



03081 8
27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades e Instituto de Fisiología Celular

"Acciones IN VITRO de la Dopamina y sus Agonistas D_1 y D_2 Sobre la Rectificación Subumbral de las Neuronas Neoestriatales de Proyección"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA,
ESPECIALIDAD NEUROCIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en IBB MARIA TRINIDAD PACHECO CANO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ELVIRA GALARRAGA

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
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.

Dedicatorias

Al creador del Universo

A Fernando, con todo mi amor. Por su paciencia, su cariño y su sonrisa en los momentos más difíciles. Por todo lo que él es y por todo lo que me ha brindado, sin lo cual no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A la memoria de mi padre y
A mi madre, por el ejemplo, el cariño y el apoyo que siempre me ha dado.

A mis hermanas: Lupita, Delia, Jose, Teté y Paty y a mis cuñados: Loren, David, Arturo y Miguel Angel.

A Tere, Luis, Marisol, Enrique, Ana y Paco por ser mis amigos.

A mis sobrinos: Teté, Miguelito, Mari Fer, Magos, Daniela, Anita, Emilio y Ana Sofia, con cariño.

A mi amigo Ismael: por su amistad y por animarme a seguir.

Al Dr. Alfredo Feria Velasco, ex-Jefe de la Subjefatura de Investigación Biomédica Básica del Instituto Mexicano del Seguro Social, por la amistad y el apoyo que me brindó en todo momento.

A mis Familiares, amigos y compañeros.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. Elvira Galarraga, mi tutora, el haberme permitido realizar en su laboratorio la presente tesis, así como el apoyo que me otorgó.

Al Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoitia agradezco también, el apoyo que me brindó siempre en todo momento.

A mis sinodales: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dra. Magda Giordano, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Arturo Hernández Cruz, Dr. Daniel Martínez Fong y Dr. Ranulfo Romo Trujillo, por su paciencia en la revisión de mi tesis así como por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Emilio Castellanos Juárez. Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Patología Experimental del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo incondicional que siempre me brindó.

También agradezco a las autoridades de la Jefatura de Investigación Biomedica del IMSS y a las del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por el apoyo y las facilidades que me brindaron durante la elaboración de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico que me otorgó a través de las Cátedras Patrimoniales de Excelencia, para hacer posible la culminación de la presente tesis.

ÍNDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCION	5
ANTECEDENTES	7
A. ORGANIZACION ANATOMICA DEL NEOESTRIADO	8
A.1 COMPOSICIÓN CELULAR DEL NEOESTRIADO	11
A.1.1 Neuronas de Proyección	11
A.1.2 Interneuronas	16
A.2 CONEXIONES SINAPTICAS EN EL NEOESTRIADO	18
A.2.1 Conexiones de la Corteza Cerebral con el Neoestriado	21
A.2.2 conexiones del Tálamo con el Neoestriado	22
A.2.3 Conexiones de la Substancia Negra Compacta con el Neoestriado	22
B. NEUROTRANSMISORES Y NEUROMODULADORES EN EL NEOESTRIADO	23
B.1 Péptidos en el Neoestriado	23
B.2 GABA en el Neoestriado	24
B.3 Acetilcolina en el Neoestriado	26
B.4 Glutamato en el Neoestriado	28
B.5 Dopamina en el Neoestriado	28
C. RECEPTORES DOPAMINERGICOS	29
C.1 Subfamilias de Receptores Dopaminérgicos	29
C.2 Similitudes y Diferencias de los Receptores Dopaminérgicos	30
C.3 Farmacología de los Receptores Dopaminérgicos	32
C.4 Localización de los Receptores en el Sistema Nervioso Central	36
C.5 Sinergismo entre los Receptores D ₁ /D ₂	39
D. RECEPTORES DOPAMINERGICOS EN EL NEOESTRIADO	40
E. FISIOLOGIA DE LAS NEURONAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	41
E.1 Propiedades Membranales Intrínsecas de las Neuronas	42
E.2 Conductancias Iónicas Presentes en las Neuronas del SNC	43
E.2.1 Corrientes Entrantes Persistentes ó de Inactivación Lenta	46
E.2.2 Corrientes Salientes Persistentes ó de Inactivación Lenta	47
E.2.3 Corrientes Entrantes Transitorias ó de Inactivación Rápida	48
E.2.4 Corrientes Salientes Transitorias ó de Inactivación Rápida	49
E.2.5 Rectificadores Entrantes	50

F. ELECTROFISIOLOGIA DE LA NEURONA ESPINOSA MEDIANA DE PROYECCION	55
F.1 Patrón de Disparo de las Neuronas Espinosas Medianas	55
F.2 Conductancias Iónicas Participantes en el Disparo de las Neuronas Espinosas Medianas	57
F.3 Relación Corriente-Voltaje	59
G. ACCIONES ELECTROFISIOLOGICAS DE LA DOPAMINA EN EL NEOESTRIADO	61
OBJETIVOS	68
HIPOTESIS	68
MATERIALES Y METODOS, RESULTADOS	69
<i>Artículos Publicados</i>	
<i>Estudio 1. Subthreshold Rectification in Neostriatal Spiny Projection Neurons. Exp. Brain Res. (1994) 100: 239-249.</i>	
<i>Estudio 2. Inhibitory Action of Dopamine involves a Cs⁺-sensitive subthreshold conductance in neostriatal neurons. Exp. Brain Res. (1996).</i>	
DISCUSION	70
CONCLUSIONES	80
REFERENCIAS	82

RESUMEN

Las disfunciones de los ganglios basales (GB), causan un amplio espectro de desórdenes motores, tales como la corea de Huntington, el balismo, la distonía y la enfermedad de Parkinson. El neostriado (NE) representa el núcleo de entrada de los ganglios basales. A éste llegan aferencias provenientes de la corteza cerebral, de los núcleos intralaminares del tálamo, de los núcleos del rafe y de los neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (SNc). Por otro lado, el NE proyecta principalmente a tres estructuras de los GB: el globo pálido externo (GPe), el globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra reticulada (SNr).

Citológicamente el neostriado está formado en su mayor parte (95%) por neuronas espinosas medianas (NEM) de proyección. Se ha demostrado, a través de registros intracelulares *in vivo*, que las neuronas neostriatales de proyección se encuentran más bien a potenciales hiperpolarizados y usualmente silentes; siendo estos períodos de hiperpolarización membranar y de silencio eléctrico, interrumpidos por períodos de despolarización lenta en forma de rampa con una duración aproximada de hasta 3 segundos. Estudios de fijación de voltaje y de fijación de corriente, han hecho evidente la participación de diversas conductancias iónicas a nivel subumbral durante la despolarización lenta característica de estas neuronas. Sin embargo el papel de estas conductancias había sido inferido únicamente a través de pulsos rectangulares de corriente y no durante las despolarizaciones lentas que mimetizan la activación fisiológica.

En este trabajo se estudió *in vitro* la conducta electrofisiológica subumbral de las neuronas de proyección del NE, a través del registro intracelular en rebanadas de neostriado de rata utilizando como protocolo de estimulación la inyección intracelular de rampas de corriente (0.5 nA-1nA/s; de alrededor de -100 a alrededor de -40 mV). La estimación de la relación corriente-voltaje se realizó utilizando ambos protocolos de estimulación: pulsos de corriente e inyección intracelular de rampas de corriente. En el rango subumbral, la respuesta característica predominante en la mayoría de estas neuronas ante la inyección intracelular de rampas de corriente, fué la rectificación entrante. La cantidad de rectificación en estas neuronas fué compleja y muy variable. Los bloqueadores de corrientes entrantes tales como la tetrodotoxina (TTX) ó el cadmio (Cd^{2+}) decrementaron la rectificación entrante, mientras que los bloqueadores de corrientes salientes tales como el tetraetilamonio (TEA) ó la 4-aminopiridina (4-AP) aumentaron la rectificación entrante. Sin embargo, la mayor parte de la rectificación entrante fué debida a las conductancias sensibles al TEA- y al cesio (Cs^+) y no a aquellas sensibles al TTX- ó al Cd^{2+} . Las conductancias sensibles al Cs^+ predominaron a potenciales más negativos, mientras que las conductancias sensibles a la 4-AP predominaron a potenciales ± 10 mV por abajo del umbral de disparo.

Por otro lado, las acciones observadas hasta la fecha con la dopamina y sus agonistas a los receptores D_1 y D_2 en estas neuronas, han sido múltiples y aparentemente contradictorias. Dichas acciones se han tratado de explicar de acuerdo a: a) la existencia de dos tipos morfológicamente diferentes de neuronas, en las que coexisten diferentes péptidos como la sustancia P y la encefalina, y las cuales proyectan a diferentes núcleos dentro de los ganglios basales; b) la segregación de los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2 en dichos tipos diferentes de neuronas; c) al estudio de la acción de la dopamina y sus agonistas D_1 y D_2 en neuronas en las que co-existen los receptores dopaminérgicos, pero registradas en condiciones muy diferentes. Así, en un intento de obtener respuestas más reproducibles y de conocer las acciones modulatorias de la dopamina y sus agonistas

D₁ y D₂ sobre estas neuronas, en la segunda parte de este trabajo se compararon las acciones de la dopamina y de sus agonistas D₁ y D₂, sobre las respuestas de membrana subumbrales observadas ante la inyección intracelular de rampas de corriente. Las respuestas obtenidas con la dopamina y los agonistas dopaminérgicos, luego de inducir el disparo en las neuronas neocorticales con la inyección intracelular de rampas de corriente, fueron muy reproducibles. La dopamina decrementó tanto el disparo neuronal como la resistencia de entrada membranosa (R_N). El cambio en la R_N se manifestó como un aumento en la rectificación entrante. El potencial de reversión fue de aproximadamente -87 mV. Los agonistas al receptor D₁ SKF 38393 y Cl-APB mimetizaron ambos efectos de la dopamina, con un potencial de reversión alrededor de -89 mV. Los efectos fueron bloqueados por la presencia de 5-10 mM de Cs⁺, pero no por 1mM de TTX, sugiriendo que los principales efectos de los agonistas D₁ sobre la resistencia de entrada son debidos a conductancias subumbrales sensibles al Cs⁺ y a nivel postsináptico. Las acciones ejercidas por la dopamina y sus agonistas D₁ parecen involucrar a la proteína cinasa A (PKA), ya que análogos del AMPcíclico, mimetizaron los efectos observados con ambos neuromoduladores.

