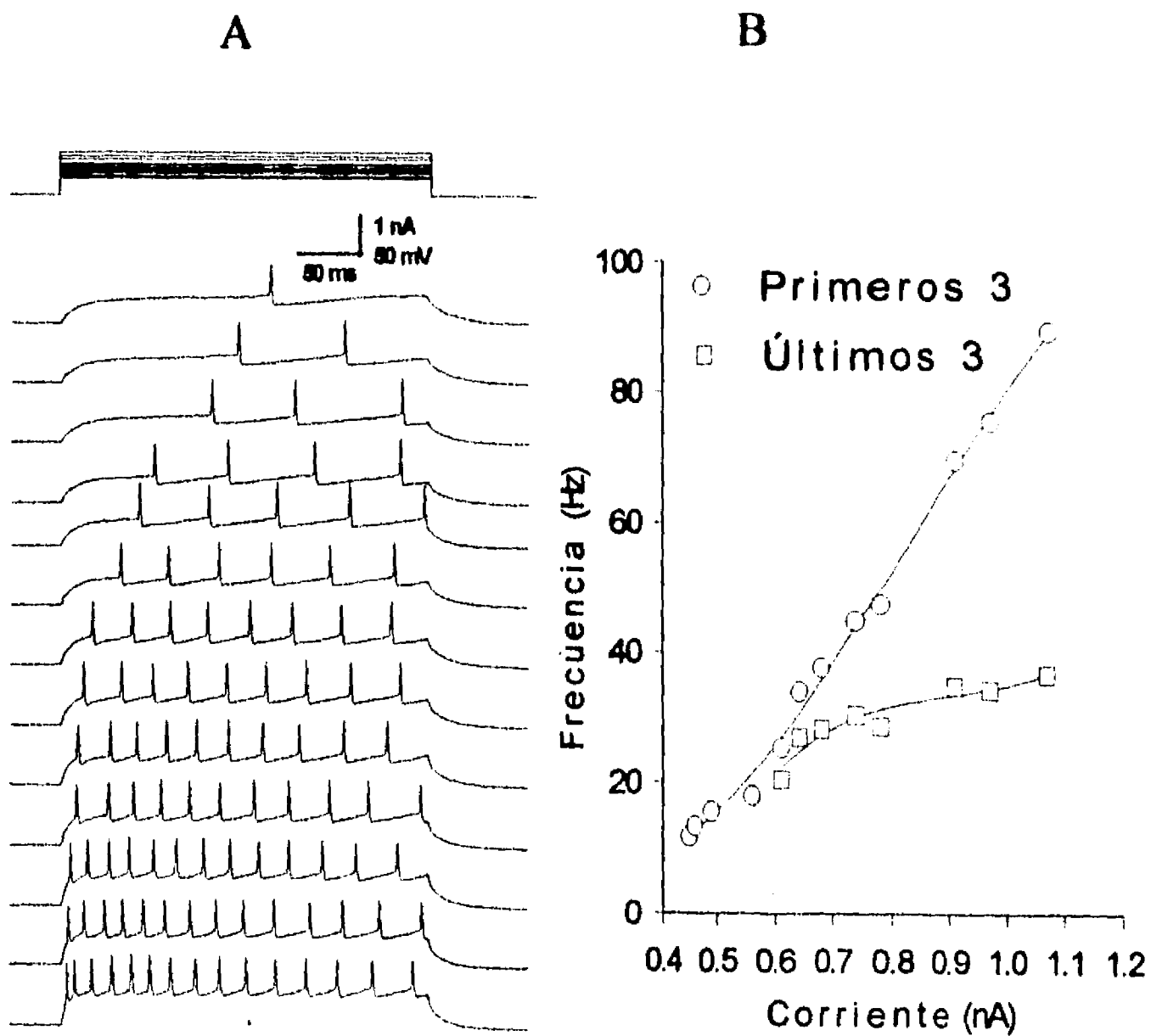


Figura 4. Relación frecuencia contra intensidad de corriente. A. Muestra los registros a diferentes intensidades de corriente aplicada. B. La relación frecuencia contra intensidad de corriente. En círculos se muestra el promedio de la frecuencia de los primeros tres intervalos; en cuadros se muestra la frecuencia de los últimos 3 intervalos.

5.- Efecto de la 4-AP sobre la resistencia de entrada de las neuronas espinosas medianas.

A dosis micromolares la 4-AP (50-100 μ M) produce una disminución no significativa en la resistencia de entrada (figura 5).

Tomando en cuenta que la 4-AP bloquea conductancias de potasio y dado que en el reposo existen conductancias de potasio activas, es de esperar que la 4-AP incremente la resistencia de entrada en las neuronas estudiadas. Sin embargo, en lugar de esto la 4-AP produce una caída en la resistencia de entrada (ver la tabla 2 y la figura 5). Este efecto en la resistencia de entrada se explica por la apertura de receptores canal activados una mayor liberación de neurotransmisores. Cuando se agrega bicuculina a la solución perfusión la resistencia de entrada tiende a incrementar por el bloqueo de las conductancias a cloro activadas por GABA. Cuando se agregaron los antagonistas glutamatérgicos CNQX y 2-APV se esperaba un incremento adicional en la resistencia de entrada, sin embargo, esto no se observó en las neuronas analizadas para este caso. Esto puede ser debido una baja frecuencia de actividad sináptica glutamatérgica.

Existen conductancias sensibles a dosis milimolares de la 4-AP que predominan a los ± 10 mV cerca del umbral de disparo del potencial de acción. Este efecto es a dosis superiores que las utilizadas este trabajo y actúan a potenciales mas despolarizados. Ver figura 5 A-H que se localiza en el artículo de Galarraga et al, 1994 anexo al final de esta tesis.

Tomando en cuenta que para probar un efecto modulador presináptico es necesario demostrar que no hay una disminución en la resistencia de entrada que pudiera disminuir la amplitud de los potenciales sinápticos, medimos la resistencia de entrada en presencia de 4-AP y bicuculina (BIC), en la presencia y ausencia del agonista dopaminérgico quinpirole (QUIN). En este caso se observó un incremento no significativo de la resistencia de entrada. Este efecto en lugar de producir una disminución en la amplitud de los potenciales produjo un incremento no significativo.

	CONTROL	4-AP	4-AP + BIC	4-AP + BIC + CNQX+2-APV	4-AP +BIC+QUIN
Media	42.0	32.5	41.9	33.7	43.1
Desv. Est.	13.7	7.2	11.6	14.2	13.8
n	34	8	6	2	4

Los resultados presentados en las primeras secciones muestran tanto anatómica como electrofisiológicamente que las neuronas estudiadas en esta tesis son espinosas medianas. Además, que la 4-AP a dosis micromolares, en incluso milimolares, no produce cambios significativos en la resistencia de entrada de las neuronas estudiadas dentro de los valores de potencial de membrana en los cuales se mantuvo.

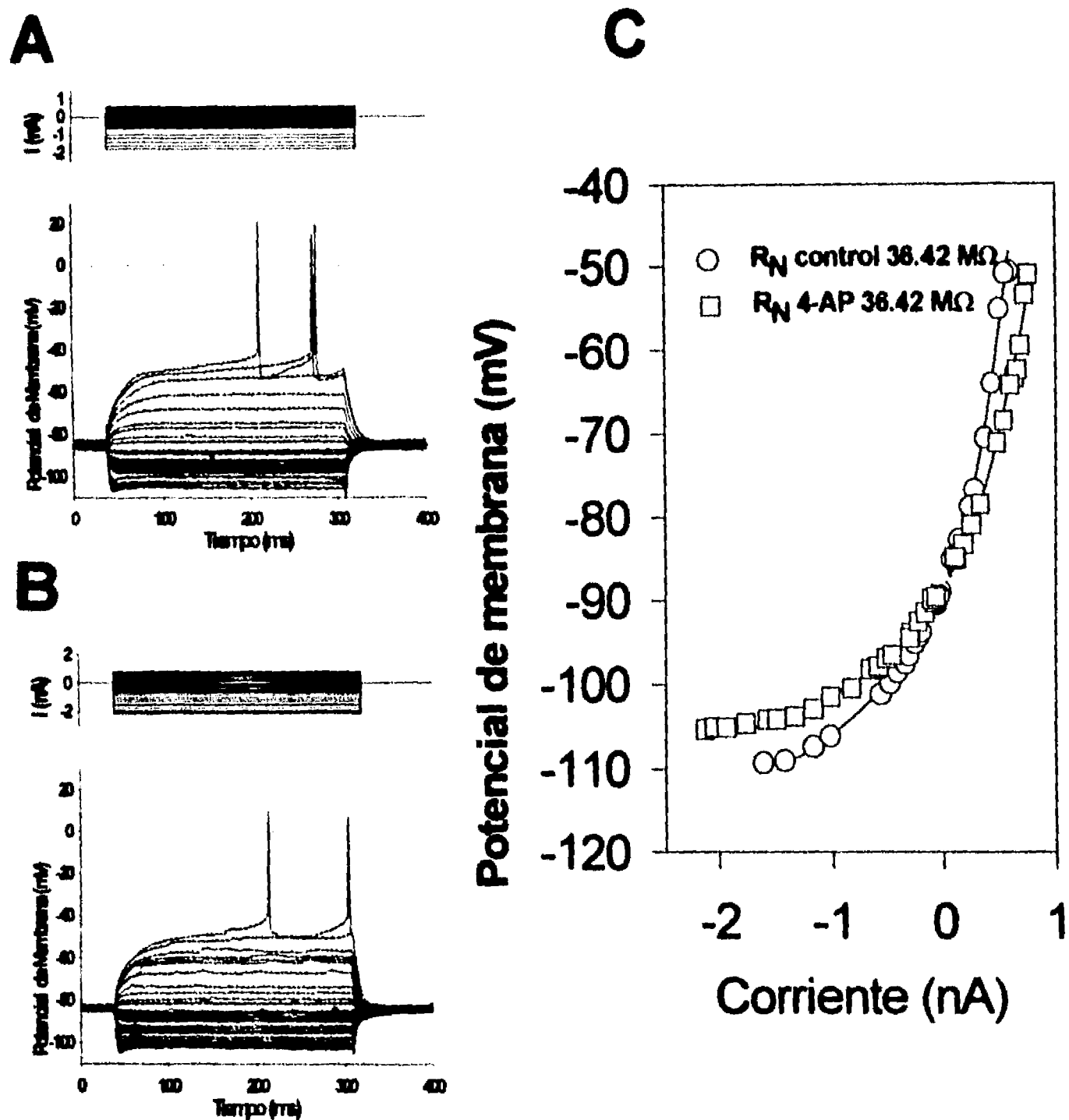


Figura 5. Efecto de la 4-AP sobre la resistencia de entrada. Registros de voltaje a diferentes corrientes de estimulación en condición control (A) y en presencia de 4-AP ($50 \mu\text{M}$) (B). C Función voltaje contra corriente, la resistencia de entrada fue tomada en el potencial de reposo mediante un ajuste polinomial (de 3er orden).

3A. SECCIÓN

"Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP"

Jorge Flores-Hernández, Elvira Galarraga, Juan C. Pineda and José Bargas.

**Journal of Neurophysiology
Vol. 72 No. 5 November 1994
2246-2256**

En este trabajo presentamos:

- 1.- La relación entre la concentración utilizada de 4-AP y el efecto en el incremento de actividad sináptica.
- 2.- La dependencia de sodio (potenciales de acción) y de calcio en el incremento de la transmisión sináptica producido por la 4-AP.
- 3.- La caracterización farmacológica de los potenciales sinápticos Glutamatérgicos y GABAérgicos inducidos por la 4-aminopiridina en las neuronas neostriatales de la rata.
- 4.- La actividad sináptica producida por una interneurona GABAérgica (marcada para parvalbúmina), cuya actividad de potenciales de acción en ráfagas se correlaciona con las ráfagas de potenciales sinápticos registrados en una población de neuronas espinosas medians registradas en presencia del bloqueo de la actividad glutamatérgica.

Patterns of Excitatory and Inhibitory Synaptic Transmission in the Rat Neostriatum as Revealed by 4-AP

JORGE FLORES-HERNÁNDEZ, ELVIRA GALARRAGA, JUAN C. PINEDA, AND JOSÉ BARGAS
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, DF

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. Synaptic potentials induced by 4-aminopyridine (4-AP) were recorded intracellularly from rat neostriatal neurons in an *in vitro* slice preparation. EC_{50} for this 4-AP action was $\sim 120 \mu\text{M}$. The threshold for activation of synaptic potentials was $5 \mu\text{M}$.

2. 4-AP-induced synaptic potentials appeared stochastically. Most were blocked by $1 \mu\text{M}$ tetrodotoxin or $400 \mu\text{M}$ Cd^{2+} . Therefore they reflect a release of neurotransmitters dependent on both Ca^{2+} entry to the terminals and action potential firing.

3. Bicuculline (BIC) ($\leq 10 \mu\text{M}$), a γ -aminobutyric acid-A (GABA_A) antagonist, blocked about half of the 4-AP-induced synaptic potentials. This suggests that intrinsic inhibitory connections within the neostriatum are activated by 4-AP administration.

4. 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; $\leq 10 \mu\text{M}$) plus D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV; $\leq 100 \mu\text{M}$) blocked most of the BIC-resistant 4-AP-induced synaptic potentials. This suggests that 4-AP induced release of glutamate (GLU) from extrinsic glutamatergic afferents. As most glutamatergic afferents are extrinsic, these afferents then would be able to fire spikes and release transmitter for several hours after they are cut from their somata.

5. If CNQX plus D-APV were administered before BIC, neostriatal neurons responded in different ways. In one half of the neurons, all induced synaptic potentials were blocked. This suggests that most GABA_A intrinsic connections between neostriatal neurons are activated indirectly by 4-AP. 4-AP would first activate extrinsic glutamatergic afferents and these in turn would activate GABA_A intrinsic neurons and connections.

6. In the remaining half of the recorded neurons, administration of CNQX plus D-APV blocked most, but not all of the 4-AP-induced synaptic potentials. The synaptic potentials that remained had a characteristic pattern: they were high amplitude, rhythmic, bursts of synaptic potentials. They were blocked by BIC ($5 \mu\text{M}$) but not by mecamylamine ($> 10 \mu\text{M}$). This suggests that these bursts of synaptic potentials were GABA_A ergic and generated by intrinsic neurons. Therefore these neurons would not innervate all neostriatal neurons equally but just a subset of them.

7. Records from an identified spiny neostriatal interneuron, obtained from the same preparation, are shown. This interneuron fired in bursts and is morphologically and physiologically similar to the recently described, fast spiking, parvalbumin immunoreactive, GABA_A ergic, spiny interneuron of the neostriatum. It then is concluded that this interneuron is functional in the slice preparation. Further, the hypothesis that it is the source of the synaptic potential trains is supported. In this case, 4-AP would be able to activate this interneuron, independently of extrinsic excitatory afferents.

8. In conclusion, 4-AP actions disclosed important aspects of the intrinsic circuitry of the mammalian neostriatum: first, not all neostriatal neurons might be innervated by intrinsic GABA_A ergic interneurons. Second, GABA connections between most neostriatal neurons need extrinsic excitatory inputs to be active.

INTRODUCTION

Excitatory glutamatergic synaptic transmission within the neostriatum mainly comes from the cerebral cortex and thalamus. Although there is some evidence of intrinsic glutamatergic interneurons, they would generate a minority of the glutamatergic inputs on spiny cells (Mori et al. 1994). On the other hand, important extrinsic GABA_A ergic inputs are absent in the neostriatum (see Albin et al. 1990; Gerfen 1992; Wilson 1990 for recent reviews). Projection neurons within the neostriatum constitute $\sim 95\%$ of all the neurons in the nucleus (Chang et al. 1982; Wilson 1990). These neurons are "spiny" and GABA_A ergic. They send their axons to the substantia nigra and pallidum (Gerfen 1992; Graybiel 1990; Kawaguchi et al. 1990). At the same time, they form inhibitory reciprocal synapses with each other (Groves 1983; Wilson 1990) through local axon collaterals. Therefore projection neurons are the main source of intrinsic GABA_A ergic connections within the neostriatum. Additionally, one of the "spiny" types of interneuron (1–3% of the population) has been demonstrated to be GABA_A ergic and parvalbumin immunoreactive. This neuron innervates the nucleus irregularly (Kita et al. 1990). Therefore in the neostriatum, GABA_A ergic synapses are mainly intrinsic, whereas glutamatergic synapses are mainly extrinsic.

Intracellular recordings *in vivo* have demonstrated that spiny projection neurons fire infrequently and have a rather negative resting potential (Hull et al. 1970; Wilson 1992; Wilson and Groves 1981). Periods of membrane hyperpolarization and electrical silence are interrupted briefly by periods of sustained depolarization driven by cortical inputs (Wilson 1992). Apparently, neostriatal projection neurons do not fire until a cortex command arrives (Fulton 1949). When they fire, their inhibitory intrinsic and reciprocal network controls the propagation of excitation (Groves 1983). One prediction from this arrangement is that reciprocal inhibition would not be active unless an extrinsic excitatory input activates some spiny neurons. This prediction is supported by the present experiments.

In nuclei with reciprocal connections between glutamatergic principal neurons, as the hippocampus and cortex, spontaneous synaptic events can be recorded in the slice preparation during physiological saline ($[\text{K}^+]_o \approx 3 \text{ mM}$; $[\text{Ca}^{2+}]_o \leq 2.5 \text{ mM}$; $30\text{--}35^\circ\text{C}$) (e.g., Aram et al. 1991; McBain and Dingledine 1992; Ropert et al. 1990). In contrast, spontaneous synaptic potentials are scarce in the neostriatum under the same conditions (Cepeda et al. 1989; Galarraga et al. 1987; Nisenbaum et al. 1994). However, 4-aminopyridine (4-AP) induces an increase in the frequency of synaptic potentials in several cerebral regions in-

cluding the neostriatum (Kita et al. 1985a; Müller and Misgeld 1990; Perreault and Avoli 1989; Segal 1987). Stochastic synaptic potentials induced by 4-AP in the neostriatum have not been characterized as those in other nuclei. In particular, 4-AP appears to activate specific interneurons in other nuclei (Aram et al. 1991; Müller and Misgeld 1991; Otis and Mody 1992; Segal 1987). In this work, an initial characterization of synaptic potential induction by 4-AP in the neostriatum is reported. The interpretation of the results indicate that 4-AP acts on cut extrinsic excitatory afferents or neurons to produce glutamate release. This is followed by activation of reciprocal inhibition. Additionally, 4-AP activates a particular class of neostriatal interneuron. These observations help to understand the role of some components of the neostriatal circuitry. Some of these results have been communicated in abstract form (Flores-Hernández et al. 1993).

METHODS

Our protocol follows The American Physiological Society policy regarding the use and care of animals and has been described in previous work (e.g., Vargas et al. 1988). Adult (>2 mo) male or female albino Wistar rats were anesthetized and decapitated. Sagittal neostriatal slices (400 μ m), completely separated from cortex and other nuclei, were recorded totally submerged at 32–34°C. Bathing solution was (in mM): 125 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25 NaHCO₃, and 11 glucose. The solution was saturated with 95% O₂-5% CO₂ (300 mOsm/L, pH 7.4, 30–34°C). Intracellular recordings were carried out with micropipettes filled with either biocytin (Sigma, 1–2%) in 2 M K-acetate or just with K-acetate 3M. Electrodes DC resistances ranged from 80 to 120 M Ω . Intracellular recordings were made with a high-input impedance electrometer with an active bridge circuit using standard techniques. After recording the resting membrane potential and input resistance (approximately less than –75 mV and 50 M Ω , respectively) (Vargas et al. 1988; Galarraga et al. 1989), ≥ 10 min of continuous recording without any manipulation were done as a control. Afterward 4-AP and different drugs were administered with the superfusion. Exchange within the recording chamber was complete in ~ 2 min. Both frequency of synaptic potentials and input resistance were monitored. In some cells, micromolar 4-AP induced a small (2–5 mV) depolarization (Nisenbaum et al. 1994). It was corrected with DC current so that resting membrane potential (RMP) was maintained during the duration of the experiment. Thus synaptic potentials' frequency and amplitude as well as cell input resistance all were recorded at the same membrane potential. Sampled cells are those in which no changes in resting input resistance were detected during experiments using micromolar concentrations of 4-AP. As no stimulus was delivered, synaptic potentials appeared stochastically both before and during 4-AP. In this sense, synaptic potentials were "spontaneous" (spontaneous synaptic potentials or SSPs). 4-AP induction of SSPs could be seen as a great increase in the probability of recording these events. Records were digitized, stored on tape, and analyzed off-line with a digital oscilloscope and a PC-computer. Records were plotted using a digital printer. Frequency of SSPs (SSPs/s) was counted in 4-s bins. Three bins were picked by chance at each minute of recording to make frequency versus time plots.

After recording, some neurons were injected with biocytin using the method described by Horikawa and Armstrong (1988). Slices containing injected neurons were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, 1% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The slices then were infiltrated with 30% sucrose and cut on a

vibratome into 60- μ m sections. The sections were incubated for 2–4 h in a phosphate buffer (PBS) solution containing 0.2 Triton-X-100, avidin, and biotinylated horseradish peroxidase (ABC-HRP; Vector's ABC kit) for 2 h and then reacted with diaminobenzidine and hydrogen peroxide (H₂O₂) to visualize the bound HRP. This enabled resolution of the intracellularly labeled processes through transillumination microscopy (Fig. 3).

In the case of the recorded interneuron (see RESULTS), a combination of intracellular labeling and somatostatin (SOM) immunocytochemistry was used. The slice containing the injected neuron was incubated, infiltrated, and cut as stipulated above. However, during incubation in Triton-X-100, avidin conjugated to Texas Red was used (12.5 μ g/ml, Vector). After washing, the sections were treated for 30 min in normal goat antiserum (1:30) before being incubated in the primary antibody for 24 h at 4°C (antiserum against SOM at 1:600 dilution in PBS containing 1% normal goat serum, Immunoclear). For fluorescence immunocytochemistry, the sections were treated with goat-antirabbit immunoglobulin-G coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC; antibody incorporated, 1:50 for 2 h). Even though the recorded interneuron was negative (not double-labeled), SOM-immunoreactive neurons could be detected in the same sections (not shown). To enable the visualization of the somatostatin negative neuron with transillumination microscopy, the tissue was treated with the ABC-HRP kit (Vector) as stated above (Fig. 11).

Tetrodotoxin (TTX), 4-AP, CdCl₂ (all from Sigma) bicuculline (BIC), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), and D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-APV, all from RBI) were dissolved from stock solutions into the superfusion saline.

RESULTS

4-AP-induced synaptic potentials are TTX and Cd²⁺ sensitive

Eighty-seven neostriatal neurons from caudate-putamen slices of 74 different adult rats were recorded for these experiments. As shown in the sample records of Fig. 1A (Control), very few SSPs were seen at resting potential (less than –75 mV) (Cepeda et al. 1989; Galarraga et al. 1987; Nisenbaum et al. 1994). RMP was -83.6 ± 1.0 mV (mean \pm SE, $n = 24$) in our recording conditions. However, frequency of SSPs increased during superfusion with 100 μ M 4-AP (Fig. 1A; 15 and 60 min) (Kita et al. 1985a; Nisenbaum et al. 1994). The graph in Fig. 1B illustrates the time course of 4-AP action. Maximum SSP frequency for this concentration of 4-AP was attained in ~ 10 min. Sample records during 4-AP show that SSP frequency is very variable from trace to trace exhibiting a stochastic nature. However, the mean frequency is clearly augmented by 4-AP as shown in the graph. The 4-AP effects at micromolar concentrations can be maintained for >1 h ($n = 54$). However, note that mean frequency declined with time (Fig. 1B).

Induction of SSPs by 4-AP was concentration dependent. A concentration-response plot for 4-AP action is shown in Fig. 2. Several slices were used for this plot. One cell was recorded in each slice. The concentration for 50% maximal effect was ~ 120 μ M. Accordingly, concentrations between 50 and 100 μ M were used in most experiments (Figs. 1 and 4–8). Concentrations around 1 mM 4-AP increased the frequency of SSPs by ~ 150 times with respect to control (Fig. 2). This was about the saturating concentration. Higher concentrations were characterized by shorter times of 4-AP action and regular oscillations of SSP frequency

FALLA DE ORIGEN

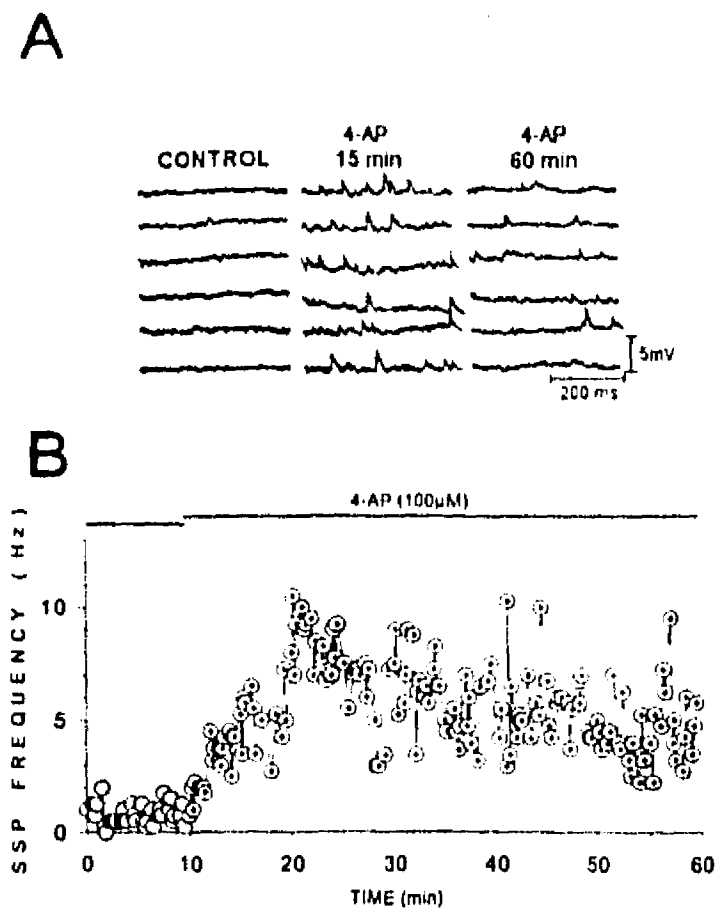


FIG. 1. 4-aminopyridine (4-AP) induces an increase in the frequency of spontaneous synaptic potentials (SSPs) recorded in neostriatal neurons. *A*: sample records of membrane potential vs. time before (Control) and during 100 μ M 4-AP (15 and 60 min). Note increase in SSPs during 4-AP. *B*: SSPs frequency vs. time plot illustrating the time course of 4-AP action. Note that SSPs frequency remained increased for >1 h. Mean resting membrane potential (RMP) during this experiment was -80 mV. Same figure design and same 4-AP concentration was used in experiments illustrated in Figs. 4–7.

(not analyzed here). They also had other effects in the recorded neurons such as changes in input resistance (Bargas et al. 1989; Kita et al. 1985a; Nisenbaum et al. 1994) and induction of spontaneous firing (Kita et al. 1985a). This work, however, is limited to describe 4-AP action at submillimolar concentrations, i.e., increases in SSP frequency with no noticeable changes in resting input resistance on the postsynaptic neuron. However, changes in orthodromic and direct responses also could be present at these concentrations of 4-AP. They are not analyzed in this work. And as long as the recorded neuron is held at its original RMP, and is not stimulated, the recorded synaptic events are not affected by these other changes. In a sample ($n = 4$) of cells recorded in the presence of 100 μ M 4-AP and not held at the original RMP, the 4-AP-induced depolarization plus the synaptic-induced depolarization were not enough to reach firing threshold. However, two of the recorded neurons ($n = 87$) had spontaneous firing in the presence of 4-AP (50 and 100 μ M). The firing of these neurons was irregular. Also, identified spiny neurons with RMPs more positive than -75 mV might fire in the presence of 4-AP, but these were not included in our sample of recorded neurons.

Except for the reported aspiny neuron (see below), all recorded and biocytin-filled neurons of this sample were typical medium spiny projection neurons (Fig. 3). These neurons are normally silent unless they are stimulated. During long rectangular pulses they fire tonically and do not fire in bursts (e.g., Galarraga et al. 1989; Nisenbaum et al. 1994; Pineda et al. 1992). The 4-AP-induced SSPs recorded on these neurons were almost abolished by 1 μ M TTX (Fig. 4; $n = 4$). Mean SSPs frequencies were 0.16 ± 0.05 Hz for the control and 3.8 ± 1.1 Hz during 4-AP. During TTX + 4-AP, mean frequency was 0.08 ± 0.04 Hz. RMP was held near to the original resting potential during the experiments. Mean RMP was -79.3 ± 3 mV for these experiments. SSPs remaining after TTX may represent quantal release of transmitter, as these events are between 0.5 and 2 mV in amplitude (Redman 1990).

The 4-AP-induced SSPs on projection neurons also were abolished by 400 μ M Cd^{2+} (Fig. 5; $n = 2$). Mean SSPs frequencies were 0.24 ± 0.06 Hz for the control, 3.1 ± 0.9 Hz during 4-AP, and 0.19 ± 0.04 Hz during 4-AP + Cd^{2+} . RMP was held near to the mean RMP, which was -75 ± 2.1 mV for these experiments. A conclusion from these observations is that most SSPs recorded in these conditions reflect a release of neurotransmitter that is Ca^{2+} dependent and TTX sensitive, e.g., generated by the firing of action potentials in either the terminals and/or the releasing neurons or afferents. This is in agreement with studies of 4-AP in other brain areas (Dolezal and Wecker 1991; Heemskerk et al. 1991; Müller and Misgeld 1990; Perreault and Avoli 1989; Segal 1987; Vizi et al. 1977).

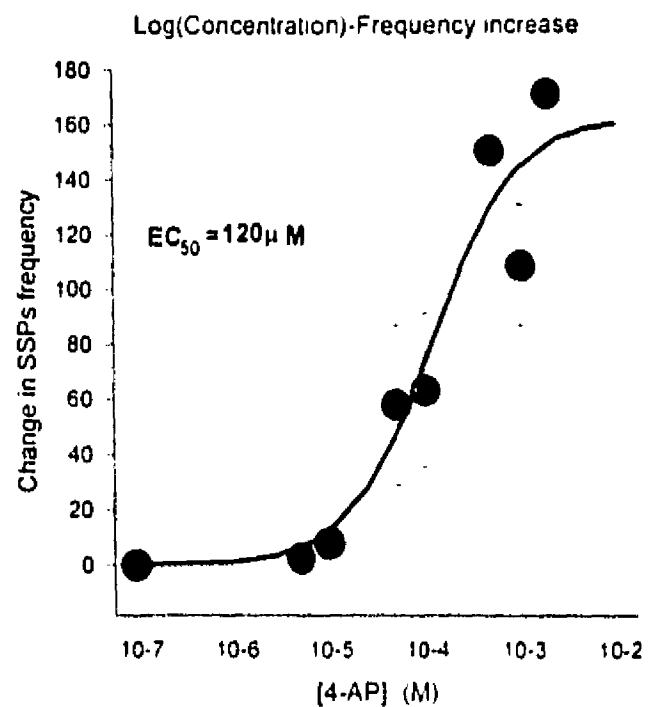


FIG. 2. Concentration-response function for 4-AP action. Continuous line is a fit for: $C = (C_{\text{MAX}} \cdot [I]) / (EC_{50} + [I])$ where: C is the number of times the SSPs frequency increased with respect to control as a function of 4-AP concentration; C_{MAX} is the maximum change in SSPs frequency; $[I]$ is the drug concentration and EC_{50} is the concentration for 50% maximal effect. Number of slices and cells used for each concentration were: $n = 50$ for control; $n = 3$ for 5 μ M; $n = 4$ for 10 μ M; $n = 14$ for 50 μ M; $n = 13$ for 100 μ M; $n = 1$ for 500 μ M; $n = 2$ for 1 mM and $n = 1$ for 2 mM. Bars are mean \pm SD.

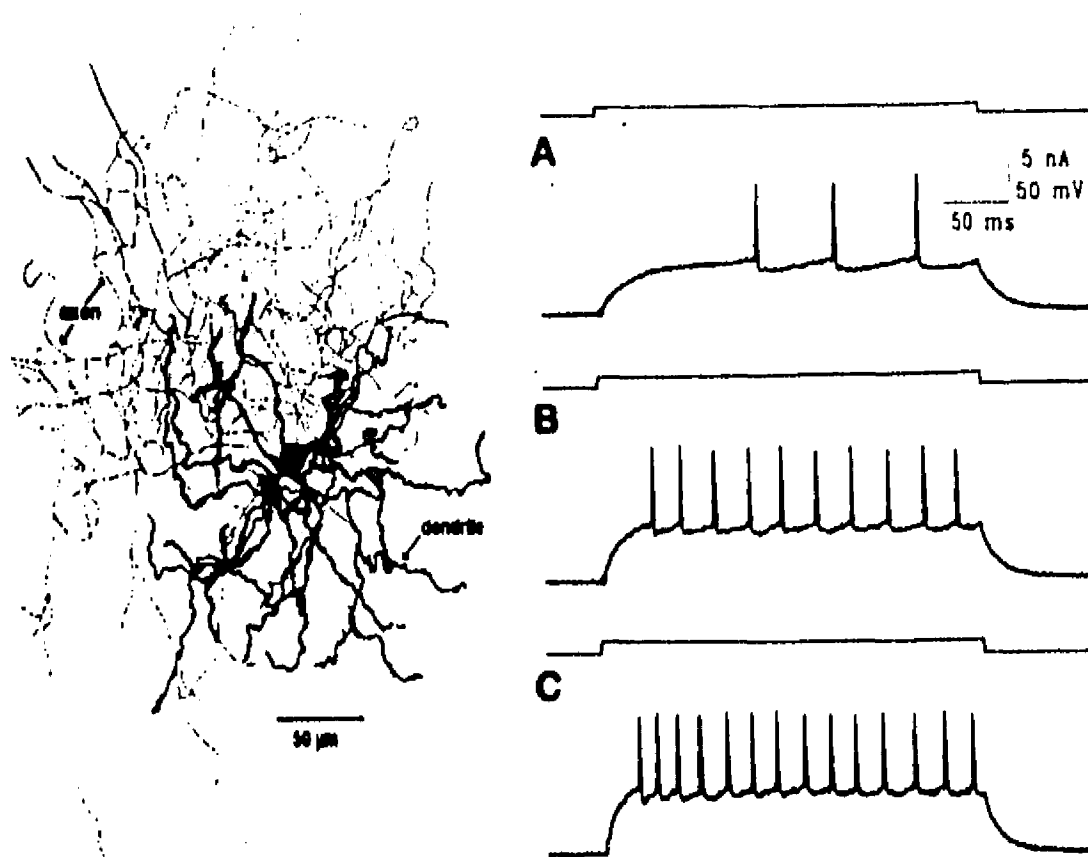


FIG. 3. Morphology and physiology of a spiny projection neuron of the neostriatum. *Left*: partial reconstruction shows a medium-sized soma, spiny secondary, and tertiary dendrites, and an axon that goes away from the soma and its own dendritic arbor, possessing abundant axon collaterals. *Right*: firing of the projection neuron as the strength of stimulus is increased from A to C. Note that frequency is maintained during the duration of the stimulus. resting membrane potential (RMP) = -86 mV. Current on top and voltage on bottom of each frame. Action potentials truncated by the digitizing procedure.

4-AP-induced synaptic potentials are mediated by γ -aminobutyrate and glutamate

To know the chemical nature of the 4-AP-induced SSPs, known antagonists for fast ligand-gated excitatory and inhibitory synaptic receptors were added to the superfusion. First, Fig. 6 shows one experiment illustrating the blocking action of $4 \mu\text{M}$ BIC (see METHODS), a γ -aminobutyric acid (GABA) antagonist of the type "A" family of receptors (GABA_A antagonist). In a series of such experiments, mean SSPs frequency induced by $50 \mu\text{M}$ 4-AP decreased by: $47 \pm 5.1\%$ ($n = 6$; range: 28–56%), and mean SSPs frequency induced by $100 \mu\text{M}$ 4-AP decreased by: $49.3 \pm 17.6\%$ ($n = 3$; range: 24–74%). Mean RMP was -83.7 ± 1.1 mV during these experiments. This frequency reduction of the 4-AP-induced SSPs by BIC, was interpreted as if about one half of the SSPs were mediated by GABA.

GABA-mediated synapses within the neostriatum are intrinsic either from a type of interneuron (Kita et al. 1990) or from connections between projection spiny neurons themselves (Groves 1983; Wilson 1990). As previously reported (Kita et al. 1985a; Nisenbaum et al. 1994), the BIC-sensitive synaptic potentials were depolarizing (Figs. 1 and 4–8). The reason for this is that the reversal potential for the GABAergic synaptic potentials is more positive than the RMP in these cells (e.g., Jiang and North 1991; Kita et

al. 1985b; Misgeld and Dietzel 1989; Seabrook et al. 1991). 4-AP-induced GABAergic SSPs are also positive in other brain neurons (e.g., Aram et al. 1991).

On the other hand, experiments as shown in Fig. 6 also established that most of the BIC-resistant SSPs could be blocked by a combination of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists, i.e., the known glutamate (GLU) antagonists. In fact, CNQX (5 – $10 \mu\text{M}$) plus D-APV (30 – $100 \mu\text{M}$, see METHODS) blocked a remaining $55 \pm 2.1\%$ of the 4-AP-induced SSPs in five quantified experiments. Another conclusion is that another main component of the synaptic activity induced by 4-AP is GLU-mediated (Cherubini et al. 1988). Thus the transmitters GABA and GLU each contribute to about half of the total synaptic activity in these conditions (cf. in Seabrook et al. 1991). Most GLU-mediated synaptic transmission within the neostriatum is extrinsic and most comes from the cerebral cortex (Gerfen 1992; Mori et al. 1994; Wilson 1990). These experiments then show that some GLU extrinsic afferents, cut from their somata, are able to release transmitter dependent on Na^+ and Ca^{2+} entry (Figs. 4 and 5). In fact, they were able to do so in all cases, for ≥ 1 h during micromolar concentrations of 4-AP ($n = 87$). Some evidence for the presence of a glutamatergic interneuron have been recently reported (Mori et al. 1994). As we have not

FALLA DE ORIGEN

analyzed glutamatergic spontaneous events separately, we do not know how much of the recorded glutamatergic activity comes from the putative interneurons. In some cases, remaining SSPs after both GLU and GABA blockers were fewer than those in the control conditions, i.e., before 4-AP. In some other cases, however, SSPs frequency remained above the control frequency during both blockers. In 16 experiments using saturating concentrations of blockers in the presence of 4-AP (10 μ M CNQX, 100 μ M D-APV, and 5 μ M BIC), SSPs frequency remained at $6 \pm 3.5\%$ above the control frequency, i.e., above the value before 4-AP was introduced. Thus other fast ligand-gated synaptic responses cannot be discarded. However, they are negligible in most cases.

Figure 7 shows one experiment that illustrates what happened when the order of antagonism was reversed. That is, when CNQX and D-APV were given before BIC. Most of the 4-AP-induced SSPs were blocked in all cells tested ($n = 24$). In about one half of the recorded neurons (11/24), no synaptic activity remained. Thus antagonism of extrinsic excitatory inputs blocked both GLU- and GABA-mediated synaptic transmission in all neurons. This is interpreted as reflecting the known fact that activation of excitatory inputs is necessary to activate the projection neurons (Wilson 1992). Most of the 4-AP-induced GABA-mediated transmission would depend upon reciprocal connections be-

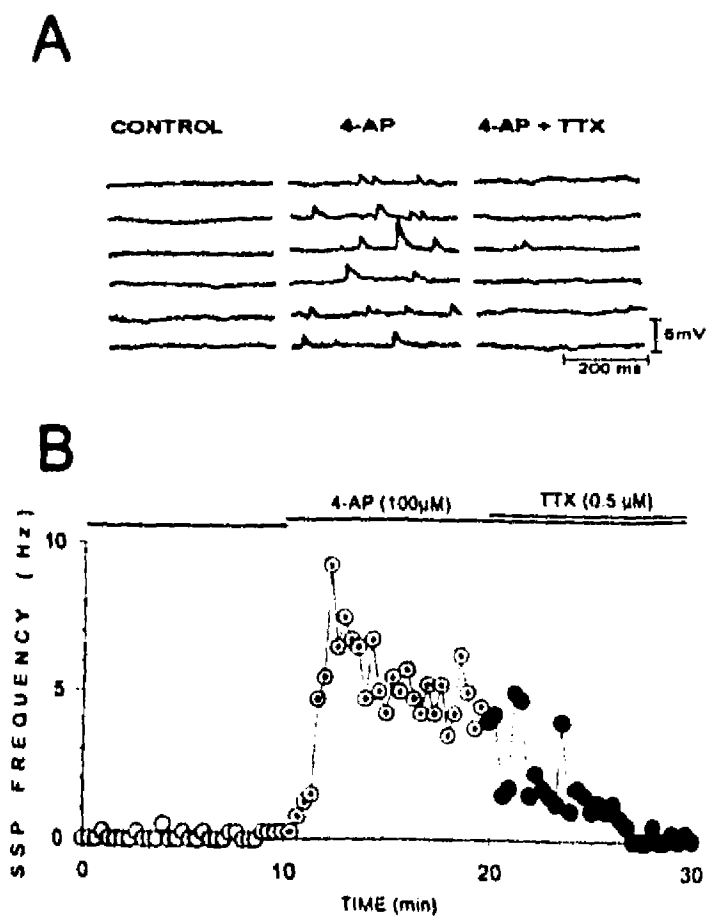


FIG. 4. Tetrodotoxin (TTX) blocked most SSPs induced by 4-AP. *A*: sample records of membrane potential before (Control), during 100 μ M 4-AP (4-AP), and during 4-AP plus 1 μ M TTX (4-AP and TTX). *B*: time course of 4-AP action showing the blockade of 4-AP-induced SSPs by TTX. RMP = -80 mV.

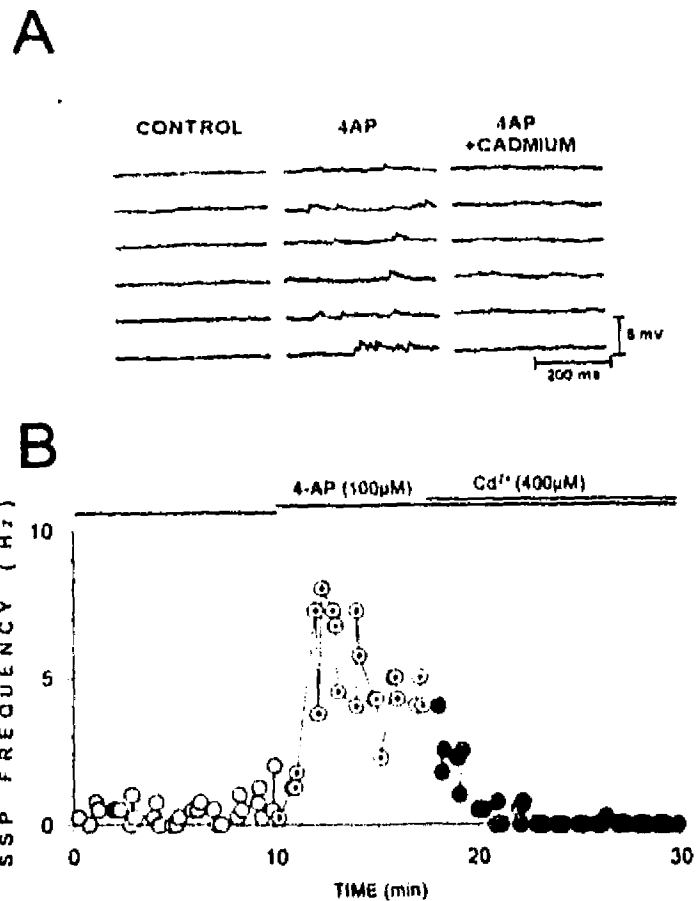


FIG. 5. Most SSPs induced by 4-AP vanish during Cd²⁺ administration. *A*: sample records of membrane potential before (Control), during 4-AP (4-AP), and during 400 μ M Cd²⁺ plus 4-AP (4-AP + Cadmium). *B*: time course of 4-AP action and Cd²⁺ blockade of 4-AP-induced SSPs. RMP = -72 mV.

tween projection neurons. In fact, they compose the great majority of neurons within the nucleus ($\sim 95\%$), and all recordings of 4-AP-induced SSPs in this work were obtained from these neurons (Fig. 3). The mean RMP for these series of experiments was -84.6 ± 1.0 mV.

Nevertheless, Fig. 8 shows that in about one half of the neurons (13/24), some synaptic activity remained after CNQX plus APV. This synaptic activity was apparent after most other synaptic activity was blocked. It was distinguished by characteristic trains of synaptic potentials. These trains suddenly arised after several milliseconds of electrical silence (Fig. 8*A*). They could be seen as peaks arising from an almost 0 baseline, as in Fig. 8*B*, during GLU-antagonists superfusion. Many of these synaptic potentials trains were of high amplitude as shown in Fig. 9, at different sweep speeds. In Fig. 9*A*, at a slow sweep speed, the events are seen as regularly spaced peaks. In Fig. 9*B*, a faster sweep speed shows a more detailed account of the events. Note that one to three peaks were present in each event. In some experiments, trains of up to five to six synaptic potentials were seen.

Continuous chart record on Fig. 10 shows the blockade of these events by BIC (5 μ M). Note a gradual decay in amplitude without an apparent decay in frequency, implying a postsynaptic effect ($n = 4$). A nicotinic antagonist, mecamylamine (≤ 20 μ M), did not block these events ($n =$

2). Therefore it is likely that the neuron that generates such events is a GABAergic neuron.

As no GABAergic afferents are described as important to the neostriatum (Albin et al. 1990; Gerfen 1992; Wilson 1990), the source of these SSPs trains would be an intrinsic neuron (see DISCUSSION).

An aspiny GABAergic interneuron that is parvalbumin immunoreactive has been described in the neostriatum (Kita et al. 1990). We may have recorded from one of these neurons as shown in Fig. 11. Partial reconstruction after recording shows a medium sized aspiny cell with profuse locally arborizing axon collaterals (Fig. 11, left; cf. Fig. 3). Its response during rectangular current pulses was in bursts (Fig. 11, right; cf. Fig. 3). Burst frequency depended on the degree of depolarization and not appeared to be caused by low-threshold spikes, as it is the case with another type of striatal interneuron (Kawaguchi 1993). Passive parameters for the putative interneuron were input resistance, 78 M Ω ; membrane time constant, 9.8 ms; electrotonic length (L), 1.1; and RMP, -79 mV. Using the whole cell technique in younger animals, Kawaguchi (1993) has recorded from some interneurons morphologically and physiologically

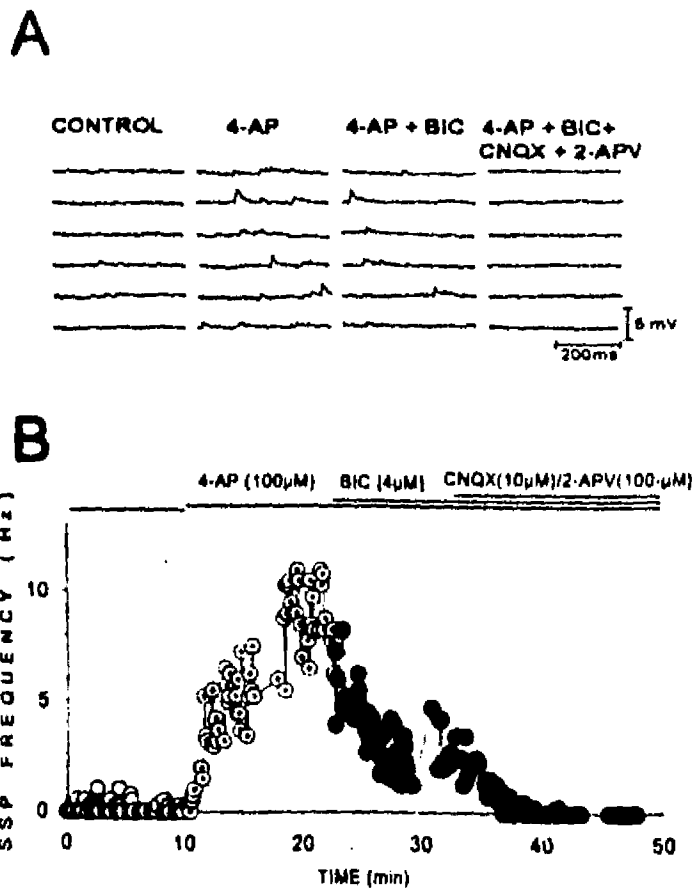


FIG. 6. Action of γ -aminobutyric (GABA) and glutamate antagonists. *A*: sample records of membrane potential before (Control), during 4-AP (4-AP), during 4 μ M bicuculline plus 4-AP (4-AP + BIC), and during 10 μ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), 100 μ M D-2-amino-3-phosphonopivalic acid (D-APV) plus 4-AP and BIC (4-AP + CNQX + D-APV + BIC). Same drug concentrations are used in other illustrated experiments. *B*: time course of blocking actions. Addition of the GABA_A antagonist, BIC, blocks about one half of the 4-AP-induced SSPs. Posterior addition of glutamate antagonists blocks the remaining SSPs. Note that, in this case, almost no synaptic potentials are left after saturating concentrations of antagonists. RMP = -80 mV.

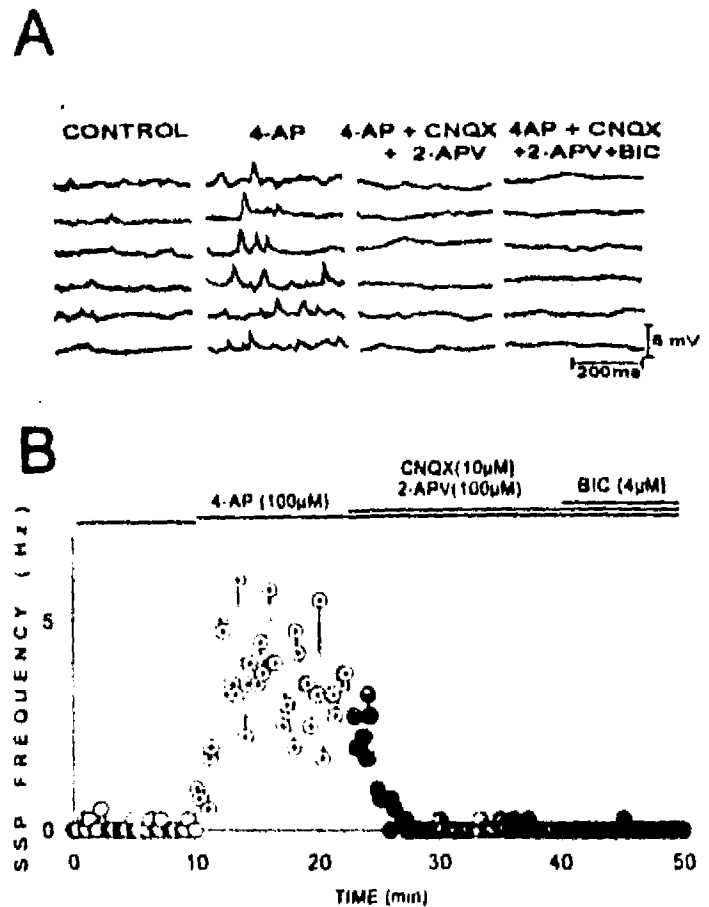


FIG. 7. Addition of glutamate antagonists before the GABA antagonists virtually blocks all SSPs. *A*: sample records of membrane potential before (Control), during 4-AP, and during CNQX plus APV plus 4-AP. Posterior addition of bicuculline had no effect. *B*: time course of blocking actions. RMP = -83 mV.

similar to this one. They were GABAergic and parvalbumin immunoreactive. In our case, immunoreaction against somatostatin was negative (see METHODS). Thus we think that this interneuron is a good candidate for generating the bursts of GABAergic SSPs depicted in Figs. 8-10 (see DISCUSSION). The present records show that these interneurons are viable in the adult slice preparation. However, the probability to record one of these neurons using sharp electrodes and blind recordings is too low. They constitute ~1-3% of the neuronal population (Kita et al. 1990).

If the projection neurons were not likely to be the origin of the GABAergic synaptic bursts, it would be reasonable to hypothesize that 4-AP may activate the GABAergic bursting interneuron directly.

DISCUSSION

4-AP induces an increase in the frequency of nonstimulated synaptic events (i.e., spontaneous) in several cerebral nuclei including the neostriatum (Kita et al. 1985a; Müller and Misgeld 1990, 1991; Nisenbaum et al. 1994; Perreault and Avoli 1989, 1992; Segal 1987). In this work, we present a concentration-response plot of this phenomenon. This work also confirmed that 4-AP-induced neurotransmitter release is a TTX-sensitive and Ca²⁺-dependent process (Dolezal and Wecker 1991; Heemskerk et al. 1991; Müller and Misgeld 1990; Perreault and Avoli 1989; Segal 1987;

FALLA DE ORIGEN

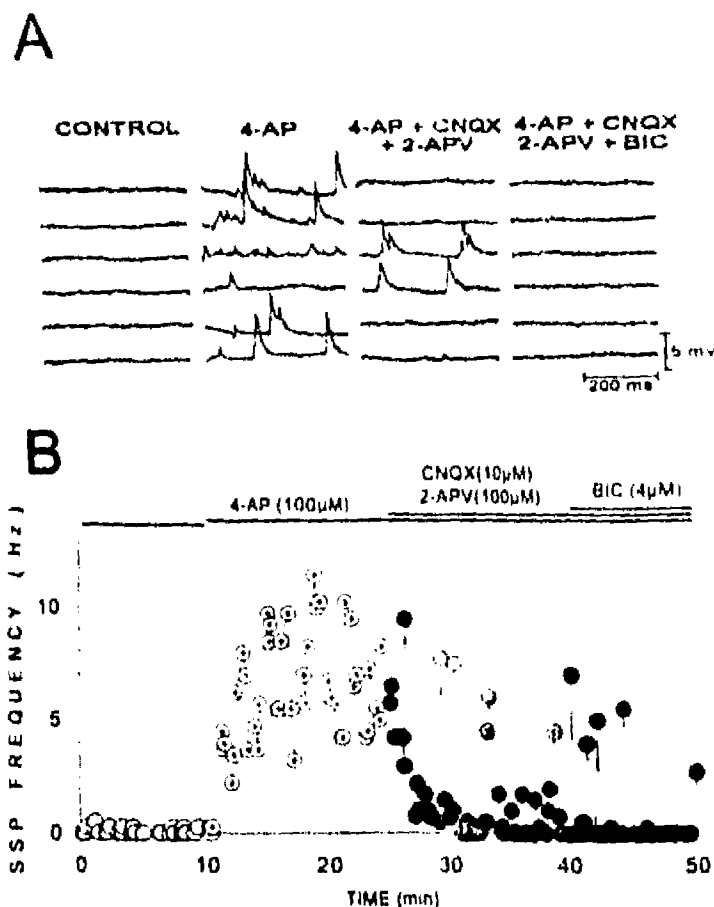


FIG. 8. Addition of glutamate antagonists before the GABA antagonists discloses repetitive trains of SSPs in about one half of the neurons. *A*: SSPs before (Control), during 4-AP, during CNQX plus APV plus 4-AP, and during addition of BIC in the continuous presence of the other drugs. *B*: time course of blocking actions. In contrast to cell in Fig. 5, some synaptic activity remained during glutamate antagonists: high-amplitude, high-frequency trains of SSPs were recorded in some traces. RMP = -83 mV.

Vizi et al. 1977). With the help of specific antagonists, the transmitter release was shown to be mediated by glutamatergic and GABAergic terminals. Reports of either intrinsic glutamatergic neurons or extrinsic GABAergic inputs are scarce (e.g., Mori et al. 1994). In any case, the output of a glutamatergic interneuron, for example, would not explain most of the glutamatergic activity present during 4-AP (see Mori et al. 1994). Different components of the glutamatergic activity were not evident by just looking at the records, and most glutamatergic activity was discrete and of low amplitude. Therefore the most parsimonious interpretation of the present observations is that most glutamatergic synaptic activity was originated from terminals of extrinsic afferents and most GABAergic activity was originated from terminals of the intrinsic circuitry. It has been demonstrated that 4-AP directly activates special classes of GABAergic interneurons in the hippocampal formation (Müller and Misgeld 1991; Perreault and Avoli 1992; Segal 1987). The present observations also give evidence that support that this also may be the case in the neostriatum. The involved interneuron might selectively innervate some, but not all, spiny projection neurons (Kita et al. 1990). Last, the present experiments correlate with pre-

vious *in vivo* work in that most activity of GABAergic projection neurons needs an extrinsic excitatory drive to be functional (e.g., Wilson 1992).

4-AP action

It has been argued that 4-AP facilitates transmitter release by blocking potassium conductances at or near the nerve terminals. This would increase action potential duration and calcium entry (see Thesleff 1980 for a review). Nonetheless, very few potassium conductances are blocked totally by micromolar 4-AP. One of them is a slowly inactivating potassium conductance, which has been found in both pyramidal and neostriatal neurons (Nisenbaum et al. 1994; Storm 1988; Surmeier et al. 1991). Therefore as our data shows that synaptic potentials induced by 4-AP were Ca^{2+} dependent, TTX sensitive (Figs. 4 and 5), and with a close-response relationship in the micromolar range (Fig. 2), there is no reason to suppose other release mechanism than the one stated by Thesleff (1980). Perhaps, the slowly inactivating potassium current is the conductance involved.

Synaptic potentials on neostriatal neurons

Most fast excitatory and inhibitory ligand-gated synapses in the mammalian brain are GABA- and GLU-mediated (Zimmermann 1993). In nucleus like the hippocampus and cortex, both GABA- and GLU-mediated synapses may come from intrinsic connections within the nucleus (Shepherd 1990). However, in the caudate-putamen, most GABAergic synapses are intrinsic, whereas glutamatergic synapses are mostly extrinsic (Wilson 1990). In making an isolated neostriatal slice, excitatory afferents are cut during the process. A question arises about the viability of the transected afferents. Field stimulation studies have reported GLU-mediated orthodromic responses (e.g., Lovinger et al. 1993) with GABA-mediated responses intermingled with them (Jiang and North 1991; Kita et al. 1985b; Seabrook et al. 1991). However, in previous studies, the contribution from cut cortical afferents is not clear because the corticostriatal pathway was maintained purposefully. In the present experiments, the corticostriatal pathway was purposefully cut. The results show that, in spite of cutting all striatal relations with other nuclei (see METHODS), GLU-mediated activity compose about half of the 4-AP-induced SSPs (Fig. 6). Most of this activity, as most GABAergic activity, was of low amplitude and stochastic. Thus a number of transected excitatory afferents appear to remain viable for hours. Evidently, they are able to have sodium mediated currents and release glutamate in an stochastic and Ca^{2+} -dependent manner under the action of 4-AP (Figs. 4 and 5). Another finding was that, in our recording conditions, the main transmitter released directly by 4-AP was glutamate.

Note that the EC_{50} reported for 4-AP action (120 μ M; Fig. 2) is an overestimation. This is so because 4-AP action was quantified globally; without separating the components of the synaptic activity. Also, distinct types of 4-AP-sensitive channels, in different classes of neuron, may be present (Bargas et al. 1989; Nisenbaum et al. 1994; Surmeier et al. 1991). Different sensitivity for 4-AP action among the

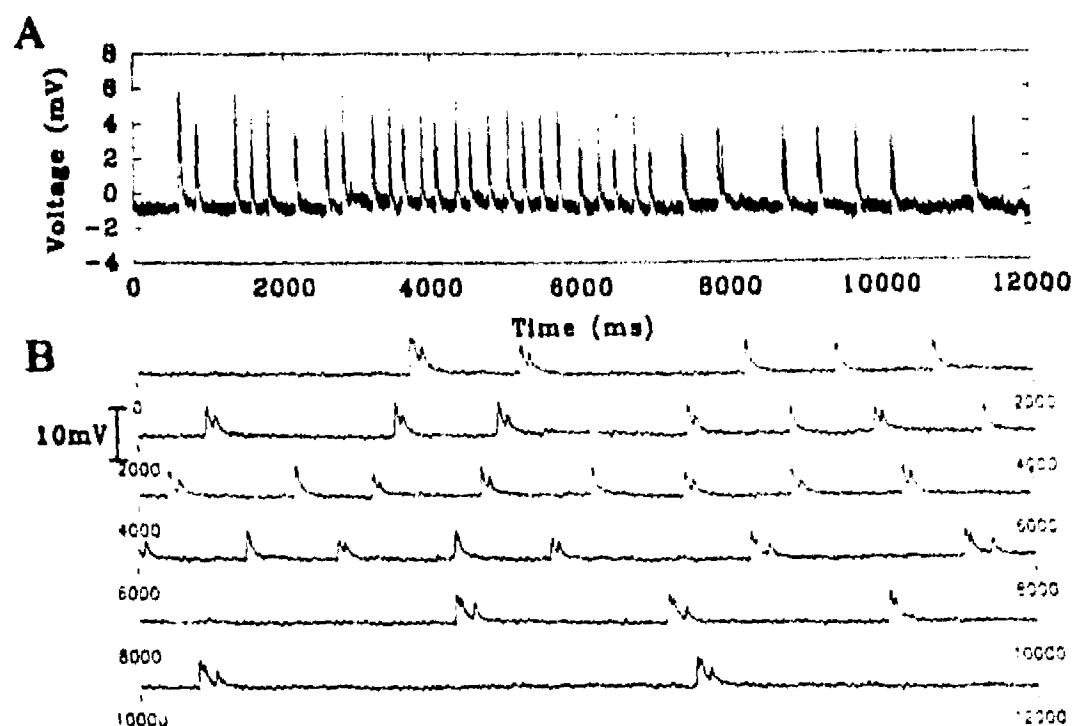


FIG. 9. Sample records of SSPs trains. *A*: chart record of synaptic trains. Note large amplitude and rhythmic firing. *B*: same SSPs trains at higher sweep speed. Note, 1-3 synaptic potentials per event. Records in the presence of 4-AP, CNQX, and APV. RMP = -85 mV.

same type of neurons because of different RMP or different proportion of sensitive channels cannot be discarded (Surrmeier et al. 1991). Thus experiments to quantify EC_{50} for 4-AP actions in the separate components of the release are needed (see RESULTS). In order to have TTX-sensitive GABAergic inputs in the recorded neuron, some spiny neurons have to fire (see below) because of the combined action of both 4-AP and released glutamate. It is hard to calculate how many spiny neurons make synapse on a neighboring cell. Some of them should depolarize enough after micromolar 4-AP to produce synaptic potentials in the recorded neuron. However, there might not be many at micromolar 4-AP. On the one hand, because it was not frequent to have spontaneous firing in the recorded neurons (see RESULTS). On the other hand, because synaptic potentials appeared

separate, easy to count, and both their frequency and amplitude were not very high. According to voltage measures of quantal events (Redman 1990), they may come from a few number of boutons. Nevertheless, statistical analysis of these events, under different conditions and 4-AP concentrations, is needed to find out the actual mechanism of 4-AP-induced release.

Components of 4-AP-induced release

The present experiments show that most 4-AP-induced synaptic activity, GABA and GLU mediated, was blocked by GLU antagonists (CNQX and D-APV) in all tested neurons (Fig. 7). Thus most of the 4-AP-induced GABAergic synaptic activity needed a glutamatergic activation to be present. This is interpreted as an *in vitro* correlation of some *in vivo* experiments. Recordings *in vivo* have demonstrated that most neurons in the neostriatum, i.e., spiny projection neurons, are usually silent and have a rather negative resting potential. They synapse with each other due to reciprocal connections. They do not fire until a cortex command arrives (Fulton 1949; Wilson 1992). Suppressing the excitatory drive would suppress the activity from these GABAergic projection neurons, which correspond to ~95% of all the intrinsic neurons. Hence, the most parsimonious interpretation for the blockade of most GABAergic synaptic activity in the present conditions is that it comes from the spiny projection neurons.

Nevertheless, in one half of the recorded neurons a GABAergic input remained active during CNQX and D-APV (Figs. 8-10). It had particular characteristics. It consisted of high-amplitude bursts of synaptic potentials (Fig. 9). Bursts of up to five to six synaptic potentials could be seen

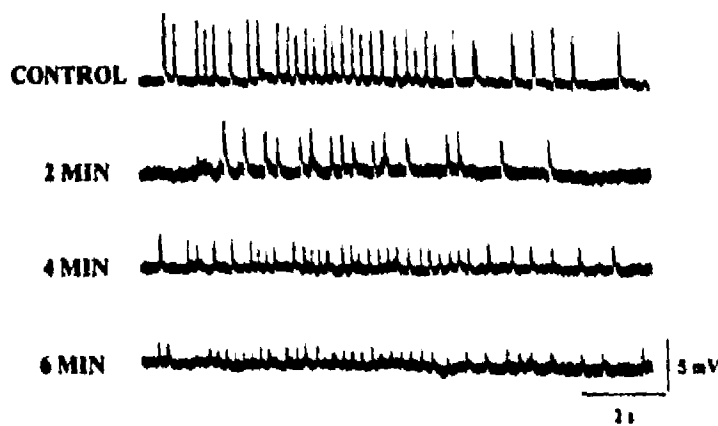


FIG. 10. Sequential blockade of SSPs trains by BIC. Note that number and rhythmicity of trains is not altered after BIC introduction, however, the amplitude decreases as a function of time. Records done in the presence of 4-AP, CNQX, and APV. BIC was introduced between first and second traces. RMP = -83 mV.

FALLA DE ORIGEN

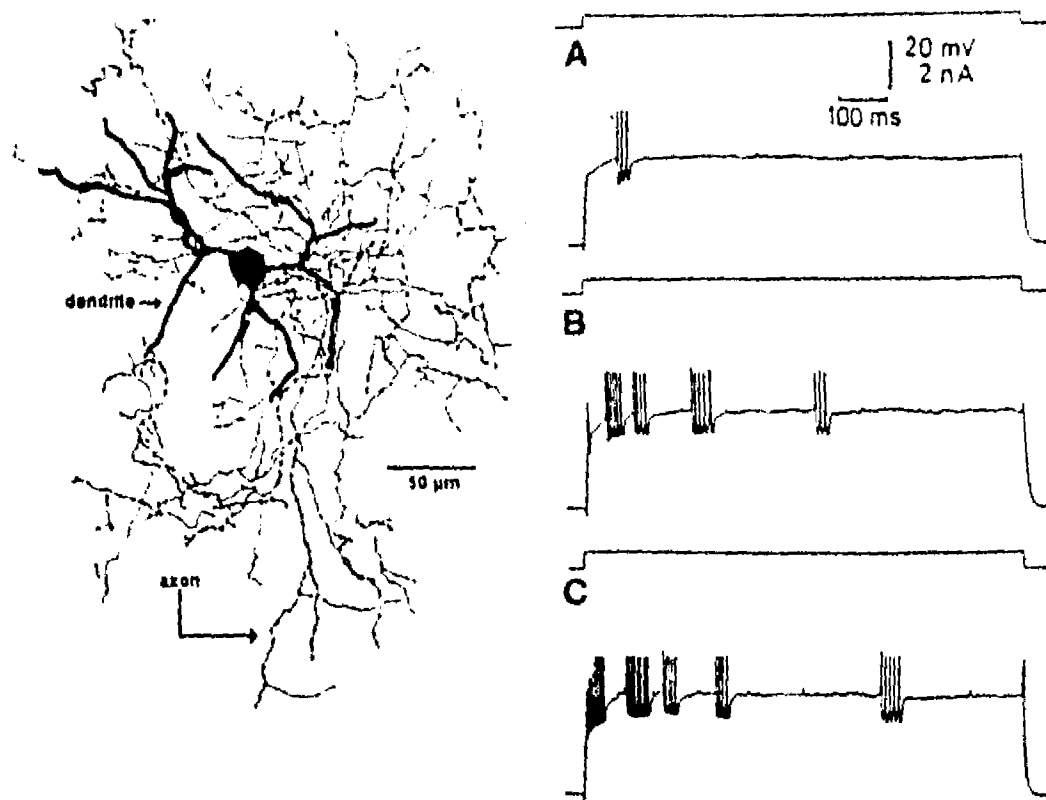


FIG. 11. Morphology and physiology of an aspiny bursting interneuron. *Left*: partial reconstruction of the aspiny interneuron. Note that axon collaterals spread locally. *Right*: firing of the interneuron as the strength of stimulus is increased from A to C. Current on top, voltage on bottom in each frame. Action potentials truncated by the digitizing procedure. RMP = -79 mV.

in some cases. They arised rhythmically, interspersed with periods of almost null synaptic activity. Thus a query about the source of these synaptic bursts arises. There are two reported intrinsic GABAergic neurons in the neostriatum: the spiny projection neuron and the aspiny interneuron (Kita et al. 1990; Wilson 1990). The most abundant GABAergic neuron in the neostriatum is the spiny projection neuron. However, projection neurons do not fire unless stimulated and excitatory inputs were being blocked in the present conditions: spontaneous firing was never recorded in spiny projection neurons when using micromolar 4-AP concentrations and CNQX and D-APV. In fact, 4-AP-induced depolarization was ~ 5 mV in spiny cells (Nisenbaum et al. 1994); most GABAergic synaptic potentials ($\sim 50\%$ of all the synaptic activity) were blocked after CNQX and D-APV and this correlates with the fact that projection neurons are the most abundant (see above); and the present results are similar to those in the hippocampal formation and the neocortex in which GLU-antagonists block most 4-AP-induced excitatory and inhibitory synapses but spare synaptic potentials coming from some classes of GABAergic interneurons (Aram et al. 1991; Müller and Misgeld 1991; Otis and Mody 1992; Perreault and Avoli 1992). Taken together, these observations make unlikely that the source of the synaptic bursts were the spiny projection neurons. On the other hand, a question arises about the possibility of interneurons being the source of the synaptic bursts.

Figure 11 shows the morphology and firing pattern of one aspiny interneuron. These records show that interneu-

rons are viable in the adult slice preparation. It is for probability reasons (they are 1–3% of the population) (Kita et al. 1990) that more records of them are not available (e.g., Mori et al. 1994). It is hard to record from them using sharp electrodes and blind approximations into the slice ($P < 0.05$). However, several arguments make interneurons good candidates to be the source of the synaptic bursts recorded after CNQX and APV. 1) Recordings very similar to the ones shown in Fig. 11 have been shown by Kawaguchi (1993) using the "thin slice" technique in young animals. His "fast-spiking" interneurons correspond closely to the one it is reported here. Those cells were parvalbumin and glutamic acid decarboxylase (GAD) immunoreactive. That is, they were GABAergic interneurons. Important to emphasize here is that these interneurons may fire in rhythmic bursts separated by silent periods. Thus they can be the source of the synaptic bursts presented here. 2) Morphologically, the interneuron depicted in Fig. 11 had aspiny dendrites and abundant locally distributed axon collaterals like those immunoreactive for GAD (see Kawaguchi 1993; Kita et al. 1990). In the present case, a test for somatostatin immunoreactivity (the other type of medium sized aspiny interneuron in the neostriatum) was negative (see METHODS). 3) These interneurons (1–3% of the population) do not innervate all spiny neurons (95% of the population) equally (Kita et al. 1990). This correlates with the fact that only half of the recorded spiny neurons exhibited synaptic bursts. 4) Boutons from interneurons tend to be seen on the soma and proximal dendrites of some spiny projection neurons (Kita et al. 1990). That is, electrotonically near the

recording site. This correlates with the high amplitudes of synaptic potentials within the synaptic bursts.

Therefore by taking these observations together, it is reasonable to hypothesize that the bursts of GABAergic synaptic potentials recorded on spiny neurons come from this type of aspiny bursting interneuron. However, a test of the direct action of 4-AP on aspiny GABAergic interneurons, in the presence of CNQX and D-APV, was not possible in the present experiments. Interestingly, however, the putative glutamatergic interneuron of the neostriatum, i.e., the somatostatin-immunoreactive neuron according to Mori et al. (1994), also would fire in bursts (Kawaguchi 1993), and its input on spiny cells also would be of high amplitude and made of multiple synaptic events.

An alternative explanation for the present data is that several interneurons fire almost synchronously on the same spiny neuron (e.g., Aram et al. 1991). This is unlikely given the difference in the number of neurons belonging to each neuronal population (see above). Still another explanation would be that some spiny neurons fire synchronously on the recorded spiny neuron. The reason for not favoring this hypothesis is that spontaneous firing with low micromolar concentrations of 4-AP and saturating concentrations of CNQX and D-APV, was never seen on our sample of spiny neurons ($n = 24$) even when the holding current was suppressed (see METHODS). However, it may be that under different conditions (higher $[K^+]_o$) this could be possible. Another explanation is that some spiny neurons fire in bursts under the action of micromolar 4-AP. We never recorded from such hypothetical spiny neurons. However, if this were the case, a stereotyped synaptic activity would not be expected (i.e., high-amplitude rhythmic bursts separated by periods of silence). All other GABAergic activity blocked in the present experiments (most probably coming from spiny neurons activated by glutamatergic synapses, see above) did not conform to this stereotype. However, firing activity from the aspiny GABAergic interneuron does match what is expected to produce the synaptic bursts. Finally, 4-AP activates GABAergic interneurons in other brain structures (e.g., Segal 1987). It is not known if, in these other nuclei (Aram et al. 1991; Müller and Misgeld 1991; Otis and Mody 1992; Perreault and Avoli 1992), interneurons activated by 4-AP are parvalbumin immunoreactive and functionally similar to the one presented here. If that were the case, it would appear that a similar type of feed-forward (Kita et al. 1990) interneuron might be a requirement for the functioning of several brain microcircuits or nets. This appears to be the case with recurrent interneurons (Shepherd 1990).

Note that the present results show that micromolar 4-AP rarely depolarized the recorded spiny cells positive enough to induce spontaneous firing (Nisenbaum et al. 1994). The depolarization was even less if CNQX and D-APV were applied. However, the interpretation of the results based on previous antecedents strongly suggests that most GABAergic inputs into these neurons come from other spiny cells (see above). Therefore to have TTX-sensitive GABAergic activity, we have to postulate that 4-AP depolarization plus the depolarization induced by the glutamatergic synaptic activity were necessary to reach firing threshold in some cells. Neither stimulus alone was able to reach threshold.