El agonista D₂, quinpirole no produjo ningún cambio en la R_N, a pesar de que produjo un decremento en la frecuencia de disparo neuronal. Sugiriendo que el efecto principal del agonista D₂ es sobre conductancias supraumbrales. Todos los efectos observados fueron respectivamente bloqueados por los antagonistas D₁ y D₂. Asimismo, las acciones de los agonistas D₁ y D₂ fueron observadas en casi la totalidad de las células estudiadas, por lo que nuestros datos no apoyan la idea de la segregación de los receptores D₁ y D₂ en diferentes neuronas, pero favorecen la idea de la co-localización de ambos tipos de receptores en una misma neurona espinosa mediana.

La morfología de las células registradas valorada a través de la inyección intracelular de biocitina, mostró que todas las neuronas estudiadas fueron del tipo espinosas medianas de proyección. Asimismo, no se encontró una relación entre los efectos observados con la dopamina y sus agonistas D₁ y D₂, con dos ó más tipos de neuronas en las que se pudieran apreciar diferencias en el tamaño del soma neuronal, la densidad de espinas dendríticas y la restricción del axón dentro ó fuera del campo dendrítico. Por lo que nuestros resultados tampoco apoyan la idea de que las acciones de la dopamina y sus agonistas D₁ y D₂, están relacionados con tipos de neuronas morfológicamente diferentes.

En conclusión, las respuestas subumbrales de las neuronas espinosas medianas ante la inyección intracelular de rampas de corriente (IIRC), fueron muy complejas y reproducibles. Contribuyendo a nivel subumbral varias conductancias iónicas sensibles a la TTX, al Cd²⁺, a la 4-AP, al TEA y al Cs⁺. Por otro lado, la dopamina y sus agonistas a los receptores D₁ y D₂ redujeron la frecuencia de disparo evocada por la IIRC y la R_N, aunque sólo los agonistas D₁ mimetizaron la habilidad de la DA de reducir la resistencia de entrada neuronal a nivel subumbral. El potencial de reversión para la acción de los agonistas D₁ estuvo cerca del potencial de equilibrio del K⁺. Las acciones ejercidas por la dopamina y sus agonistas D₁ parecen involucrar a la proteína cinasa A (PKA), ya que análogos del AMPcíclico, mimetizaron los efectos observados con ambos neuromoduladores.

SUMMARY

The neostriatum (NE) represents the input nucleus of the basal ganglia (BG). It receives afferents, among others, from the cerebral cortex, the intralaminar thalamic nuclei, the raphe nuclei and the substantia nigra compacta (SNc) dopaminergic neurons. The NE instead projects to three BG structures: the external globus pallidus (EGP), the internal globus pallidus (IGP) and the substantia nigra reticulata (SNr). The NE is almost composed at a cellular level (95%), by one kind of neuron: the medium spiny neuron (MS). Intracellular *in vivo* recordings have shown that MS neurons are rather at hyperpolarized levels and silent most of the time. Episodes of firing arises from periods of sustained (0.1-3 sec) membrane depolarization. Separating these periods of depolarization are longer episodes of membrane hyperpolarization and greatly decreased synaptic noise.

Voltage and current clamp experiments, have made apparent that several ionic conductances participates in the subthreshold response of neostriatal neurons. However, the role of these ionic conductances have been inferred only from steady rectangular current steps, but not from slow depolarization stimulation, mimicking the timing of physiological activation.

In this work, we studied the subthreshold *in vitro* physiological behavior of MS neurons, after ramp intracellular injection currents (0.5 nA-1 nA/sec), as stimulus. Both current steps and ramp currents were used to estimate the current-voltage relationship (I-V plot).

Inward rectification in the subthreshold range, was the main characteristic of most neurons. The amount of rectification varied greatly, and it was complex. 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.

On the other hand, dopamine (DA) and D_1 and D_2 receptor agonists, have shown multiple and apparently contradictory actions upon the MS neurons. Such controversial effects have been tried to be explained according to: a) different kinds of neurons, which project to separate targets within BG; b) D_1 and D_2 dopamine receptors segregation in different MS neuron classes; c) D_1 and D_2 dopamine receptors found in the same class of spiny neuron, but recorded under quite different experimental conditions.

Therefore, to get more reproducible actions and to understand the modulatory effects of DA and its D_1 and D_2 agonists upon MS neurons, in the second part of this work, it was compared the DA and D_1 and D_2 agonists actions upon the subthreshold membrane properties of these neurons after intracellular ramp injections. Results showed that DA and its D_1 and D_2 agonists, induced reproducible effects in these neurons after neuronal firing was evoked by intracellular ramp injections. Dopamine decreased both firing rate and membrane slope input resistance (R_N) in virtually all tested cells. Input resistance change appeared as an increase in inward rectification. Approximate reversal potential was around -87 mV. The D_1 receptor agonists SKF 38393 and Cl-APB mimicked both dopamine effects with a reversal potential of around -89 mV. The effects were blocked by the presence of 5-10 mM cesium (Cs^+) but not by 1 micromolar tetrodotoxin, suggesting that main D_1 effects on input resistance are due to subthreshold Cs^+ sensitive conductance and at a postsynaptic level. DA and D_1 and D_2 actions upon MS neurons seem to involve the protein kinase A (PKA), since

cAMP analogues, such as dibutyryl cAMP, mimicked the actions of D₁ receptor agonists. The D₂ agonist quinpirole, did not produce any input resistance change, nonetheless, it still produced a decrease in the firing rate. This suggests that the main D₂ effect on firing is due to actions on suprathreshold ion conductances. All effects were blocked by D₁ and D₂ antagonists, respectively. D₁ or D₂ effects were found in the majority of the tested cells. Therefore, our results support the idea of co-localization of D₁ and D₂ receptors within the same MS neuron, and does not support the idea of D₁ and D₂ receptor segregation within different types of neurons.

We always recorded from MS projection neuron, as morphological analysis showed from recorded biocytin-injected neurons. No relations were found between the observed DA and D₁ and D₂ receptor agonists effects, with cytologically different types of MS neurons.

INTRODUCCION

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales que se encuentran localizados en el cerebro anterior y en el mesencéfalo de reptiles, aves y mamíferos. Los principales núcleos que conforman a los ganglios basales son: el neostriado (formado por el núcleo caudado, el putamen y el núcleo accumbens), el globo pálido, la sustancia negra y el núcleo subtalámico. El neostriado representa la vía de entrada de los ganglios basales, y a él llegan aferencias provenientes de la corteza cerebral, de los núcleos intralaminares del tálamo, de la sustancia negra compacta (SNc) y de los núcleos del raquí. Asimismo, el neostriado se proyecta exclusivamente a otras estructuras de los ganglios basales que son, el segmento externo del globo pálido, el segmento interno del globo pálido y a la sustancia negra pars reticulada (DeLong and Georgopoulos, 1981). Así pues, una gran parte del misterio que encierra la organización y el funcionamiento de los ganglios basales, radica en la organización anatómo-sináptica del neostriado y en las propiedades intrínsecas de las neuronas que lo conforman.

Se ha demostrado por registros intracelulares *in vivo* que las neuronas neostriatales de proyección se encuentran usualmente silentes y a potenciales de membrana más bien negativos (Wilson, 1993). También se ha observado que estos períodos de hiperpolarización y de silencio eléctrico son interrumpidos por períodos de despolarizaciones lentas sostenidas en forma de rampa, de hasta 3 segundos de duración (Wilson, 1992). Estas despolarizaciones lentas son ocasionadas por las entradas sinápticas excitatorias provenientes de otros núcleos cerebrales, principalmente de la corteza cerebral. Se ha propuesto que es durante estas despolarizaciones lentas cuando se induce la interacción entre la actividad sináptica y las propiedades membranales de las neuronas (Wilson, 1992).

Existen evidencias de la participación de algunas conductancias iónicas dependientes de voltaje en la respuesta subumbral de las neuronas neostriatales, sin embargo se han inferido únicamente a través de estudios en los que se utilizaron pulsos de corriente como protocolo experimental (Bargas y cols., 1989, 1991b, 1994; Galarraga y cols., 1989; Jiang y North, 1991; Kita y cols., 1985; Nisenbaum y cols., 1994; Ogata y Tatebayashi, 1990; Pineda y cols., 1992; Surmeier y cols., 1988, 1991). Hasta la fecha no ha sido investigado el papel de estas conductancias durante despolarizaciones lentas que mimetizan su activación fisiológica. Tampoco ha sido investigada la modulación subumbral de tales conductancias iónicas por transmisores ó péptidos, que ayuden a

entender el procesamiento neural en el neocórtex. En este sentido la dopamina es uno de los transmisores más importantes en el procesamiento de información en los ganglios basales, como lo demuestran los efectos que causa su depleción (Ungerstedt, 1971; Ljungberg y Ungerstedt, 1976). La degeneración prematura y acelerada de la población neuronal dopaminérgica de la sustancia negra compacta conduce a la sintomatología clínica de la denominada enfermedad de Parkinson (Hornykiewicz, 1966; Marsden, 1984). Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta se encuentran anatómicamente y funcionalmente relacionadas con el neocórtex (Hedreen y DeLong, 1991; Marsden, 1984; Parent y Hazrati, 1995). Las acciones de la dopamina y sus agonistas D_1 y D_2 sobre el neocórtex han sido estudiadas desde diferentes puntos de vista, tales como el conductual, el bioquímico y el electrofisiológico (Arnt y Hyttel, 1984; Akaike y cols., 1987; Breese y cols., 1987; Calabresi y cols., 1987; Cepeda y cols., 1993; Enz y cols., 1990; Freedman y Weight, 1988; Greif y cols., 1995; Heikkila y cols., 1981; Herrling y Hull, 1980; Hernández-López y cols., 1996; Hu y cols., 1990; Hull y cols., 1974; Langer y cols., 1986; Rutherford y cols., 1988).

Se ha considerado a la dopamina como un neuromodulador (DiChiara et al., 1994) y sus acciones dependen de su interacción con receptores específicos. En el neocórtex, parecen estar presentes diferentes tipos de receptores dopaminérgicos, probablemente con diferentes funciones cada uno. En estudios electrofisiológicos se ha mostrado que las acciones de la dopamina sobre las neuronas espinosas medianas de proyección, son múltiples y algunas veces contradictorias (Akaike y cols., 1987; Herrling y Hull, 1980; Uchimura y cols., 1986). Por ejemplo, el análisis de corrientes iónicas a través de la técnica de fijación de voltaje, ha mostrado que la dopamina ejerce acciones simultáneas sobre corrientes entrantes y salientes localizadas en el mismo tipo neuronal (Surmeier y Kitai, 1993). Los registros intracelulares en condiciones de fijación de corriente y utilizando como estímulo un pulso cuadrado de corriente, tampoco han arrojado resultados claros y reproducibles (Akaike y cols., 1987; Uchimura y cols., 1986).

Se ha reportado que los agonistas a los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2 pueden ejercer acciones excitatorias, inhibitorias o ser inefectivos en modular el potencial de membrana en las neuronas espinosas del neocórtex. Usando este mismo protocolo la dopamina puede producir una inhibición de los potenciales de acción evocados (Calabresi y cols., 1987; Akaike y cols., 1987) ó un aumento en el número de espigas que se acompañan por la inhibición del postpotencial (PPH) que

sigue a un tren de espigas (Akaike y cols., 1987; Rutherford y cols., 1988).

Se ha especulado acerca de las posibles causas que pudieran estar determinando la variabilidad en las múltiples respuestas observadas con la dopamina. Las acciones modulatorias de la dopamina pueden variar de acuerdo al potencial de membrana y por ejemplo, en los experimentos de fijación de corriente normalmente no hay un control de él. Asimismo, las diferentes respuestas observadas pueden corresponder a la estimulación de diferentes subtipos de receptores (D_1 ó D_2) localizados en diferentes clases neuronales ó bien a diferentes receptores localizados en la misma clase de neurona espinosa registrada bajo diferentes condiciones experimentales.

El estudio electrofisiológico de las acciones membranales globales de la dopamina y sus diferentes agonistas tipo D_1 y tipo D_2 a diferentes potenciales de membrana y a nivel subumbral, parece ser de gran importancia para obtener respuestas reproducibles y confiables de la dopamina. Ya que una respuesta global puede ser más reproducible y consistente a un potencial de membrana dado, siendo los diferentes tipos de receptores los que estén determinando la respuesta fina. En este sentido, el empleo de un estímulo que mimetice la activación fisiológica de estas neuronas, como la inyección intracelular de rampas de corriente, permitiría un análisis más adecuado de las acciones de la dopamina y los agonistas D_1 y D_2 a nivel subumbral.

Por otro lado, el estudio morfológico de las neuronas registradas también sería de gran utilidad para determinar si las respuestas observadas con la dopamina están relacionadas con diferencias anatómicas y probablemente con una segregación de los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos (Gerfen y cols., 1990a, 1992d).

ANTECEDENTES

La dopamina que es liberada de las terminales axónicas de las neuronas provenientes de la sustancia negra compacta en el mesencéfalo, juega un papel muy importante en la modulación de la actividad eléctrica de las neuronas neostriatales (núcleo caudado y putamen) (NE), e influye en las señales de salida del neostriado a los demás componentes de los ganglios basales, dado que las neuronas de proyección estriatales hacen contacto con otros núcleos de los ganglios basales (Bolam

y cols., 1993).

La acción reguladora ó moduladora de la dopamina sobre la actividad eléctrica de las neuronas neostriatales parece estar asociada con diversos factores ó elementos, entre los cuales se pueden incluir, la morfología celular, las conexiones anatómicas, el tipo y localización del receptor dopaminérgico, las propiedades de membrana, los canales iónicos activos a nivel subumbral y umbral, el potencial de membrana, así como a los sistemas de segundos mensajeros activados.

Así, el conjunto de conductancias iónicas que poseen las neuronas espinosas medianas, determinarán el ajuste de la función integradora de entrada y salida de estas neuronas a un estímulo dado, a través de los diferentes tipos de receptores DAérgicos ya descritos, y neuromoduladores como la dopamina regularán esta función modulando dichas conductancias (Freedman y cols., 1988; Greif y cols., 1995; Surmeier y Kitai, 1993; Surmeier y cols., 1995).

A . ORGANIZACION ANATOMICA DEL NEOESTRIADO

El NEOESTRIADO está constituido por el núcleo caudado, el putamen y el núcleo acumbens y representa la vía de entrada de los ganglios basales. Este núcleo recibe principalmente entradas de todas las áreas de la neocorteza cerebral, de los núcleos intralaminares del tálamo y de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNc) (Véase Figura 1) y menos prominentemente del globo pálido (GP), del núcleo subtalámico (STN), del núcleo rafé dorsal y del núcleo tegmental pedunculopontino (PPN) (Wilson, 1990; Parent, 1990). En contraste las eferencias del estriado se proyectan masivamente a tres regiones de los ganglios basales: el segmento externo del globo pálido (GPe), el segmento interno del globo pálido ó núcleo entopeduncular en la rata (GPi) y la sustancia negra pars reticulata (SNr). De éstas, el globo pálido interno y la sustancia negra pars reticulata se proyectan a otras estructuras fuera de los ganglios basales como son, las neuronas talamocorticales del conjunto de núcleos del tálamo ventral, el colículo superior y la habénula lateral (Véase Figura 1) (DeLong y Georgopoulos, 1981; Albin, y cols., 1990; Wilson, 1990).



FIGURA 1. Diagrama que muestra los principales núcleos cerebrales que forman parte de los Ganglios Basales y algunas de las conexiones que se forman entre ellos. La importancia del NEOESTRIADO como principal receptor de entradas sinápticas de los Ganglios Basales queda de manifiesto en este esquema (modificado de Wilson, 1990).

El neostriado de la rata es una estructura heterogénea con diferentes niveles de organización anatómica. A un cierto nivel, el neostriado establece conexiones con regiones específicas de otros núcleos cerebrales, por ejemplo: de las conexiones corticoestriatales, la corteza sensorimotora se proyecta a la parte dorsolateral del neostriado, mientras que la allocorteza y la mesocorteza, proyectan a la parte ventromedial del neostriado (Kubota y Kawaguchi, 1993). A un segundo nivel el estriado se ha dividido en dos tipos de compartimentos denominados respectivamente "los Parches" y "la Matriz". Los parches fueron identificados inicialmente como regiones de alta densidad de unión al receptor opiáceo mu asentadas en una matriz de baja densidad a este receptor (Kubota y Kawaguchi, 1993). Subsecuentemente se ha revelado con una variedad de técnicas que los dos compartimentos muestran heterogeneidad en su anatomía química así como en su conectividad con otras áreas del cerebro (Kubota y Kawaguchi, 1993).

Recientemente se ha propuesto que los ganglios basales están organizados en circuitos neurales estructural y funcionalmente diferentes, que unen a la corteza cerebral, a los ganglios basales y al tálamo (Alexander y Crutcher, 1990) y en donde el NE juega un papel fundamental. Cinco son los circuitos que se han definido: 1) el prefrontal dorsolateral, 2) el orbitofrontal lateral, 3) el oculomotor, 4) el motor y 5) el límbico, los cuales aunque se encuentran organizados como vías en paralelo, aún permanecen estructuralmente y funcionalmente segregados uno de otro. Se ha propuesto una organización básica de tales circuitos (véase Figura 2). En cada uno de ellos, áreas corticales específicas envían proyecciones glutamatérgicas excitatorias, a regiones selectas del neostriado, el cual ha sido representado como la estación de "entrada" de los ganglios basales. La información que fluye a través de esas vías es procesada en el NE, pasa a las estaciones de salida de los ganglios basales (GPi, SNr y GPe), y es diferencialmente modulada por dos vías paralelas pero opuestas: la vía directa (VD) y la vía indirecta (VI) (véase Figura 2). Cada circuito incluye una vía "directa" a los núcleos de salida, la cual surge de eferentes estriatales inhibitorias que contienen GABA y substancia P. La activación de esta vía tiende a desinhibir el tálamo. Asimismo, cada circuito incluye una vía "indirecta", la cual surge de neuronas estriatales de proyección que contienen GABA y encefalina, y cuya información pasa del globo pálido externo al núcleo subtalámico. La activación de las neuronas inhibitorias GABA/encefalina del NE tienden a suprimir las descargas espontáneas de alta frecuencia del GPe, provocando la desinhibición de las neuronas subtalámicas

glutamatérgicas, conduciendo finalmente a la excitación de los núcleos de salida de los ganglios basales: el GPi y la SNr y a la inhibición de los núcleos talámicos blanco. Posteriormente esta información es regresada a través de la VD y de la VI a distintas regiones del tálamo y de la corteza (Alexander y Crutcher, 1990). Se ha propuesto que la dopamina estaría modulando diferencialmente la VD y la VI, ejerciendo un efecto excitatorio sobre las neuronas GABA/substancia P (VD) y un efecto inhibitorio sobre aquellas que envían proyecciones GABA/enkefalina hacia el GPe (VI) (Alexander y Crutcher, 1990; Wichmann y DeLong, 1993).

A.1 COMPOSICION CELULAR DEL NEOESTRIADO

El neostriado se encuentra formado por diferentes tipos de neuronas, las cuales han sido clasificadas de diferentes formas de acuerdo a diferentes autores. El neostriado se encuentra compuesto por: a) neuronas de proyección (células Golgi Tipo I) y b) por interneuronas locales (células Golgi Tipo II) (Véase Figura 3), de la misma manera que otros núcleos principales en el sistema nervioso central. Sin embargo a diferencia de otros núcleos cerebrales, las neuronas de proyección en el neostriado sobrepasan en número a las interneuronas. Así, en ratas la proporción de neuronas de proyección con respecto a las interneuronas es de aproximadamente 9:1, mientras que en los primates es de 3:1 (Graveland y DiFiglia, M., 1985).

A.1.1 Neuronas de Proyección

Las Neuronas Espinosas Medianas. De los estudios realizados en secciones teñidas con Nissl (técnica que permite observar los cuerpos celulares de las neuronas), se ha podido corroborar que el neostriado de los humanos está formado aproximadamente por 111 millones de neuronas (Fox y Rafols, 1976). Así, utilizando técnicas como la degeneración anterógrada, el Nissl (Ramón y Cajal, 1911; Kemp y Powell, 1971), la impregnación de Golgi (Mensah y Deadwyler, 1974; Lu y Brown, 1977; Danner y Pfister, 1979a, 1979b; Chang y cols., 1982), el transporte retrógrado de peroxidasa de rábano (Grofová, 1979) y la inmunocitoquímica (Martin y cols., 1991), se han descrito diferentes tipos celulares en el neostriado. En estos estudios, los criterios básicos que se consideraron para la clasificación de los tipos celulares fueron: el tamaño del soma (mediano vs grande), así como la presencia ó ausencia de espinas ó varicosidades en las dendritas y en el soma