Alternatively, 4-AP may be acting on axon collaterals or terminals of the spiny neurons and these would have glutamate receptors.

Relation with previous findings

To explain pathological findings in humans, as well as motor and behavioral findings in lesioned animals, functional models of the basal ganglia have come to require different subsets of spiny projection neurons (e.g., Albin et al. 1990). Differences in peptide content (e.g., Izzo et al. 1987; Reiner and Anderson 1990), in axonal arborizations and projections (e.g., Gerfen 1992; Kawaguchi et al. 1990), in receptors content and proportion of ion conductances (Gerfen 1992; Surmeier et al. 1993), and in temporal patterns of orthodromic stimulation have been found (Nisenbaum and Berger 1992). In this respect, this work gives the first physiological evidence about a differential innervation by GABAergic interneurons. It correlates with previous anatomic evidence (Kita et al. 1990). More experimental work is needed to correlate this with the other findings.

By the temporal pattern of orthodromic activation during paired-pulse stimulation, neostriatal neurons have been divided in two types (Nisenbaum et al. 1992). Only one of them would exhibit short-term inhibition by a second stimulus. The possibility that the GABAergic interneuron is a feed-forward interneuron (Kita et al. 1990) may explain this electrophysiological behavior: only those neurons innervated by the GABAergic interneuron would present short term inhibition after cortical stimulation.

On the other hand, long-term synaptic depression only can be achieved in some cases (e.g., Lovinger et al. 1993). Perhaps innervation from GABAergic interneurons confers the ability to develop this form of plasticity. GLU-mediated synapses have different capabilities to develop long-term potentiation (Zalutsky and Nicoll 1990). Thus it may be that GABA-mediated synapses also are equipped differentially to develop long-term depression.

We thank D. Tapia for skillful technical assistance with anatomic reconstructions and histology.

The research was financed partially by DGAPA-UNAM and CONA-CyT (México).

Address reprint requests to J. Bargas.

Received 10 March 1994; accepted in final form 20 July 1994.

REFERENCES

- ALBIN, R. L., YOUNG, A. B., AND PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12: 366-375, 1990.
- ARAM, J. A., MICHELSON, H. B., AND WONG, R. K. S. Synchronized GABAergic IPSPs recorded in the neocortex after blockade of synaptic transmission mediated by excitatory aminoacids. *J. Neurophysiol.* 65: 1034-1041, 1991.
- BARGAS, J., GALARRAGA, E., AND ACEVES, J. Electrotonic properties of neostriatal neurons are modulated by extracellular potassium. *Exp. Brain Res.* 72: 390-398, 1988.
- BARGAS, J., GALARRAGA, E., AND ACEVES, J. An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp. Brain Res.* 75: 146-156, 1989.
- CEPEDA, C., WALSH, J. P., HULL, C. D., HOWARD, S. G., BUCHWALD, N. A., AND LEVINE, M. S. Dye-coupling in the neostriatum of the rat. I. Modulation by dopamine-depleting lesions. *Synapse* 4: 229-237, 1989.
- CHANG, H. T., WILSON, C. J., AND KIFAL, S. T. A Golgi study of rat neostriatal neurons: light microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 208: 107-126, 1982.

FALLA DE ORIGEN

- CHERUBINI, E., HERRLING, P. L., LANFUMEY, J., AND STANZIONE, P. Excitatory amino acids in synaptic excitation of rat striatal neurones in vitro. *J. Physiol. Lond.* 400: 677-690, 1988.
- DOLEZAL, V. AND WEIKER, J. Modulation of acetylcholine release from rat striatal slices: interaction between 4-aminopyridine and atropine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 762-766, 1991.
- FLORES-HERNÁNDEZ, J., GALARRAGA, E., PINEDA, J. C., AND BARGAS, J. Spontaneous synaptic potentials induced by 4-aminopyridine in neostriatal neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 977, 1993.
- FULTON, J. F. *Physiology of The Nervous System* (3rd ed.). New York: Oxford University Press, 1949, p. 491. Cited by J. Divac, R. Gunilla, and E. Oberg. In: *The Neostriatum*. Oxford: Pergamon Press, 1979, p. 217.
- GALARRAGA, E., BARGAS, J., MARTÍNEZ-FONG, D., AND ACEVES, J. Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neurosci. Lett.* 81: 351-355, 1987.
- GALARRAGA, E., BARGAS, J., SIERRA, A., AND ACEVES, J. The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp. Brain Res.* 75: 157-168, 1989.
- GERFEN, C. R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 15: 133-139, 1992.
- GRAYBIEL, A. M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 13: 244-254, 1990.
- GROVES, P. M. A theory of the functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movement. *Brain Res. Rev.* 5: 109-132, 1983.
- HEEMSKERK, F. M. J., SCIRAMA, L. H., GHIJSEN, W. E. J. M., DE GRAAN, P. N. E., LOPES DA SILVA, F. H., AND GISPEN, W. H. Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free Ca^{2+} concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J. Neurochem.* 56: 1827-1835, 1991.
- HORIKAWA, A. AND ARMSTRONG, W. E. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci. Methods* 25: 1-11, 1988.
- HULL, C. D., BERNARDI, G., AND BUCHWALD, N. A. Intracellular responses of caudate neurons to brain stem stimulation. *Brain Res.* 22: 163-179, 1970.
- IZZO, P. N., GRAYBIEL, A. M., AND BOLAM, J. P. Characterization of substance P- and [met]enkephalin-immunoreactive neurons in the caudate nucleus of the cat and ferret by a single section Golgi procedure. *Neuroscience* 20: 557-587, 1987.
- JIANG, Z.-G. AND NORTH, R. A. Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *J. Physiol. Lond.* 443: 533-553, 1991.
- KAWAGUCHI, T. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13: 4908-4923, 1993.
- KAWAGUCHI, Y., WILSON, C. J., AND EMSON, P. C. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci.* 10: 3421-3438, 1990.
- KITA, T., KITA, H., AND KITAI, S. T. Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res.* 361: 10-18, 1985a.
- KITA, T., KITA, H., AND KITAI, S. T. Local stimulation induced GABAergic response in rat striatal slice preparations: intracellular recordings on QX-314 injected neurons. *Brain Res.* 360: 304-310, 1985b.
- KITA, H., KOSAKA, T., AND HEIZMANN, C. W. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res.* 536: 1-15, 1990.
- LOVINGER, D. M., TYLER, E., AND MERRITT, A. Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *J. Neurophysiol.* 70: 1937-1949, 1993.
- MCBAIN, C. AND DINGLEIDINE, R. Dual-component miniature excitatory synaptic currents in rat hippocampal CA_1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 68: 16-27, 1992.
- MISGELD, U. AND DIETZEL, I. Synaptic potentials in the rat neostriatum in dissociated embryonic cell culture. *Brain Res.* 492: 149-157, 1989.
- MORI, A., TAKAHASHI, T., MIYASHITA, Y., AND KASAI, H. Two distinct glutamatergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurones of neonatal rats and paired pulse depression. *J. Physiol. Lond.* 476: 217-228, 1994.
- MULLER, W. AND MISGELD, I. Inhibitory role of dentate hilus neurons in guinea pig hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* 64: 46-56, 1990.
- MULLER, W. AND MISGELD, I. Picrotoxin and 4-aminopyridine-induced activity in hilar neurons in the guinea-pig hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* 65: 141-147, 1991.
- NISENBAUM, E. S. AND BERGER, T. W. Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by gabaergic and dopaminergic inputs. II. In vivo analysis. *Neuroscience* 48: 561-578, 1992.
- NISENBAUM, E. S., XU, Z. C., AND WILSON, C. J. Contribution of a slowly inactivating potassium current to the transition to firing of neostriatal spiny projection neurons. *J. Neurophysiol.* 71: 1174-1189, 1994.
- OTIS, T. S. AND MODY, I. Differential activation of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptors by spontaneously released transmitter. *J. Neurophysiol.* 67: 227-235, 1992.
- PERRIAULT, P. AND AVOLI, M. Effects of low concentrations of 4-aminopyridine on CA_1 pyramidal cells of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 61: 953-970, 1989.
- PERRIAULT, P. AND AVOLI, M. 4-aminopyridine-induced epileptiform activity and a GABA-mediated long-lasting depolarization in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 12: 104-115, 1992.
- PINEDA, J. C., GALARRAGA, E., BARGAS, J., CRISTASCIO, M., AND ACEVES, J. Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 68: 287-294, 1992.
- REDMAN, S. Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiol. Rev.* 70: 165-198, 1990.
- REINER, A. AND ANDERSON, K. D. The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Res. Rev.* 15: 251-265, 1990.
- ROBERT, N., MILLS, R., AND KORN, H. Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA_1 pyramidal neurones of rat hippocampus. *J. Physiol. Lond.* 428: 707-722, 1990.
- SEABROOK, C. R., HOWSON, W., AND LACEY, M. G. Subpopulations of GABA-mediated synaptic potentials in slices of rat dorsal striatum are differentially modulated by presynaptic $GABA_B$ receptors. *Brain Res.* 562: 332-334, 1991.
- SEGAL, M. Repetitive inhibitory postsynaptic potentials evoked by 4-aminopyridine in hippocampal neurons in vitro. *Brain Res.* 414: 285-293, 1987.
- SHEPHERD, G. M. *The Synaptic Organization of The Brain*. New York: Oxford University Press, 1990.
- STORM, J. F. Temporal integration by a slowly inactivating K^+ current in hippocampal neurons. *Nature Lond.* 336: 379-381, 1988.
- SURMEIER, D. J., STEFANI, A., FOEHRING, R. C., AND KITAI, S. T. Developmental regulation of a slowly inactivating potassium conductance in rat neostriatal neurons. *Neurosci. Lett.* 103: 331-337, 1991.
- SURMEIER, D. J., REINER, A., LEVINE, M. S., AND ARIANO, M. A. Are neostriatal dopamine receptors co-localized? *Trends Neurosci.* 16: 299-305, 1993.
- THEISLEFF, S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5: 1413-1419, 1980.
- VIZI, E. S., VAN DUKE, J., AND FOLDES, F. F. The effect of 4-aminopyridine on acetylcholine release. *J. Neural Trans.* 41: 265-274, 1977.
- WILSON, C. J. The basal ganglia. In: *The Synaptic Organization of the Brain*, edited by G. M. Shepherd. New York: Oxford University Press, 1990, p. 279-316.
- WILSON, C. J. Dendritic morphology, inward rectification and the functional properties of neostriatal neurons. In: *Single Neuron Computation*, edited by T. McKenna, J. Davies, and S. F. Zornetzer. Boston: Academic Press, 1992, p. 141-171.
- WILSON, C. J. AND GROVES, P. M. Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 194: 599-615, 1985.
- ZALUTSKY, R. A. AND NICOLL, R. A. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science Wash. DC* 248: 1619-1624, 1990.
- ZIMMERMANN, H. *Synaptic Transmission*. New York: G. T. Verlag and Oxford Univ. Press, 1993.

4A. SECCIÓN

"Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons"

Jorge Flores-Hernández, Elvira Galarraga and José Bargas

Enviado en manuscrito para publicación en la revista J. Neurophysiology
Agosto, 1994

En este trabajo mostramos:

- 1.- El análisis de las amplitudes de los potenciales sinápticos inducidos por la 4-AP en presencia de bicuculina (bloqueo de la actividad GABAérgica) y de Quinpirole (un agonista a los receptores de dopamina tipo D2).
- 2.- El efecto de la activación de receptores a dopamina tipo D2 sobre la frecuencia de aparición de potenciales sinápticos inducidos por la 4-AP.
- 3.- La demostración que el efecto de quinpirole (agonista dopaminérgico tipo D2) no modifica las propiedades pasivas dendríticas y somáticas de las neuronas estudiadas.
- 4.- El efecto modulador de quinpirole (dopamina D2) ocurre en un 30 % de las neuronas estudiadas.
- 5.- Mostramos que la actividad sináptica inducida por 4-AP y modulada por dopamina es de tipo cuántico.
- 6.- Finalmente, mostramos que la modulación presináptica dopaminérgica tiene un efecto selectivo de las entradas glutamatérgicas a las neuronas estudiadas.

The American Physiological Society

9650 ROCKVILLE PIKE BETHESDA MARYLAND 20814 3997
301 530-7186 or 7189 FAX 301 571 1814

August 24, 1995

DR. JOSE BARGAS
DEPTO. DE NEUROCIENCIAS
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
04510 MEXICO DF.
MEXICO

Dear Dr. Bargas:

The Office of the Executive Editor acknowledges the receipt of your manuscript. The manuscript has been forwarded to the Editor/Associate Editor (see name and address below), who will assign it to referee editors. The paper will be reviewed as promptly as possible and you will be notified by the Editor/Associate Editor of the action taken.

Please note that a charge of \$100 will be levied if the manuscript is accepted and a disk is not provided for the final revised, accepted version of the paper. The \$100 charge will be used to offset the extra typesetting costs associated with the publication of paper manuscripts. The receipt of a disk also enables the Society to include the abstract of the article (with author permission) in advance of print publication in *APS Abstracts*, a copyrighted electronic journal available on the Society's Gopher information server and World Wide Web.

Please address any correspondence regarding the manuscript to the Editor/Associate Editor listed below and refer to the identification number that appears above the title.

Sincerely,

Brenda B. Rauner

Brenda B. Rauner
Publications Manager and Executive Editor

Id Number:	J-0557-5	Received:	08/23/1995
Journal:	JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY		
Title:	"DOPAMINE SELECTS GLUTAMATERGIC INPUTS TO NEOSTRIATAL NEURONS"		
Editor:	DR. WAYNE E. CRILL SCHOOL OF MEDICINE DEPT OF PHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS, SJ-40 UNIV OF WASHINGTON SEATTLE, WA 98195 206-543-0954 FAX: 206-685-0619		

JOURNALS

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY • CELL PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: LUNG, CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: RENAL, FLUID AND ELECTROLYTE PHYSIOLOGY • ADVANCES IN PHYSIOLOGICAL EDUCATION • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: CONSOLIDATED • JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY • JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY • PHYSIOLOGICAL REVIEWS • NEWS IN PHYSIOLOGICAL SCIENCES • THE PHYSIOLOGIST

BOOKS

HANDBOOK OF PHYSIOLOGY • CLINICAL PHYSIOLOGY SERIES • SPECIAL PUBLICATIONS

DOPAMINE SELECTS GLUTAMATERGIC INPUTS TO NEOSTRIATAL NEURONS

Jorge Flores-Hernández, Elvira Galarraga and José Bargas

Depto. de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, POBox: 70-253, Universidad
Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México.

Key words: 4-aminopyridine, dopamine, neostriatum, presynaptic modulation,
quinpirole, synaptic transmission.

Running title: Afferent selection

Correspondence: Dr. José Bargas. Depto. de Neurociencias, Instituto de Fisiología
Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México.
POBox: 70-253. Phone: (525)622-5670. FAX: (525)622-5607. e-mail:
jbargas@ifcsun1.fisiol.unam.mx

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. Synaptic potentials induced by micromolar concentrations of 4-aminopyridine (4-AP) were recorded intracellularly from rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. Synaptic potentials induced by 4-AP were completely blocked by a combination of 10 μ M bicuculline (BIC) and 10 μ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) plus 100 μ M D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (2-APV). If BIC was added alone to the superfusion, only about half of the synaptic potentials are blocked. The remaining synaptic potentials are then glutamatergic.

2. Synaptic potentials induced by 4-AP appear randomly. Amplitude histograms of these potentials are skewed to the right, with mean amplitudes around 1 mV, both in the presence or absence of bicuculline. Since input resistance of the recorded neurons is around 42 M Ω , mean amplitude of these synaptic potentials is in agreement to quantal size measurements in mammalian central neurons. This suggests that 4-AP induces single afferent fibers to fire in a random and asynchronous manner.

3. 10 μ M quinpirole, a dopaminergic D₂ receptor agonist, reduced the frequency of glutamatergic synaptic potentials induced by 4-AP. This dopaminergic effect was seen in 35% of cases, and was blocked by the D₂ receptor antagonist sulpiride (10 μ M). The effect occurred with no change in the input resistance, the membrane potential, or the threshold for action potential in the recorded postsynaptic neurons. The mean amplitude of the synaptic potentials also remained the same. These results suggest a presynaptic site of action for quinpirole in some but not all glutamatergic afferents.

4. In a few cells, synaptic potentials could be sorted by amplitude. In these cases, 4-AP may affect only the frequency of synaptic potentials of a given amplitude. This result supports that, in a single cell, dopamine may affect some afferents and not others. Alternatively, it may indicate that dopamine may inhibit some but not all the boutons of a single afferent.

5. The present experiments show that glutamatergic synaptic transmission in the neostriatum can be presynaptically modulated by dopamine in a minority of cases. This suggests that, in physiological conditions, dopaminergic presynaptic modulation is selective towards a class of afferents. This may control the quality and quantity of afferent flow upon neostriatal neurons.

INTRODUCTION

In spite of several lines of electrophysiological (García-Muñoz et al., 1991; Calabresi et al., 1993) and neurochemical evidence (Mitchell and Dogget, 1980; Rowlands and Roberts, 1980) supporting the existence of dopaminergic D₂ presynaptic modulation of glutamatergic afferents to the neostriatum, some ultrastructural and immunohistochemical studies (e.g., Fisher et al., 1994) have shown that only a small fraction of the dopaminergic D₂ receptors in the neostriatum are located on presynaptic asymmetric boutons. With the aim of obtaining an estimation of the extent of dopaminergic D₂ presynaptic modulation in this nucleus, quinpirole was tested on glutamatergic afferents excited by 4-aminopyridine (4-AP).

In the neostriatum (Kita et al., 1985), as in many systems (e.g., Thesleff, 1980; Segal, 1987; Perreault and Avoli, 1989), 4-AP increases the probability of recording spontaneous synaptic potentials (SSPs)(see Methods). Since, at micromolar concentrations, the induced synaptic activity can be shown to be discrete, random, of low frequency, and tetrodotoxin (TTX) and cadmium (Cd²⁺) sensitive (Flores-Hernández et al., 1994), it can be argued that 4-AP increases transmitter release by causing the random and asynchronous firing or depolarization of a few afferent fibers or boutons (Tibbs et al., 1989).

In the neostriatum, the presence of bicuculline isolates the glutamatergic SSPs induced by 4-AP (Flores-Hernández et al., 1994). Glutamatergic synaptic potentials in this nucleus are the output of cortical and thalamic afferents (see Wilson et al., 1990; Graybiel et al., 1990; Albin et al., 1991, for reviews). They contribute with about 60% of

all synaptic boutons in a spiny projection neuron (Kemp and Powell, 1971a). These boutons are mainly located on dendritic spine heads (Kemp and Powell, 1971b; Somogyi et al., 1981; Xu et al., 1989). It has been calculated that most glutamatergic afferents give one to four boutons to each postsynaptic spiny projection neuron (Wilson, 1994). Though in some occasions, large synaptic events may be recorded. These events may be produced by either a putative glutamatergic interneuron (Mori et al., 1994), a complex and more ramified afferent fiber (Wilson, 1994), or both. If an interneuron turns out to be present, it would constitute about 1% of the neuronal population (Wilson, 1990) and its synaptic contacts would not be present in all neurons (Mori et al., 1994). However, 4-AP as used in this work, affected all recorded neurons.

In the slice preparation used for the present report, all external afferents were cut from their somas of origin. Since most, if not all glutamatergic transmission, would come from these cut afferents (Wilson, 1990; 1994; Flores-Hernández et al., 1994), any modulatory effect upon glutamatergic transmission that occurs with no change in postsynaptic excitability might be imputable to a presynaptic action on them. Under these conditions, the D₂ receptor agonist quinpirole, was able to decrease the frequency of SSPs in some, but not all, experiments. This suggests a selective presynaptic site of action for quinpirole. A preliminary report of these findings has been presented at the Society for Neuroscience (Flores-Hernández et al., 1994).

METHODS

Our protocol follows The American Physiological Society policy regarding the use and care of animals (NIH publication No. 86-23, revised 1985) and has been described in previous work (e.g., Bargas

et al. 1988). Briefly, adult (> 2 mo) male or female albino Wistar rats were anesthetized and decapitated. Sagittal neostriatal slices (400 μm), completely separated from cortex and other nuclei, were recorded totally submerged at 32-34 °C. Bathing solution was (in mM): 125 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25 NaHCO₃ and 11 glucose. The solution was saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ (300 mOsm/L, pH 7.4). Intracellular recordings were carried out with micro-pipettes filled with either biocytin (Sigma, 1-2 %) in 2 M K-acetate or just 3M K-acetate. Electrode d.c. resistances ranged from 80 to 120 M Ω . Intracellular recordings were made with a high input impedance electrometer with an active bridge circuit using standard techniques. After recording the resting membrane potential and input resistance (approximately: < -75 mV and 40 M Ω respectively; Galarraga et al. 1994), 10 or more min of continuous recording without any manipulation were done as a control. Afterwards, 4-AP and different drugs were administered with the superfusion. Exchange within the recording chamber was complete in about 2 min. Both frequency of synaptic potentials and input resistance were monitored. In some cells, micromolar 4-AP induced a small (2 - 5 mV) depolarization which was corrected with d.c. current, so that original resting membrane potential (RMP) was maintained during the duration of the experiment. Quinpirole never changed this potential. Thus, frequency and amplitude of synaptic potentials, as well as cell input resistance, were all recorded at the same membrane potential. Since no stimulus was delivered, synaptic potentials appeared stochastically. In this sense, synaptic potentials were "spontaneous" (spontaneous synaptic potentials or SSPs). 4-AP induction of SSPs could be seen as a great increase in the probability of recording these events. Records were digitized, stored on VHS tapes, and analyzed off-line with a digital oscilloscope and a PC-computer. SSPs were counted with the help of a home-made window discriminator which first differentiated the SSPs to detect the fast rate of rise, then produced a TTL pulse for each SSP detected. Thereafter, pulses were counted continuously by means of a program kindly provided by Dr. E. Soto (v. 3.86, UAP) or by a program made in the laboratory inside the LabView™ environment. Events about 0.4 mV were among the smallest recorded. The standard deviation of the noise was: 153 \pm 18 μV (n = 16 experiments; see also: Cotman et al., 1986; Dumas and Foster, 1995). "Frequency vs time plots" were done by obtaining the frequency as events per second (s⁻¹), and then, taking the average of this measurement every minute. The methods were checked to

agree, in a sample of experiments, with counts obtained directly from the oscilloscope screen. Amplitude histograms were done by measuring SSPs directly from the screen of a digital oscilloscope. The measured events were chosen by chance: taped records were replayed in one beam of the oscilloscope while the window discriminator signaled the SSPs with TTL pulses that appeared on the second beam (see above). The tape was stopped at variable times and the SSPs signaled by TTL pulses were measured with cursors. The procedure was repeated several times until an arbitrary number of events (100 to 500) was collected. This method seemed enough for the purposes of this work.

After recording, some neurons were injected with biocytin using the method described by Horikawa and Armstrong (1988). Slices containing injected neurons were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, 1% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The slices were then infiltrated with 30% sucrose and cut on a vibratome into 60 μm sections. The sections were incubated for 2 to 4 hours in a phosphate buffer solution containing 0.2 Triton-X-100, avidin, and biotinylated horseradish peroxidase (ABC-HRP, Vector's ABC kit) for two hours and then reacted with diaminobenzidine and hydrogen peroxide (H_2O_2) to visualize the bound HRP. This enabled resolution of the intracellularly labeled processes through trans-illumination microscopy.

4-aminopyridine (4-AP) and bicuculline (BIC) (Sigma), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), D(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (2-APV), quinpirole (QUIN) and sulpiride (SULP) (RBI), were dissolved from stock solutions into the superfusion saline.

RESULTS

Intracellular recordings reveal a low frequency of spontaneous synaptic potentials (SSPs; see Methods) in neostriatal neurons (mean \pm s.e.m., in this and other numerals): $0.16 \pm 0.31 \text{ s}^{-1}$ (range: 0.02 - 0.33; $n = 8$) (Galarraga et al., 1987; Cepeda et al., 1989; Flores-Hernández et al., 1994). Mean amplitude of these synaptic potentials is: $0.9 \pm 0.03 \text{ mV}$ (median: 0.8 mV; $n = 7$). The smallest SSP measured in control conditions was around 0.5 mV (but see Dumas and Foster, 1995), and the largest

around 5 mV. In the presence of 100 μ M 4-AP, SSPs frequency increased to: 4.3 ± 0.3 s^{-1} (range: 1 - 14; $n = 8$). The increase in the probability of recording SSPs after 4-AP did not change their mean amplitude, which remained around 0.9 ± 0.04 mV (median: 0.81 mV; $n = 8$) (Fig. 1). The smallest and largest SSPs recorded in these conditions were 0.45 mV and 13 mV, respectively. However, it was rare to see events larger than 5 mV in any single experiment (e.g., Fig. 1). As shown in Figure 1A, typical amplitude histograms were skewed to the right, so that larger events were infrequent and most events had amplitudes than 2 mV. The range of the histograms was extended, in most cases, from around 0.5 to around 2.0 to 5.0 mV (v.g., Figs. 1 A, B, C and 4 A, B). Records in Figs. 1D-F show samples of SSPs taken from those used to build the histograms at left. It is worth noticing that since the input resistance in the same sample of neurons was: 42 ± 2.4 $M\Omega$ ($n = 34$; at a resting potential around -80 mV where the SSPs were recorded), then, the mean amplitude of synaptic potentials induced by 4-AP agrees with unitary amplitude measurements in central neurons (e.g., Redman, 1990; Finch et al., 1990; Edwards et al., 1990; McBain and Dingledine, 1992; i.e., $\approx 1\text{mV} / 40\text{M}\Omega = 25\text{pA}$). Although recordings necessarily involve more or less electrotonic decay which is a source of variance (Bargas et al., 1988; and discussed in Redman, 1990; Finch et al., 1990), the narrow range of amplitudes (roughly: 1 to 5 mV) with respect to the mean or main mode (Fig. 1 A-C) suggests that they are produced by a few number of active sites. This is supported by previous calculations that expect each spiny cell to receive only a few number of boutons from each afferent fiber (Wilson et al., 1994). The present measurements also agree with the view that 4-AP most

probably induces the asynchronous firing of individual afferent fibers (e.g., Tibbs et al., 1989; Flores-Hernández et al., 1994).

In spite of being a potassium conductance blocker, 100 μ M 4-AP induces a decay in the input resistance of neostriatal neurons; from 42 M Ω (see above) to: 33 ± 2.5 M Ω (n=8) ($p = 0.012$; Student's t test; input resistance is a normally distributed variable in these cells; Galarraga et al., 1994). This effect was hypothesized by Nisenbaum et al. (1994) to be caused by an enhancement of ligand gated conductances caused by the increase in transmitter release. This effect would occur without a great blockade of postsynaptic potassium conductances (Galarraga et al., 1994). The present experiments proved this hypothesis, as the sole addition of bicuculline (10 μ M) to block the GABAergic SSPs (Flores-Hernández et al., 1994), increased back the input resistance to: 42 ± 4.9 M Ω (n = 6). Thus, the 4-AP concentration chosen allows glutamatergic SSPs to be compared at similar membrane potential and input resistance in control and test recordings (cf., Figs. 1 A, 1 B and 1C).

Figure 2 illustrates the increase in SSPs frequency induced by 100 μ M 4-AP. 10 μ M bicuculline blocks part of the SSPs induced by 4-AP. 10 μ M CNQX plus 100 μ M 2-APV block what is left by bicuculline (Fig. 2B). This suggests that in the presence of bicuculline, most SSPs induced by 4-AP are glutamatergic. Mean amplitude of SSPs in these conditions was: 1.1 ± 0.03 mV (median: 1.1 mV; n= 8), and the SSPs frequency was: 2.6 ± 0.03 s $^{-1}$ (range: 0.3 - 7; n = 8). Thus, in spite of the small change in input resistance (see above), SSPs amplitudes are very similar with or without bicuculline (cf., Figures 1 A and 1 B). Since similar results as those illustrated in

Figures 1 and 2 were found in all cells tested, the experiments suggest that 4-AP randomly stimulates a few individual glutamatergic afferent fibers; which have been cut from their somata (see Methods and Tibbs et al., 1989; Flores-Hernández et al., 1994).

Fig 2

Figure 3 shows that 10 μ M quinpirole may reduce the frequency of glutamatergic SSPs induced by 4-AP. This reduction was reversed by sulpiride (10 μ M). This suggests that dopaminergic D_2 receptor agonists can reduce glutamate release from external afferents innervating the neostriatum. In average, this reduction was: 38 ± 13 % ($n = 7$; range: 11 to 100 %) of the maximum frequency attained with 4-AP plus bicuculline. As shown in Figure 4, the abatement in frequency occurred with no significant change or reduction in SSPs mean amplitude. In fact, this case shows a small non-significant increase in mean amplitude. The effect of quinpirole also occurred without changes in mean input resistance, or changes in the membrane potential of the postsynaptic cell (Figure 5) (see also: Pacheco-Cano et al., 1995). Also, the threshold for the firing of action potentials does not seem to change after quinpirole at these concentrations (Fig. 5). In the present sample of neurons, mean input resistance during the addition of quinpirole (10 μ M) was not significantly different than that obtained in the presence of 4-AP plus bicuculline: 43 ± 7 $M\Omega$ ($n = 4$; as tested with the slope of the current-voltage relationships at resting potential; see above). Figures 3, 4, and 5 are from the same experiment and neuron.

Fig 3

Since transmission was potently affected without any appreciable change in postsynaptic excitability, or SSPs mean amplitude, in the same sample of neurons ($n = 6$), the present results confirm a presynaptic site of action for dopamine agonists

(Calabresi et al., 1993). However, when tested at suprathreshold voltage levels, during repetitive firing, quinpirole did reduce firing frequency (not shown but see: Pacheco-Cano et al., 1995). Nonetheless, this effect occurs at a voltage level very different than that at which SSPs were recorded to monitor glutamate release. That effect may be due to the action of D₂ receptor agonists upon voltage-dependent ion conductances that participate in shaping the firing pattern (Pacheco-Cano et al., 1995; Surmeier and Kitai, 1993). It does not interfere with the interpretation of the present results. Fig 6

Dopaminergic D₂ receptor modulation of synaptic potentials induced by 4-AP was not present in all neurons recorded. An example of a negative result is shown in Figure 6. Modulation was present in 7 out of 20 (35%) cells tested with the present protocol. Thus, most recorded SSPs, in the same neuronal population, did not respond to quinpirole. Nevertheless, in all cases quinpirole was without effect on input resistance (as tested in most cases with small hyperpolarizing pulses), membrane potential, or action potential threshold. Since the results presented above suggest that 4-AP randomly stimulates single afferent fibers (Tibbs et al., 1989; Flores-Hernández et al., 1994), the present experiments suggest that not all afferents excited by 4-AP have dopaminergic presynaptic receptors. Fig 7

In two cases the presence of bicuculline (10 μM) made possible to record a neuron in which SSPs congregate around different mean amplitudes (Fig. 7). That is, the amplitude histogram exhibited two separated peaks with no intermediate amplitudes. One case is illustrated in Figure 7 C in which the main mode has a mean of

0.78 mV (vertical arrow). The other peak is around 4 mV (Fig. 7 C, tilted arrow). Aligned samples of SSPs taken from each peak are shown in Figures 7 A and 7B. In one case, SSPs seemed to come in discrete amplitudes from 0.45 to 1.3 mV (Fig. 7 A). In the other case amplitudes of 2 and 4 mV were common (Fig. 7 B). Larger SSPs had a much lower frequency of occurrence as compared to smaller SSPs. These two cases departed from the most common amplitude histograms, depicted in Figures 1 B and 4 A, which normally exhibited counts scattered all over the amplitude range.

In view of the peculiar amplitude distribution shown on Figure 7 C, it was decided to see, in this neuron, if quinpirole was able to affect the SSPs of a given amplitude. This was done by adjusting the window discriminator (see Methods) to count either the large SSPs only (Figs. 8 A top), or all events altogether (Fig. 8 A bottom; arrow signals the beginning of superfusion with 4-AP and BIC). It can be seen that, in this case, quinpirole reduced the frequency of large events without changing the frequency of small events (cf., Figures 8A and B). The action was reversed by sulpiride (10 μ M) (Fig. 8 A top). Sample records in Figures 8 B-D show examples of large events, except during quinpirole, when they were infrequent. A selective reduction of large events was seen in two other cases (see Figure 1 C as compared to 1B), even if a clear separation between different amplitudes was not present. Also note that, after quinpirole, events of different amplitudes scatter over all amplitude range (Figures 7 D and E). Nonetheless, SSPs' mean amplitude in the main mode did not change significantly.

DISCUSSION

The main conclusion of this work is that only part of the glutamatergic input to the neostriatum is presynaptically modulated by dopamine (cf., Figs 3 and 6). This allows to hypothesize that one function of dopamine is that of selecting the afferent inputs to neostriatal cells.

Presynaptic dopaminergic modulation was only present in a subset of experiments (35%). Further work is necessary to discern what is the origin of the modulated afferents. It may be cortical, thalamic, or both. It may concern a single type of afferent (see Wilson, 1994 for a discussion on the possibility of several types of corticostriatal afferents), and so on. At this moment, however, there is not enough anatomical knowledge about the arborizations of single striatal afferents (Xu et al., 1989; Wilson, 1994), according to their origin.

4-AP as a releasing agent.

Depending on the location of recording and stimulating electrodes, different proportions of the field potential, or the population postsynaptic potential or current, may be blocked by various agonists or antagonists (e.g., see Jiang and North, 1991). In the case of presynaptic modulators, it is hard to evaluate the amount of afferents being modulated. In this work 4-AP was used as a means of randomly stimulate a few afferent fibers impinging upon single neostriatal projection neurons in order to see how common was to find modulated fibers. This stimulation is TTX and calcium sensitive (Tibbs et al., 1989; Flores-Hernández et al., 1994), and all neurons recorded were of the spiny projection type (not shown but see Flores-Hernández et al., 1994).

Consequently, according to the present experiments we can be sure that only some afferent fibers or boutons making synaptic contacts upon projection neostriatal neurons are modulated by D₂ agonists. However, the exact number of fibers being excited in any one trial is not known so that, first, quantal analysis is precluded, and second, we do not know, of all the afferents impinging on a single neuron, which is the exact percentage modulated. Nonetheless, the experiments do give a quantitative sense of the importance of presynaptic modulation. In one out of seven cases that presented modulation the reduction of frequency reached control levels (Fig 3). In other cases a partial reduction in frequency was obtained: 38 %. This suggests that very few fibers are being excited by the chosen concentration of 4-AP in each case, so that modulation in one of them may be visualized in case it is present. Also the method allows to monitor changes in SSPs mean amplitude (Figs. 4 and 7), in order to discard changes in input conductance at dendritic sites distant from the soma. A change in input resistance of a far away dendritic site cannot be discarded with population synaptic events, even if compared with responses to locally applied agonists (possible nearer extrasynaptic receptors may be preferred to synaptic ones by the method of local application). In this respect, it is noteworthy that although mean amplitude of synaptic events changed from cell to cell (most probably due to different input resistances of postsynaptic neurons and different electrotonic lengths of the SSPs), it did not change in the same experiment. Supporting the view that the few afferents which are excited by 100 μ M 4-AP are the ones that are present during the whole

experiment. The frequency of recorded SSPs depends on 4-AP concentration (Flores-Hernández et al., 1994).

One problem with the present method is that the proportion of fibers modulated may not reflect the physiological situation if 4-AP selects, somehow, the afferent fibers excited. A selection bias, however, has not been demonstrated for 4-AP or any other releasing agent such as ionomycin or potassium. Nonetheless it is a possibility, so that experiments comparing the results obtained with different releasing agents and techniques are necessary. Also, if a modulated fiber fires at low frequency it may pass undetected. However, this is simple a problem of sampling, unless low frequency firing fibers were already being modulated by tissue dopamine. This last possibility was discarded because sulpiride alone never induced an increase in SSPs frequency ($n = 12$). In conclusion, 4-AP permits the observation of neurotransmitter release electrophysiologically. With the chosen 4-AP concentration, the increase in release could be observed with no significant changes in postsynaptic somatodendritic input resistance and with controllable changes in membrane potential (in the presence of bicuculline). This is a significant advantage over the use of potassium as a releasing agent. The method also allows a quantitative evaluation of the importance of presynaptic modulation by randomly stimulated afferents. It is a complement to other methods and techniques because in contrast to many other releasing agents (e.g., ionomycin, latrotoxin), 4-AP induces the random TTX-sensitive firing of afferent fibers (Tibbs et al., 1989; Flores-Hernández et al., 1994).

Presynaptic modulation

It was shown that quinpirole, a dopaminergic D₂ receptor agonist, reduced the frequency of synaptic potentials which are the result of 4-AP stimulation in some but not all experiments (c.f., Figs. 3 and 6). This dopaminergic effect was blocked by the D₂ receptor antagonist sulpiride and occurred with no change in input resistance, membrane potential, or action potential threshold in the recorded postsynaptic neuron (Fig. 5) (see Pacheco-Cano et al., 1995). Furthermore, quinpirole did not produce a significant change in the mean amplitude of the induced synaptic potentials (Fig. 4). Moreover, most glutamatergic synapses made on projection neostriatal neurons come from afferents external to the nucleus (Kemp and Powell, 1971b; Somogyi et al., 1981; Wilson, 1994), and all afferents in the preparation were cut from their somas of origin. The most parsimonious interpretation for these data taken together is that quinpirole acted on presynaptic afferent fibers or boutons (Calabresi et al., 1993).