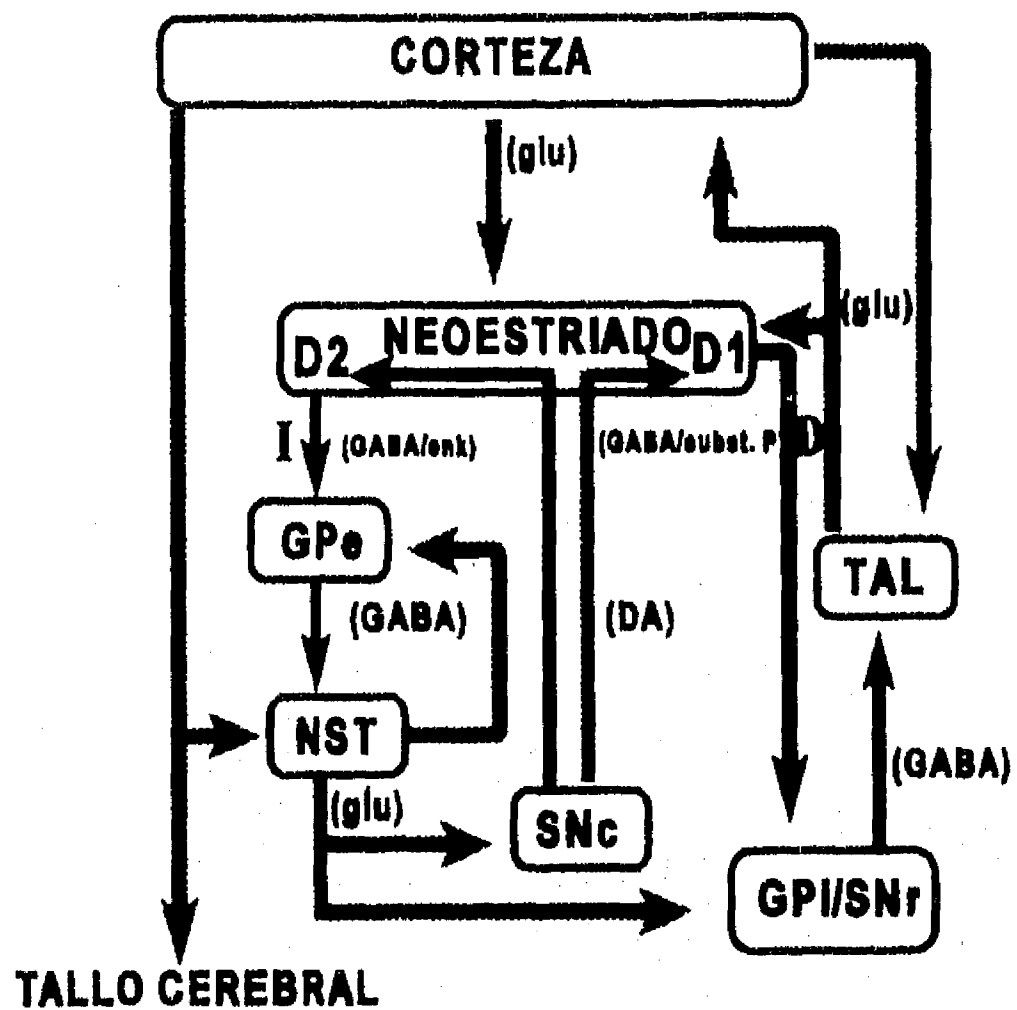


FIGURA 2. Esquema del modelo de la anatomía funcional del circuito "motor" tálamo-cortical-ganglios-basales, que muestra las conexiones excitatorias e inhibitorias que unen a los diferentes elementos del circuito básico de los ganglios basales. Estructuras de entrada (Neostriado) y de salida de los ganglios basales, conectados a través de las vías de proyección "Directa" (D) e "Indirecta" (I). La dopamina ejerce efectos diferenciales sobre las vías "Directa" e "Indirecta", a través de la activación de los receptores D₁ y D₂ respectivamente. (modificado de Alexander y Crutcher, 1990; Wichmann y DeLong, 1993). **Flechas punteadas**= conexiones excitatorias; **Flechas sólidas**= conexiones inhibitorias. GPe=globo pálido externo; NST= núcleo subtalámico; SNc=substancia negra compacta; GPi=globo pálido interno; Tál=tálamo; SNr=substancia negra reticulada.

(espinas vs no espinas).

La importancia de estos estudios radica en que en ellos se pone de manifiesto que en el gato, la rata y el ratón, el 95% de la población celular total del neocórtex está formado por un tipo de célula principal denominada **Neurona Espinosa Mediana de Proyección**. Aunque en el mono, esta población de neuronas sólo representa el 77%. Las características morfológicas de este tipo celular son en general un soma de tamaño mediano, con un campo dendrítico amplio, así como la presencia de un gran número de espinas que recubren sus dendritas (Di Figlia y cols., 1976; Wilson y Groves, 1980) (Véase Figura 3). Los cuerpos de estas células varían de 12 a 20 micras de diámetro y de ellas surgen un número pequeño de troncos dendríticos con diámetros de 2 a 3 micras. Los cuerpos celulares y los troncos dendríticos iniciales están usualmente libres de espinas. Los troncos lisos se dividen dentro de las 10 a 30 micras de su origen, dando lugar a las dendritas secundarias espinosas las cuales pueden ramificarse una o dos veces más.

Una neurona espinosa tiene generalmente de 25 a 30 ramificaciones dendríticas terminales, las cuales se radían en todas direcciones del cuerpo celular, llenando un volumen esférico con un radio de 300 a 500 micras. La densidad de espinas dendríticas aumenta rápidamente desde la primera aparición de las espinas aproximadamente a 20 micras del soma, hasta llegar a un pico de distancia de aproximadamente 80 micras del soma. La densidad pico de las espinas dendríticas puede ser tan alta como 4 a 6 por micrómetro de longitud dendrítica, haciendo a la neurona neocortical principal, una de las células más cargadas de espinas en el cerebro en cuanto a densidad y no en cuanto al número total de espinas. Las espinas dendríticas disminuyen gradualmente de aproximadamente 1.5 micrómetros a sólo 0.25 micrómetros en las puntas, asimismo la densidad de espinas dendríticas disminuye gradualmente, llegando aproximadamente a la mitad del valor pico en las puntas dendríticas (Wilson, 1990).

En base a su morfología somatodendrítica homogénea, las neuronas espinosas medianas de proyección del neocórtex han sido consideradas por mucho tiempo como un solo tipo neuronal. Sin embargo, recientemente se han acumulado evidencias de tipo morfológico, bioquímico, farmacológico y fisiológico que apoyan la idea de la existencia de 2 subtipos de neuronas espinosas medianas. Se ha descrito un segundo tipo de neurona espinosa mediana principal, aunque esta célula es mucho menos común (Wilson, 1990; DiFiglia y cols., 1976). Esta se ha caracterizado por tener un soma de

diámetro mayor y con una densidad de espinas dendríticas mucho menor, así como con una menor densidad de dendritas las cuales se observan menos ramificadas pero de mayor longitud. Se ha demostrado que esta célula proyecta a la sustancia negra, aunque realmente es muy poco lo que se sabe aún de ella (Wilson, 1990).

El neocortico recibe su nombre de la apariencia estriada que se deriva de los fascículos de fibras que se forman de los axones de las neuronas neocorticales que perforan la materia gris del neocortico (Wilson, 1990). Estos axones forman el principal sistema de fibras en el cerebro anterior. Algunos axones están mielinizados ligeramente cerca del cuerpo celular, pero pierden su mielina posteriormente (Chang y cols., 1981). En las ratas, los axones están cerca del diámetro umbral para la mielinización (cerca de 0.25 micras). En los primates, los axones son más grandes y más consistentemente mielinizados, aunque la disminución gradual en el diámetro axonal es acompañado por un adelgazamiento y una pérdida parcial de la mielinización en estas especies (Fox y Rafols, 1976). Al menos dos clases diferentes de fibras pueden ser distinguidas en la rata, las cuales surgen de dos tipos diferentes de neuronas espinosas medianas. Una clase de neurona espinosa daría lugar a un axón que se arboriza primariamente en el segmento externo del globo pálido, mientras que la otra clase se proyectaría poco ó nada a esta estructura, arborizándose más bien en el segmento interno del globo pálido y en la sustancia negra (Chang y cols., 1981).

En el globo pálido y en la sustancia negra, los axones de las neuronas espinosas neocorticales se arborizan en una forma muy característica denominada patrón axodendrítico longitudinal. Este patrón el cual contrasta fuertemente con el de las fibras aferentes en el neocortico, está caracterizado por axones eferentes neocorticales individuales que corren paralelamente a las dendritas de las neuronas blanco palidales y nigrales, haciendo múltiples contactos sinápticos, los que envuelven casi completamente a las dendritas de las células postsinápticas (Wilson, 1990; Di Figlia y Rafols, 1988).

La estimación cuantitativa del grado de convergencia y divergencia para las aferentes neocorticales no es fácil de obtener, debido a que no existe un arreglo geométrico simple en este núcleo. Sin embargo, hasta ahora las evidencias disponibles sugieren que las sinapsis asimétricas formadas sobre las cabezas de las espinas dendríticas surgen de fibras aferentes, lo que sugiere que uno puede asignar un límite bajo al número de sinapsis aferentes formadas en las neuronas espinosas

diámetro mayor y con una densidad de espinas dendríticas mucho menor, así como con una menor densidad de dendritas las cuales se observan menos ramificadas pero de mayor longitud. Se ha demostrado que esta célula proyecta a la sustancia negra, aunque realmente es muy poco lo que se sabe aún de ella (Wilson, 1990).

El neostriado recibe su nombre de la apariencia estriada que se deriva de los fascículos de fibras que se forman de los axones de las neuronas neostriatales que perforan la materia gris del neostriado (Wilson, 1990). Estos axones forman el principal sistema de fibras en el cerebro anterior. Algunos axones están mielinizados ligeramente cerca del cuerpo celular, pero pierden su mielina posteriormente (Chang y cols., 1981). En las ratas, los axones están cerca del diámetro umbral para la mielinización (cerca de 0.25 micras). En los primates, los axones son más grandes y más consistentemente mielinizados, aunque la disminución gradual en el diámetro axonal es acompañado por un adelgazamiento y una pérdida parcial de la mielinización en estas especies (Fox y Rafols, 1976). Al menos dos clases diferentes de fibras pueden ser distinguidas en la rata, las cuales surgen de dos tipos diferentes de neuronas espinosas medianas. Una clase de neurona espinosa daría lugar a un axón que se arboriza primariamente en el segmento externo del globo pálido, mientras que la otra clase se proyectaría poco ó nada a esta estructura, arborizándose más bien en el segmento interno del globo pálido y en la sustancia negra (Chang y cols., 1981).

En el globo pálido y en la sustancia negra, los axones de las neuronas espinosas neostriatales se arborizan en una forma muy característica denominada patrón axodendrítico longitudinal. Este patrón el cual contrasta fuertemente con el de las fibras aferentes en el neostriado, está caracterizado por axones eferentes neostriatales individuales que corren paralelamente a las dendritas de las neuronas blanco palidales y nigrales, haciendo múltiples contactos sinápticos, los que envuelven casi completamente a las dendritas de las células postsinápticas (Wilson, 1990; Di Figlia y Rafols, 1988).