Besides, the amplitude of most events agrees with unitary amplitude measurements in central neurons (Figs. 1, 4, and 7) (Redman, 1990; Finch et al., 1990; Edwards et al., 1990; McBain and Dingledine, 1992). The range of amplitudes in the histograms was 1 to 5 times the main amplitude, supporting the view that recorded SSPs have their origin on individual afferents firing asynchronously, each of them giving rise to only a few boutons on any single spiny projection neuron (Wilson, 1994). Note then that, also in this case, a comparison of frequency and amplitude using other techniques (e.g., whole cell) will experimentally evaluate electrotonic decay, influence of dendritic spines, and so on.

Another possibility to the interpretation given above is that 4-AP selectively stimulates the firing of a putative glutamatergic interneuron (Mori et al., 1994). The objections to this alternative hypothesis are: 1) There is no immunocytochemical or anatomical evidence for a glutamatergic interneuron in the neostriatum (Kawaguchi, 1993; Kubota et al., 1993; Kita, 1993), 2) An interneuron would selectively innervate some, but not all, projection cells (Mori et al., 1994), but SSPs induced by 4-AP were found in all recorded neurons, 3) It would be strange that, in the case of recording synaptic potentials from a class of interneuron, some of them were modulated and some were not, and 4) No signs of interneuron involvement such as burst of SSPs (Flores-Hernández et al., 1994), rhythmic, or multip peaked synaptic potentials (Segal, 1987; Perreault and Avoli, 1988; Mori et al., 1994) were seen under the present conditions.

Still it could be argued that since 4-AP would randomly stimulate a small number of afferent fibers, the process would include an interneuron in some cases and not in others. And in fact, some large events, i.e., > 10 mV, could be recorded in some experiments (see Results). However, it could hardly be argued that the cases with positive modulation would be those involving the interneuron, as the amplitude range of the modulated cases did not differ with most cases.

To conclude, although presynaptic modulation is a well documented phenomenon, in many cases it is not clear if it is a massive phenomenon involving all afferent fibers of a given type, or if it is a way to select some inputs over others. The answer to this question may have important functional implications in some systems

like the neostriatum. The experiments of this work show that dopaminergic presynaptic modulation of glutamatergic inputs to the neostriatum may be a way to select among afferent inputs. Combined anatomical experiments are needed to find out which are the selected inputs.

ACKNOWLEDGMENTS: This research was supported in part by DGAPA-UNAM (México). We thank Dr. J.L.Gongora for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Albin, R.L., Young, A.B. and Penney, J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12: 366-375, 1990.
- Bargas, J., Galarraga, E. and Aceves, J. Electrotonic properties of neostriatal neurons are modulated by extracellular potassium. *Exp. Brain Res.* 72: 390-398, 1988.
- Calabresi, P., Mercuri, N.B., and Bernardi, G. Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. *Prog. Brain Res.* 99: 299-308, 1993.
- Cepeda, C., Walsh, J.P., Hull, C.D., Howard, S.G., Buchwald, N.A. and Levine, M.S. Dye-coupling in the neostriatum of the rat. I. Modulation by dopamine-depleting lesions. *Synapse* 4: 229-237, 1989.

- Cotman, C.W., Flatman, J.A., Ganong, A.H. and Perkins M.N. Effects of excitatory amino acid antagonists on evoked and spontaneous excitatory potentials in guinea-pig hippocampus. *J. Physiol. Lond.* 378: 403-415, 1986.
- Dumas, T.C. and Foster, T.C. Developmental increase in CA3-CA1 presynaptic function in the hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* 73: 1821-1828, 1995.
- Edwards, F.A., Konnerth, A. and Sakmann, B. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J. Physiol. Lond.* 430: 213-249, 1990.
- Finch, D.M., Fisher, R.S. and Jackson, M.B. Miniature excitatory synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 518: 257-268, 1990.
- Fisher, R.S., Levine, M.S., Sibley, D.R. and Ariano, M.A. D₂ dopamine receptor protein location: Golgi impregnation-gold toned and ultrastructural analysis of the rat neostriatum. *J. Neurosci. Res.* 38: 551-564, 1994.
- Flores-Hernández, J., Galarraga, E., Pineda, J.C. and Bargas, J. Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J. Neurophysiol.* 72: 2246-2256, 1994.
- Galarraga, E., Bargas, J., Martinez-Fong, D. and Aceves, J. Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neurosci. Letts.* 81: 351-355, 1987.
- Galarraga, E., Pacheco-Cano, M.T., Flores-Hernández, J. and Bargas, J. Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp. Brain Res.* 100: 239-249, 1994.

- Garcia-Munoz, M., Young, S. J., and Groves, P.M. Terminal excitability of the corticostriatal pathway. I. Regulation by dopamine receptor stimulation. *Brain Res.* 551: 195-206, 1991.
- Graybiel, A.M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 15: 133-139, 1990.
- Horikawa, A. and Armstrong, W. E. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci. Methods* 25: 1-11, 1988.
- Jiang, Z.G. and North, R.A. Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro. *J. Physiol. Lond.* 443: 533-553, 1991.
- Kawaguchi, T. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13: 4908-4923, 1993.
- Kemp, J.M. and Powell, T.P.S. The synaptic organization of the caudate nucleus. *Phil. Trans. R. Soc. B262*: 403-412, 1971a.
- Kemp, J.M. and Powell, T.P.S. The site of termination of afferent fibers in the caudate nucleus. *Phil. Trans. R. Soc. B262*: 413-427, 1971b.
- Kita, H. GABAergic circuits of the striatum. *Prog. Brain Res.* 99: 51-72, 1993.
- Kita, T., Kita, H. and Kitai, S.T. Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res.* 361: 10-18, 1985.
- Kubota, Y., Mikawa, S. and Kawaguchi, Y. Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin. *Neuroreport* 5: 205-208, 1993.

- McBain, C. and Dingledine, R. Dual-component miniature excitatory synaptic currents in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 68: 16-27, 1992.
- Mitchell, P.R. and Doggett, N.S. Modulation of striatal [³H]glutamic acid release by dopaminergic drugs. *Life Sci.* 26: 2073-2081, 1980.
- Mori, A., Takahashi, T., Miyashita, Y. and Kasai, H. Two distinct glutamatergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurones of neonatal rats and paired pulse depression. *J. Physiol. Lond.* 476: 217-228.
- Nisenbaum, E.S., Xu, Z.C. and Wilson, C.J. Contribution of a slowly inactivating potassium current to the transition to firing of neostriatal spiny projection neurons. *J. Neurophysiol.* 71: 1174-1189, 1994.
- Pacheco-Cano, M.T., Bargas, J., Hernández-López, S., Tapia, D. and Galarraga, E. Subthreshold action of dopamine involves a Cs⁺-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Submitted*, 1995.
- Perreault, P. and Avoli, M. Effects of low concentrations of 4-aminopyridine on CA1 pyramidal cells of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 67: 227-235, 1989.
- Redman, S. Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiol. Revs.* 70: 165-198, 1990.
- Rowlands, G.J. and Roberts, P.J. Activation of dopamine receptors inhibits calcium-dependent glutamate release from cortico-striatal terminals in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 62: 241-242, 1980.

- Segal, M. Repetitive inhibitory postsynaptic potentials evoked by 4-aminopyridine in hippocampal neurons *in vitro*. *Brain Res.* 414: 285-293, 1987.
- Somogyi, P., Bolam, J.P., and Smith, A. Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. *J. Comp. Neurol.* 195: 567-584, 1981.
- Surmeier, D.J. and Kitai, S.T. D₁ and D₂ dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. *Prog. Brain Res.* 99: 309-324, 1993.
- Thesleff, S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neurosci.* 5: 1413-1419, 1980.
- Tibbs, G.R., Barrie, A.P., Van Mieghem, F.J.E., McMahon, H.T. and Nicholls, D.G. Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release. *J. Neurochem.* 53: 1693-1699, 1989.
- Wilson, C.J. The basal ganglia. In: *The Synaptic Organization Of The Brain*, edited by G.M. Shepherd. New York NY. Oxford University Press, 1990, p. 279-316.
- Wilson, C.J. The contribution of cortical neurons to the firing pattern of striatal spiny neurons. In: *Models Of Information Processing In The Basal Ganglia*, edited by J.C. Houk, J.L. Davies, and D.G. Beiser, Cambridge MA. MIT Press, 1994, p. 29-50.

Xu, Z.C., Wilson, C.J. and Emson, P.C. Restoration of the corticostriatal projection in rat neostriatal grafts: electron microscopic analysis. *Neuroscience* 29: 539-550, 1989.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Amplitude histograms of synaptic potentials induced by 4-AP.

From A to C: Histograms built in the presence of 100 μM 4-AP ($n = 201$) (A); the same concentration of 4-AP plus 10 μM bicuculline ($n = 200$)(B); and the same concentrations of 4-AP and BIC plus the addition of 10 μM quinpirole ($n = 201$) (C)

D-F: Samples of the records from which the histograms in A-C were built. All histograms and records are from the same cell. Calibration: 10 mV, 100 ms. Note that histograms are skewed to the right representing non-unimodal distributions. Range of amplitudes is from around 1 to around 5 mV. Membrane potential = -84 mV.

Figure 2. 4-AP increases the frequency of spontaneous synaptic potentials (SSPs). **A.** From left to right samples of records after consecutive addition of: 100 μM 4-AP (4-AP), 10 μM BIC (+BIC) in the continuous presence of 4-AP, and 10 μM CNQX plus 100 μM 2-APV in the continuous presence of 4-AP and BIC (+CNQX+2-APV). **B.** Frequency of SSPs vs time plot before and after sequential addition of 4-AP, BIC and CNQX plus 2-APV. See Methods for abbreviations and plot construction. Calibration: 5 mV, 100 ms. Membrane potential = -82 mV.

Figure 3. Quinpirole reduces the frequency of SSPs. **A.** Samples of records under consecutive addition of (see abbreviations in Methods): 100 μM 4-AP plus 10 μM BIC (4-AP+BIC); 10 μM quinpirole (+QUIN) in the same 4-AP and BIC concentrations; and 10 μM sulpiride (SULP) in the continuous presence of the previous drugs. Since SSPs were induced by 4-AP in the presence of BIC, the glutamatergic component is isolated (see text and Figure 2). **B.** Frequency vs time plot illustrating the reduction in

SSPs frequency induced by quinpirole and the blocking of this effect after introducing sulpiride. Calibration: 5 mV, 100 ms. Membrane potential = -84 mV. Data from this same experiment is illustrated in Figures 4 and 5.

Figure 4. Quinpirole does not change SSPs mean amplitude. **A.** In the control, the amplitude histogram was constructed in the presence of 4-AP and BIC. Mean amplitude was (mean \pm s.e.m): 0.91 ± 0.02 mV (n= 102). **B.** Mean amplitude was measured in the same conditions after addition of quinpirole: 1.09 ± 0.05 mV (n= 100). Given the non-normal distributions, difference is not significant. The small mean's shift in B, was due to the counting of some large events not counted in A. Dashed vertical line signals the approximate median for the main mode in both histograms. Data from the same experiment illustrated in Figures 3 and 5.

Figure 5. Quinpirole does not change input resistance in postsynaptic neurons. **A.** Membrane potential responses, on bottom, to intracellularly injected current steps depicted on top. Records were obtained at resting potential in the presence of 4-AP and BIC. Note that 4-AP does not block inward rectification in these neurons. **B.** Same experiment as in A, after introducing 10 μ M quinpirole to the superfusion. **C.** Current-voltage relationships from the records in A and B. Note that quinpirole, at the concentrations used, does not change input resistance appreciably at the range of potentials where the synaptic responses were measured. Data from the same experiment as that in Figures 3 and 4.

Figure 6. Dopaminergic D₂ receptor agonists not always reduce glutamate release. **A.** Sample records taken at different conditions (drug concentrations as in

previous Figures). **B.** Frequency vs time plot shows an absence of D₂ receptor modulation in this experiment. Calibration: 5 mV, 100 ms. Membrane potential = -81 mV. This experiment represents the most common finding.

Figure 7. SSPs of different amplitudes may be discerned. **A.** In this cell, most frequent SSPs had discrete amplitudes between 0.45 and 1.3 mV. **B.** SSPs between 2 and 4 mV could also be recorded in the same cell. **C, D and E.** Amplitude histograms obtained under different conditions. Mean amplitude reflects the population of most frequently found SSPs (SSPs samples in A). A second and smaller peak can be seen at the right of the histogram in C (arrow). This peak collects counts around 4 mV. Note that there are no counts of events with intermediate amplitudes, i.e., between the two main peaks in C (n= 461). After addition of quinpirole, the peak around 4 mV is lost and intermediate events, between 2 and 4 mV, appear (D) (n= 287). After addition of sulpiride some large events reappear and the scattering of event amplitudes along the histogram range persists (n= 286). 4 and 2 mV events in B were taken from C and E, respectively. Figure 8 illustrates data from the same experiment.

Figure 8. Modulation may be present for SSPs of one amplitude only. **A.** Top: The window discriminator was adjusted to count only the larger events (> 1.8 mV). Note that quinpirole does reduce the frequency of these events, and that sulpiride blocks quinpirole's effect. Bottom: The window discriminator was adjusted to record all events (> 0.4 mV). Note that D₂ receptor modulation cannot be seen under these conditions. Arrow signals the time when 4-AP (100 μM) and BIC (10 μM) were added to the bathing solution. Note different frequencies in ordinates of large and small events.

B, C, and D. Sample records taken under different conditions. Note that larger events are absent in C. Calibration: 5 mV, 200 ms. Membrane potential = -82 mV. Figures 7 and 8 depict data from the same experiment.

Figura 1.

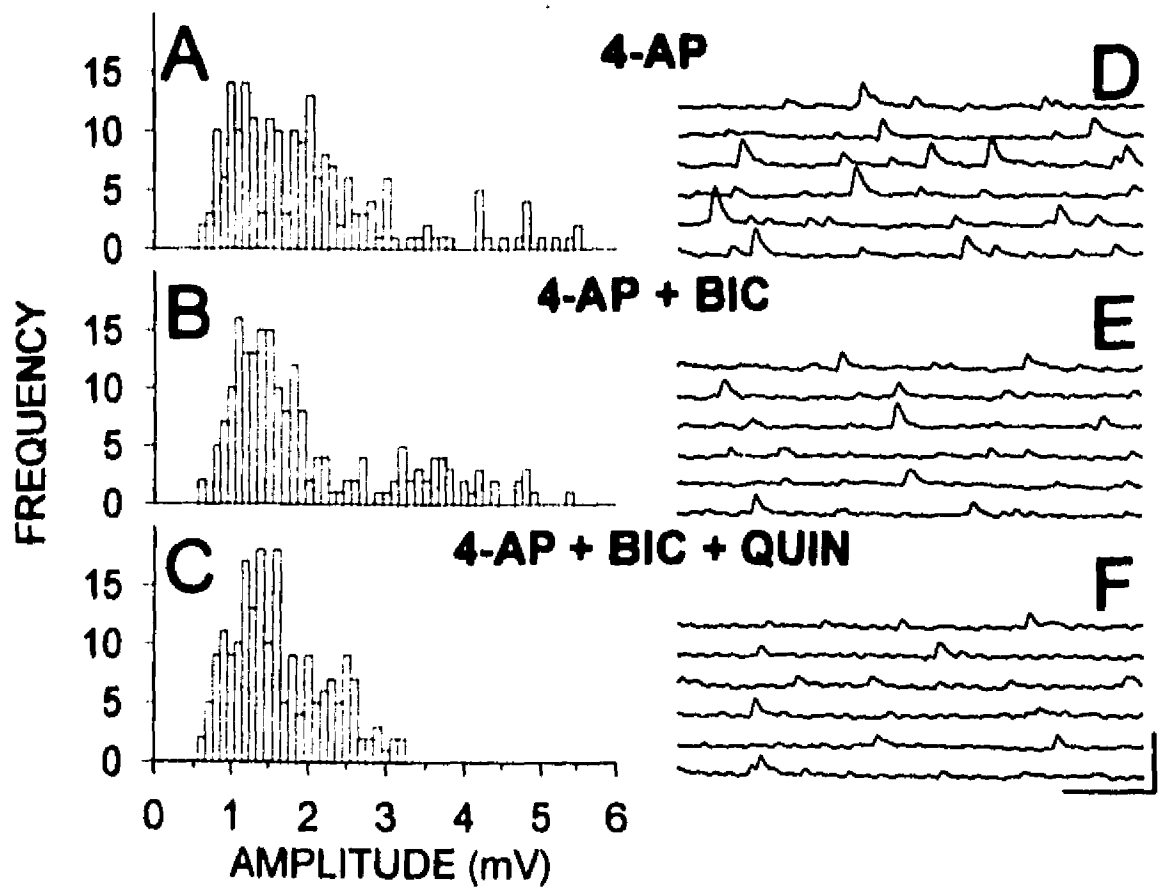


Figura 2.

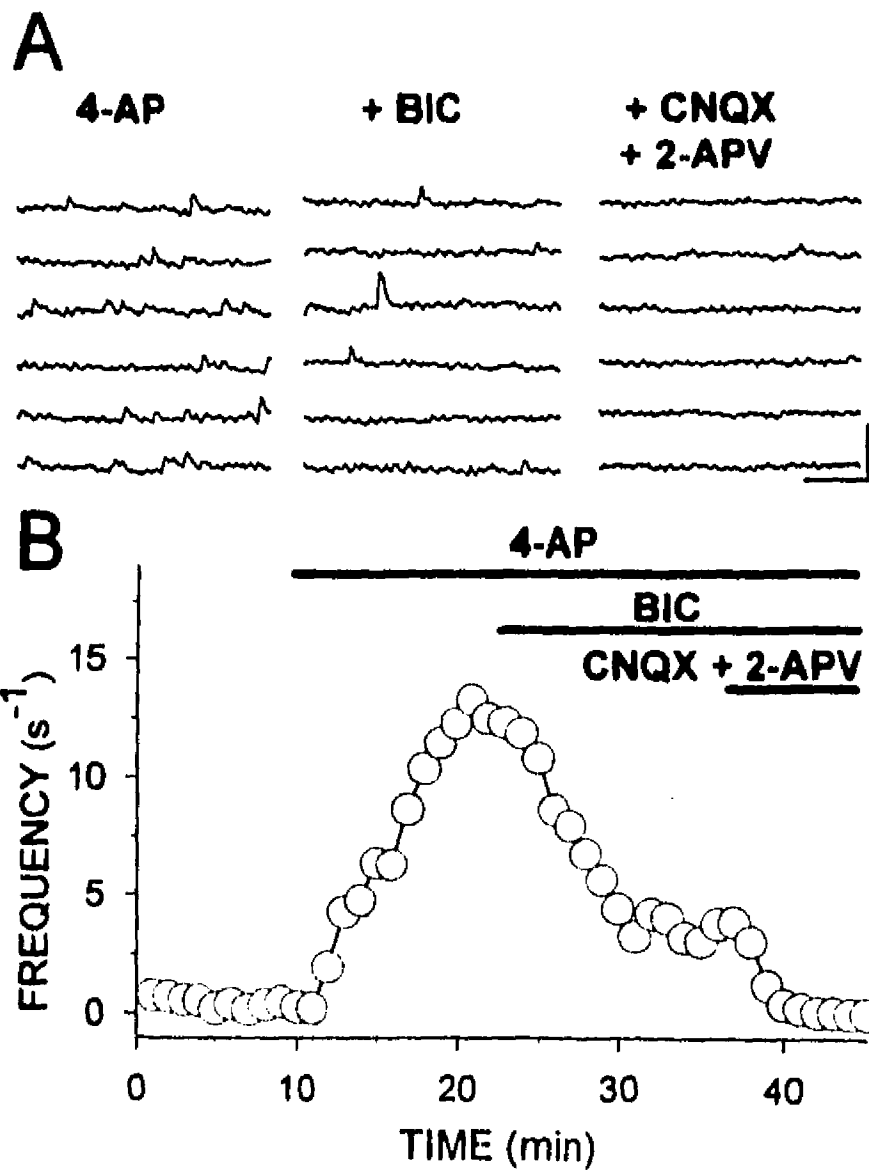


Figura 3.

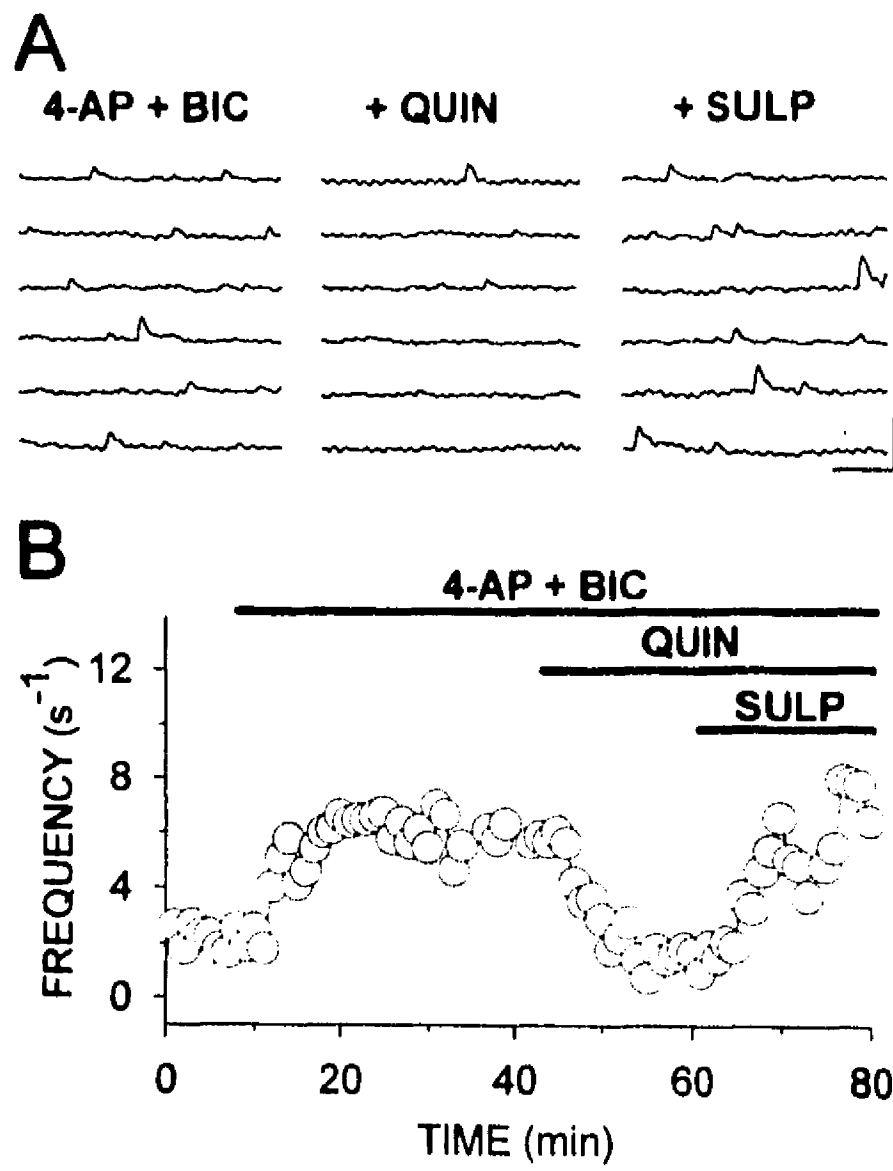


Figura 4.

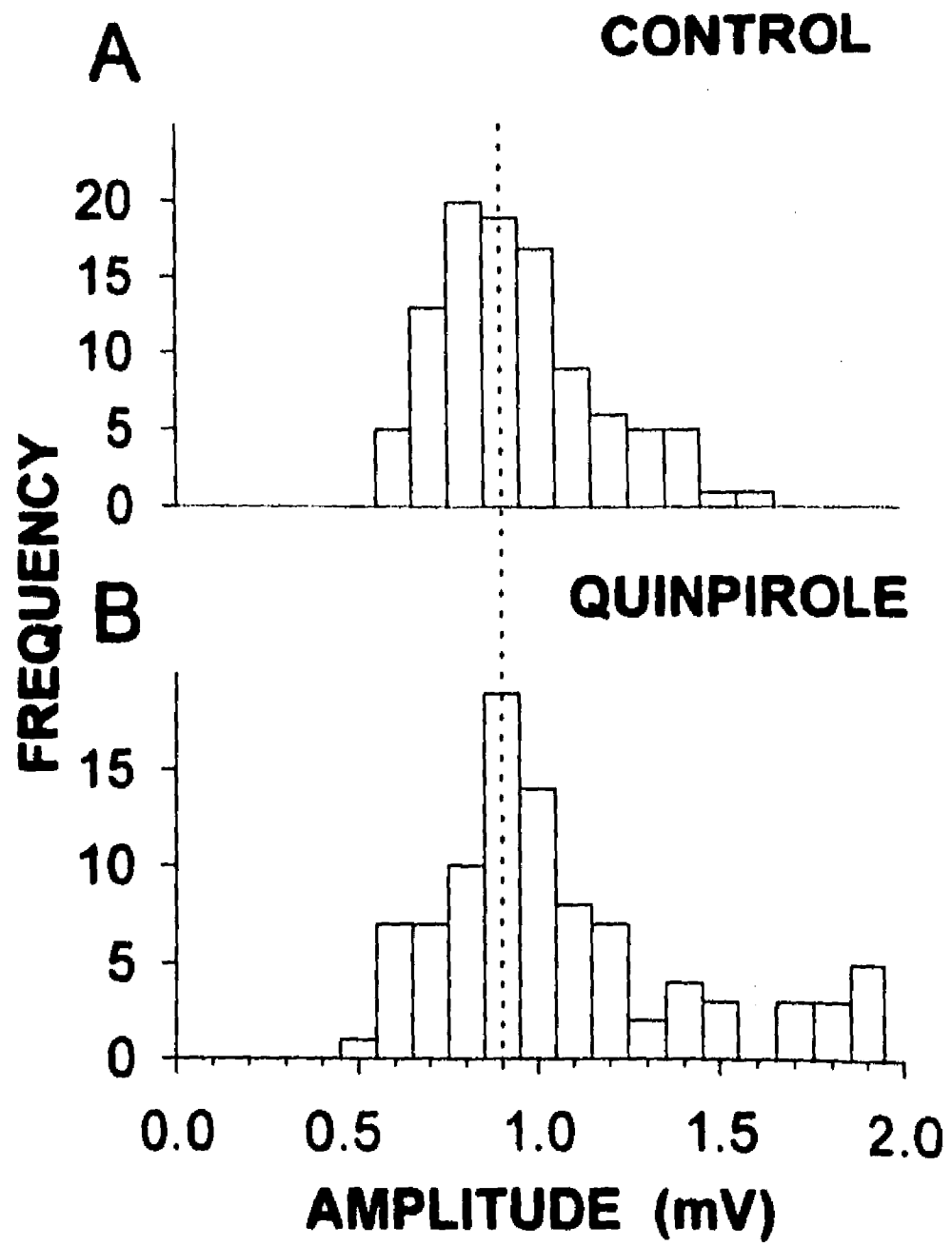


Figura 5.

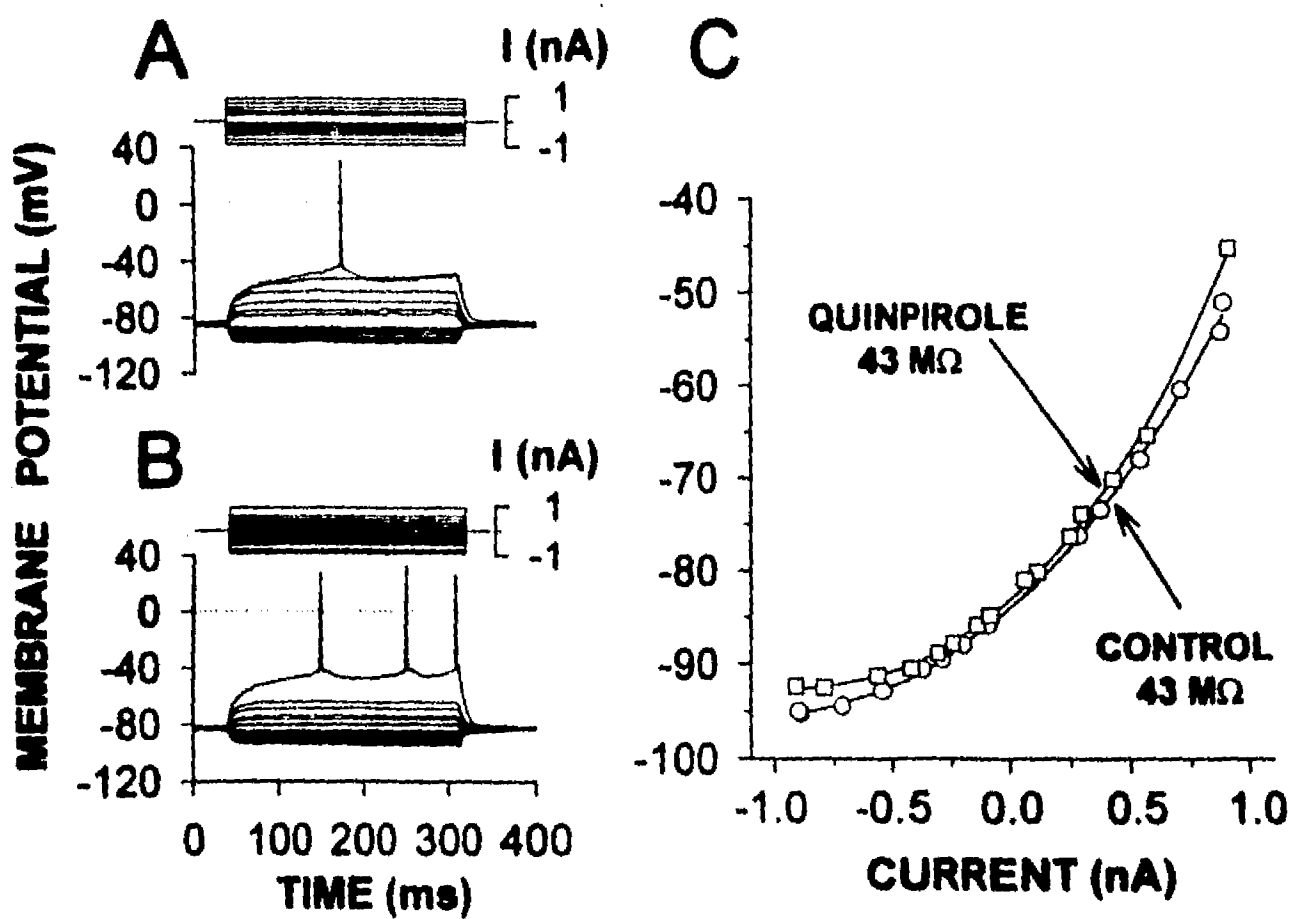


Figura 6.

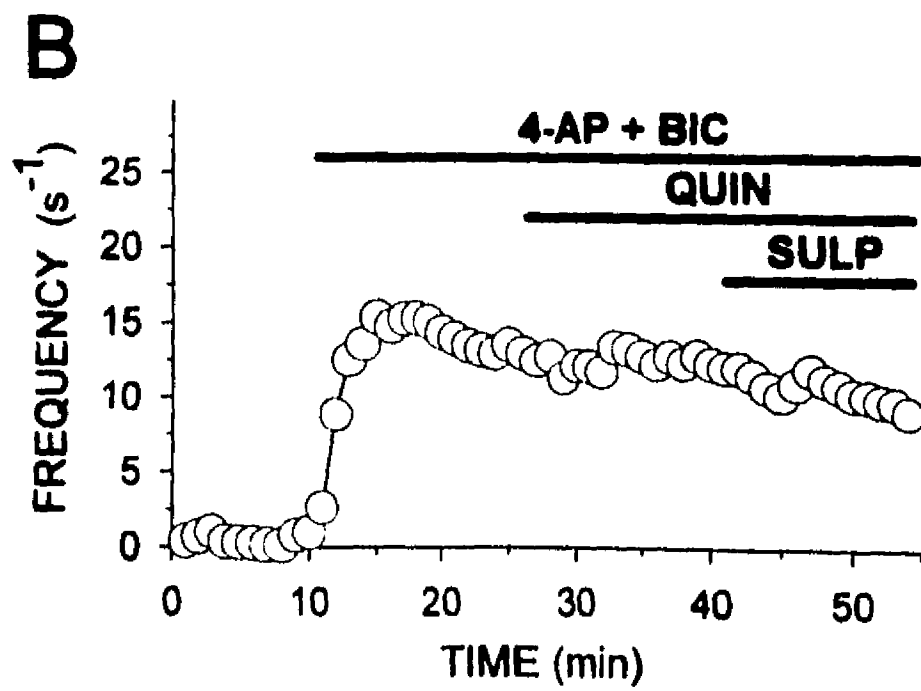
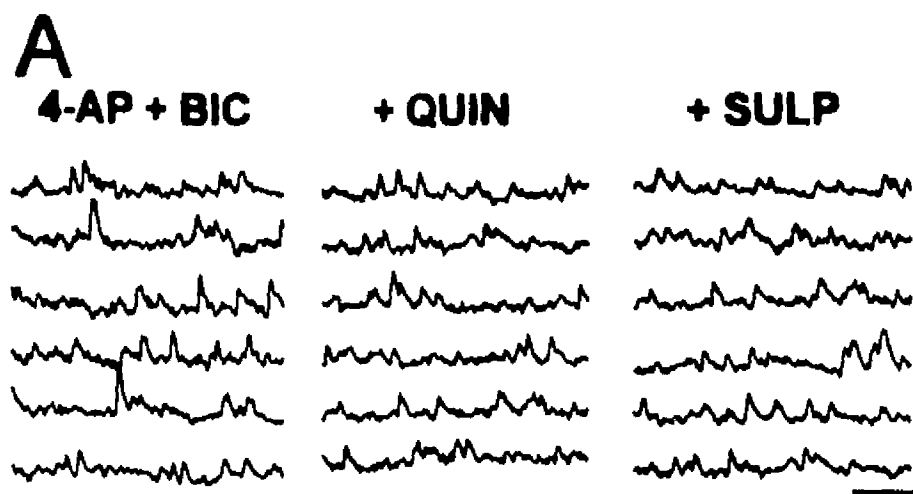


Figura 7.

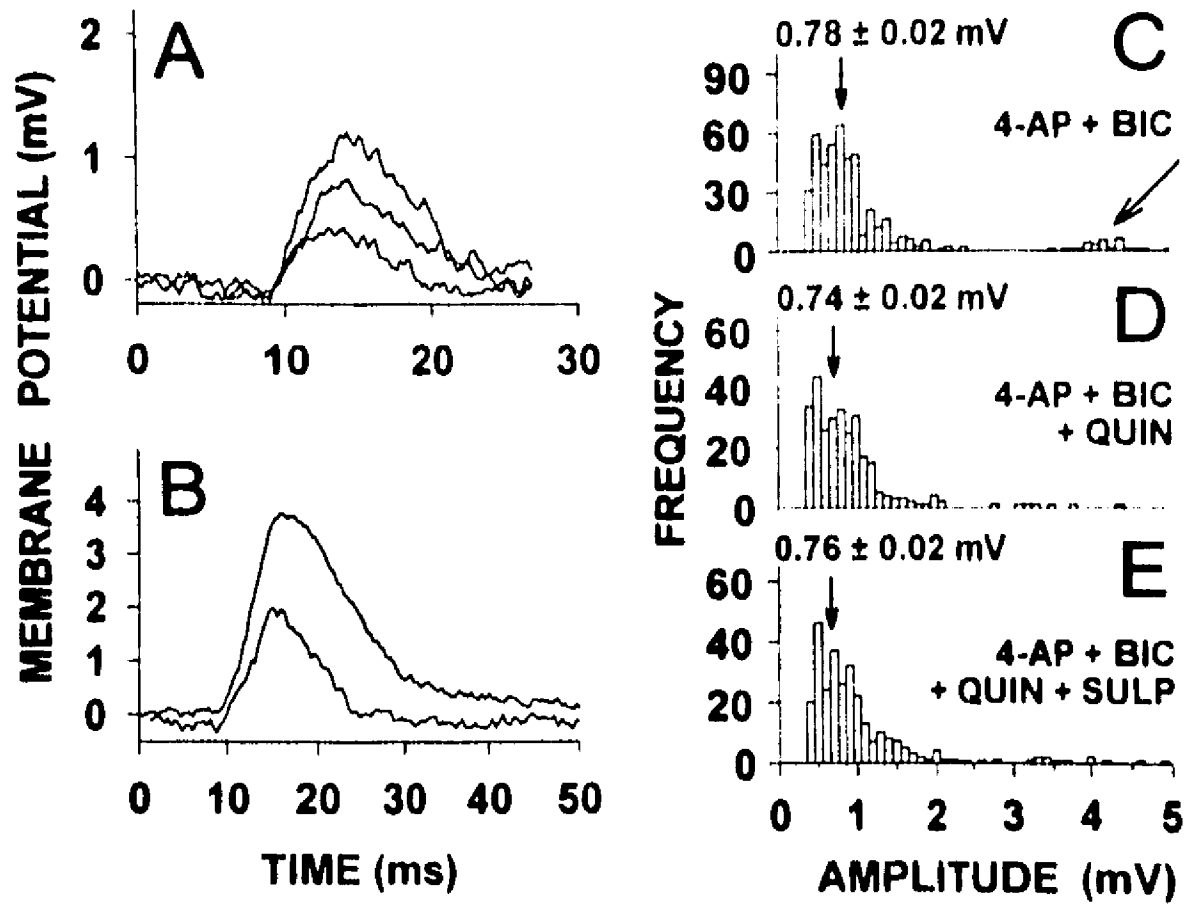
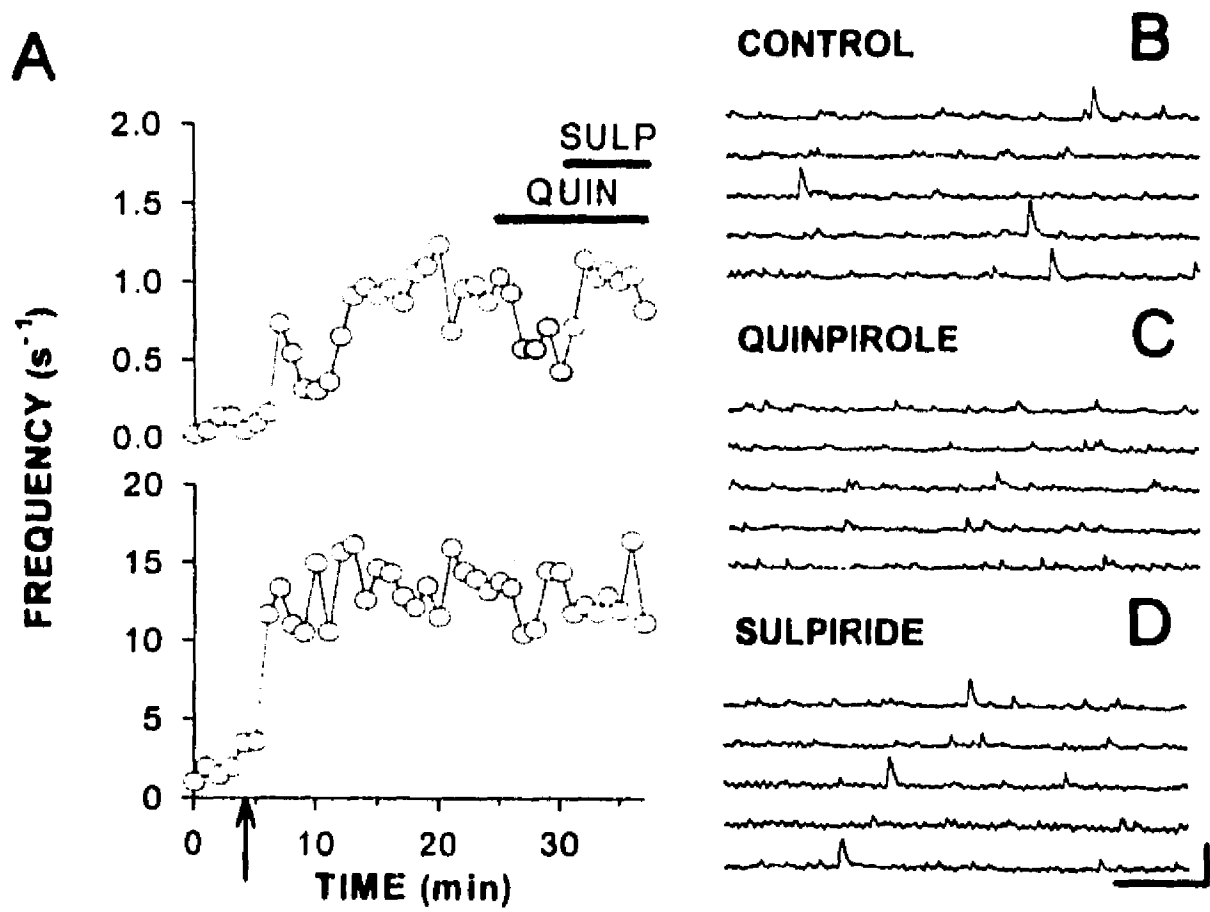


Figura 8.



DISCUSION

Caracterización electrofisiológica de las neuronas espinosas neocstriatales.

Las características tanto anatómicas como electrofisiológicas de las neuronas espinosas estudiadas son semejantes a las previamente reportadas (Kita et al., 1989; Kita et al., 1985; Kawaguchi et al., 1989, 1993; Bargas et al., 1988).

Actividad sináptica en las neuronas espinosas medianas.

La actividad sináptica espontánea en las neuronas espinosas medianas es de baja frecuencia (alrededor de 1 evento por segundo) (Ver la figura 1 de la 3a. sección). Cuando se agregó 4-AP a dosis micromolares (10-100 μM) se produjo un incremento de alrededor del 150 % en la frecuencia de aparición de potenciales sinápticos. El estudio de la relación dosis-respuesta mostró que la DE_{50} para la 4-AP en la inducción de potenciales sinápticos es de 120 μM (Ver figura 2 de la 3a. sección). Estos resultados concuerdan con los presentados por Kita et al., (1985a), Müller y Misgeld (1990, 1991), Perreault y Avoli (1989) y Segal (1987).

El efecto producido por la 4-AP es sensible a TTX y a cadmio, mostrando la dependencia de conductancias de sodio y calcio respectivamente (Ver figura 4 y 5 de la 3a. sección). Estos datos son apoyados por los trabajos de Tibbs et al (1989), Dolezal y Wecker (1991), Heemskerk et al., (1991), Müller y Misgeld (1990), Perreault y Avoli (1989), Segal (1987), Vizi et al., (1977) y Versteeg et al., (1995). Sin embargo, existen trabajos en los proponen que la actividad de la 4-AP puede estar actuando de manera independiente de sodio (Agoston et al., 1983; Arzate et al., 1986; Tapia y Sitges, 1982; Tapia et al., 1985).

Efecto de la 4-AP sobre la resistencia de entrada de las neuronas espinosas medianas.

La 4-AP produjo un decremento del 25 % en la resistencia de entrada de las neuronas analizada (ver tabla 2 y figura 5 de la segunda sección). El efecto de la 4-AP de acuerdo a la revisión presentada es producido por un bloqueo de conductancias de potasio que están presentes en las terminales nerviosas y que están activas en el potencial de reposo, estas conductancias son bloqueadas por 4-AP a dosis micromolares. Esta hipótesis implica que el bloqueo de dichas conductancias produciría un incremento de la resistencia a nivel de las terminales. Sin embargo, en las terminales la despolarización producida por el bloqueo de dichas conductancias de potasio produce la activación de conductancias de sodio y calcio que llevan al incremento de la probabilidad de liberación de neurotransmisores. Los

transmisores liberados a su vez, abrirían conductancias de canales activados por ligando, produciendo una disminución de la resistencia a nivel postsináptico. Esta hipótesis es probada por los datos experimentales, mostrados en la tabla 2 de la primera sección, en el que después de agregar el antagonista GABAérgico, bicuculina, la resistencia de entrada regresó a valores encontrados en condiciones control. Sin embargo, no se observó esto cuando se agregaron los antagonistas glutamatérgicos, CNQX y 2-APV, probablemente debido al bajo número de observaciones de este experimento.

La actividad sináptica inducida por la 4-AP es de tipo glutamatérgico y GABAérgico.

La actividad sináptica inducida por la 4-AP es de tipo glutamatérgico y secundariamente de tipo GABAérgico. Cuando se agregó el antagonista GABAérgico específico, bicuculina (2 - 10 μ M) la actividad sináptica disminuyó a la mitad. La actividad sináptica restante fue eliminada por la aplicación conjunta los antagonistas glutamatérgicos CNQX (10 μ M) y 2-APV (100 μ M). Si la aplicación de los bloqueadores glutamatérgicos fue realizada antes de la aplicación de bicuculina la actividad sináptica fue eliminada en casi la mitad de las neuronas registradas. Estos resultados sugieren que la 4-AP directamente incrementa la actividad sináptica glutamatérgica y esta activación facilita la actividad sináptica GABAérgica. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Morales-Villagrán y Tapia (1995) en los que muestran que la 4-AP incrementa principalmente la liberación de glutamato en experimentos realizados *in vivo*, y con los trabajos de Fragoso-Veloz, y Tapia (1992) en los que muestran que la administración de antagonistas NMDA protege *in vivo* de la actividad epiléptica ("wet-dog shakes") producida por 4-AP (ver las figuras 6, 7 y 8 de la 3a. sección).

En presencia de los bloqueadores GABAérgicos y glutamatérgicos no se observaron potenciales sinápticos lo que implica que no están presentes otros sistemas de neurotransmisión, como sería el caso de actividad colinérgica (nicotínica), glicinérgica, ATP o purinérgica, o de tipo serotoninérgico (5-HT₃).

A pesar de que el estriado presenta alta actividad colinérgica, esta es mediada a través de los receptores muscarínicos vía segundos mensajeros, o mecanismos metabotrópicos, no por mecanismos ionotrópicos. Cuando se probó el antagonista colinérgico nicotínico, la mecamilamina, sobre la actividad sináptica de las neuronas espinosas medianas este no alteró la frecuencia de potenciales sinápticos inducidos por la 4-AP, tanto en ausencia o la presencia de los bloqueadores GABAérgicos y/o glutamatérgicos. Estos datos contrastan con los presentados por Misgeld y Dietzel, 1989, en los que

dan evidencia de actividad nicotínica en el estriado. Estos resultados son encontrados en neuronas embrionarias o en sistemas de cultivo, mas no en neuronas adultas (Misgeld *et al.*, 1980, 1982, 1989).

En este trabajo encontramos una actividad sináptica GABAérgica que apareció en forma de ráfagas de potenciales sinápticos de amplitudes mayores a 4 mV. Esta amplitud es mayor a la de los potenciales sinápticos comúnmente registrados, ya que en estos casos la amplitud media es de 1 mV. La mayor parte de las sinapsis GABAérgicas son formadas por las recurrentes de las neuronas espinosas medianas. Cuando se agregó bicuculina la amplitud de los potenciales disminuyó sin decrementar su frecuencia. Estos resultados mostraron que el efecto de la bicuculina fue postsináptico (ver las figuras 9 y 10 de la tercera sección). Esta actividad sináptica en ráfagas parece ser originada en una interneurona GABAérgica no espinosa cuya actividad electrofisiológica y anatomía es reportada en el mismo trabajo (ver la figura 11 de la tercera sección). Esta interneurona mostró inmunoreactividad para parvalbúmina, proteína que une calcio. Es posible que esta interneurona realice contactos sinápticos de manera segregada y que divida a las neuronas espinosas medianas en dos grupos, donde uno de estos recibiría entradas GABAérgicas desde esta población interneuronal. Estos resultados pueden explicar los hallazgos de Nisenbaum y colaboradores (Nisenbaum *et al.*, 1988, 1992a, 1992b; Berger *et al.*, 1987) en los que, basados en el protocolo de pulso pareado, dividen a las neuronas espinosas medianas en dos subpoblaciones. En el patrón temporal a la estimulación ortodrómica durante la estimulación con pulsos pareados, las neuronas neostriatales se han dividido en dos grupos. Sólo uno de ellos muestra inhibición a corto tiempo por un segundo estímulo. La posibilidad de que la interneurona que dispara en ráfagas actúe como retroalimentación negativa puede explicar este comportamiento electrofisiológico: sólo aquellas neuronas innervadas por la interneurona GABAérgica podrían presentar inhibición a corto tiempo después de una estimulación cortical. A este respecto este trabajo da la primera evidencia fisiológica de la innervación diferencial de las interneuronas neostriatales.

Modulación presináptica de la neurotransmisión glutamatérgica.

En virtud de que la actividad sináptica inducida por la 4-AP puede ser separada farmacológicamente en sus componentes GABAérgico y glutamatérgico, se hizo posible el estudio de la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica producida por el agonista dopaminérgico (D_2), quinpirole. La dopamina actúa via dos grandes familias de receptores. A través de los receptores D_1 se ha mostrado que la dopamina modifica postsinápticamente la neurotransmisión por la alteración, entre otras acciones, de la resistencia de entrada membranal. Sin embargo, la acción de los receptores D_2 no es a través de mecanismos postsinápticos. El agonista específico D_2 , el quinpirole, no modifica la

resistencia de entrada de las neuronas espinosas estudiadas (resistencia somática: ver la figura 5 de la cuarta sección) en los valores cercanos al potencial de mantenimiento en el cual se realizaron los estudios (-80 mV), ni modifica la distribución de amplitudes de los potenciales sinápticos analizados en presencia o ausencia de quinpirole, lo que implica que no hay cambios de resistencia dendrítica (ver la figura de la cuarta sección). Con estos datos mostramos que la disminución en la aparición de potenciales sinápticos glutamatérgicos se debe a un efecto presináptico.

La activación de los receptores D_2 produce en sólo el 30 % de las neuronas espinosas estudiadas un decremento en la frecuencia de aparición de potenciales sinápticos espontáneos. En otra población el quinpirole no produjo disminución aparente de la actividad sináptica. Sin embargo, si se cuantifican exclusivamente los potenciales sinápticos de mayor amplitud (moviendo el discriminador de ventana para potenciales de más de 2 mV) se puede observar un decremento en su frecuencia de aparición que es revertida cuando se agrega sulpiride, antagonista específico D_2 . Estos resultados sugieren que no todos los botones sinápticos activados por la 4-AP presentan modulación dopaminérgica.

Para poder demostrar que la modulación de la actividad sináptica por la activación de receptores D_2 es por mecanismos presinápticos es necesario comprobar que la activación de los receptores D_2 por acción del quinpirole no causa efectos a nivel postsináptico. En esta tesis utilicé dos métodos presentados en la metodología para probarlo.

Con los dos métodos mostraron que el quinpirole no modifica las propiedades postsinápticas de las neuronas espinosas medianas, en los valores de potencial de membrana en los que mantuvo a las neuronas, lo que implica que el efecto modulador sobre la aparición de potenciales sinápticos glutamatérgicos inducidos por la 4-AP es presináptico.

En una serie de experimental encontramos que los agonistas de los receptores tipo D_1 no alteran la frecuencia de aparición de potenciales sinápticos inducidos por la 4-AP.

CONCLUSIONES

- 1.- En las neuronas espinosas medianas del neocórtex de la rata, con la técnica de rebanada sumergida y en condiciones basales, la frecuencia de aparición de potenciales sinápticos espontáneos registrada es baja.
- 2.- La 4-AP a dosis micromolares (10 - 100 μ M) produce un incremento de más del 100 % en la frecuencia de registro de potenciales sinápticos espontáneos.
- 3.- Los potenciales sinápticos inducidos por la 4-AP en las neuronas espinosas medianas es dependiente de sodio y de calcio.
- 4.- Los potenciales sinápticos inducidos por la 4-AP en las neuronas espinosas medianas son principalmente de tipo glutamatérgico.
- 5.- Los potenciales sinápticos inducidos por la 4-AP en las neuronas espinosas medianas son secundariamente de tipo glutamatérgico.
- 6.- Después de eliminar los potenciales sinápticos glutamatérgicos y GABAérgicos, mediante el uso de fármacos antagonistas específicos, no queda actividad sináptica de otro tipo.
- 7.- Alrededor del 50% de las neuronas espinosas medianas estudiadas recibe ráfagas de potenciales sinápticos GABAérgicos que por su patrón de frecuencia suponemos surgen de la interneurona mediana no espinosa (que contiene parvalbúmina).
- 8.- El empleo de antagonistas GABAérgicos permite la disección farmacológica de una población de potenciales sinápticos glutamatérgicos, que es eliminada por la acción conjunta de los antagonistas glutamatérgicos, CNQX y 2-APV.
- 9.- La dopamina modula presinápticamente al 30 % de las entradas glutamatérgicas a través de la activación de receptores tipo D_2 .

REFERENCIAS

- Acheson, G. H. (1948). "Physiology of neuro-muscular junctions: chemical aspects". *Fed. Proc.* 7:447-457.
- Agoston, D., Hargittai, P. y Nagy, A. (1983). "Effects of a 4-aminopyridine in calcium movements and changes of membrane potential in pinched-off nerve terminals from rat cerebral cortex". *J. Neurochem.*, 41:745-751.
- Akaike, A., Ohno, Y., Sasa, M. y Takao, S. (1987). "Excitatory and inhibitory effects of dopamine on neuronal activity of the caudate nucleus neurons in vitro". *Brain Res.*, 418:262-272.
- Akert, Pfenninger, Sandri y Moor, (1972). "Freeze etching and cytochemistry of vesicles and membran complexes in synaptosomes of the central nervous system". En "Structure and function of synapses". Pappas, G. y D. Purpuracs, Raven Press, New York.
- Alexander, G. E. y Crutcher, M. D. (1990a). "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing". *TINS*, 13:266-271.
- Alexander, G. E., Crutcher, M. D. y DeLong, M. R. (1990b) "Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, 'prefrontal' and 'limbic' functions". *Prog. Brain Res.*, 85:119-146.
- Alexander, G. E., De Long, M. R. y Strick, P. L. (1986). "Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex". *Ann. Rev. Neurosci.*, 9:357-381.
- Anderson, C. R. y Stevens, C. F. (1973). "Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate currents fluctuations at frog neuromuscular junctions". *J. Physiol.* 235:655-691.
- Anderson, P. H., Gingrich, J. A. Bates, M. D., Deary, A., Falardeau, P., Senogles, S. E. y Caron, M. G. (1990). "Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification". *TIPS*, 11:231-236.
- Arancio, O., Korn, H., Gulyas, A., Freund, T. y Miles, R. "Excitatory synaptic connections onto rat hippocampal inhibitory cells may involve a single transmitter release". *J. Physiol.*, 481:396-405.
- Ariano, M. A., Monsma, F. J. Jr., Barton, A. C., Kang, H. C. Haugland, R. P. y Sibley, D. R. (1989). "Direct visualization and cellular localization of D1 and D2 dopamine receptors in rat forebrain by use of fluorescent ligands" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86:8570-8574.
- Arikuni, T. y Kubota, K. (1986). "The organization of prefrontocaudate projection and their laminar origin in the macaque monkey: a retrograde study using HRP gel". *J. Comp. Neurol.*, 244:429-510.
- Arluisson, M. y DeLa Manche, I. S. (1980). "High-resolution radioautographic study of the serotonin innervation of the rat corpus striatum after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine". *Neuroscience*, 5:229-240.
- Armstrong, D. M., Saper, C. B., Levey, A. I., Wainer, B. H. y Terry, R. D. (1983). "Distribution of cholinergic neurons in rat brain: Demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase". *J. Comp. Neurol.*, 216:53-68.
- Aronin, N., Chase, K. y DiFligia, M. (1986). "Glutamic acid decarboxylase and enkephalin immunoreactive axon terminals in the rat neostriatum synapse with striatonigral neurons". *Brain Res.*, 365:151-158.
- Arzate, M. E., Morán, J. y Pasantes-Morales, H. (1986). "Inhibitory effects of taurine on 4-aminopyridine-stimulated release of labelled dopamine from striatal synaptosomes". *Neuropharmacol.*, 25:689-694.
- Augustine, G. J., Charlton, M. P. y Smith, S. J. (1987). "Calcium action in synaptic transmitter release". *Ann. Rev. Neurosci.*, 10:633-698.
- Ballivet, M., Nef, P., Couturier, S., Rungger, D., Bader, C. R., Bertrand, D. y Cooper, E. (1988). "Electrophysiology of a chick neuronal nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus* oocytes after cDNA injection". *Neuron*, 1:847-852.
- Bargas, J., Galarraga E. y Aceves, J. (1991a). "Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings". *Brain Res.*, 539:159-163.
- Bargas, J., Surmeier, D. J. y Kitai, S. T. (1991b). "High-voltage and low-voltage activated calcium currents are expressed by neurons cultured from embryonic rat striatum". *Brain Res.* 541:70-74.
- Bargas, J., Galarraga E. y Aceves, J. (1988). "Electrotonic properties of neostriatal neurons are modulated by extracellular potassium". *Exp. Brain Res.*, 72:390-398.
- Barker, J. L., McBurney, R. N. y MacDonald, J. F. (1982). "Fluctuations analysis of neural amino acid responses in cultured mouse spinal neurones". *J. Physiol.*, 322:365-387.
- Bean, B. P. (1992). "Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels". *TIPS*, 13:87-90.
- Beckstead, R. M. (1988). "Association of dopamine D₁ and D₂ receptors with specific cellular elements in basal ganglia of the cat: the uneven topography of dopamine receptors in the striatum is determined by intrinsic striatal cells, not nigrostriatal axons". *Neuroscience*, 27:951-853.
- Beckstead, R. M., Wooten, G. F. y Trugman, J. M. (1988). "Distribution of D₁ and D₂ dopamine receptors in the basal ganglia of the cat determined by quantitative autoradiography". *J. Comp. Neurol.*, 268:131-143.

- Beckstead, R. M. y Cruz, C. J. (1986). "Striatal axons to the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra come mainly from separate cell populations in cat". *Neuroscience*, 19:147-158.
- Beckstead, R. M. (1984a). "A projection to the striatum from the medial subdivision of the posterior group of the thalamus in the cat" *Brain Res.* 300:351-356.
- Beckstead, R. M. (1984b). "The thalamostriatal projection in the cat". *J. Comp. Neurol.* 223:313-346.
- Bekkers, J. M., Richerson, G. B. y Stevens, C. F. (1990). "Origin of variability in quantal size in cultured hippocampal slices". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87:5359-5362.
- Bekkers, J. M. (1994) "Quantal analysis of synaptic transmission in the central nervous system". *Curr. Op. Neurobiol.*, 4:360-365.
- Benham, C. D. y Tsien, R. W. (1987). "A novel receptor-operated Ca²⁺-permeable channel activated by ATP in smooth muscle". *Nature*. 328:275-278.
- Bennet, M. V. L. y Goodenough, D. A. (1978). "Gap junctions, electrotonic coupling and intercellular communication", *Neurosci. Res. Bull.*, 16.
- Bentivoglio M., Van der Kooy D. y Kuypers, H. G. J. M. (1979). "The organization of the efferent projection of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labeling study". *Brain Res.*, 174:1-17.
- Berger, T. W., Nisenbaum, E. S., Stricker, E. M. y Zigmond M. J. (1987). "Evidence for two functionally distinct subpopulations of neurons within striatum and their differential sensitivity to dopamine". En "Neurophysiology of dopaminergic systems. Current status and clinical perspectives". Chiodo, L. A. y Freedman A. S. eds. *Lakeshore publishing company*, pp 253-284.
- Bernardi, G., Calabresi, P., Mercuri, N. y Stanzione, P. (1984). "Dopamine decreases the amplitude of excitatory post-synaptic potentials in rat striatal neurons". En *Advances in behavioral biology*. Vol. 27. J. S. McKenzi, R. W. Kemen y L. N. Wilcock. eds. *Plenum Press*, New York. pp.161-171.
- Bernath, S. y Zigmond, M. J. (1989). "Dopamine may influence striatal GABA release via three separate mechanisms". *Brain Res.*, 476:373-376.
- Besson, M. J., M. L. Kemel, C. D. Gauchy y Glowinski, J. (1982). "Bilateral asymmetrical changes in the nigral release of 3HGABA induced by application of acetylcholine in cat caudate nucleus". *Brain Res.*, 241:241-248.
- Besson, M. J., Graybiel, A. M. y Quin B. (1991). "Coexpression of neuropeptides and glutamic acid decarboxylase in cat striatal neurons: Dependence striosomal compartmentation". En "The basal ganglia III" editado por Bernardy, G., Carpenter, M. B., Di Chiara, G., Morelli, M. y Stanzione, P. *Advances in behavioral biology*, Vol. 39:29-38.
- Bodian. (1972). "Synaptic diversity and characterization by electron microscopy". En *Structure and function of synapses*. Pappas G. D. y D. Purpura, eds. *Raven Press*, New York, pp 45-65.
- Bolam, J. P., Ingham, C. A., Izzo, P. N., Levy, A. I., Rye, D. B., Smith A. D. y Wainer, B. H. (1986). "Substance P-containing terminals in synaptic contact with cholinergic neurons in the neostriatum and basal forebrain. A double immunocytochemical study in the rat". *Brain Res.*, 397:279-289.
- Bormann, J., Hamill, O. P. y Sakmann B. (1987). "Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and g-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons". *J. Physiol., (Lond)*, 385:243-286.
- Bouyer, J. J., Park, D. H. Joh, T. H. y Pickel, V. M. (1984). "Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum". *Brain Res.* 302:267-275.
- Bovier, P., C. Broekkamp y Lloid K. (1982). "Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats by electrical stimulation of periaqueductal gray region", *Brain Res.*, 248:313-320.
- Brink. 1954. "The role of calcium ions in neural processes". *Pharmacol. Rev.*, 6:243-299.
- Brooks, V. B. (1986). "The basal ganglia". En "The neural basis of motor control". *Oxford. University Press*, N. T. pp 290-315.
- Brosius, D. C., Hackett, J. T., y Tuttle, J. B. A. (1992). "Ca²⁺-independent and Ca²⁺-dependent stimulations of quantal neurosecretion in avian ciliary ganglion neurons". *J. of Neurophysiol.*, 68:1229-1234.
- Brown, A. G. y Fyfe, R. E. (1981). "Direct observations on the contacts made between Ia afferents fibers and α -motoneurons in the cat's lumbosacral cord". *J. Physiol.*, 313:121-140.
- Brown, D. A. y Schofield, C. N. (1979). "Depolarization of neurones in the isolated olfactory cortex of the guinea-pig by γ -aminobutyric acid". *Br. J. Pharmacol.*, 65:339-345.
- Burgard, E. C. y Hablitz, J. J. (1993). "NMDA receptor-mediated components of miniature excitatory synaptic currents in developing rat neocortex". *J. Neurophysiol.* 70:1841-1952.
- Burke, R. E., Walmsley, B. y Hodgson, J. A. (1979). "HRP anatomy of group Ia afferent contacts on alpha motoneurons". *Brain Res.*, 156:347-352.
- Busch, C. y Sakmann, B. (1990). "Synaptic transmission in hippocampal neurons: numerical reconstruction of quantal IPSCs". *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 55:69-80.

- Calabresi, P., Mercuri, N., Stanzione, P., Stefani, A. y Bernardi, G. (1987a). "Intracellular studies on the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons in vitro: Evidence for D₁ receptor involvement". *Neuroscience*, 20:757-771.
- Calabresi, P., Misgeld, U. y Dodt, H. U. (1987b). "Intrinsic membrane properties of neostriatal neurons can account for their low level of spontaneous activity". *Neuroscience*, 20:293-303.
- Calabresi, P., Benedetti, M., Mercuri, N. B. y Bernardi, G. (1988a). "Depletion of catecholamines reveals inhibitory effects of bromocryptine and lysuride on neostriatal neurones recorded intracellularly in vitro". *Neuropharmacology*, 27:579-587.
- Calabresi, P., Benedetti, M., Mercuri, N. B. y Bernardi, G. (1988b). "Endogenous dopamine and dopaminergic agonists modulate synaptic excitation in neostriatum: Intracellular studies from naive and catecholamine-depleted rats". *Neuroscience*, 27:145-157.
- Calabresi, P., Mercuri, N. B., Stefani, A. y Bernardi, G. (1990). "Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons. I. An in vivo analysis". *J. Neurophysiol.*, 63:651-662
- Calabresi, P., Mercuri, N. B. y Bernardi, G. (1990). "Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons. II. An in vitro analysis". *J. Neurophysiol.*, 63:663-675.
- Calabresi, P., De Murtas, M., Mercuri, N. B. y Bernardi, G. (1992). "Chronic neuroleptic treatment: D2 dopamine receptor supersensitivity and striatal glutamatergic transmission". *Annals of Neurology*, 31:366-372.
- Calabresi, P., Mercuri, N. B. y Bernardi, G. (1991).
- Calabresi, P., Mercuri, N. B., De Murtas, M., Stefani, A. y Bernardi, G. 199xxx. "Spontaneous depolarizing synaptic potentials in the neostriatum". En "The Basal Ganglia III. Editado por Bernardi, G. et al. Plenum press, New York. p 239-247.
- Calas, A., Besson, M. J., Gauchy, C. Alonso, G., Glowinsky, J. y Cheramy, A. (1976). "A radioautographic study of in vivo incorporation of 3H-monoamines in the cat caudate nucleus: identification of serotonergic fibers". *Brain Res.* 118:1-13.
- Campbell, D. L., Qu, Y., Rasmusson, R. L. y Strauss, H. C. (1993). "The calcium independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes II. Closed state reverse use-dependent block by 4-AP". *J. of Gen. Physiol.*, 101:603-626.
- Carlson, C. G., Kriebel, M. E. y Muniak, C. G. (1982). "The effect of temperature on the amplitude distributions of miniature endplate potentials in the mouse diaphragm". *Neuroscience* 7:2537-2549.
- Cepeda, C., Buchwald, N. A. y Levine, M. S. (1992a). "Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:9576-9580.
- Cepeda, C., Lee, N., Buchwald, N. A., Radisavljevic, Z. y Levine, M. S. (1992b). "Age-induced changes in electrophysiological responses of neostriatal neurons recorded in vitro". *Neuroscience*, 51:411-423.
- Cepeda, C., Radisavljevic, Z., Peacock, W., Levine, M. S. y Buchwald, N. A. (1992c). "Differential modulation by dopamine of responses evoked by excitatory amino acids in human cortex". *Synapse*, 11:330-341.
- Chang, H. T., Wilson, C. J., y Kitai, S. T. (1981). "Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: A light and electron microscopic study". *Science*, 213:915-918.
- Chang, H. T., Wilson, C. J., y Kitai, S. T. (1982). "A Golgi study of rat neostriatal neurons: Light microscopic analysis". *J. Comp. Neurol.*, 208: 107-126.
- Cherubini, E., Herrling, P. L., Lanfumey, I. y Stanzione, P. (1988). "Excitatory amino acids in synaptic excitation of rat striatal neurones in vitro". *J. Physiol.*, 400:677-690.
- Chevalier G., Vacher S. y Deniau J. M. (1984). "Inhibitory nigral influence on tectospinal neurons, a possible implication of basal ganglia in orienting behaviour". *Exp. Brain Res.*, 53:320-326.
- Chevalier G., Vacher, S. Deniau, J. M. y Desban M. (1985). "Desinhibition as a basic process in the expression of the functions. I The striatonigral influence on tectospinal and tectodiencephalic neurons". *Brain Res.*, 334:215-226.
- Chevalier, G. y Deniau, J. M. (1990). "Desinhibition as a basic process in the expression of the striatal functions". *TINS.*, 13:277-280.
- Chiodo, L. A. y Berger, T. W. (1986). "Interactions between dopamine and amino acid-induced excitation and inhibition in the striatum". *Brain Res.*, 375:198-203.
- Civelli, O., Bunzow, J. R., Grandy, D. K., Zhou, Q. Y. y Van Tol, H. H. M. (1991). "Molecular biology of the dopamine receptor". *Eur. J. Pharmacol.*, 207:277-286.
- Cohen, G. A., Doze, V. A. y Madison, D. V. (1992). "Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons". *Neuron*, 8:325-335.
- Collingridge, G. L., Gage, P. W. y Robertson, B. (1984). "Inhibitory post-synaptic currents in rat hippocampal CA₁ neurones". *J. Physiol.*, 356:551-564.

- Consolo, S., Girotti, P., Zambelli, M., Benzi, M. y Bertorelli, R. (1993). "D1 y D2 dopamine receptors and the regulation of striatal acetylcholine release in vivo". *Progress in Brain Res.*, 98:201-207
- Cuello, A. C. y Sofroniew, M. V. (1984). "The anatomy of the CNS cholinergic neurons". *TINS.*, 7:74-78.
- Cull-Candy, S. G. y Miledi, R. (1981). "Junctional and extra-junctional membrane channels activated by GABA in locust muscle fibers". *Proc. Roy. Soc. B*, 211:527-535.
- Cutting, G. R., Lu, L., O'Hara, B. F., Kasch, L. M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D. M., Shimada, S., Antonarakis, S. E., Guggino, W. B., Uhl, G. R. Kazazian, H. H. Jr. (1991). "Cloning of the g-aminobutyric acid (GABA)_{ρ1} cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in the retina". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88, 2673-2677.
- De Koninck, Y. y Mody, I. (1994). "Noise analysis of miniature IPSCs in adult rat brain slices: properties and modulation of synaptic GABA_A receptor channels". *J. Neurophysiol.*, 71:1318-1335.
- Del Castillo J. y Katz, B. (1954). "Quantal components of the end-plate potential". *J. Physiol.*, 124:560-573.
- Del Castillo J. y Katz, B. (1955). "On the localization of acetylcholine receptors". *J. Physiol.*, 128:157-181.
- Delgado, J. M. R. (1979). "Inhibitory functions in the neostriatum". En "The neostriatum". Divac, J. y Öberg, R. G. E. Eds. *Pergamon press*, pp. 241-247.
- DeLong, M. R. (1990). "Primate models of movements disorders of basal ganglia origin". *TINS.*, 13:281-285.
- Deniau, J. M. y Chevalier, G. (1985). "Desinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. II The striatonigral influence on thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus". *Brain Res.*, 334:227-233.
- Desban, M., Gauchy, C., Kemel, M. L. Besson, M. J. y Glowinsky, J. (1989). "Three-dimensional organization of the striosomal compartment and patchy distribution of striatonigral projections in the matrix of the cat caudate nucleus". *Neuroscience*, 29:551-566.
- DiFligia, M., Pasik, P., y Pasik, T. (1976). "A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys". *Brain Res.*, 114:245-256.
- DiFligia, M., Pasik, T., y Pasik, P. (1978). "A Golgi study of afferent fibers in the neostriatum monkeys". *Brain Res.*, 152:341-347.
- Divac, I. (1983). "Two levels of functional heterogeneity of the neostriatum". *Neuroscience*, 10:1151-1155.
- Dolezal, V. y Wecker, L. (1991). "Modulation of acetylcholine release from rat striatal slices: interaction between 4-aminopyridine and atropine". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258:762-766.
- Donoghue, J. P. y Herkenham, M. (1986). "Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat". *Brain Res.*, 365:397-403.
- Douglas, W.W. y Nemeth, E. R. (1982). "On the calcium receptor activating exocytosis: inhibitory effects of calmodulin interacting drug on rat mast cells". *J. Physiol.*, 323:229-244.
- Drewe, J. A. Childs, G. V. y Kunze, D. L. (1988). "Synaptic transmission between dissociated adult mammalian neurons and attached synaptic boutons". *Science*, 241:1810-1913.
- Dudel, J., Finger, W. y Stettmeier, H. (1980). "Inhibitory synaptic channels activated by g-aminobutyric acid (GABA) in crayfish muscle". *Pflügers Arch.*, 387:143-151.
- Edwards, F. A., Gibb, A. J. y Colquhoun, D. (1992). "ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system". *Nature*, 359:144-147.
- Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B. (1990). "Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch clamp study". *J. Physiol.*, 430:213-249.
- Edwards, F. A. (1994). "ATP receptors". *Curr. Op. Neurol.* 4:347-351.
- Fagg, G. E. y Massieu, L. (1991). "Excitatory aminoacid receptor subtypes". En: "Frontiers in pharmacology and therapeutics. Excitatory Aminoacid Antagonists". Ed. B. S. Meldrum. *Blackwell Scientific Publications*, p39-63.
- Fatt, P. y Katz, B. 1950. "Some observations on biological noise". *Nature*, 166:597-598.
- Fatt, P. y Katz, B. 1951. "An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode". *J. Physiol.*, 115:320-370.
- Fatt, P. y Katz, B. 1952. "Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings". *J. Physiol.*, 117:109-128.
- Faull, R. L. M. y Melher, W. R. (1978). "The cells of origin of nigrotectal, nigrotalamic and nigrostriatal projections in the rat". *Neuroscience*, 3:989-1002.
- Feigenspan, A. y Bormann, J. (1994). "Modulation of GABA_A receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C". *J. Physiol.*, 481:325-330.
- Finch, D. M., Fisher, R. S. y Jackson, M. B. (1990). "Miniature excitatory synaptic currents in cultured hippocampal neurons". *Brain Res.* 518:257-268.
- Kinkel, A. y Redman, S. J. (1983). "The synaptic current evoked in cat spinal motoneurons by impulses in single group Ia axons". *J. Physiol. Lond.* 342:615-632.