La estimación cuantitativa del grado de convergencia y divergencia para las aferentes neostriatales no es fácil de obtener, debido a que no existe un arreglo geométrico simple en este núcleo. Sin embargo, hasta ahora las evidencias disponibles sugieren que las sinapsis asimétricas formadas sobre las cabezas de las espinas dendríticas surgen de fibras aferentes, lo que sugiere que uno puede asignar un límite bajo al número de sinapsis aferentes formadas en las neuronas espinosas



FIGURA 3. Fotomicrografías de los principales tipos de neuronas que forman el NEOESTRIADO, teñidas con el método de Golgi : 1) Neuronas de Proyección y 2) Interneuronas. Las neuronas de proyección en este núcleo son: (a) Neuronas Espinosas Medianas, obsérvense la densidad de espinas en las dendritas y el tamaño del soma, de donde derivan los nombres de esta neurona neocortical. Mientras que las interneuronas en este núcleo son de tres tipos: (b) Interneuronas No-Espinosas Gigantes, Neuronas Medianas No-Espinosas con penachos dendríticos (no se muestra) y (c) Neuronas Medianas No-Espinosas con varicosidades dendríticas.

individuales contando el número de espinas dendríticas por célula.

Podemos decir que virtualmente todas las neuronas espinosas medianas usan el ácido gamma-aminobutírico (GABA) como su principal neurotransmisor, pero también coexpresan un número de péptidos neuroactivos, tal como la sustancia P, la encefalina, la dinorfina y la neurotensina (Parent y cols., 1995). Sin embargo, no todos estos péptidos son expresados en cada neurona espinosa, sino que más bien ellos se han localizado en subconjuntos particulares de neuronas espinosas de proyección (Parent y cols. 1995). En las neuronas espinosas medianas individuales, el GABA coexiste con la encefalina ó con la sustancia P y/o la dinorfina. La coexistencia del GABA con un péptido dado parece estar en relación con el blanco al cual proyectan estas neuronas (Gerfen y cols., 1990a, 1990b, 1992a, 1992b) y probablemente también con la existencia de 2 tipos diferentes de neuronas espinosas de proyección (Parent y cols., 1984) (ver más adelante péptidos en el neocóstriado).

A.1.2 Interneuronas

El otro 5% de las células que integran el neocóstriado en carnívoros y roedores y quizá el 23% en primates, lo constituyen una gran diversidad de tipos de neuronas no espinosas caracterizadas principalmente por el método de Golgi. Siete u ocho tipos celulares han podido ser descritas en base a criterios morfológicos (Chang y cols., 1982). Sin embargo solo tres tipos de interneuronas han sido caracterizadas con suficiente detalle y agrupadas en categorías separadas de acuerdo a criterios estructurales y funcionales, estas son: a) Las interneuronas gigantes no espinosas (célula no espinosa Tipo II de DiFiglia y cols., 1976); b) Las células medianas ligeramente espinosas (células no espinosas Tipo III de DiFiglia y cols., 1976) y c) Las células medianas con dendritas varicosas y lisas (células no espinosas Tipo I de DiFiglia y cols., 1976) (Véase Figura 3).

Las Interneuronas Gigantes No Espinosas fueron descritas principalmente por DiFiglia y Carey en 1986 y por Chang y Kitai en 1982 en secciones teñidas con Golgi y a través de la tinción intracelular, por Bishop y cols., en 1982. Estas células representan menos del 2% de todas las células en el neocóstriado y originalmente fueron reconocidas como interneuronas por Kolliker alrededor de 1800. Morfológicamente estas células poseen un cuerpo celular alargado con una longitud mayor a 50-60 micras, pero comúnmente con 15 a 25 micras en su diámetro menor. Del soma surgen algunas

dendritas gruesas, las cuales se ramifican en forma radial, con algunas dendritas extendiéndose de 500 a 750 micras del soma. Las dendritas distales muestran algunas varicosidades y apéndices de forma irregular. Los axones de estas neuronas surgen de troncos dendríticos y pueden estar mielinizados inicialmente y luego perder la mielina en las reducciones del diámetro axonal que se observan en las ramificaciones repetidas. El axón se ramifica muchas veces de la manera clásica asociada con las interneuronas es decir, con las ramificaciones hijas de igual tamaño y formando aproximadamente ángulos de 120 grados entre ellas y con la ramificación madre. De esta forma, la arborización resultante consiste de un plexo denso de ramificaciones axonales extremadamente finas que llenan la región del campo dendrítico (alrededor de 1 mm del soma) ó en algunas ocasiones llegando más allá, aunque usualmente no dejan el núcleo (Wilson, 1990).

Por otro lado, ha sido ampliamente demostrado desde un punto de vista bioquímico que las interneuronas gigantes son colinérgicas. Originalmente se pensó que estas interneuronas colinérgicas eran neuronas de proyección, pero más tarde se demostró a través de técnicas de marcado retrógrado que ellas no proyectan a las principales estructuras recipientes del estriado (Parent y cols., 1995).

Las Interneuronas de Tamaño Mediano se han dividido en dos categorías, aunque no existe un consenso común entre los diferentes autores del nombre otorgado a estas categorías. Los criterios utilizados para su clasificación se basan en las diferencias más obvias entre los dos tipos de neuronas, es decir la presencia de algunos apéndices dendríticos semejantes a espinas y terminaciones dendríticas en forma de finos penachos en una clase de células y con dendritas lisas frecuentemente con prominentes varicosidades en el otro tipo de células. DiFiglia y cols., (1976) han denominado a estos dos tipos celulares como las neuronas no-espinosas tipo I y tipo III respectivamente. Mientras que Chang y cols., (1982) las han clasificado respectivamente como las neuronas medianas tipo V y la neurona mediana tipo III/IV. El soma de la mayor parte de estas neuronas es aproximadamente del mismo tamaño que el de las neuronas espinosas medianas (12-15 μm), aunque existen sus excepciones. Ambos tipos de interneuronas medianas poseen somas redondos y dendritas lisas ó ligeramente espinosas, que llenan un volumen aproximadamente equivalente a aquel del campo dendrítico de la neurona espinosa. Por otro lado, la clasificación de estos dos tipos de neuronas como interneuronas se ha basado principalmente en la ausencia de evidencias de un axón que se proyecta,

más que por una visualización completa de su arborización axonal, así en preparaciones teñidas con Golgi muchos autores han visualizado el axón de la célula con dendritas varicosas. El axón del otro tipo celular no se puede teñir fácilmente sin embargo algunas arborizaciones locales han sido reportadas (Wilson, 1990).

Las interneuronas de tamaño mediano también han sido usualmente clasificadas por el tipo de neurotransmisor que contienen. Así, se ha observado que las interneuronas que corresponden al Tipo I no-espinoso de DiFiglia y cols. y a las neuronas medianas Tipo V de Chang y Kitai despliegan una intensa inmunoreactividad por el GABA y contienen además parvalbumina (Parent y cols., 1995). Mientras que el segundo tipo de interneuronas que corresponden a las neuronas no-espinosas Tipo III de DiFiglia y cols., y las neuronas tipo III/IV de Chang y Kitai, despliegan inmunoreactividad por la somatostatina y el neuropeptido Y, sin embargo no contienen mRNA que codifica para la GABA descarboxilasa (GAD). También se ha observado que estas neuronas contienen la enzima nicotinamida adenina dinucleotida fosfato (NADPH)-diaforasa (Parent y cols., 1995).

A.2 CONEXIONES SINAPTICAS EN EL NEOESTRIADO

Una de las características más sobresalientes del neostriado consiste en la gran cantidad de sinapsis asimétricas que se observan en micrografías electrónicas, las cuales se forman por los pequeños axones provenientes de la corteza cerebral y de algunas regiones de los núcleos intralaminares del tálamo, sobre las cabezas de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas. Este tipo de sinapsis se encuentra en aproximadamente el 85% de todas las sinapsis en el neostriado (Kemp and Powell, 1971a; Wilson, 1990). Los axones de la corteza cerebral y del tálamo son similares en morfología, es decir ambos exhiben pequeñas vesículas sinápticas redondas (Wilson, 1990). Por otro lado, las conexiones nigroestriatales han sido intensamente estudiadas utilizando varias técnicas. Así, los axones que provienen de la sustancia nigra pueden ser identificados en micrografías electrónicas por técnicas de trazado axonal con aminoácidos radioactivos, por degeneración axonal, por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (la cual está involucrada en la síntesis de la dopamina en la vía nigroestriatal), por destrucción de los axones con la neurotoxina selectiva 6-hidroxidopamina (la cuál destruye específicamente los axones dopaminérgicos en el estriado) (Ungerstedt, 1971a) y por el marcaje de

las neuronas dopaminérgicas con un análogo dopaminérgico, la 5-hidroxi-dopamina (el cuál no destruye los axones dopaminérgicos, pero es absorbido específicamente por ellos) (Groves, 1980).

Los resultados mostrados hasta el momento utilizando estas técnicas han sido contradictorios e inconsistentes. Por ejemplo, utilizando la autoradiografía ó la destrucción de la vía nigroestriatal por el tratamiento con la 6-hidroxi-dopamina ó bien el marcaje con 5-hidroxi-dopamina, se ha observado, que los axones que se marcan en el neostriado son muy similares a los de las proyecciones corticoestriatales ó tálamo-corticales, es decir, con pequeñas vesículas sinápticas redondas y formando sinapsis asimétricas sobre las cabezas de las espinas dendríticas. Por otro lado, si se usa la inmunocitoquímica para marcar la tirosina hidroxilasa, se identifica un axón diferente, el cual contiene grandes vesículas sinápticas con contornos más variables y formando sinapsis simétricas sobre troncos dendríticos, somas y troncos de espinas dendríticas (Freund y cols., 1984).

Sin embargo, utilizando una técnica combinada de impregnación de Golgi con inmunocitoquímica, se reveló una fuerte distribución de botones inmunoreactivos a la tirosina-hidroxilasa sobre las neuronas espinosas medianas impregnadas de Golgi que habían sido retrógradamente marcadas de la sustancia negra. Es decir, que los principales blancos de estos botones, son las espinas dendríticas distales de las neuronas nigroestriatales, las cuáles forman sinapsis simétricas. Únicamente aquéllas espinas que reciben entradas de otros botones no-inmunoreactivos ó no-TH, reciben entradas dopaminérgicas. Se ha postulado que tal arreglo anatómico implica que una de las principales funciones de las entradas dopaminérgicas es la de interactuar con la otra entrada que recibe la misma espina. Se ha observado también que los botones no-dopaminérgicos forman sinapsis asimétricas, las cuales derivan de neuronas en la corteza (Smith y Bolam, 1990). Se ha postulado, la existencia de un circuito estriatal fundamental, el cuál incluye una neurona espinosa mediana de proyección, que recibe entradas de la corteza cerebral sobre sus espinas dendríticas distales y entradas de las terminales dopaminérgicas sobre sus espinas dendríticas distales y sus troncos dendríticos (Smith y Bolam, 1990).