- Faber, D. S. Young, W. S., Legendre, P. y Korn H. (1992). "Intrinsic quantal variability due to stochastic properties of receptor-transmitter interactions". *Science*, 258:1494-1498.
- Fisher, R. S., Buchwald, N. A., Hull, C. D. Levine, M. S. (1986). "The GABAergic striatonigral neurons of the cat: demonstration by double peroxidase labeling". *Brain Res.* 398:148-156.
- Floran, B., Aceves, J., Sierra, A. y Martínez-Fong, D. (1990). "Activation of D₁ receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat". *Neurosci. Lett.*, 116:136-140.
- Flores-Hernández, J., Pineda, J. C. Galarraga, E. y Bargas, J. (1993). "Revisión de los mecanismos de acción de la 4-aminopiridina a la luz de un tipo de conductancias descubiertas recientemente". *Rev. Biomed.*, 4:141-151.
- Flores-Hernández, J., Galarraga, E., Pineda, J. C. y Bargas, J. (1994). "Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP". *J. Neurophysiol.*, 72:2246-2256.
- Forsythe, I. D. (1994). "Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro". *J. Physiol.* 479:381-387.
- Fox, C. A. Andrade, A. N., Hillman, D. E. y Schwyn, R. C. (1971). "The spiny neurons in the primate striatum. A Golgi study and electron microscopy". *J. Hirnforsch.* 13:181-201.
- Fragoso-Veloz, J y Tapia R. (1992). "NMDA receptor antagonists protect against seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine". *Eur. J. Pharmacol.*, 221:275-280.
- Frankenhaeuser, B. y Hodgkin, A. L. 1957, "The action of calcium on the electrical properties of squid axons". *J. Physiol.*, 137:218-244.
- Freund, T. F., Powell, J. F. y Smith, A. D. (1984). "Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines". *Neuroscience*, 13:1189-1215.
- Galarraga, E., Bargas, J., Martínez-Fong, D y Aceves, J. (1987). "Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons". *Neurosci. Lett.*, 81:351-355.
- Galarraga, E., Bargas, J., Sierra, A. y Aceves, J. (1989). "The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons". *Exp Brain Res.*, 75:157-168.
- Galarraga, E., Bargas, J. Chang, H. T. (1990). "Propiedades electrofisiológicas de una neurona "mediana sin espinas" del neostriado". *Rev. Biomed.*, 1:196-210.
- Galarraga, E., Pacheco-Cano, M. T., Flores-Hernández, J. V. y Bargas, J. (1994). "Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons". *Exp. Brain Res.*, 100:239-249.
- García-Muñoz, M., Patiño, A. J. Wright y Arbuthnott, G. W. (1983), "The anatomical substrate of the turning behaviour seen after lesions in the nigrostriatal dopamine system", *Neuroscience*, 8:87-95.
- García-Muñoz, M., Young, S. J. y Groves, P. M. (1991). "Terminal excitability of the corticostriatal pathway. I. Regulation by dopamine receptor stimulation". *Brain Res.*, 551:195-206.
- García-Muñoz, M., Young, S. J., Patiño, P. y Groves, P. M. (1994). "Long lasting changes in excitability of corticostriatal terminals following tetanic stimulation". En "Basal ganglia IV" editado por Percheron et al, Plenum Press, New York. pp:245-254.
- Gardner, D. y Stevens, C. F. (1980). "Rate limiting step of inhibitory post-synaptic current decay in Aplysia buccal ganglia". *J. Physiol.*, 304:145-164.
- Gauchy C., M. L. Kemel, R. Romo, A. Cheramy, J. Glowinsky y Besson, M. J. (1983). "Effects of nigral application of muscimol on release of 3HGABA and multiunit activity in various cat thalamic nuclei". *Neuroscience*, 10:781-788.
- Gerfen, C., W. Staines, G. W. Arbuthnott y Fibiger, H. C. (1982). "Crossed connections of the rat substantia nigra" *J. Comp. Neurology*, 207:283-303.
- Gerfen, C. R. (1984). "The neostriatal mosaic: Compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems". *Nature* 311:461-464.
- Gerfen, C. R. (1990) "The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination". *Science*, 246:385-388.
- Gerfen, C. R. (1992). "The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization". *TINS*, 15:133-139.
- Gerfen, C. R. (1992). "D1 and D2 dopamine receptor regulation of striatonigral and striatopallidal neurons". *Seminars in the Neurosciences*, 4:109-118.
- Gold, M. R. y Martin, A. R. (1983). "Analysis of glycine-activated inhibitory postsynaptic channels in brain-stem neurones of the lamprey". *J. Physiol.*, 342:99-117.
- González-Burgos, G. R., Bial, F. I., Cherksey, B. D., Sugimori, M., Llinás, R. R. y Uchitel, O. D. (1995). "Different calcium channels mediate transmitter release evoked by transient or sustained depolarization at mammalian sympathetic ganglia". *Neuroscience*, 64:117-123.
- Graveland, G. A. y Di Figlia, M. (1985). "The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum". *Brain Res.*, 327:307-311.
- Graybiel, A. M. (1990). "Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia". *TINS*, 13:244-254.

- Graybiel, A. M. y Ragsdale, C. W. (1978). "Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey and cat demonstrated by acetylcholinesterase staining". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75:198-202.
- Graybiel, A. M., Ragsdale, C. W., Yoneoka, E. S. y Elde, R. P. (1981). "An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining". *Neuroscience* 6: 377-397.
- Graybiel, A. M. (1990). "Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia". *TINS*, 13:244-253.
- Graybiel, A. M., Flaherty, A. W. y Giménez-Amaya, J. M. (1991). "Striosomas and matrixomas", En "The basal ganglia III" editado por Bernardy, G., Carpenter, M. B., Di Chiara, G., Morelli, M. y Stanzione, P. *Advances in behavioral biology*, Vol. 39:3-12.
- Grofová, I. (1975). "The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase". *Brain Res.* 91:286-291.
- Groves, P. M., Martone, M. E., Young S. J. y Armstrong, D. M. (1988). "Three-dimensional pattern of enkephalin-like immunoreactivity in the caudate nucleus of the cat". *J. Neurosci.*, 8:892-900.
- Groves, P. M., Garcia-Muñoz, M., Linder, J. C., Manles, M. S., Martone, M. E. y Young S. J. (1995). "Elements of the intrinsic organization and information processing in the neostriatum". En "Models of information processing in the basal ganglia". Houk, J. C., Davis, J. L. y Beiser, D. G. Eds., MIT Press, Cambridge, pp 51-95.
- Häusser, M. A. y Yung, W. H. (1994). "Inhibitory synaptic potentials in guinea-pig substantia nigra dopamine neurones in vitro". *J. Physiol.*, 479:401-422.
- Hemmings Jr, H. C., Walaas, S. I., Onimet, C. C. y Greengard, P. (1987). "Dopaminergic regulation of protein phosphorylation in the striatum: DARP-32". *TINS*, 2:377-383.
- Heemskerk, F. M. J., Schrama, L. H., Gianotti, C., Spierenburg, H., Versteeg, D. H. G., De Graan, P. N. E. y Gispen W. H. (1990). "4-Aminopyridine stimulates B-50 (GAP43) phosphorylation and [3H]noradrenaline release in rat hippocampal slices". *J. Neurochem.*, 54:863-869.
- Heemskerk, F. M. J., Schrama, L. H., Ghijzen, W. E. J. M., De Graan, P. N. E., Lopez da Silva, F. H. y Gispen W. H. (1991). "Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: Changes in intracellular free Ca²⁺ and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation". *J. Neurochem.*, 56:1827-1835.
- Herkenham, M. y Pert, C. B., (1981), "Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum", *Nature* 291:415-418.
- Herrera-Marschitz, M., T. Hokfelt, U. Ungerstedt, L. Terenius y Goldstein, M. (1984). "Effect on intranigral injections of dynorphin, dynorphin fragments and a-neoendorphin on rotational behaviour in the rat". *European J. Pharmacol.*, 102:213-227.
- Herrling, P. L. (1985). "Pharmacology of the corticocaudate excitatory postsynaptic potential in the cat: evidence for its mediation by quisqualate- or kainate-receptors". *Neuroscience*, 14:417-426.
- Heuser, J. E., Reese, T. S., Dennis, M. J., Jan, Y., Jan, L. y Evans, L. (1979). "Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release". *J. Cell. Biol.*, 81:275-300.
- Hille, B. (1992). "Ionic channels of excitable membranes". 2a. Ed. Sinauer, Mass.
- Hirsch, E. C., Graybiel, A. M., Hersh, L. B., Duyckaerts, C. y Agid Y. (1989). "Striosomes and extra-striosomal matrix contain different amounts of immunoreactive choline acetyltransferase in the human striatum". *Neurosci. Lett.*, 96:145-150.
- Hodgkin, A. L. y Keynes, R. D. 1957. "Movements of labelled calcium in squid giant axons", *J. Physiol.*, 138:253-281.
- Hokfelt, T. (1991). "Neuropeptides in perspective- The last ten years". *Neuron* 7, 867-879.
- Hong, S. J. y Chang, C. C. (1990). "Facilitation by 3,4-diaminopyridine of regenerative acetylcholine release from mouse motor nerve" *Br. J. Pharmacol.*, 101:793-798.
- Hoover, J. E. y Strick, P. L. (1993). "Multiple output channels in the basal ganglia". *Science*, 259:819-821.
- Horikawa, A. y Armstrong, W. E. (1988). "A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates". *J. Neurosci. Meth.*, 25:1-11.
- Hosokawa, Y., Sciancalepore, M., Stratta, F., Martina, M. y Cherubini, E. (1994). "Developmental changes in spontaneous GABA_A-mediated synaptic events in rat hippocampal CA3 neurons". *Eur. J. of Neurosci.*, 6:805-813.
- Hu, X. T. y Wang, R. Y. (1988). "Comparison of effects of D-1 and D-2 dopamine receptor agonists on neurons in the rat caudate-putamen: An electrophysiological study". *J. Neurosci.*, 8:4340-4348.
- Iwasaki, S. y Florey, E. (1969). "Inhibitory miniature potentials in the stretch receptor neurons of the crayfish". *J. Gen. Physiol.* 53:666-682.
- Jack, J. J. B., Noble, D. y Tsien, R. W. (1975). "Electric current flow in excitable cells". Oxford Science Publications" London p: 226.

- Jackson, M. B., Lecar, H., Mathers, D. A. y Barker, J. L. (1982). "Single channel currents activated by γ -aminobutyric acid, muscimol and (-)-pentobarbital in cultured mouse spinal neurons". *J. Neurosci.*, 2:889-894.
- Jaeger, D., Kita, H. y Wilson, C. J. (1994). "Surround inhibition among projection neurons is weak or nonexistent in the rat neostriatum". *J. Neurophysiology*, 72:2555-2558.
- James T. A. y Massey, S. (1978). "Evidence for a possible Dopaminergic link in the action of acetylcholine in the rat substantia nigra". *Neurpharmacology*, 17:687-690.
- James, T. A. y Starr, M. S. (1979). "Effects of substantia P injected into the substantia nigra". *J. Pharmac.*, 65:423-439.
- James, T. A. y Collindridge, G. L. (1979). "Rapid behavioural and biochemical effects of tetanus toxin microinjected into the substantia nigra: A dual role for GABA". *Neurosci. Lett.*, 11:205-208.
- Jarvie, K. R. y Caron, M. G. (1993). "Heterogeneity of dopamine receptors". *Advances in Neurology*, 60:325-333.
- Jayaraman, A. (1980). "Anatomical evidence for cortical projections from the striatum in the cat". *Brain Res.*, 195:29-36.
- Jiang, Z. G. y North, R. A. (1991). "Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro". *J. of Physiol.*, 443:533-553.
- Jiménez-Castellanos, J. y Graybiel, A. M. (1989). "Compartmental origins of striatal efferent projections in the cat". *Neuroscience*, 32:297-321.
- Jones, E. G., Coulter, J. D. Burton, H. y Porter, R. 1977. "Cells of origin and terminal distribution of corticostriatal fibres arising in the sensory-motor cortex of monkeys". *J. Comp. Neurol.*, 173:53-80.
- Kandel, E. (1991a). "Nerve cells and behaviour". En "Principles of neural science". Kandel, E. R., Schwartz, J.H. y Jessell, T. M. eds. Elsevier 3a. Ed. New York. pp 18-32.
- Kandel, E. R., Schwartz, J.H. (1991b). "Directly gated transmission at central synapses". En "Principles of neural science" editado por Kandel, E. R., Schwartz, J.H. y Jessell, T. M. Elsevier 3a. Ed. New York. pp:152-172.
- Kandel, E. R., Siegelmann, S. A. y Schwartz, J. H. 1991c. "Synaptic Transmission". En "Principles of neural science". Kandel, E. R., Schwartz, J.H. y Jessell, T. M. eds. Elsevier 3a. Ed. New York. pp 123-134.
- Katz B. y Miledi, R. (1967). "The timing of calcium action during neuromuscular transmission". *J. Physiol.*, 189:535-544.
- Katz B. y Miledi, R. (1968). "The role of calcium in neuromuscular facilitation". *J. Physiol.*, 195:481-492.
- Katz B. y Miledi, R. (1972). "The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components". *J. Physiol.*, 224:665-699.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J. y Emson, P. C. (1989). "Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs". *J. Neurophysiol.*, 62:1052-1068.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J. y Emson, P. C. (1990). "Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin". *J. Neurosci.*, 10:3421-3438.
- Kawaguchi, Y. (1993). "Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in the rat striatum". *The J. of Physiol.*, 13:4908-4923.
- Keibarian, J. W. y Calne D. B. (1979). "Multiple receptors for dopamine". *Nature*, 277:93-96.
- Kemel, M. L., Desban, M., Glowinsky, J. y Gauchy, C. (1992). "Functional heterogeneity of the matrix compartment in the cat nucleus as demonstrated by the cholinergic presynaptic regulation of dopamine release". *Neuroscience*, 50:597-610.
- Kemp, J. M. y Powell, T. P. S. 1971. "The termination of fibres from the cerebral cortex and thalamus upon dendritic spines in the caudate nucleus: A study with the Golgi method". *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 262:429-439.
- Kilpatrick, I. C., y Starr, M. S. (1981). "Involvement of dopamine in circling responses to muscimol depends on intranigral site of injection". *European J. of Pharmacol.*, 69:407-419.
- Kimura, M. (1990). "Behaviorally contingent property of movement-related activity of the primate putamen". *J. Neurophysiol.*, 63:1277-1296.
- Kimura, M., Rajowski, J. y Evarts, E. (1984). "Tonically discharging putamen neurons exhibit set dependent responses". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:4998-5001
- Kimura, M. (1986). "The role of primate putamen neurons in the association of sensory stimuli with movement". *Neurosci. Res.*, 3:436-443.
- Kita, T., Kita, H. y Kitai, S. T. (1984). "Passive electrical membrane properties of neostriatal neurons in an in vitro slice preparation". *Brain Res.*, 300:129-139.
- Kita, T., Kita, H. y Kitai, S. T. (1985a). "Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation". *Brain Res.*, 361:10-18.
- Kita, H., Kita, T. y Kitai, S. T. (1985a). "Active membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation". *Exp. Brain Res.*, 60:54-62.

- Kita, T., Kita, H. y Kitai, S. T. (1985b). "Local stimulation induced GABAergic response in rat striatal slice preparations: Intracellular recordings on QX-314 injected neurons". *Brain Res.* 360:304-310.
- Kita, H., Kita, T. y Kitai, S. T. (1985c). "Regenerative potentials in rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation". *Exp. Brain Res.* 60:63-70.
- Kita, H., Kosaka, T. y Heizmann, C. W. (1990). "Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study". *Brain Res.* 536:1-15.
- Kitai, S. T., Kocsis J. D. y Wood, J. (1976). "Origin and characteristics of the cortico-caudate afferents: an anatomical and electrophysiological study". *Brain Res.* 118:137-141.
- Kita, H. y Kitai, S. T. (1988). "Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in the cat neostriatum. Their morphological types and populations". *Brain Res.* 447:346-352.
- Kitai, T. S. y Surmeier, D. J. (1993). "Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons". *Adv. in Neurol.* 60:40-52.
- Klapstein, G. J. y Colmers, W. F. (1992). "4-aminopyridine and low Ca²⁺ differentiate presynaptic inhibition mediated by neuropeptide Y, baclofen and 2-chloroadenosine in rat hippocampal CA1 in vitro". *Br. J. Pharmacol.* 105:470-474.
- Klee, M. R., Misgeld, U. y Zeise, M. L. (1981). "Pharmacological differences between CA3 and dentate granule cells in hippocampal slices". En "Advances in physiological sciences, vol. 36. Cellular analogues of conditioning and neural plasticity". Fehér, O. y Job F., eds. Pergamon Press, Oxford y Akadémiai Kiadó, budapest. pp 145-154.
- Korn, H. y Faber, D. S. (1990) "Transmission at a central inhibitory synapse IV. Quantal structure of synaptic noise". *J. Neurophysiol.* 63:198-222.
- Kraszewski, K. y Grantyn, R. (1992). "Unitary, quantal and miniature GABA-activated synaptic chloride currents in cultured neurons from the rat superior colliculus". *Neuroscience*, 47:555-570.
- Kriebel, M., Vautrin, J. y Holsapple, J. (1990). "Transmitter release: prepackaging and random mechanism or dynamic and deterministic process". *Brain Res. Rev.* 15:167-178.
- Kubota, Y., Mikawa, S. y Kawaguchi, Y. (1993). "Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calcitonin or parvalbumin". *Neuroreport*, 5:205-208.
- Kuffler, S. W. y Yoshikami, D. (1975). "The number of transmitters molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse". *J. Physiol.* 251:465-482.
- Larkman, A., Stratford, K. y Jack, J. (1991). "Quantal analysis of excitatory synaptic action and depression in hippocampal slices". *Nature*, 350:344-347.
- Laursen, A. M. 1963. "Corpus striatum". *Acta Physiol. Scand.* 59(Suppl. 211):1-103.
- Lavidis, N. A. y Bennet, M. R. (1992). "Probabilistic secretion of quanta from visualized sympathetic nerve varicosities in mouse vas deferens". *J. of Physiol.* 454:9-26.
- Lehntan, J. y Langer, S. Z. (1983). "The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopamine terminals". *Neuroscience*, 10:1105-1120.
- Levoie, B. y Parent, A. (1990). "Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey". *J. Comp. Neurol.* 299:1-16.
- Liley, A. W. 1956. "The quantal components of the mammalian end-plate potential". *J. Physiol.* 106:571-587.
- Lin, Y. Q. y Bennet, M. R. (1994). "Nitric oxide modulation of quantal secretion in chick ciliary ganglia". *J. Physiol.* 481:385-394.
- Liu, G. y Feldman, J. L. (1992). "Quantal synaptic transmission in phrenic motor nucleus". *J. of Neurophysiol.* 68:1468-1471.
- Lundberg J.M. y Hokfelt, T. (1983). "Coexistence of peptides and classical neurotransmitters". *TINS*, 6:325.
- Lundh H. (1978). "Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission". *Brain Res.* 153:307-318.
- Lundh H. y Thesleff, S. (1977). "The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from nerve terminals". *E. J. Pharmacol.* 42:411-412.
- Lupica, C. R., Proctor, W. R. y Dunwiddie, T. V. (1992). "Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by adenosine in rat hippocampus: Analysis of unitary EPSP variance measured by whole-cell recording". *The J. of Neurosci.* 12:3753-3764.
- Manley, M. S., Young, S. J., Martone, M. E. y Groves, P. M. (1991). "Three-dimensional reconstruction of the neuropeptide network in the human caudate nucleus". *Soc. Neurosci. Abstr.* 17:962.
- Marsden, C. D. (1992). "Dopamine and basal ganglia disorders in humans". *Seminars in the Neurosciences*, 4:171-178.
- Martone, M. E., Armstrong, D. M., Young, S. J. y Groves, P. M. (1993). "Cholinergic neurons are distributed preferentially in areas rich in substance P-like immunoreactivity in the caudate nucleus of the adult cat". *Neuroscience*, 56:567-579.

- Maura, G., Giardi, A. y Raiteri, M. (1988). "Release-regulating D-2 dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247:680-684
- McBain, C. y Dingledine, R. (1992). "Dual-component miniature excitatory synaptic currents in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons". *J. Neurochem.*, 68:16-27.
- McGeer, E. G., McGeer, P. L. y Singh, K. (1978). "Kainate induced degeneration of neostriatal neurons: dependency upon corticostriatal tract". *Brain Res.*, 139:381-383.
- McGeorge, A. J. y Faull, R. L. M. (1989). "The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat". *Neuroscience*, 29:503.
- Melis, R. M. y Gale, K. (1983). "Effect on dopamine agonists on GABA turnover in the superior colliculus: Evidence that nigrothalamic GABA projections are under the influence of dopaminergic transmission". *J. Pharm. Exp. Therap.*, 226:425-431.
- Meredith, G. E. y Wouterlood, F. G. (1990). "Hippocampal and midline thalamic fibers and terminals in relation to the choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in nucleus accumbens of the rat: a light and electron microscopy study". *J. Comp. Neurol.*, 296:204-221.
- Misgeld, U., Okada, Y. y Hassler, R. (1979). "Locally evoked potentials in slices of rat neostriatum: A tool for the investigations of intrinsic excitatory processes". *Exp. Brain Res.*, 34:575-590.
- Misgeld, U., Weiler, M. H. y Bak, I. J. (1980). "Intrinsic cholinergic excitation in the rat neostriatum: nicotinic and muscarinic receptors". *Exp. Brain Res.*, 39:401-409.
- Misgeld, U., Wagner, A. y Ohno, T. (1982). "Depolarizing IPSPs and depolarization by GABA of rat neostriatal cells in vitro". *Exp. Brain Res.*, 45:108-114.
- Misgeld, U. y Dietzel, I. (1989). "Synaptic potentials in the rat neostriatum in dissociated embryonic cell culture". *Brain Res.*, 492:149-157.
- Misgeld, U. y Bak, I. J. (1979). "Intrinsic excitation in the rat neostriatum mediated by acetylcholine". *Neurosci. Lett.*, 12:277-282.
- Mitchell, I. J., Brotchie, J. M., Brown, G. D. A. y Crossman, A. R. (1991). "Modeling the functional organization of the basal ganglia. A parallel distributed processing approach". *Movement disorders*, 6:189-204.
- Molgó, J. y Thesleff, S. (1982a). "4-aminoquinoline induced 'giant' miniature endplate potentials at mammalian neuromuscular junction". *Proc. Roy. Soc. B.* 214:229-247.
- Molgó, J., Gómez, S., Polak, R. L. y Thesleff, S. (1982b). "Giant miniature endplate potential induced 4-aminoquinoline". *Act. Physiol. Scand.*, 115:201-207.
- Montis De, M. O., Tagliamonte, G. S. A. y Krüger, S. (1979). "Evidence that a nigral GABAergic-Cholinergic balance controls posture". *European J. Pharmacol.*, 53:181-190.
- Moore, R. Y. y Bloom, F. E. (1978). "Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of dopamine systems". *Ann. Rev. Neurosci.*, 1:129-169.
- Morales-Villagrán, A. Y. y Tapia R. (1995). "Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum *in vivo*". *Neurochem. Int.* en prensa.
- Mori, A., Takahashi, T., Miyashita, Y. y Kasai, H. (1994). "Two distinct glutamatergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurons of neonatal rats and paired-pulse depression". *J. of Physiol.*, 476:217-228.
- Müller, W. y Misgeld U. (1990). "Inhibitory role of dentate hilus neurons in guinea pig hippocampal slice". *J. Neurophysiol.* 64:46-56.
- Müller, W. y Misgeld U. (1991). "Picrotoxin and 4-aminopyridine-induced activity in hilar neurons in the guinea-pig hippocampal slice". *J. Neurophysiol.* 65:141-147.
- Nauta, W. J. H. Domesick, V. B. (1984). "Afferent and efferent relationships of the basal ganglia". En "Functions of the basal ganglia", Ciba Foundation Symposium 107, Pitman, London, pp 3-29.
- Nakazawa, K., Inoue, K., Fujimori, K. y Takanaka A. (1990). "ATP-activated single channel currents recorded from cell-free patches of pheochromocytoma PC12 cells". *Neurosci. Lett.*, 119:5-8.
- Neale, E. A. Nelson, P. G. MacDonald, R. L., Christian, C. N. y Bowers, L. (1983). "Synaptic interactions between mammalian central neurons in cell culture. III. Correlates of quantal synaptic transmission". *J. of Neurophysiol.*, 49:1459-1466.
- Nelson, P. G., Marshall, K. C., Pun, R. Y. K., Christian, C. N., Sheriff Jr, W. H., MacDonald, R. L. y Neale, E. A. (1983). "Synaptic interactions between mammalian central neurons in cell culture. II. Quantal analysis of EPSPs". *J. Neurophysiol.*, 49:1442-1458.
- Neuhaus, R., Reber, B. F. X. y Reuter, H. (1991). "Regulation of Bradikinin- and ATP-activated Ca²⁺-permeable channels in rat pheochromocytoma (PC12) cells". *J. Neurosci.*, 11:3984-3990.
- Nisembaum, E. S. William, B. O. y Berger, T. W. (1988). "Evidence for two functionally distinct subpopulations of neurons within the rat striatum". *J. Neurosci.*, 8:4138-4150.

- Nisenbaum, E. S. y Berger, T. W. (1992a). "Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by gabaergic and dopaminergic inputs-I. in vivo analysis". *Neurosci.*, 48:561-578.
- Nisenbaum, E. S. y Berger, T. W. (1992b). "Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by gabaergic and dopaminergic inputs-II. in vitro analysis". *Neurosci.*, 48:579-593.
- O'Boyle, K. M. y Waddington, J. L. (1992). "Agonist-antagonist interactions with D₁ dopamine receptors: Agonist-induced masking of D₁ receptors depends on intrinsic activity". *Neuropharmacology*, 31:177-183.
- Ohno, Y., Sasa, M. y Takaori, S. (1986). "Excitation by dopamine D-2 receptor agonists, bromocriptine and LY-171555, in caudate nucleus neurons activated by nigral stimulation". *Life Sci.* 38: 18667-1873.
- Ohno, Y., Sasa, M. y Takaori, S. (1985). "Dopamine D-2 receptor-mediated excitation of caudate nucleus neurons from substantia nigra". *Life Sci.* 37:1515-1521.
- Ohno, Y., Sasa, M. y Takaori, S. (1987). "Coexistence of inhibitory dopamine D-1 and excitatory D-2 receptors on the same caudate nucleus neurons". *Life Sci.* 40:1937-1945.
- Olson, L., Sieger, A. y Fuxe, K. (1972). "Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation: Highly fluorescent islands in developing and adult rats". *Brain Res.*, 44:283-288.
- Otis, T. S., Staley, K. J. y Mody, I. (1991). "Perpetual inhibitory activity in mammalian brain slices generated by spontaneous GABA release". *Brain Res.* 545:142-150.
- Pappas, G. y Waxman, S.(1972). "Synaptic fine structure morfological and electrotonic transmission". En Pappas and Purpura eds, Raven Pres, New York,pp 1-43
- Parent, A. (1990). "Extrinsic connections of the basal ganglia" *TINS*, 13:254-258.
- Parent, A. (1986). "Comparative neurobiology of the basal ganglia" Jonh Wiley, New York.
- Parent, A., Bouchard, C. y Smith, Y. (1984). "The striatopallidal and striatonigral projections: two distinct fiber systems in primate". *Brain Res.* 303:385-390.
- Parent, A. y Hazrati, L-N. (1993). "Anatomical aspects of information processing in primate basal ganglia". *TINS.*, 16:111-116.
- Parent, A. y Hazrati, L-N. (1995). "Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop". *Brain Res. Rev.*, 20:91-127.
- Parent, A., Mackey, A. Smith, Y. y Bouchard, C. (1983). "The output organization of the substantia nigra in primate as revealed by a retrograde double labeling method". *Brain Res. Bull.*, 10:529-538.
- Parthasarathy, H. B., Schall, J. D. y Graybiel, A. M. (1992). "Distributed but convergent ordering of corticostriatal projections: Analysis of the frontal eye field and the supplementary eye field in the macaque monkey". *J. Neurosci.* 12:4468-4488.
- Pasik, P., Pasik, T., Holstein, G. y Hamori, J. (1988). "GABAergic elements in the neuronal circuits of the monkey neostriatum: A light and electron microscopy immunocytochemical study". *J. Comp. Neurol.*, 270: 157-170.
- Pasik, P., Pasik, T. y Holstein, G. R. (1991). "The ultrastructural chemoanatomy of teh basal ganglia: 1984-1989. I. The neostriatum." En "The basal ganglia III" editado por Bernardy, G., Carpenter, M. B., Di Chiara, G., Morelli, M. y Stanzione, P. *Advances in behavioral biology*, Vol. 39:187-197.
- Pasik, P., Pasik, T. y Saavedra, J. P. (1982). "Immunocytochemical localization of serotonin at the ultrastructural level". *J. Histochem. Cytochem.* 30:760-764.
- Pasik, P., Pasik, T., Pecci-Saavedra, J., Holstein, G. R. y Yahr, M. D. "Serotonin in pallidal neuronal circuits: an immunocytochemical study in monkeys". *Adv. Neurol.* 40:61-76.
- Patiño, P. y M. García-Muñoz. (1985). "Electrophysiological thalamic responses evoked by dopamine receptor stimulation into the striatum". *Brain Res.*, 361:1-9.
- Penny, G. R., Afsharpour, S. y Kitai, S. T. (1986a). "The glutamate decarboxilase-, leucine enkephalin-, methionine-enkephaline and substance P-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: Evidence for partial population overlap". *Neuroscience*, 17:1011-1045.
- Penny, G. R., Wilson, C. J. y Kitai, S. T. (1986b). "Relationship of the axonal and dendritic geometry of spiny projection neurons to the compartmental organization of the neostriatum". *J. Comp. Neurol.*, 269:275-289.
- Percheron, G. y Fillion, M. (1991). "Parallel processing in the basal banglia: up to a point (letter)". *TINS*, 14:55-56.
- Perreault, P y Avoli, M. (1989). " Effects of low concentrations of 4-aminopyridine on CA1 pyramidal cells of the hippocampus". *J. Neurophysiol.* 61:953-970.
- Perreault, P y Avoli, M. (1992). "4-aminopyridine-induced epileptiform activity and a GABA-mediated long lastin depolarization in the rat hippocampus". *J. Neurosci.* 12:104-115.
- Petrenko, A. G. (1993). "a-Latrotoxin receptor. Implicatons in nerve terminal function". *FEBS letters.* 325:81-85.
- Petrenko, A. G., Perin, M. S., Davletov, B. A., Ushkaryov, Y. A., Gepert, M. y Südhoff, T. C. (1991). "Binding of synaptotagmin to a-latrotoxin receptor implicates both in synaptic vesicle exocytosis". *Nature*, 353:65-68.

- Pickel, V. M., Beckely, S. C., Joh, T. H. y Reis, D. J. (1981). "Ultrastructural immunochemical localization of tyrosine hydroxylase in the neostriatum". *Brain Res.* 225:373-385.
- Pineda, J. C., Galarraga, E., Bargas, J., Cristancho, M. y Aceves, J. (1992). "Charibdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons". *J. Neurophysiol.*, 68:287-294.
- Precht, W. y Yoshida, M. 1971. "Blockage of caudate-evoked inhibition of neurons in the substantia nigra by picrotoxin". *Brain Res.*, 32: 229-233.
- Preston, R. J., Bishop, G. A. y Kitai, S. T. (1980). "Medium spiny neuron projection from the rat striatum: an intracellular horseradish peroxidase study". *Brain Res.* 183:253-263.
- Ramón y Cajal, S. (1909, 1911). "Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés". Traducido por L. Azoulay. Maloine, Paris, 2 vols. (Reimpreso, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramón y Cajal, Madrid, 1972)
- Redman, S. (1990). "Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system". *Physiol. Rev.* 70:165-198.
- Rekling, J. C. (1993) "Effects of met-enkephalin on GABAergic spontaneous miniature IPSPs in organotypic slice cultures of the rat hippocampus". *J. of Neurosci.* 13:1954-1964.
- Riveros, N., Fiedler, J., Lagos, N., Muñoz, C. y Orrego, F. (1986). "Glutamate in rat brain cortex synaptic vesicles: influence of the vesicle isolation procedure". *Brain Res.*, 386:405-408.
- Robbins T. W. y Everitt, B. J. (1992). "Functions of dopamine in the dorsal and ventral striatum". *Seminars in the Neurosciences*, 4:119-127.
- Rogawsky M. A. y Barker, J. L. (1983). "Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons". *Brain Res.*, 280:180-185.
- Ropert, N., Miles, R. y Korn, H. (1990). "Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus". *J. of Physiol.*, 428:707-722.
- Rosenblueth, A. (1959). "The transmission of nerve impulses at neuro-effector junctions and peripheral synapses", New York, p. 325.
- Royce, G. J. (1982). "Laminar origin of cortical neurons which project upon the caudate nucleus: A horseradish peroxidase investigation in the cat". *J. Comp. Neurol.*, 205:8-29.
- Royce, G. J. y Bromley, S. (1984). "Fluorescent double labeling studies of thalamostriatal and corticalstriatal neurons". En "The basal ganglia. Structure and function" editado por McKenzie, J. S. Kemm, R. E. y Wilcox, L. N. Plenum Press New York. pp131-146.
- Royce, G. J. (1987) "Recent research on the centromedian and parafascicular nuclei". En "Basal ganglia. II Structure and function- Current concepts. Vol. 32: Advances in Behav. Biol. Plenum Press, New York. pp 293-319.
- Rubin, R. (1982). "Calcium and secretion cellular". Plenum Press, New York, 1-3, 45-177.
- Rudy, B. (1988). "Diversity and ubiquity of K channels". *Neuroscience*, 25:729-749.
- Sakmann, B. (1992). "Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels" (Nobel Lecture). *Neuron*, 8:613-629.
- Sakmann, B., Edwards, F., Konnerth, A. y Takahashi, T. (1989). "Patch clamp techniques used for studying synaptic transmission in slices of mammalian brain". *Quart. J. Exp. Physiol.*, 74:1107-1118.
- Sandberg K., P. R. Sandberg y Coyle, J. T. (1984). "Effects of intrastriatal injections of the dopaminergic neurotoxin AF64A on spontaneous nocturnal locomotor behaviour in the rat". *Brain Res.*, 299:339-343.
- Sandoval, M. R. L. y Palermo-Neto, J. (1989). "Behavioral aspects of GABAergic-dopamine interactions in the central nervous system". *Eur. J. Pharmacol.*, 167:117-125.
- Saudou, F. y Hen, R. (1994). "5-hidroxitriptamine receptors subtypes in vertebrates and invertebrates". *Neurochem. Int.*, 25:503-532.
- Scheel-Krüger, J., G. Magelung y Olanas, M. C. (1981). "The role of GABA in the striatal output system: globus pallidus, nucleus entopeduncularis, substantia nigra and nucleus subthalamicus". En "GABA and the Basal Ganglia", Plenum, New York.
- Schiffmann, S. N., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J. E. y Vanderhaeghen, J. J. (1990). "A cloned G protein-coupled protein with a distribution restricted to striatal medium-sized neurons. Possible relationship with D1 dopamine receptor". *Brain Res.*, 519:333-337.
- Schofield, C. N. (1978). "A depolarizing inhibitory potential in neurones of the olfactory cortex in vitro". *J. Physiol.* 275:547-558.
- Schröder, K. F., Hopf, A., Lange, H. y Thörner, G. (1975). "Morphometrisch-statistische strukturanalysen des striatum, pallidum und nucleus subthalamicus beim menschen. I Striatum". *J. Hirnforsch.*, 16:333-350.