Como se mencionó anteriormente, se ha postulado la existencia de una segunda clase de neurona espinosa mediana, con una densidad más baja de espinas dendríticas, la cual podría formar parte de otro circuito. Pudiendo ser también dicha neurona una neurona de proyección, la cual recibiría aferencias dopaminérgicas de la SNc y del núcleo parafascicular del tálamo sobre sus troncos

las neuronas dopaminérgicas con un análogo dopaminérgico, la 5-hidroxidopamina (el cuál no destruye los axones dopaminérgicos, pero es absorbido específicamente por ellos) (Groves, 1980).

Los resultados mostrados hasta el momento utilizando estas técnicas han sido contradictorios e inconsistentes. Por ejemplo, utilizando la autoradiografía ó la destrucción de la vía nigroestriatal por el tratamiento con la 6-hidroxidopamina ó bien el marcaje con 5-hidroxidopamina, se ha observado, que los axones que se marcan en el neostriado son muy similares a los de las proyecciones corticoestriatales ó tálamocorticales, es decir, con pequeñas vesículas sinápticas redondas y formando sinapsis asimétricas sobre las cabezas de las espinas dendríticas. Por otro lado, si se usa la inmunocitoquímica para marcar la tirosina hidroxilasa, se identifica un axón diferente, el cual contiene grandes vesículas sinápticas con contornos más variables y formando sinapsis simétricas sobre troncos dendríticos, somas y troncos de espinas dendríticas (Freund y cols., 1984).

Sin embargo, utilizando una técnica combinada de impregnación de Golgi con inmunocitoquímica, se reveló una fuerte distribución de botones inmunoreactivos a la tirosina-hidroxilasa sobre las neuronas espinosas medianas impregnadas de Golgi que habían sido retrógradamente marcadas de la sustancia negra. Es decir, que los principales blancos de estos botones, son las espinas dendríticas distales de las neuronas nigroestriatales, las cuáles forman sinapsis simétricas. Únicamente aquéllas espinas que reciben entradas de otros botones no-inmunoreactivos ó no-TH, reciben entradas dopaminérgicas. Se ha postulado que tal arreglo anatómico implica que una de las principales funciones de las entradas dopaminérgicas es la de interactuar con la otra entrada que recibe la misma espina. Se ha observado también que los botones no-dopaminérgicos forman sinapsis asimétricas, las cuales derivan de neuronas en la corteza (Smith y Bolam, 1990). Se ha postulado, la existencia de un circuito estriatal fundamental, el cuál incluye una neurona espinosa mediana de proyección, que recibe entradas de la corteza cerebral sobre sus espinas dendríticas distales y entradas de las terminales dopaminérgicas sobre sus espinas dendríticas distales y sus troncos dendríticos (Smith y Bolam, 1990).

Como se mencionó anteriormente, se ha postulado la existencia de una segunda clase de neurona espinosa mediana, con una densidad más baja de espinas dendríticas, la cual podría formar parte de otro circuito. Pudiendo ser también dicha neurona una neurona de proyección, la cual recibiría aferencias dopaminérgicas de la SNc y del núcleo parafascicular del tálamo sobre sus troncos

dendríticos (Smith y Bolam, 1990).

Las neuronas espinosas medianas también establecen contactos sinápticos colaterales entre ellas mismas, así como con las interneuronas. Los botones que surgen de las colaterales locales de las neuronas espinosas contienen grandes vesículas sinápticas de forma variable y forman sinapsis simétricas con los troncos de las espinas dendríticas, con los ejes de las dendritas, con los somas y con los segmentos iniciales de los axones (Wilson y Groves, 1980; Bishop y cols., 1982). Las colaterales locales de las células espinosas que terminan sobre espinas dendríticas generalmente comparten esa espina con alguna otra entrada, generalmente una fibra cortical. Algunas de las terminales axonales de las neuronas espinosas medianas forman sinapsis con dendritas, somas y segmentos axonales iniciales de otras neuronas espinosas medianas, pero algunas se forman definitivamente con aquellas porciones de las células no espinosas, incluyendo las neuronas no-espinosas gigantes (Bolam y cols., 1986).

Las sinapsis que se forman por las terminales axonales de las células no-espinosas gigantes y de algunas de los tipos de interneuronas medianas constituyen el tercer tipo sináptico morfológico en el neocórtex. Este tipo de sinapsis posee pequeñas vesículas aplanadas y forman sinapsis simétricas sobre los troncos de las espinas dendríticas, los troncos dendríticos, los somas y los segmentos iniciales. Se ha demostrado que los axones de las neuronas no-espinosas gigantes y las interneuronas medianas terminan de esta forma en las células espinosas. Las terminales de este tipo y las terminales con grandes vesículas pleomórficas, forman los principales tipos sinápticos observados sobre el soma y la superficie dendrítica proximal de la célula espinosa (Wilson, 1990).

Las entradas de las neuronas gigantes no-espinosas son de los mismos tres tipos morfológicos principales que encontramos en las neuronas espinosas medianas, pero no muestran la localización específica sobre la superficie celular que se observa en las neuronas espinosas (Chang y Kitai, 1982; DiFiglia y Carey, 1986). Los botones con pequeñas vesículas redondas forman sinapsis asimétricas sobre las dendritas de todos los tamaños e igualmente sobre el soma de las neuronas no-espinosas. Por otro lado, sinapsis simétricas formadas por botones con grandes vesículas pleomórficas y por botones con pequeñas vesículas sinápticas aplanadas, pueden observarse sobre todas las partes de estas células (Wilson, 1990). Las sinapsis que forman los axones de salida de las neuronas espinosas medianas en la sustancia negra y el globo pálido, son muy similares en morfología a las que forman

las terminales axonales locales (Chang y cols., 1981).

A.2.1 Conexiones de la Corteza Cerebral con el Neostriado

Entre las aferentes que le llegan al neostriado, aquellas provenientes de la corteza cerebral podemos considerarlas entre las más importantes. Las entradas corticales glutamatérgicas convergen también con las talámicas glutamatérgicas, con las dopaminérgicas provenientes de la SNc y con las entradas serotoninérgicas que se originan en los núcleos del rafé. La mayoría de las áreas corticales proyectan topográficamente al estriado, dándole a este un patrón funcional de regionalización (Parent, 1990). Así en base al área cortical de proyección, el neostriado puede subdividirse en territorios sensorimotors, asociativos y límbicos, sin embargo puesto que existe una sobreposición entre las diferentes proyecciones corticoestriatales, dichos territorios pueden ser visualizados más como un continuum que como subdivisiones estriatales con límites estrictos (Parent, 1990). Asimismo, se ha observado que las áreas corticales que se encuentran recíprocamente interconectadas vía conexiones corticocorticales tienden a compartir zonas comunes de terminación en el neostriado, sugiriendo que además de que se puedan delinear grandes sectores topográficos en el estriado, el sistema corticoestriatal está organizado de acuerdo a afiliaciones funcionales generales de las áreas corticales. Sin embargo, también se ha observado que muchas áreas de la corteza asociativa conectadas recíprocamente, proyectan a áreas espacialmente distintas del neostriado y que aún en áreas donde ocurre sobreposición, los campos terminales no se intermezclan sino que forman patrones de interdigitación complejos dentro de zonas longitudinales en la parte mediolateral del neostriado (Selemon y Goldman-Rakic, 1985).

En estudios de marcaje con leucoaglutinina Phaseolus vulgaris, se ha mostrado que las fibras que llegan de la corteza cerebral al NE, se arborizan con un patrón definido como axodendrítico cruciforme (Ramón y Cajal, 1911). Se ha dado el término de cruciforme a las fibras que viajan a través del núcleo, cruzándose sobre las dendritas de otras neuronas y haciendo sinapsis con ellas en passant (a su paso). Al igual que la mayoría de las aferentes que llegan al estriado, las proyecciones corticoestriatales terminan en forma de racimos de varios tamaños, cuya distribución es muy cercana a la compartimentalización de los parches (estriosomas) y la matriz. En la rata, se ha observado que la organización compartamental de las entradas corticoestriatales está relacionada principalmente con

su origen laminar y en segundo lugar con sus áreas citoarquitectónicas de origen (Gerfen, 1990b). De hecho, cada área cortical parece inervar tanto a los parches como a la matriz (Parent, 1990).

A.2.2 Conexiones del Tálamo con el Neoestriado

El tálamo proyecta masivamente al neoestriado. Aunque los núcleos intralaminares anteriores y el complejo parafascicular centromediano son las principales fuentes de esta proyección, otros núcleos talámicos también contribuyen, como aquellos del conjunto ventral, de la línea media y del grupo posterior. En los primates el núcleo centromediano recibe selectivamente entradas del globo pálido interno y a su vez, proyecta masivamente al territorio sensorimotor del neoestriado, donde termina en bandas paralelas oblicuamente orientadas (Parent, 1990). En contraste con el núcleo centromediano, el núcleo parafascicular recibe entradas de una gran variedad de sitios, incluyendo estructuras límbicas que a su vez proyectan a territorios límbicos y asociativos del neoestriado. Tales entradas a los territorios asociativos y límbicos del estriado parecen provenir de la porción dorsal y ventral del núcleo parafascicular respectivamente (Parent, 1990).

A.2.3 Conexiones de la Substancia Negra Compacta con el Neoestriado

Las aferencias que la substancia negra compacta envía hacia el neoestriado (que terminan topográficamente) y que forman el sistema dopaminérgico nigroestriatal, constituyen otra de las principales vías de entrada hacia este núcleo. Dado que la degeneración de esta vía da lugar clínicamente a la denominada enfermedad de Parkinson, en los últimos años ha sido uno de los sistemas más ampliamente estudiados dentro del sistema nervioso central. Ha sido reportado que la mayoría de las fibras de la vía nigroestriatal proyectan únicamente ipsilateralmente en la rata, en el gato y en el mono (Beckstead, 1979; Bentivoglio y cols., 1979; Loughlin y Fallon, 1982), aunque algunos autores (Royce, 1978; Fass y Butcher, 1981; Loughlin y Fallon, 1982), han encontrado evidencias en la rata de una vía nigroestriatal ligeramente cruzada. La importancia de las aferencias de la substancia negra compacta hacia el estriado se hace evidente cuando se lesiona esta vía selectivamente con una substancia denominada 6-hidroxidopamina. En la rata, las inyecciones unilaterales locales de 6-hidroxidopamina en el sistema dopaminérgico ascendente provoca una profunda alteración de la postura, de la movilidad (De Long y Georgopoulos, 1981) y una profunda

falta de atención sensorial contralateral (Jungberg y Ungerstedt, 1976).