- Schultz, W. (1992). "Activity of dopamine neurons in the behaving primate". *Seminars in the Neurosciences*, 4:129-138.
- Schultz, W. y Romo, R. (1992). "Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements I. Preparatory activity in the anterior striatum". *Exp Brain Res.*, 91:363-384.
- Schwartz, J. C., Giros, B., Martres, M. P. y Sokoloff, P. (1992). "The dopamine receptor family: molecular biology and pharmacology". *Seminars in the Neurosciences*, 4:99-108.
- Schwartz, J. H. y Kandel, E. R. (1991). "Synaptic Transmission mediated by second messengers". En "Principles of Neural Science". Kandel, E., Schwartz J.H. y Jessell, T. M., eds, Elsevier 3a. Ed. New York, pp 159-168.
- Seabrook, G. R., Howson, W. y Lacey, M. G. (1991). "Subpopulations of GABA-mediated synaptic potentials in slices of rat dorsal striatum are differentially modulated by presynaptic GABA_B receptors". *Brain Res.* 562:332-334.
- Segal, M. (1987). "Repetitive inhibitory postsynaptic potentials evoked by 4-aminopyridine in hippocampal neurons *in vitro*". *Brain Res.* 414:285-293.
- Selemon, L. D. y Goldman-Rakic, P. S. (1985). "Longitudinal topography and interdigitation of cortical projections in the rhesus monkey". *J. Neurosci.*, 5:776-794.
- Shen, B.Y., Asdourian, D. y Chiodo, L. A. (1992). "Microiontophoretic studies of the effects of D-1 and D-2 receptor agonists on type I caudate nucleus neurons: Lack of synergistic interaction". *Synapse*, 11:319-329.
- Shepherd, G. M. (1990). "The synaptic organization of the brain". Oxford University Press New York. p279-316.
- Sibley, D. R. y Monsma, F. J. Jr. (1992). "Molecular biology of dopamine receptors". *TIPS*, 13:61-68.
- Silver, R.A., Traynelis, S. F. y Cull-Candy, S. G. (1992). "Rapid-time-course miniature and evoked excitatory currents at cerebellar synapses *in situ*". *Nature*, 355:163-166.
- Smith, S. J. y Augustine, G. J. (1988). "Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release". *TINS*, 11:458-464.
- Smith, A. D. y Bolam J. P. "The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones". *TINS*, 13:259-261.
- Simonneau, M., tauc, L. y Baux, G. (1980). "Quantal release of acetylcholine examined by current fluctuation analysis at an identified neuro-neuronal synapse of *Aplysia*". *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.*, 77:1661-1665.
- Snyder, S. H. y Goodman, R. R. (1980). "Multiple neurotransmitter receptors". *J. Neurochem.*, 35:5-15.
- Soghomonian J. J., Descarries, L. y Watkins, K. C. (1989). "Serotonin innervation in adult rat neostriatum. II. Ultrastructural features: a radioautographic and immunocytochemical study". *Brain Res.* 481:67-86.
- Somogyi, J. P., Bolam, J. P. y Smith, A. D. (1981). "Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscope study using the Golgi-peroxidase transport degeneration procedure". *J. Comp. Neurol.* 195:567-584.
- Stent, G. S. (1972). "Cellular communication", *Sci. Am.*, 277:42-51.
- Storm, J. F. (1988). "Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons". *Nature*, 336:376-381.
- Strange, P. G. (1993). "Dopamine receptors: structure and function". *Prog. Brain Res.* 99:167-179.
- Stuenkel, E. L. (1994). "Regulation of intracellular calcium and calcium buffering properties of rat isolated neurohypophysial nerve endings". *J. Physiol.*, 481:251-271.
- Sugimori, M., Preston, R. J. y Kitai, S. T. (1978). "Response properties and electrical constants of caudate nucleus neurons in the cat". *J. Neurophysiol.*, 41:1662-1675.
- Sugimoto, T., Takada, M., Kaneko, T. y Mizuno, N. (1984). "Substance P-positive thalamocaudate neurons in the center-median-parafascicular complex in the cat". *Brain Res.*, 323:181-184.
- Surmeier, D. J. Reiner, A., Levine, M. S. y Ariano M. (1993). "Are neostriatal dopamine receptors co-localized?". *TINS*, 16:299-305.
- Surmeier, D. J. y Kitai, S. T. (1993). "D1 y D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons". *Prog. Brain Res.*, 99:309-324.
- Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings Jr., H. C., Nairn, A. C. y Greengard, P. (1995). "Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons". *Neuron*, 14:385-397.
- Sutor, B. y Hablitz, J. J. (1989). "EPSPs in rat neocortical neurons *in vitro*. I. Electrophysiological evidence for two distinct EPSPs". *J. Neurophysiol.*, 61:607-620.
- Takahashi, T. (1992). "The minimal inhibitory synaptic currents evoked in neonatal rat motoneurons". *J. Physiol.* 450:593-614.
- Takeuchi A. y Takeuchi, N. (1960). "On the permeability of end-plate membrane during the action of transmitter". *J. Physiol.* 154:52-67.
- Tapia R. y Arias, C. (1981). "Calcium transport and the release of neurotransmitters: effects of drugs *in vivo* and *in vitro*". En "Regulatory mechanisms of synaptic transmission" Tapia R. y Cotman C. W. eds. Plenum, New York, pp 166-186.

- Tapia, R. y Sitges, M. (1982), "Effects of 4-Aminopyridine on transmitter release in synaptosomes". *Brain Res.*, 250:291-299.
- Tapia, R., M. Sitges y Morales, E. (1985). "Mechanism of the calcium dependent stimulation of transmitter release by 4-Aminopyridine in synaptosomes". *Brain Res.*, 361:378-382.
- Tareilus, E. y Brrer, H. (1995). "Presynaptic calcium channels: pharmacology and regulation". *Neurochem. Int.* 26: 539-558.
- Teitler, M. y Herrick-Davies, K. (1994). "Multiple serotonin receptor subtypes: molecular cloning and functional expression". *Critic. Rev. in Neurobiol.*, 8:175-188.
- Thesleff, S. (1980). "Aminopyridines and synaptic transmission". *Neuroscience*, 5:1413-1419.
- Thesleff, S., Molgó, J. y Lundh, H. (1983). "Boullinum toxin and 4-aminoquinoline induce a similar abnormal type of spontaneous quantal transmitter release at the rat neuromuscular junction". *Brain Res.*, 264:89-97.
- Tibbs, G. R., Barrie, A. P., Van Mieghem, F. J. E., McMahon, H. T. y Nicholls, D. G. (1989). "Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects of cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release" *J. Neurochem.* 53:1693-1699
- Trimble, W. S., Linial, M. y Scheller, R. H. (1991). "Cellular and molecular biology of the presynaptic nerve terminal". *Ann. Rev. Neurosci.*, 14:93-122.
- Turner, T. J. Adams, M. E. y Dunalp, K. (1993). "multiple Ca²⁺ channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9518-9522.
- Uchizono, K. (1965). "Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat". *Nature* 207:642-643.
- Uchizono, K. (1967). "Inhibitory synapses on the stretch receptor neurons of the crayfish" *Nature* 214:833-834.
- Ulrich D. y Lüscher, H. R. (1993). "Miniature excitatory synaptic currents corrected for dendritic cable properties reveal quantal size and variance". *J. Neurophysiol.*, 69:1769-1773.
- Vautrin, J., Schaffner, A. E. y Barker, J. L. (1992). "Two classes of spontaneous GABA-mediated miniature synaptic currents in cultured rat hippocampal neurons". *Neurosci. Lett.*, 138:67-71.
- Vautrin, J. y Kriebel, M. E. (1991). "Characteristics of slow-miniature endplate currents show a subunit composition". *Neuroscience*, 41:71-88.
- Verhaart, W. J. C. (1950). "Fiber analysis of the basal ganglia". *J. Comp. Neurol.* 93:425-440.
- Vizi, E. S., Kobayashi, O, Töröcsik, A., Kinjo, M., Nagashima, H., Manabe, N., Goldiner, P. L., Potter, P. E. y Foldes, F. F. (1989). "Heterogeneity of presynaptic muscarinic receptors involved in modulation of transmitter release". *Neuroscience*, 31:259-267.
- VonBonin, G. y Shariff, G. A. (1951) "Extrapiramidal nuclei among mammals. A quantitative study". *J. Comp. Neurol.*, 94:427-438.
- Walsh, J. P., Cepeda, C., Hull, C. D., Fisher, R. S., Levine, M. S. y Buchwald, N. (1989). "Dye-coupling in the neostriatum of the rat: II. Decreased coupling between neurons during development". *Synapse*, 4:238-247.
- Wernig, A. y Stirner, H. 1977. "Quantum amplitude distributions point to functional unity of the synaptic 'active zone' ". *Nature*, 269:820-822.
- Westbrook, G. L. (1994). "Glutamate receptor update". *Curr. Op. Neurobiol.*, 4:337-346.
- Whittaker, V. P. y Zimmerman, H. (1974) "Biochemical studies on cholinergic synaptic vesicles". En "Synaptic transmission and Neuronal Interaction". Editado por Bennett, M. V. L. Raven Press, New York, p217-238.
- White, F. J. y Wang, R. Y. (1986). "Electrophysiological evidence for the existence of both D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat nucleus accumbens". *J. Neurosci.*, 6:274-280.
- White, F. J. (1987). "D-1 dopamine receptor stimulation "enables" the inhibitory effect of the D-2 agonist quinpirole on rat nucleus accumbens neurons" *Eur. J. Pharmacol.*, 135:101-105.
- Wickens, J. (1993). "A theory of the striatum". Pergamon press, Oxford.
- Wilson, C. J. (1994). "The contribution of cortical neurons to the firing pattern of striatal spiny neurons". En "Models of information processing in the basal ganglia". Editado por Houk, J. C., Davis, J. L. y Beiser, D. G. MIT Press, Cambridge, Mass. pp:29-50.
- Wilson, C. J. y Groves, P. M. (1980). "Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum. A study employing intracellular injection of horseradish peroxidase". *J. Comp. Neurol.*, 220:67-80.
- Wilson, C. J., Groves, P. M., Kitai, S. T. y Linder, J. C. (1983). "Three dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum". *J. Neurosci.*, 3:383-398.
- Wilson, C. J. (1992). "Dendritic morphology, inward rectification and the functional properties of neostriatal neurons". En "Single neuron computation". Academic. Boston, pp 141-171.
- Wilson, C. J., Chang, H. T. y Kitai, S. T. (1990). "Firing patterns and synaptic potentials of identified giant interneurons in the rat neostriatum". *J. Neurosci.*, 10:508-519.

- Wilson, C. J. (1990). "Basal Ganglia". En "The synaptic organization of the brain". Shepherd, G. M. Ed. Oxford University Press. 3a. Ed. New York, pp 279-316.
- Xu, Z. C., Wilson, C. J. y Emson, P.C. (1991). "Restoration of thalamostriatal projections in rat neostriatal grafts: An electron microscopic analysis". *J. Comp. Neurol.* 303:2-34.
- Yao, J. A. y Tseng, G. N. (1994). "Modulation of 4-AP block of a mammalian A-type K channel clone by channel gating and membrane voltage". *Biophys. Jour.*, 67:130-142.
- Yawo, H. y Moriyama, A. (1993). " Re-evaluation of calcium current in the pre- and postsynaptic neurones of the chick ciliary ganglion". *J. of Physiol.*, 460:153-172.
- Yelnik, E. H., François, C., Percheron, G. y Tandé, D. (1991). "Morphological taxonomy of the neurons of the primate striatum". *J. Comp. Neurol.* 313:273-294.
- Yeterian, E. H. y Van Hoesen, G. W. (1978). "Cortico-striate projections in the rhesus monkey: the organization of certain cortico-caudate connections". *Brain Res.* 139:43-63.
- Zimmermann, H. (1993). "Synaptic transmission. Cellular and molecular basis". Thieme / Oxford. New York..
- Zimmermann, H. (1994). "Signalling via ATP in the nervous system". *TINS*, 17:420-426.

ORIGINAL PAPER

E. Galarraga · M.T. Pacheco-Cano
J.V. Flores-Hernández · J. Bargas

Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons

Received: 13 January 1994 / Accepted: 26 April 1994

Abstract Intracellular recordings from slice preparations were used to assess the subthreshold electrophysiological behavior of rat neostriatal projection neurons. Both current steps and ramp currents were used to estimate the current-voltage relationship (I-V plot). Inward rectification in the subthreshold range was a characteristic of most neurons. The amount of rectification varied greatly, and it was complex: membrane voltage trajectories in response to ramps were made up by almost piecewise changes in the rate of voltage rise, suggesting that multiple conductances contribute to the subthreshold range. Inward current blockers such as tetrodotoxin (TTX) or Cd^{2+} decreased inward rectification, whereas outward current blockers such as tetraethylammonium (TEA) or 4-aminopyridine (4-AP) increased inward rectification. However, most inward rectification was due to TEA- and Cs^+ -sensitive conductances and not to TTX- or Cd^{2+} -sensitive conductances. Cs^+ -sensitive conductances predominated at more negative membrane potentials, whereas 4-AP-sensitive conductances predominated at just ± 10 mV below the firing threshold. In spite of a very slow activation, there was evidence for transient outward currents modulating the response, i.e., 4-AP-sensitivity, and voltage-sensitivity for firing frequency and threshold. TEA-sensitive conductances also contributed toward fixing the firing threshold. These results imply the contribution of various ion conductances on the shaping of the characteristic physiological firing recorded *in vivo*. Modulation of these responses by transmitters or peptides may help to understand neural processing in the neostriatum.

Key words Neostriatum · *In vitro* brain slices
Inward rectification · Subthreshold ion conductances
Firing pattern · Rat

E. Galarraga · M.T. Pacheco-Cano · J.V. Flores-Hernández
J. Bargas (✉)
Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
UNAM, P.O. Box 70-253, Mexico City DF 04510, Mexico.
FAX no: (525) 622-5607

Introduction

Intracellular recordings *in vivo* have demonstrated that neostriatal neurons are usually silent and have a rather negative resting potential (Hull et al. 1970; Wilson and Groves 1981; Wilson 1992). Periods of membrane hyperpolarization and electrical silence are interrupted by periods of ramp-like sustained depolarizations lasting up to 3 s (Wilson 1992). These slow depolarizations are driven by synaptic inputs, mostly coming from cortical afferents (references in Wilson 1990). Activation of slow potentials able to sustain repetitive firing may contribute (Bargas et al. 1991a). In fact, perievent time histograms of neuronal firing reveal ramp-like increases in frequency as the onset of a self-initiated movement is approached (Schultz and Romo 1992). Therefore, a slow recruitment of cortical neurons may build up occasional depolarizing episodes in neostriatal neurons (Wilson 1992).

Slow depolarizing episodes may induce the interaction between synaptic activity and the intrinsic membrane properties of the neuron. Through correlations of voltage- and current-clamp studies there is evidence of several types of voltage-dependent ion conductances in the subthreshold response of neostriatal neurons (Kita et al. 1985; Surmeier et al. 1988, 1991; Bargas et al. 1989, 1991b, 1994; Galarraga et al. 1989; Ogata and Tatebayashi 1990; Jiang and North 1991; Pineda et al. 1992; Nisenbaum et al. 1994). However, the role of these conductances during firing have been inferred only from responses to current steps. Their role during slow depolarizations mimicking physiological activation has not been investigated. For example, it is not clear whether transient currents (Surmeier et al. 1988, 1991; Bargas et al. 1989; Nisenbaum et al. 1994) inactivate during very slow depolarizations, thus becoming unavailable for synaptic integration.

In order to analyze subthreshold responses in current-clamp conditions, the membrane potential trajectories after slow ramp stimuli have been studied in several neuronal classes (e.g., Jahnsen and Llinás 1984;

Jahnsen 1986; Baldissera et al. 1987; Yarom and Ulinas 1987; Uchimura et al. 1989). A voltage-clamp response after ramp stimulus has been described in neostriatal neurons (Jiang and North 1991). Accordingly, the sub-threshold response to ramp currents, in current-clamp conditions, is analyzed in this work. A preliminary communication of these data was presented at the annual meeting of the Society for Neuroscience (Galarraga and Bargas 1991).

Materials and methods

Brain slices were obtained from albino Wistar rats using procedures described elsewhere (e.g., Bargas et al. 1988). A 400- μm -thick neostriatal slice was held submerged in a recording chamber at 30–34°C. Extracellular saline consisted of (in mM): 120 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 11 glucose. Osmolarity was 300 mosmol/l (with glucose), pH was 7.4 and the solution was saturated with 95% O₂-5% CO₂. Tetraethylammonium (TEA), 4-aminopyridine (4-AP), tetrodotoxin (TTX), cadmium (Cd²⁺), nickel (Ni²⁺), cesium (Cs⁺), all from Sigma, and apamin (Salomone), were added from stock solutions to the bath saline. Chloride salts of TEA, Cd, Cs, and Ni were used. Recordings used conventional intracellular techniques: a high-input impedance electrometer with an active bridge circuit. Microelectrodes were filled with either potassium acetate (3–4 M or 1.5 M potassium acetate and 2% biocytin (Sigma), with d.c. resistances of 80–120 M Ω).

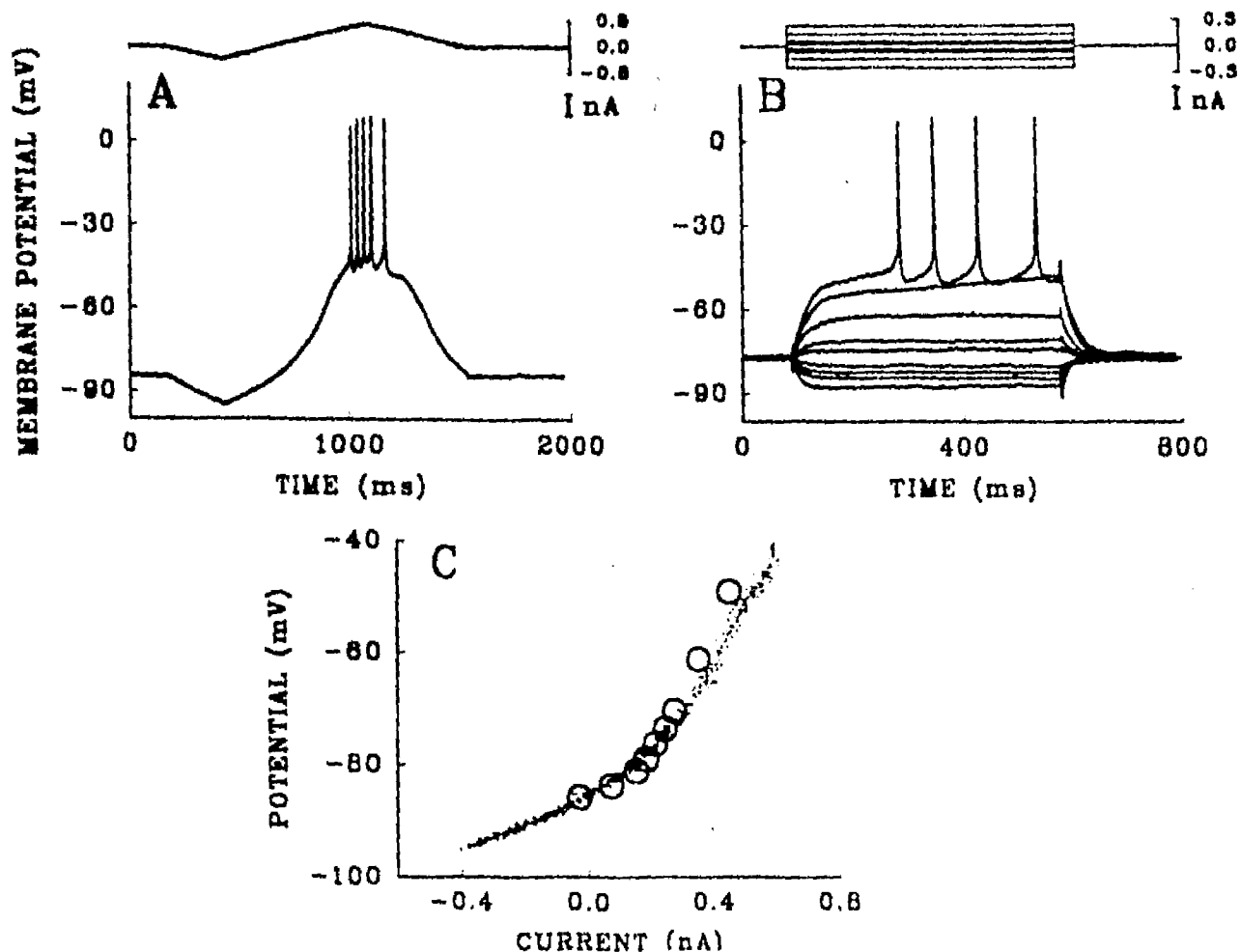
Stimulation consisted of either intracellular injections of current steps or of current ramps. At most times, hyperpolarizing

ramps preceded depolarizing ones. Thus, a continuous depolarization was achieved from a hyperpolarized to a depolarized membrane potential (from -100 to -80 to -40 mV). Mean rate of voltage change was around 0.1 mV/ms. Voltage versus time as well as current to voltage relationships (I-V plots) were obtained. As the rate of change of applied current (1–4 nA/s) did not vary during stimulation, any change in the slope of voltage rise during the response could be interpreted as a membrane conductance change (Jack et al. 1975; Benson and Adams 1987). Whole neuron input resistance (R_i) was obtained from I-V plots as slope-R_i (Jack et al. 1975). In order to restrict variability (see Discussion), R_i reported in this study was measured at around -70 mV [R_i(-70 mV)]. To do this, a polynomial of the form:

$$V_m(t) = A_1 t^n + A_2 t^{n-1} + \dots + A_n + MP$$

was first fit to the I-V plot. Where V_m(t) is the membrane potential response as a function of intracellularly injected current (t), A_n are polynomial coefficients. The last constant term, MP, is the membrane potential (held) at varying membrane potentials with d.c. current and the last coefficient, A_n, corresponds to R_i at

Fig. 1A–C. Response of rectifying neuron. I-V plots using ramps and steps. A: Response to current ramps (in all figures, current protocols are at the top, transmembrane voltage responses are at the bottom, and action potentials are clipped due to digitizing procedures, unless stated otherwise). B: Responses to current steps. C: Superimposed I-V plots: voltage response to ascending ramp in A is plotted against ramp current (dots). Continuous line, polynomial regression. Voltage responses measured at the end of the stimulus in B (empty circles) are plotted against magnitude of current steps. Close superimposition was achieved after correction for different holding potentials. R_i(-70 mV) = 39 M Ω .



holding potential. Then, R_{in} was evaluated as the derivative of this I-V function at -70 mV for all cells, slope- R_{in} (-70 mV Jack et al. 1975). As I-V plots exhibit slope changes, then R_{in} is seen as dependent on membrane potential. Fits stopped when $r > 0.99$. Positivity of some higher order coefficients (A_2, A_3, \dots) is an indication of the amount of inward rectification.

Histological procedures such as those described by Horikawa and Armstrong (1988) and Nisenbaum et al. (1994) were used to identify the type of neuron recorded. In all cases ($n > 25$), neurons were of the spiny projection type.

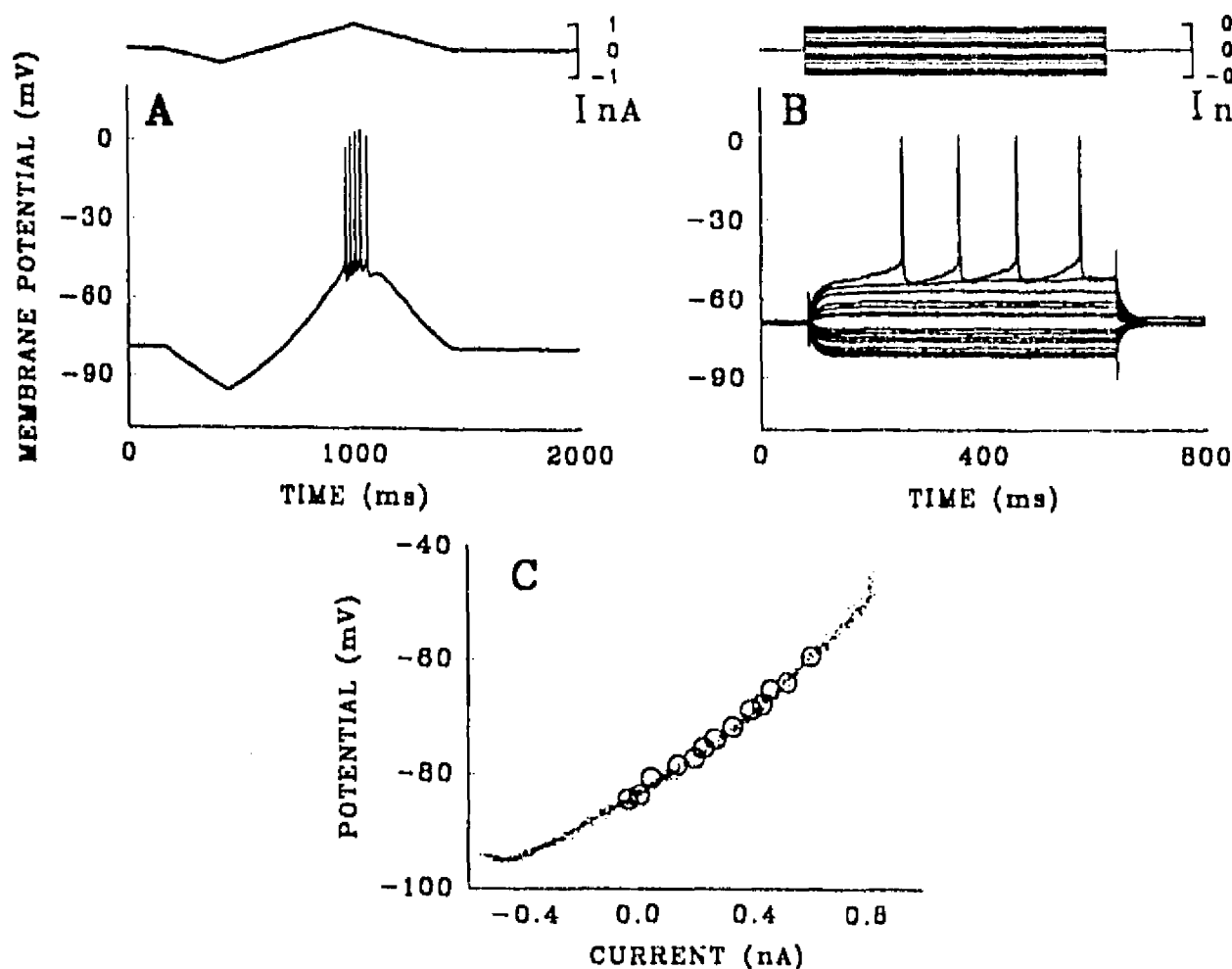
Results

Nonlinear membrane properties of neostriatal projection neurons

More than 80 neurons were recorded for this work. Neurons labeled with biocytin and identified (see Materials and methods) had the morphological features of "medium spiny" projection neurons, which correspond to more than 95% of all the neurons in this nucleus (see Wilson 1990, for a review). The electrophysiological properties and responses of unidentified neurons were identical to those of the identified neurons. Therefore, the data from identified and unidentified neurons were combined. Thus, all data presented is considered to come from a single cell population: the spiny projection neuron.

All records in Fig. 1 are from the same neuron. In Fig. 1A, the response to intracellular injections of ramp currents is shown. Responses to traditional current steps are shown in Fig. 1B. Figure 1C illustrates I-V plots obtained from traces in Fig. 1A (dots) and B (circles). Note in Fig. 1A that, in spite of a constant rate of change for the current stimulus (on top), the membrane potential did not respond linearly (see also Figs. 3A,B, 5A, 6A). In fact, slope- R_{in} increases with depolarization: from negative to more depolarized membrane potentials. Therefore, these neurons exhibited inward rectification in most of the physiological range of the sub-threshold response (Wilson 1990, 1992). Fitting of I-V plot in Fig. 1C needed a 6th-order polynomial. After correction for different holding potentials (cf. Fig. 1A and B), a close superimposition of ramp and step I-V plots was achieved (Fig. 1C). A small discrepancy occurs at less negative potentials. The reason for this is clear by noting that most depolarized responses in Fig. 1B exhibit a continuous ramp-like depolarization during con-

Fig. 2A-C. Response of slightly rectifying neuron. I-V plots using ramps and steps. A. Response to current ramp. B. responses to current steps. C. Superimposed I-V plots, voltage response to ascending ramp in A is plotted against current (dots). Continuous line is the polynomial regression. Voltage responses measured at the end of the stimulus in B (empty circles) are plotted against magnitude of current steps. $R_{in}(-70\text{mV}) = 42\text{ M}\Omega$.



FALLA DE ORIGEN

Fig. 3A-D Analysis of the subthreshold response.
A Subthreshold response;
B threshold response.
Horizontal line in A and B corresponds to $V_m = 0$ mV.
C Subthreshold ascending and descending I-V plot.
Hysteresis is only present in the depolarizing range.
D Threshold I-V plot

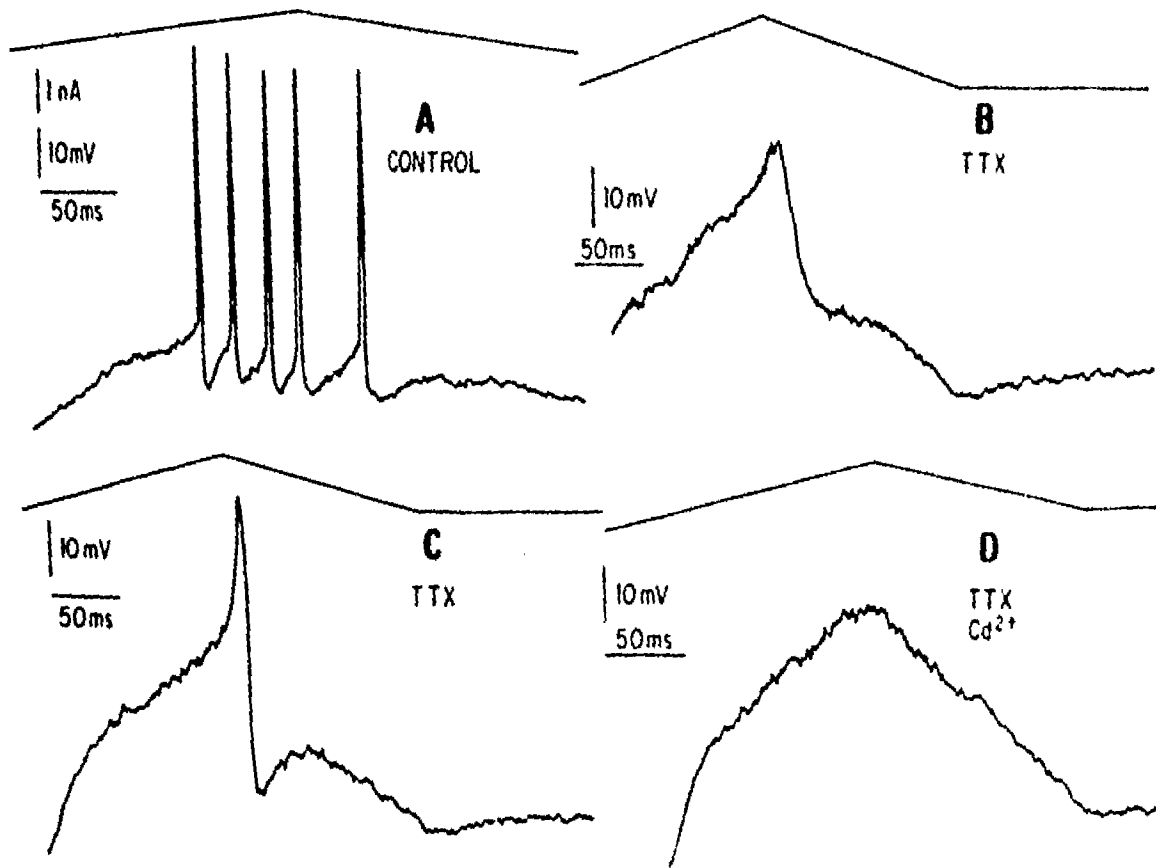
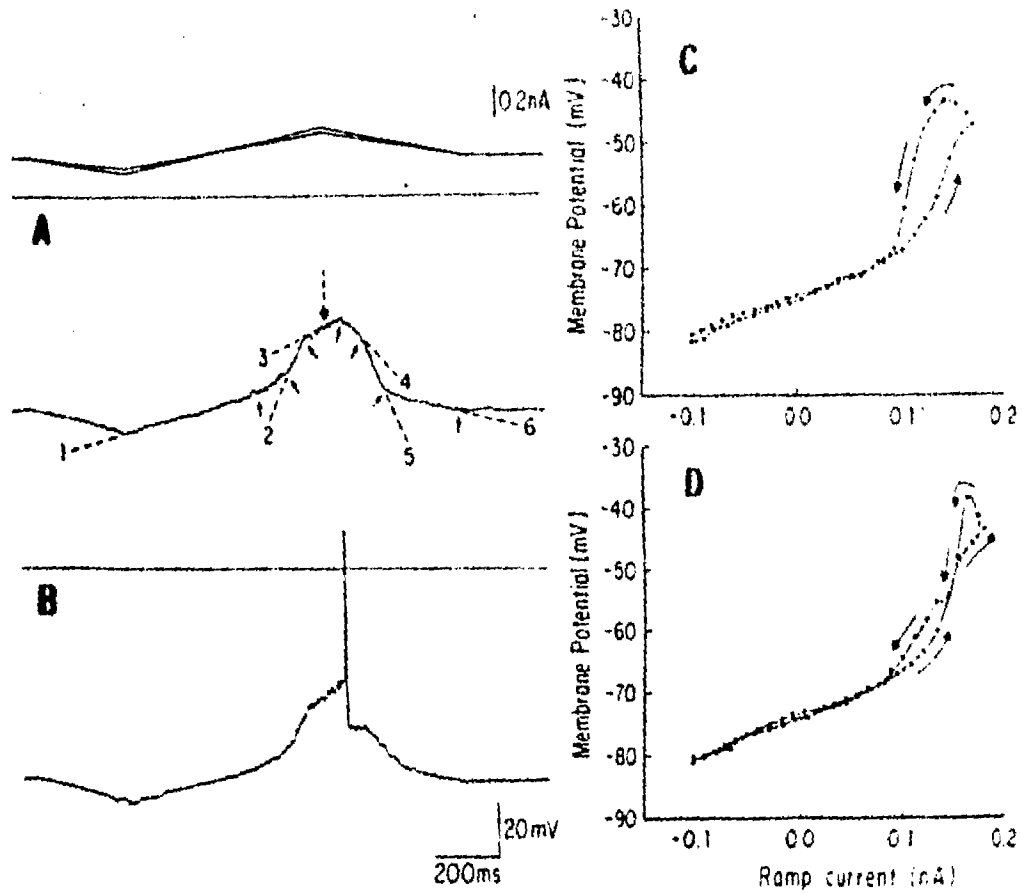
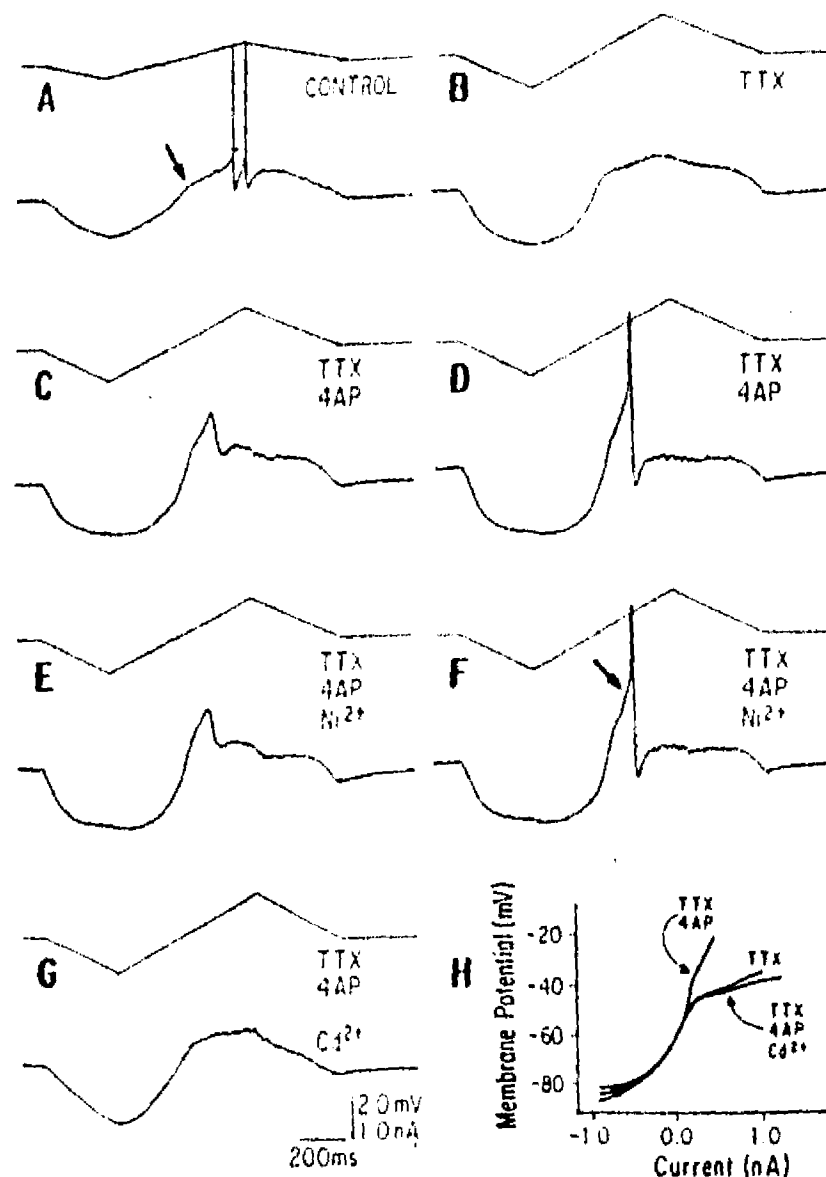


Fig. 4A-D Tetrodotoxin (TTX) effects on the ramp response. **A** A train of action potentials is evoked by a suprathreshold ramp current. **B** TTX (1 μ M) blocked the firing of action potentials even if a stronger stimulus was given. However, during a strong suprathreshold stimulation a faster repolarization was elicited

during the descending response. **C,D** In a few neurons, a TTX-resistant (1 μ M TTX) (**C**) and Cd^{2+} -sensitive (50 μ M Cd^{2+}) (**D**) spike could also be elicited. Note that the repolarization during the descending ramp was also sensitive to Cd^{2+} (**D**)

Fig. 5A-H 4-Amino-pyridine-(4AP)-sensitive conductances contribute to the subthreshold response. **A** Control, arrow indicates the beginning of the last ascending voltage trajectory. **B** TTX (1 μ M) abolished firing even if stimulus was stronger. However, TTX did not change most of the subthreshold response: both last voltage trajectory and inward rectification are still present. **C, D** 4AP (1 mM) blocked the last voltage trajectory without altering inward rectification. TTX-resistant responses appeared in the presence of 4AP: either local (**C**) or autoregenerative (**D**). Note strong afterhyperpolarizations after these responses. **E, F** Ni^{2+} (100 μ M) did not block the TTX-resistant events. **G** Cd^{2+} (100 μ M) blocked the TTX-resistant events. **H** Superimposition of ascending I-V plots from B-D



stant current (Bargas et al. 1989; Nisenbaum et al. 1994). By just inverting the axes, the I-V plot in Fig. 1C agrees with I-V plots obtained in voltage-clamp conditions (Jiang and North 1991).