B. NEUROTRANSMISORES Y NEUROMODULADORES EN EL NEOESTRIADO

Se sabe que en los ganglios basales, se encuentran muchos de los neurotransmisores y neuromoduladores más conocidos presentes en el cerebro de los mamíferos. Asimismo, se conoce que en los desórdenes de los ganglios basales existen alteraciones importantes en múltiples de estos sistemas (Graybiel, 1990). El circuito básico de los ganglios basales parece trabajar a través de la neurotransmisión sináptica rápida durante la cual se pueden activar directamente receptores-canal. De igual manera existen evidencias de que los ganglios basales funcionan también a través de la neurotransmisión sináptica lenta, en la cual se pueden activar receptores que no están acoplados directamente a un canal iónico, sino que más bien están acoplados a sistemas de transducción transmembranal acoplados a las proteínas G ó a otros sistemas de segundos mensajeros intracelulares (ver Figuras 10 y 11). La diferencia principal entre los dos tipos de activación sináptica antes mencionados es su temporalidad. Mientras que la activación de los canales acoplados a un receptor se lleva a cabo en la clásica escala de tiempo de alrededor de 1 milisegundo (1ms), la activación de las proteínas G induce cambios en el potencial de membrana, con duración mayor a 30 ms (Hille, 1992). Así los neuropéptidos, la dopamina y la acetilcolina actuando a través de los receptores acoplados a las proteínas G, y el glutamato actuando en los receptores tipo NMDA, pueden participar todos como neuromoduladores lentos en estas vías (Véase Figura 4) (Graybiel, 1990).

B.1 Péptidos en el Neostriado

La presencia de diferentes neuropéptidos, en un gran número de neuronas neostriatales de proyección se ha hecho evidente en los últimos 10 años. Estos péptidos incluyen a varios miembros de las taquiquininas, tales como la sustancia P (SP) y la neurokinina A; varios miembros de la familia de las encefalinas (ENK) y varios miembros de la familia de las dinorfinas (DYN) (Reiner y Anderson, 1990). Inicialmente, cuando fué descubierto que estos neuropéptidos se localizaban en las neuronas neostriatales, no se sabía si se encontraban presentes en las neuronas GABAérgicas de proyección. Recientemente, algunos estudios en los que emplearon doble-marcado inmunocitoquímico y algunos otros en los que utilizaron hibridización in situ, han arrojado nuevas conclusiones acerca de la

localización de los neuropéptidos en el neostriado: 1) que la SP y la DYN se encuentran típicamente en la misma neurona estriatal de proyección; 2) que la ENK, se encuentra ampliamente distribuída en una población de neuronas neostriatales de proyección diferente a la de la SP y la DYN y 3) que el GABA se encuentra en todas las neuronas neostriatales de proyección (Reiner y Anderson, 1990). Así, en aves, reptiles y mamíferos se han definido cuatro poblaciones separadas de neuronas estriatales de proyección, de acuerdo a la combinación de neuropéptidos que contienen y al núcleo al cual proyectan: el globo pálido ó la sustancia negra (Véase Figura 5) (Reiner y Anderson, 1990).

Aunque aún no se sabe cual es la función de estos péptidos en el neostriado, algunos autores han especulado acerca de ello de acuerdo a la distribución heterogénea que presenta la expresión de los niveles de RNA mensajero (RNAm) de dichos péptidos en neuronas específicas del neostriado y de su co-localización con los receptores D₁ y D₂, como efecto de la depleción dopaminérgica de este núcleo. A partir de dichos estudios Gerfen y cols. (1990, 1992), llegaron a la conclusión de que la mayoría de las neuronas de proyección estriato-palidales expresan la ENK y el receptor dopaminérgico D₂; mientras que la mayoría de las neuronas de proyección estriado-nigrales, expresan ambos neuropéptidos SP y DYN y el receptor D₁.

B.2 GABA en el Neostriado

En el neostriado podemos encontrar un gran número de neuronas y terminales que contienen al ácido-gamma-aminobutírico (GABA), considerado clásicamente como un neurotransmisor inhibitorio. El neostriado contiene dos tipos de neuronas GABAérgicas: las neuronas espinosas medianas y las interneuronas GABAérgicas (Véase Figura 4). Hace alrededor de veinticinco años se demostró que las proyecciones estriato-palidales y estriato-nigrales eran de naturaleza GABAérgica inhibitoria, desde entonces se ha asumido que las neuronas estriatales de proyección contienen GABA (Precht y Yoshida, 1971). Recientemente esto se ha corroborado a través de estudios de inmunocitoquímica, en los cuales se ha demostrado que la enzima glutamato descarboxilasa GAD (la enzima involucrada en la síntesis del GABA) así como la gamma-aminobutírico transaminasa pueden ser localizadas en las neuronas espinosas medianas de proyección. El otro tipo de neurona neostriatal que es GABAérgica, es un tipo de interneurona mediana no-espinosa (Bolam y cols., 1983; Oertel y Mugnaini, 1984; Wilson, 1990). Estas neuronas se distinguen

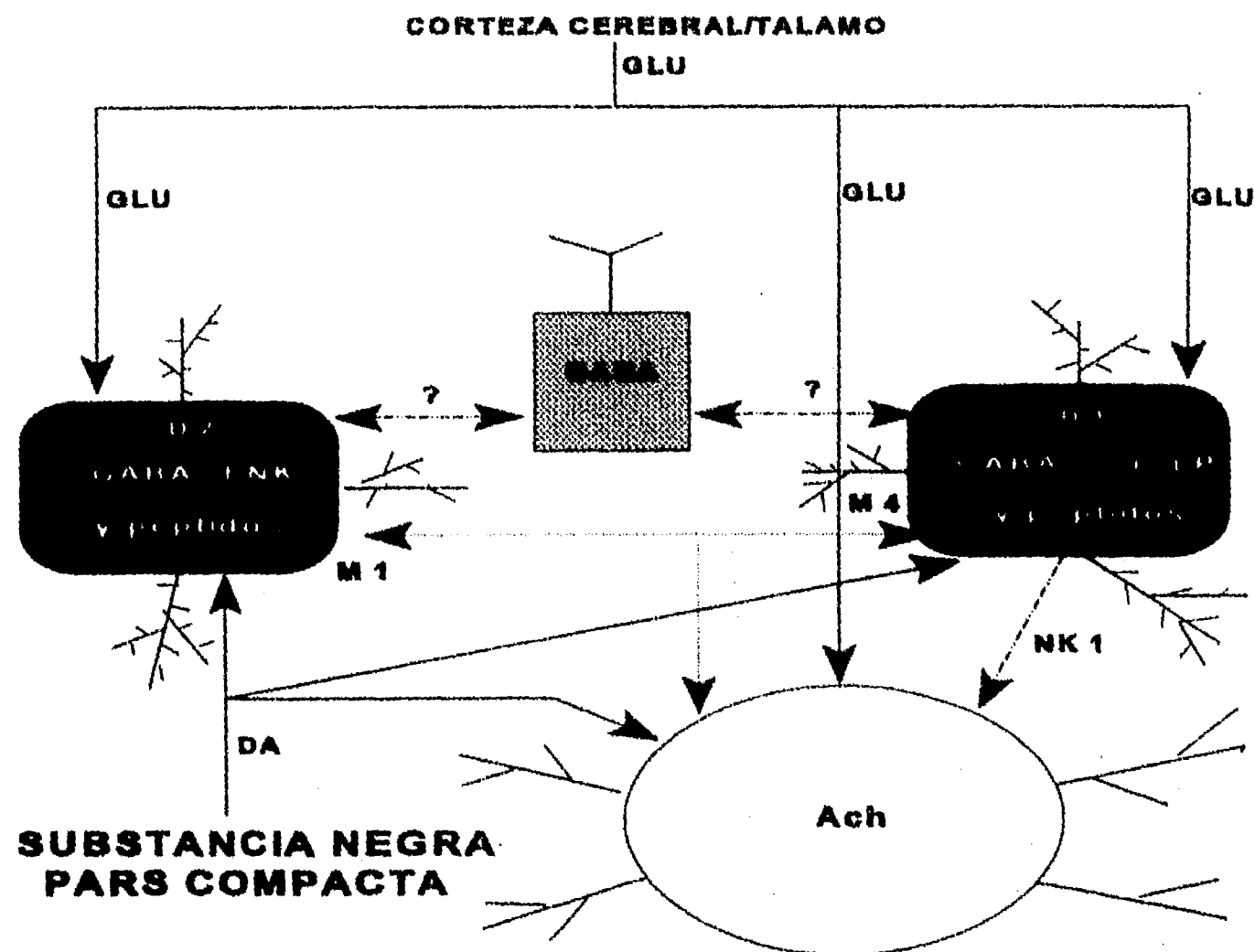


FIGURA 4. Representación esquemática de la relación entre la transmisión Colinérgica (ACh), Dopaminérgica (DA) y Glutamatérgica (NMDA) en el Neocórtex. En **NEGRO** se muestran dos tipos de neuronas GABAérgicas espinosas medianas: a) las que expresan Encefalina y otros péptidos y b) las que expresan Substancia P y otros péptidos. En **BLANCO** se muestra la interneurona Colinérgica Gigante. En **GRIS PUNTEADO** se muestra la interneurona GABAérgica. Se muestran también dos vías aferentes: La dopaminérgica, proveniente de la sustancia negra pars compacta y la Glutamatérgica, proveniente de la corteza cerebral y del tálamo intralaminar. Ambas vías aferentes hacen contacto con ambos tipos de neuronas espinosas medianas y con las interneuronas colinérgicas. La DA reduce la liberación de la ACh y del Glutamato, a través de su acción presináptica con el receptor D_2 . La ACh por otro lado, parece actuar sobre las neuronas encefalinérgicas a través de los receptores M_1 y sobre las neuronas con substancia P a través de los receptores M_4 . La relación de las interneuronas GABAérgicas con la ACh, la DA y el NMDA, en el neocórtex es aún desconocida. Ver Texto para más detalles (modelo modificado de DiChiara y cols., 1994; Wilson C.J., 1990).

fácilmente de las células espinosas medianas, por sus concentraciones especialmente elevadas de GABA, así como por su contenido en la proteína amortiguadora de calcio denominada parvalbúmina. Esta proteína parvalbúmina, está presente en algunas clases de neuronas GABAérgicas en varias partes del cerebro y en todos los casos, parece estar concentrada en células capaces de mantener frecuencias muy altas de disparo (Wilson, 1990).

Las neuronas neostriatales que contienen parvalbúmina son morfológicamente las mismas que las interneuronas de disparo rápido y aunque no se ha demostrado directamente su identidad, es muy probable que sean del mismo tipo celular (Wilson, 1990). Por otro lado, las aferentes GABAérgicas al neostriado provienen del globo pálido y de la sustancia negra pars reticulada (Kita, 1993).