In contrast, I-V plots in Fig. 2C, corresponding to the records in Figs. 2A and B, are almost linear. They correspond to a neuron which exhibited little inward rectification. All neurons exhibited some amount of rectification. In general, I-V plots were not fitted well by straight lines (see Materials and methods). However, a quadratic function was enough for the cell in Fig. 2. As superimpositions show, there were no significant differences between slope- R_N values measured after steps or ramps (see Materials and methods); provided that the ramps lasted several hundreds of milliseconds. In spite of the variability in the amount of inward rectification between neurons, the $R_N(-70)$ histogram was unimodal and intermediate cases could be found between strongly rectifying (Fig. 1) and weakly rectifying neurons (Fig. 2). Therefore, data from different neurons were combined:

$R_N(-70 \text{ mV})$: mean \pm SEM) was $58 \pm 4 \text{ M}\Omega$ (modal number $\approx 40 \text{ M}\Omega$; range 20-97; $n=49$).

When subthreshold responses from strongly rectifying neurons were analyzed, a very reproducible picture was obtained ($n>25$). This is shown in Figs. 3A and B, for subthreshold and threshold responses, respectively. Plots in Figs. 3C and D illustrate the corresponding I-V plots. Inward rectification was seen as deviations from linearity that almost occurred in a piecewise fashion. That is, several voltage trajectories could be fitted with separate straight lines (dashed numbered lines in Fig. 3A). These trajectories were separated from each other by sudden transitions (corners signaled by arrows in Fig. 3A). From left to right, transitions during the ascending ramp occurred at ca. -70, -60, and -50 mV. The trajectory from -70 to -60 mV (between the first two arrows) could not be fitted by a straight line. Each transition indicated an increase in apparent slope- R_N , and, therefore, it might signal the participation of different ion conductances during sub-

FALLA DE ORIGEN

threshold depolarizations (Jack et al. 1975; Benson and Adams 1987). This subthreshold response was typical of many neurons (see most other figures). It mimics the activation recorded *in vivo* (Wilson 1992). It suggests that synaptic responses occurring in this voltage range would be the subject of modification by intrinsic conductances and that simple linear summation of synaptic inputs is very unlikely. Repolarizing trajectories during descending ramps (dashed lines 4-6 in Fig. 3A) were almost a mirror image of upward trajectories. However, note that downward arrow in Fig. 3A signals the end of depolarizing current. Note that voltage kept rising, after the arrow, while the current ramp was already falling. This suggests that inward currents remained active opposing repolarization. This caused counterclockwise hysteresis in the depolarizing portion of the I-V plot (Fig. 3C, arrows follow time direction). Neurons lost their counterclockwise hysteresis (Fig. 3C) after TTX (plot not shown, but see Figs. 5B, 6B). This correlates with TTX effects on inward rectification during current steps (Bargas et al. 1989; Nisenbaum et al. 1994). Therefore, these observations suggest that inward rectification has a Na^+ component.

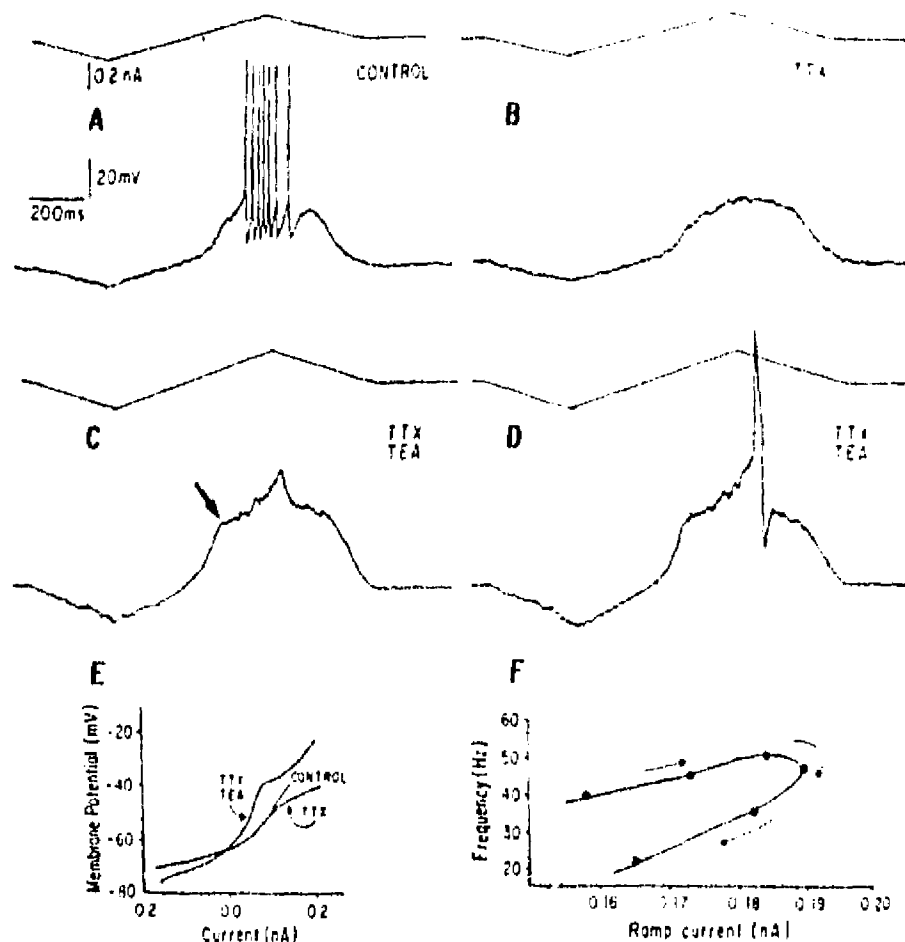
On the other hand, note that the last voltage trajectory during the ascending ramp response (number 3 in Fig. 3A) exhibits a smaller slope than the previous trajectory (number 2). This suggests coactivation and predominance of outward currents during this stage. In-

ward rectification predominates during most of the subthreshold depolarization, but apparent slope- R_{in} decreases, and the predominant response becomes outward rectification, at a narrow voltage range just below firing threshold.

Activation of action potentials induced a fast repolarization and afterpotential during the descending ramp response (Fig. 3B, Pineda et al. 1992). This almost abolished hysteresis (Fig. 3D). Therefore, activation of conductances at the suprathreshold level changed the repolarizing response. Firing threshold for action potential generation was ca. -45 mV in this case. Consequently, in order to restrict our analysis to the subthreshold response, it was restricted to the ascending I-V plot.

Figure 4A illustrates the firing of action potentials at the top of a ramp response in another neuron. Note that repetitive firing (Fig. 4A) was completely blocked after $1 \mu\text{M}$ TTX (Fig. 4B), even if stimulus strength was increased. However, during suprathreshold stimulation in the presence of TTX, a fast repolarization appeared during the descending ramp (Fig. 4B). It was similar to the afterpotential shown in Fig. 3B, but it was not preceded by regenerative potentials. Nonetheless, this same stimulus could elicit, on some occasions, a TTX-resistant (Fig. 4C), Cd^{2+} -sensitive spike ($50-100 \mu\text{M}$; Fig. 4D) in two out of ten neurons. The threshold for TTX-resistant regenerative events was between -30 and -35 mV in

Fig. 6A-F Subthreshold response has tetraethylammonium- (TEA)-sensitive conductances. **A** Control; **B** tetrodotoxin ($1 \mu\text{M}$ TTX) blocked firing but did not block most of the subthreshold inward rectification. **C** Addition of 5 mM TEA in the presence of $1 \mu\text{M}$ TTX increased the slope of the ramp response over the whole subthreshold voltage range. However, TEA did not block the last voltage trajectory (beginning at arrow). Note a TTX-resistant local response during TEA. **D** A TTX-resistant action potential was evoked at the descending ramp during TEA application. **E** Superimposed I-V plots (for A-C) revealed that Na^+ conductance contributes very little to inward rectification as compared to TEA-sensitive conductances. **F** Frequency-intensity plot (F-I plot) for record in A. Same stimulus strength was used in all frames



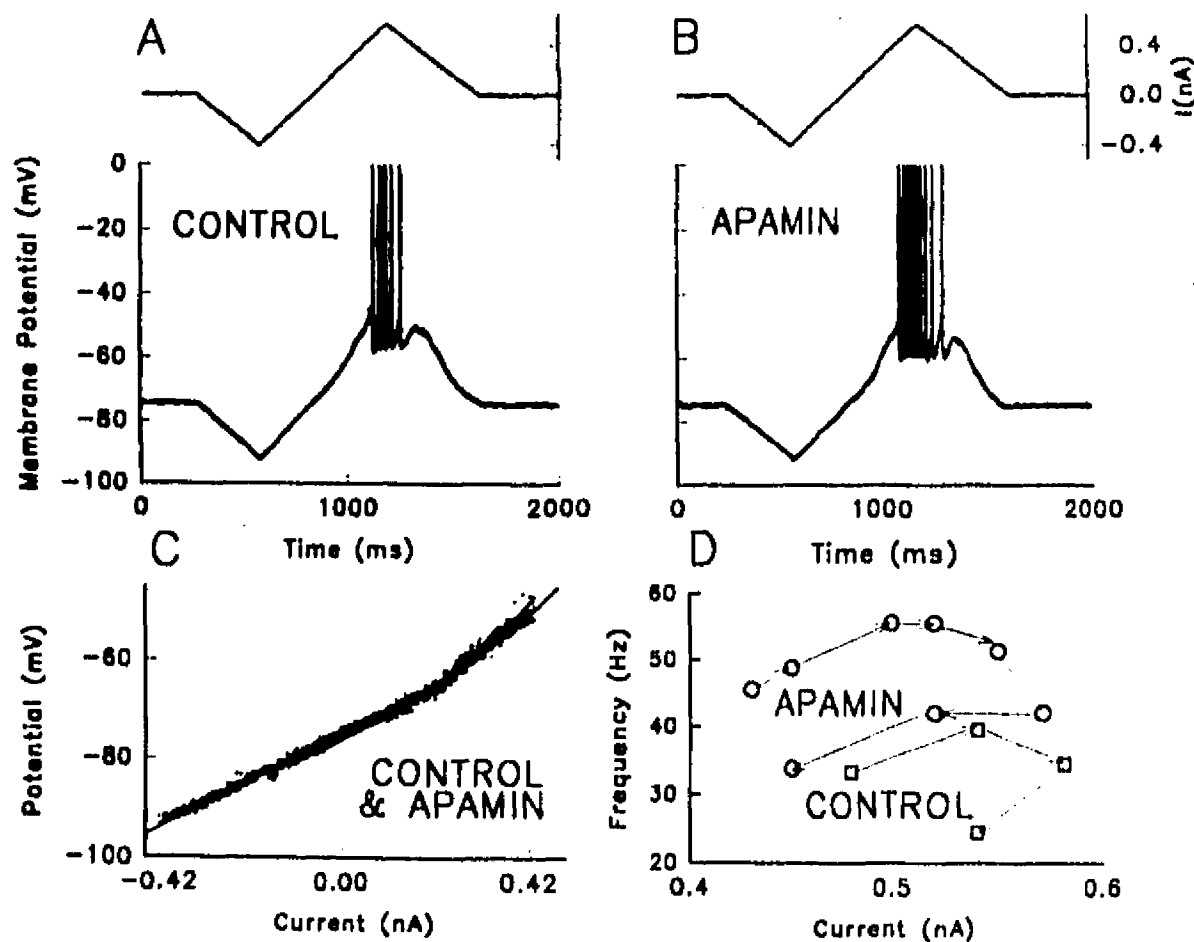
these conditions. This is more positive than the threshold for Ca^{2+} currents in voltage-clamp conditions (Bargas et al. 1994). The repolarization during the descending ramp was also sensitive to Cd^{2+} (Fig. 4D). As a previous report has shown that a part of the afterpotential is Ca^{2+} -activated (Pineda et al. 1992), these observations suggest that activation of Ca^{2+} -currents and Ca^{2+} -dependent outward currents may be present in the ramp depolarization even in the absence of regenerative responses, as in Fig. 4B. However, note that in order to elicit such responses, a stimulus higher than the threshold for firing was used.

Actions of ion conductance blockers

Ion channel antagonists modified the subthreshold response in different ways. As shown in Fig. 5A and B, most of the subthreshold response was unchanged after firing blockade by $1 \mu\text{M}$ TTX. This means that the main contributor for inward rectification is not a Na^+ conductance. Also, the last voltage trajectory occurring at -54 mV (arrow in Fig. 5A or number 3 in Fig. 3A) remained unchanged in the presence of TTX, even if a stronger suprathreshold stimulus was applied (cf. Fig. 5B, G with 5A). Threshold for action potentials in Fig. 5A was -43 mV . Thus, outward, not inward currents predominate during the last voltage trajectory, even if inward currents are also present (as shown in Fig. 3A-C).

It was the addition of 1 mM 4-AP that abolished the last voltage trajectory during the ascending ramp response (Fig. 5C,D). Local and autoregenerative TTX-resistant events were evoked in its place. However, 4-AP did not affect inward rectification in the rest of the subthreshold response. Characteristically, TTX-resistant events appeared during the ascending, not the descending ramp. This occurred at different stimulus strengths. Threshold for TTX-resistant events was between -45 and -40 mV in the presence of 4-AP. This shows that 4-AP lowers the threshold for TTX-resistant events (see Fig. 4C). Further, threshold for TTX-resistant events now coincides with activation voltage for Ca^{2+} currents during voltage clamp (Bargas et al. 1994). Note also that regenerative responses were followed by strong repolarizations and afterhyperpolarizations (AHPs). AHPs were manifest as a strong outward rectification with almost zero slope, whether the ramp was going up or down (Fig. 5D,F). These action potentials and AHPs were not blocked by $100 \mu\text{M}$ Ni^{2+} (Fig. 5E,F), but they were blocked by $100 \mu\text{M}$ Cd^{2+} (Fig. 5G). This argues in favor of high voltage-activated (HVA) Ca conductances

Fig. 7A-D Apamin-sensitive conductances do not contribute to the subthreshold response. A Control firing; B firing during $1 \mu\text{M}$ apamin application. Note increase in firing frequency for the same stimulus. C Ascending I-V plots before and during apamin application were not significantly different. D Apamin increased firing for the same current, but clockwise hysteresis was still present



underlying these events. Also, ramp responses showed that 4-AP-insensitive outward rectification is in part Ca^{2+} -dependent (see also Fig. 4). However, a 4-AP-resistant and Ca^{2+} -independent outward rectification was disclosed during Cd^{2+} blockade (Fig. 5G). A superimposition of ascending I-V plots for records in Fig. 5B,C, and G is illustrated in Fig. 5H. Note that the impact of 4-AP (1 mM) blockade was only apparent at the last voltage trajectory.

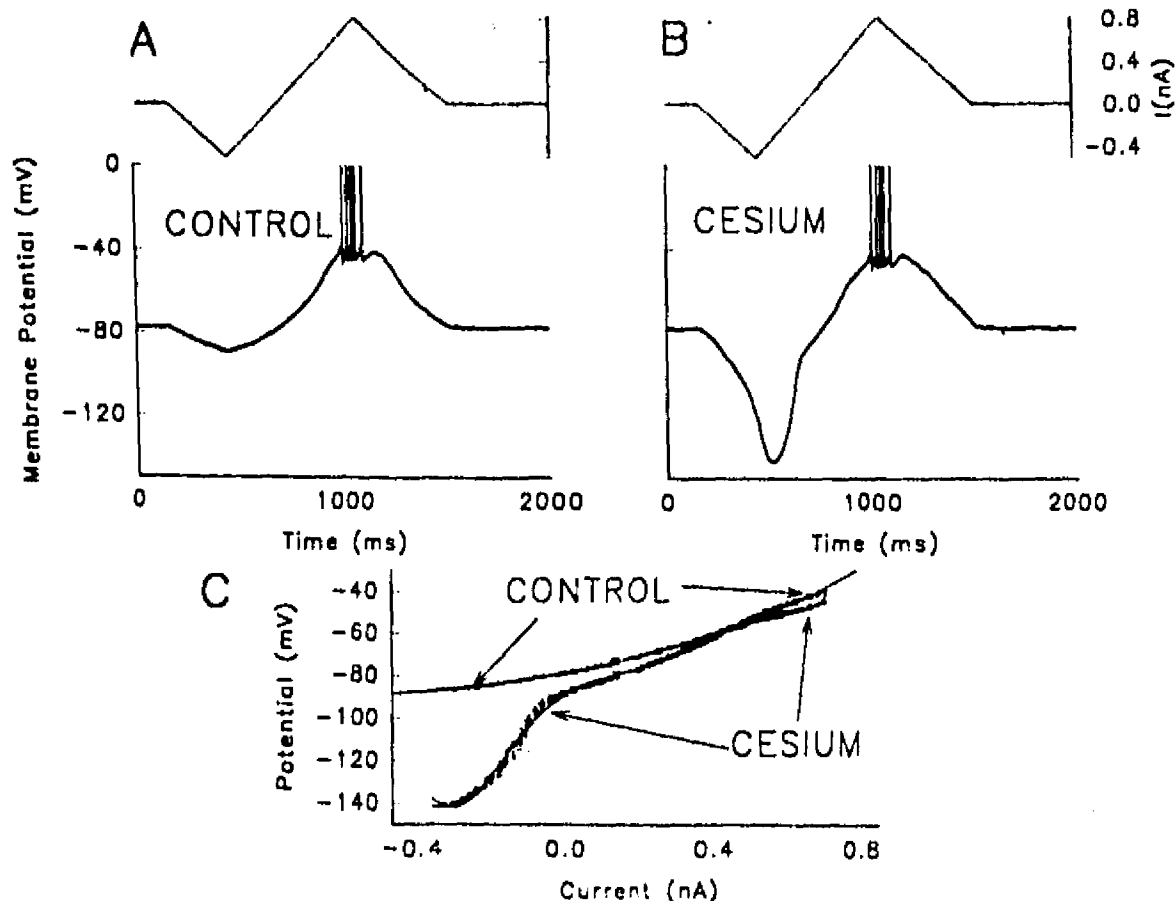
Figure 6 shows the effects of another outward current blocker: TEA (5 mM). Interestingly, its actions were different than 4-AP actions in several respects. The control record in Fig. 6A shows repetitive firing (threshold -44 mV), readily abolished by $1 \mu\text{M}$ TTX (Fig. 6B). In this case, the stimulus strength was maintained throughout the experiment. Note again that, in most of the subthreshold voltage range, there were no noticeable changes in the amount of inward rectification with TTX. Superimposition of I-V plots shows that the contribution of TTX-sensitive currents was limited to a range just below threshold voltage (Fig. 6E). Addition of 5 mM TEA in the presence of $1 \mu\text{M}$ TTX increased the slope of the ascending ramp response over the whole subthreshold voltage range (Figs. 6C, D-E). Thus, TEA-sensitive channels are main contributors to inward rectification. Noticeably, the last 4-AP-sensitive voltage trajectory, was not blocked by TEA (beginning at arrow in Fig. 6C). However, it was displaced to more depolarized membrane potentials (arrow at -42 mV). As with 4-AP, TTX-resistant local (Fig. 6C) and regenerative

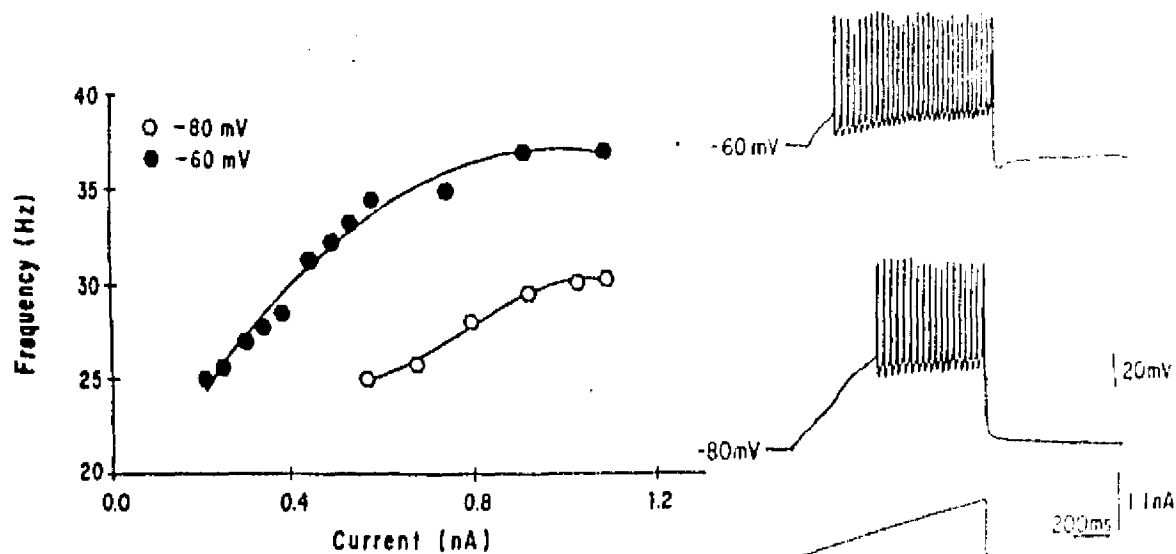
events (Fig. 6D) could be evoked during TEA. However, broad (50 ms) overshooting action potentials would characteristically fire during descending, not ascending, ramps (cf. Figs. 5D and 6D). Again, these TTX-resistant events were blocked by $100 \mu\text{M}$ Cd^{2+} , and not by $100 \mu\text{M}$ Ni^{2+} (data not shown). Their threshold was around -33 mV. This means that TEA does not affect the threshold for Ca^{2+} events as much as 4-AP does. Note that TEA-insensitive AHPs and repolarizations follow the TTX-resistant events.

Superimposed I-V plots for this experiment are shown in Fig. 6E. A typical relation between firing frequency and ramp current (F-I plot) is shown in Fig. 6F. Note that hysteresis for the F-I plot was clockwise. This reflects the activation of suprathreshold outward currents (Jahnsen and Llinás 1984; Jahnsen 1986; Yarom and Llinás 1987).

From the above results it can be predicted that, if the action of ion blockers reflects the blockage of subthreshold conductances, then a compound which mainly affects conductances generated as a product of action potential firing (suprathreshold) should not be reflected on the ascending ramp. This prediction is correct as shown in Fig. 7, where I-V plots (Fig. 7C) taken before

Fig. 8A-C Cs^+ -sensitive conductances contribute to inward rectification at the most negative voltage range. A Control; B addition of 5 mM Cs^+ increased slope- R_{in} at the most hyperpolarized range. C Superimposed I-V plots show the blockage of inward rectification at hyperpolarized potentials





(Fig. 7A) and during application of $1 \mu\text{M}$ apamin (Fig. 7B), superimpose closely. Nonetheless, records and F-I plots (Fig. 7D) show that apamin did increase the current to frequency transduction (Pineda et al. 1992). Therefore, ascending ramp responses only reflect the action of subthreshold activated ion conductances.

The action of TEA in all the subthreshold voltage range (Fig. 6E) suggests the presence of conductances activated by hyperpolarization. Some of these conductances are sensitive to TEA (e.g., Stelling and Jacob 1992). These conductances would be main contributors to inward rectification (Jiang and North 1991). Another blocker for these conductances is Cs^+ administered extracellularly. As shown in Fig. 8, 5 mM Cs^+ mainly affected the most negative voltage range of the subthreshold response. At these potentials, a dramatic increase in slope- R_{in} occurred (cf. Fig. 8A and B and see I-V plots in C). Neither the firing frequency (Fig. 8A,B) nor the subthreshold response at relatively more positive potentials had great changes during Cs^+ application. Hyperpolarizing response during Cs^+ application was not symmetric (Fig. 8B; Stelling and Jacob 1992), and at relatively more positive potentials the effects of Cs^+ progressively decayed (up to -70 mV).

From the above experiments one can conclude that several ion conductances contribute to make up the subthreshold response in these cells. Some of them may be transient conductances -- as described for 4-AP-sensitive conductances (Surmeier et al. 1988, 1991; Bargas et al. 1989; Nisenbaum et al. 1994). If this is so, they would contribute differentially to firing patterns depending on previous membrane potential. To test this hypothesis, firing was evoked after ramps beginning at two different holding potentials: -80 and -60 mV . Figure 9 shows that the input to output relationship changed depending on previous membrane potential. F-I slope increased with membrane depolarization and firing response was facilitated for the same stimulus strength. This is expected if some contributing outward currents were inactivating (Bargas et al. 1989; Pineda et al. 1992; Nisenbaum et al. 1994). However, the lowest recorded

frequency was similar at the two potentials ($\approx 25 \text{ Hz}$), even if the stimulus current was different. The lowest recorded frequency depends on the slope of the ramp stimulus (not analyzed here).

frequency was similar at the two potentials ($\approx 25 \text{ Hz}$), even if the stimulus current was different. The lowest recorded frequency depends on the slope of the ramp stimulus (not analyzed here).

Discussion

In this work, the responses to ramp currents mimicking the timing of physiological activation (see Wilson 1992) were used to analyze subthreshold membrane responsiveness. A main conclusion is that several ion conductances contribute to subthreshold depolarizations of this sort. Therefore, these conductances probably shape physiological synaptic activation.

Evidence was found for the presence of TTX-, Cd^{2+} -, 4-AP-, TEA- and Cs^+ -sensitive conductances in the subthreshold range. However, their contribution and voltage range of action were very different. These different ion conductances could work in concert, opposing or modulating each other, to adjust or preset the input-output function of the neuron for a given stimulus. It is likely that conductances described in voltage-clamp studies as being selectively blocked by the blockers used here (Surmeier et al. 1988, 1991, 1992; Bargas et al. 1991b, 1994; Ogata and Tatebayashi 1990; Jiang and North 1991) could be responsible for this presetting or adjustment. Consequently, this adjustment could be regulated by the transmitters that modulate these conductances (Akins et al. 1990; Surmeier et al. 1992, 1993; Pacheco-Cano et al. 1993; Pineda et al. 1993). In this respect, the present experiments describe the characteristic response before and after some of the contributing conductances are blocked. Therefore, we can now compare the effects of blockers with those produced by transmitters. This permits us to better interpret the modulatory actions of transmitters on firing and synap-

FALLA DE ORIGEN

tically driven depolarizations (e.g., Pacheco-Cano et al. 1993).

Ion conductances participating in slow depolarizations

Most probably, we always recorded from spiny projection neurons (e.g., Chang et al. 1982; Wilson 1990; all biocytin-injected neurons in this sample were medium spiny; $n > 25$). As slope- R_{∞} depends on membrane potential in any given neuron, R_{∞} reported here was always evaluated at -70 mV (see Materials and methods). A unimodal distribution was obtained (see Results); nevertheless, variation in the amount of inward rectification was considerable, from neuron to neuron, under the same recording conditions. Thus, until more data is available, this variability can be seen as arising from a single neuronal population. As has been indicated previously, I-V plots and R_{∞} measurements also differ, depending up on recording techniques and conditions (Bargas et al. 1988; Storm 1990). These differences cannot be attributed just to lesions (Storm 1990). The loss or variation in any source of subthreshold rectification will result in a different I-V plot and R_{∞} (Benson and Adams 1987). And as these observations show, many types of conductance contribute to the subthreshold response. For example, in many cells, a substantial part of the inward rectification is lost during whole-cell recordings if precautions are not taken (e.g., Stelling and Jacob 1992).

Ramp responses exhibited complex but reproducible changes in voltage trajectory (Fig. 3). Cs^+ and TEA blocking actions (Figs. 6, 8; e.g., Hille 1992; Stelling and Jacob 1992; Yarom and Llinás 1987) suggest that conductances activated by hyperpolarization predominate at relatively negative potentials. These conductances deactivate at -70 to -65 mV. Accordingly, voltage rate of rise increased (Figs. 2, 3, 5, 6) when the depolarization reached this level. In fact, the steepest slope- R_{∞} was obtained when the ramp response reached potentials between -65 and -50 mV. Neither TTX nor Cd^{2+} changed the slope of the I-V plot in this voltage range (Figs. 5, 6). Therefore, we conclude that subthreshold rectification largely represents the closing of inward rectifier channels (Wilson 1992). This is in agreement with both voltage-clamp measurements (Jiang and North 1991) and Cs^+ action, which declined around -70 mV (Fig. 8).

However, by comparing the actions of TEA and Cs^+ , it is evident that TEA also increased slope- R_{∞} at potentials between -70 and -50 mV (Fig. 6). Indeed, TEA was the only blocker that acted in this potential range. This suggests that some, yet undescribed, TEA-sensitive conductance plays a role in this voltage range of the subthreshold response in these cells. Evidence of cholinergic agents increasing the slope- R_{∞} in this potential range have been reported (Pineda et al. 1993).

A sudden drop in slope- R_{∞} occurred when the ramp response surpassed potentials more positive than -55

or -50 mV. This marks the beginning of the last voltage trajectory before reaching firing threshold (Fig. 3, dashed-line 3 and Figs. 2, 5, 6). A decrease in slope- R_{∞} indicates a predominant activation of outward currents in this voltage range. Remarkably, TEA increased slope- R_{∞} in most of the subthreshold range, but it did not block this last voltage trajectory (Fig. 6). However, the last voltage trajectory during the ascending ramp response was blocked by 4-AP (Fig. 5). The concentration of 4-AP used (1 mM) would partially affect fast transient outward currents and completely block slow transient outward currents (Surmeier et al. 1991; Nisenbaum et al. 1994). This last voltage trajectory is not readily seen on steady-state I-V plots obtained with current steps (e.g., Fig. 1). The participation of transient outward currents at this voltage range is also supported by the observation that holding potential modifies the gain of the F-I function (Fig. 9). It is also compatible with the slow inactivation kinetics reported for a class of these currents (Surmeier et al. 1991; Nisenbaum et al. 1994). Therefore, the present observations suggest that 4-AP-sensitive conductances do play a significant role in input integration, even when the stimuli is made up of slow ramp depolarizations, as in *in vivo* conditions. Depolarizing episodes much longer than 1 s would be needed to elude the escape of the transient outward currents.

However, in spite of the outward current predominance in the last voltage trajectory, a role for inward currents was also evident. Both I-V counterclockwise hysteresis (Fig. 3) and TTX reduction of slope- R_{∞} (Fig. 6E) suggest Na^+ participation.

On the other hand, fast, Cd^{2+} -sensitive repolarizations suggest calcium entry (Fig. 4B-D). They occur even in the absence of regenerative events (Fig. 4B). Also, when potassium currents are blocked with 4-AP, TTX-resistant local responses and action potentials are disclosed. They are accompanied by fast repolarizations and AHPs. All these events are blocked by micromolar Cd^{2+} and not by micromolar Ni^{2+} . Therefore, they should be produced by high voltage activated (HVA) Ca^{2+} currents (Bargas et al. 1991, 1994). The threshold for Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent events is very near the firing threshold for Na^+ action potentials. Moreover, they require stronger stimuli than those needed to reach the firing threshold (cf. Figs. 4B and 5B). Therefore, their contribution to the subthreshold response is difficult to evaluate. Nonetheless, the lack of action of apamin during depolarizing ramp responses (Fig. 7) suggests that the role of Ca^{2+} -activated currents is mainly accomplished at suprathreshold voltage levels.

Note that changes in trajectory (e.g., Fig. 3) during the ramp responses do not exactly match voltage thresholds reported for described conductances using step-like stimuli or voltage-clamp conditions (Bargas et al. 1989, 1991b; Surmeier et al. 1988, 1991; Nisenbaum et al. 1994). This is expected because during very slow depolarizations all conductances act sequentially and in concert, each influenced by the others. Except for the

fact that physiological synaptic integration comes mainly from dendrites, a slow ramp depolarization would represent more closely the physiological excitation that these neurons exhibit *in vivo*.

In conclusion, the present experiments investigated the contribution of subthreshold conductances during responses that mimicked the timing of physiological activation and compared them with traditional step-like responses. On the one hand, the results show that the correspondence of the I-V plots obtained by the two methods was close enough to be confident that ramp responses give a good idea of both R_{in} and the amount of rectification. On the other hand, ion blockers evidenced that slow subthreshold responses might be very complex. At the very least, several potassium and sodium conductances contribute to these responses and, thus, are likely to modify the transformation of synaptic inputs into firing of action potential trains.

Acknowledgements Research was partially supported by DGAPA UNAM and CONACyT (Mexico). We also thank Dagoberto Tapia for technical assistance.

References

- Akins PT, Surmeier DJ, Kitai ST (1990) Muscarinic modulation of the transient potassium current in rat neostriatal neurons. *Nature* 344:240-242
- Baldissera F, Campadelli P, Piccinelli L (1987) The dynamic response of cat gastrocnemius motor units investigated by ramp-current injection into their motoneurons. *J Physiol (Lond)* 387:317-330
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1988) Electrotone properties of neostriatal neurons are modulated by extracellular potassium. *Exp Brain Res* 72:390-398
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989) An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res* 75:146-156
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1991a) Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res* 539:159-163
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994) Acutely isolated rat neostriatal neurons express four types of high-voltage activated Ca^{2+} current. *J Neurosci* (in press)
- Bargas J, Surmeier DJ, Kitai ST (1991b) High-voltage and low-voltage activated calcium currents are expressed by neurons cultured from embryonic rat striatum. *Brain Res* 541:70-74
- Benson JA and Adams WB (1987) The control of rhythmic neuronal firing. In: Kaczmarek LK, Levitan IB (eds) *Neuromodulation*. Oxford University Press, New York, pp 100-118
- Chang HF, Wilson CJ, Kitai ST (1982) A Golgi study of rat neostriatal neurons: light microscopic analysis. *J Comp Neurol* 208:107-126
- Galarraga E, Bargas J, Sierra A, Aceves J (1989) The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 75:157-168
- Galarraga E, Bargas J (1991) Responses to injection of ramp currents in neostriatal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 17:849
- Hille B (1992) *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer, Sunderland, Mass
- Horikawa K, Armstrong WE (1988) A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25:11-11
- Hull CD, Bernardi G, Buchwald NA (1970) Intracellular responses of caudate neurons to brain stem stimulation. *Brain Res* 22:163-179
- Jack HB, Noble D, Tsien RW (1975) *Electric current flow in excitable cells*. Clarendon, Oxford
- Jahnson H (1990) Electrophysiological characteristics of neurons in the guinea-pig deep cerebellar nuclei *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 372:129-147
- Jahnson H, Elinäs R (1984) Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurons: an *in vitro* study. *J Physiol (Lond)* 349:205-226
- Jiang ZG, North RA (1991) Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 443:533-553
- Kita H, Kita T, Kitai ST (1985) Active membrane properties of rat neostriatal neurons in an *in vitro* slice preparation. *Exp Brain Res* 60:54-62
- Nisenbaum ES, Xu ZC, Wilson CJ (1994) Contribution of a slowly inactivating potassium current to the transition to firing of neostriatal spiny projection neurons. *J Neurophysiol* 71:1174-1189
- Ogata N, Tatebayashi H (1990) Sodium current kinetics in freshly isolated neostriatal neurons of the adult guinea pig. *Pflügers Arch* 416:594-603
- Pacheco-Gano ME, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (1993) Comparison of D₁ and D₂ agonist actions on neostriatal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 23:127
- Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J (1992) Chloridotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 68:287-294
- Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernandez J, Galarraga E (1993) M₁ receptors modulate afterhyperpolarization amplitude (AHP) and excitability in neostriatal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 23:127
- Stelling JW, Jacob HC (1992) The inward rectifier potassium current underlies oscillatory membrane potential behavior in bovine pigmented colary epithelial cells. *J Physiol (Lond)* 458:439-456
- Storm JF (1990) Why is the input conductance of hippocampal neurons impaled with microelectrodes so much higher than when giga-seal patch pipettes are used? *Soc Neurosci Abstr* 16:506
- Schultz W, Romo R (1992) Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. I. Preparatory activity in the anterior striatum. *Exp Brain Res* 91:363-384
- Surmeier DJ, Bargas J, Howe AR (1993) Dopamine D₁ receptor activation reduces Ca^{2+} currents in acutely dissociated rat neostriatal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 23:978
- Surmeier DJ, Bargas J, Kitai ST (1988) Voltage-clamp analysis of a transient potassium current in rat neostriatal neurons. *Brain Res* 473:187-192
- Surmeier DJ, Eberwine J, Wilson CJ, Cao Y, Stefani A, Kitai ST (1992) Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10178-10182
- Surmeier DJ, Stefani A, Foehring RC, Kitai ST (1991) Developmental regulation of a slowly-inactivating potassium conductance in rat neostriatal neurons. *Neurosci Lett* 122:41-46
- Uehunura N, Cherubini F, North A (1989) Inward rectification in rat nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol* 62:1280-1286
- Yarom Y, Elinäs R (1987) Long-term modifiability of anomalous and delayed rectification in guinea pig inferior olivary neurons. *J Neurosci* 7:1166-1177
- Wilson CJ, Groves PM (1981) Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Res* 220:67-80
- Wilson CJ (1990) Basal Ganglia. In: Shepherd GM (ed) *The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press, Oxford
- Wilson CJ (1992) Dendritic morphology, inward rectification and the functional properties of neostriatal neurons. In: *Single neuron computation*. Academic, Boston, pp 141-171

FALLA DE ORIGEN