B.3 Acetilcolina en el Neostriado

Está bien establecido que el neostriado contiene una población de neuronas colinérgicas (Véase Figura 4), las cuales pueden ser reveladas utilizando la técnica de histoquímica para acetilcolinesterasa (AChE) ó por inmunohistoquímica de la colin-acetiltransferasa (ChAT). Las neuronas colinérgicas han sido identificadas en el neostriado de ratas (Butcher y Hodge, 1976; Bolam y cols., 1984b; Phelps y cols., 1985), de gatos (Kimura y cols., 1981; Parent y O'Reilly-Fromentin, 1982), de monos (Mesulam y cols., 1984; Smith y Parent, 1984; Satoh y Fibiger, 1985; DiFiglia, 1987) y de humanos (Nagai y cols., 1983). Así, se sabe actualmente que el neurotransmisor de la interneurona gigante no-espinosa en el neostriado, es la acetilcolina (Bolam y cols., 1984b; Phelps y cols., 1985). Se sabe que aunque estas neuronas son pocas en número, sus arborizaciones axonales son muy grandes y densas, proporcionando al neostriado una inervación colinérgica muy rica. Se sabe también, que las neuronas colinérgicas del neostriado y el sistema de sinapsis colinérgicas que dan lugar al neuropilo neostriatal ejercen una potente influencia sobre el disparo de las neuronas espinosas y la salida final del neostriado (Wilson, 1990). Por otro lado, frecuentemente ciertos tratamientos farmacológicos para muchos desórdenes humanos, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington's y aún para la esquizofrenia, se apoyan en la manipulación de la transmisión colinérgica en el neostriado. Inicialmente, a la luz de los primeros tratamientos para los pacientes con enfermedad de Parkinson con anticolinérgicos, se

propuso que la dopamina (liberada de las fibras nigroestriatales) y la acetilcolina (liberada de las interneuronas colinérgicas estriatales) se encontraban en un "balance" que podría estar dirigido hacia la hipercinesia de la corea (muy poca acetilcolina) ó hacia la hipocinesia del parkinsonismo (muy poca dopamina). Esta teoría fué muy pronto desechada por el descubrimiento de la presencia de múltiples neurotransmisores y por múltiples subtipos de receptores en los ganglios basales.

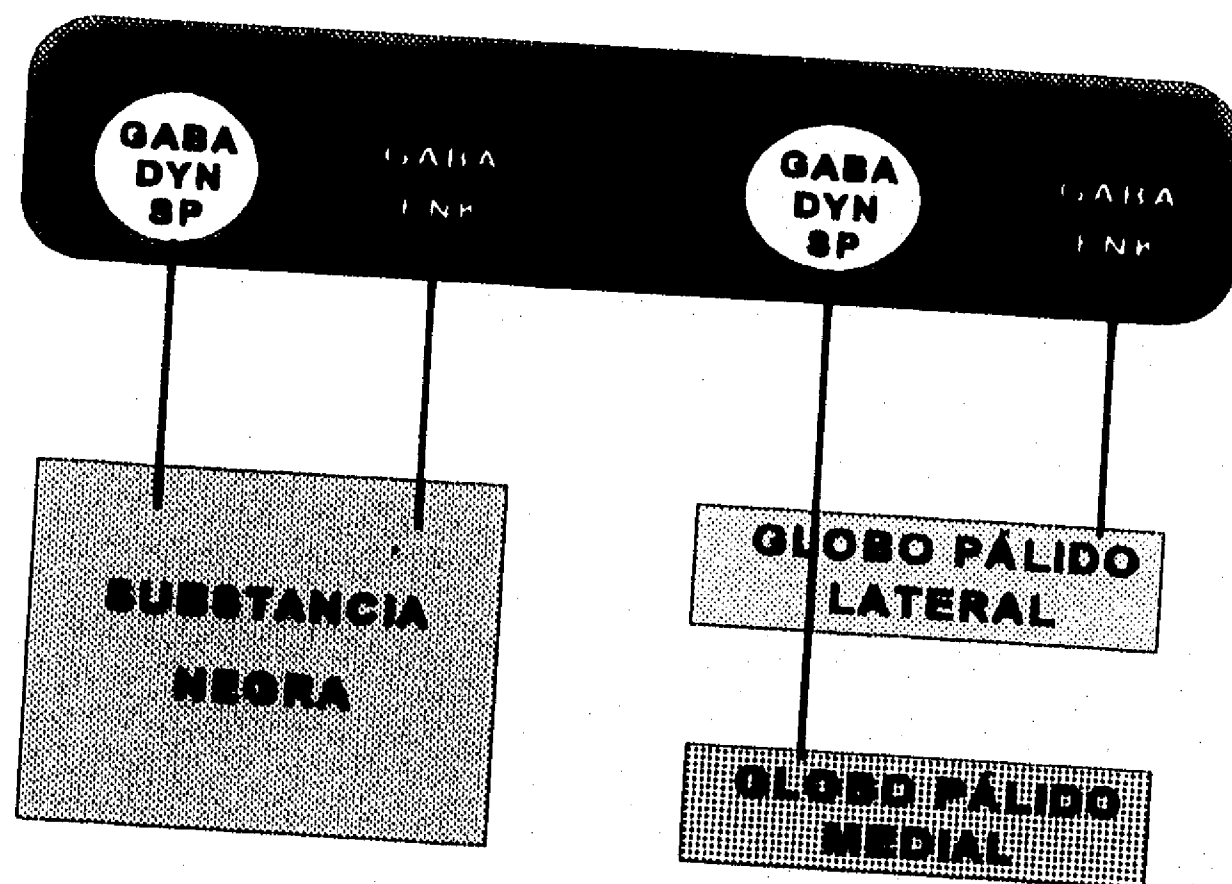


FIGURA 5. Esquema que muestra las cuatro poblaciones de neuronas de proyección neostriatales presentes en aves, reptiles y mamíferos, definidas por el blanco de proyección y por la combinación de neurotransmisores y neuropéptidos que contienen. Dos poblaciones separadas de neuronas proyectan al globo pálido (GP): a) las que contienen encefalina (ENK) y GABA y b) las que contienen sustancia P (SP), dinorfina (DYN) y GABA. En mamíferos, estas dos poblaciones proyectan a diferentes regiones del GP, con la población ENK/GABA proyectando hacia el GP lateral y la población SP/DYN/GABA proyectando hacia el GP medial. Las otras dos poblaciones de neuronas estriatales de proyección: ENK/GABA y SP/DYN/GABA, se dirigen hacia la sustancia negra.

Sin embargo, el concepto de que la dopamina y la acetilcolina son de importancia funcional central en el neostriado, es aún generalmente aceptado. De hecho, se ha sugerido que la sobreactividad de la dopamina en las regiones "límbicas" del neostriado podría disparar la aparición de enfermedades mentales, tal como la esquizofrenia. Asimismo se han reportado alteraciones en las funciones de los receptores dopaminérgicos en tales enfermedades (Graybiel, 1990).

B.4 Glutamato en el Neostriado

El glutamato presente en el neostriado proviene principalmente de las fibras aferentes provenientes de la corteza cerebral. Así, una gran variedad de evidencias indican que el neurotransmisor en la vía corticoestriatal es el glutamato (McGeer y cols., 1977; Wilson, 1990). Algunos autores han postulado que las aferencias talámicas que llegan al neostriado son también glutamatérgicas, aunque aún no existe un consenso común (Wilson, 1990). Una aferencia glutamatérgica adicional al neostriado estaría dada por las fibras provenientes del núcleo subtalámico.

B.5 Dopamina en el Neostriado

La vía nigro-estriatal que proviene de los núcleos mesencefálicos A8, A9 y A10, constituye una de las vías dopaminérgicas más importantes en el cerebro de los mamíferos. La localización y mapeo de la distribución anatómica de las neuronas que contienen dopamina en el cerebro de rata, fué descrita hace aproximadamente 31 años, inicialmente por los científicos suecos Dahlstrom y Fuxe en 1964 utilizando el clásico método de paraformaldeído de Falck-Hillarp. Más tarde, con la purificación bioquímica de los anticuerpos contra las enzimas involucradas en la síntesis de la dopamina i.e tirosina hidroxilasa (TH), estos resultados fueron confirmados a través de la técnica de inmunocitoquímica.

A diferencia de otros sistemas monoaminérgicos en el sistema nervioso central, los sistemas dopaminérgicos se encuentran bien circunscritos dentro del SNC, formando al menos tres sistemas distintos: el mesoestriatal, cuya parte dorsal es la vía nigroestriatal, el mesolímbico y el mesocortical (Robbins, 1992). Existe también un sistema dopaminérgico tuberoinfundibular (Robbins, 1992). Las neuronas que contienen dopamina de la sustancia negra pars compacta (el grupo celular A9)

proyectan al neostriado (caudo-putamen) dando lugar a la vía nigroestriatal (Véase Figura 4). Por su parte los llamados sistemas dopaminérgicos mesocortical y mesolímbico se originan en área ventral tegmental, el grupo celular A10; y se proyectan a las cortezas prefrontal, cingulada y entorinal ó a estructuras límbicas, incluyendo el núcleo acumbens, el tubérculo olfatorio y la amígdala.

C. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

Los receptores dopaminérgicos son heterogéneos desde muchos puntos de vista y han sido clasificados en diferentes subtipos en base a una variedad de criterios (Nicoll y cols., 1990). A finales de los años 70's dos clases de receptores dopaminérgicos fueron postulados para explicar la conducta bioquímica, farmacológica y electrofisiológica de los agonistas y antagonistas dopaminérgicos: el D₁ y el D₂.

C.1 Subfamilias de Receptores Dopaminérgicos

Recientemente la aplicación de las técnicas de biología molecular en el estudio de los receptores del sistema nervioso de mamífero, ha tenido un impacto dramático en el estudio de los receptores a los diferentes neurotransmisores, así el uso de técnicas de recombinación del DNA ha resultado en la clonación de múltiples y a veces inesperados subtipos de receptores para un neurotransmisor dado. Los receptores dopaminérgicos no fueron la excepción. Cinco diferentes tipos de receptores dopaminérgicos han sido clonados hasta el momento usando estas técnicas. Para la dopamina, el primer reporte conocido de la aplicación de esta técnica, fué a finales de 1988, con la publicación de la secuencia del DNA y correspondiente secuencia aminoácida del receptor D₂ dopaminérgico (Bunzow y cols., 1988). Posteriormente, cuatro receptores más fueron clonados. Aunque estos hallazgos nos dan una idea de la enorme complejidad en las diferentes isoformas de los receptores dopaminérgicos, ellos pueden ser agrupados en sub-familias de acuerdo a sus semejanzas y diferencias con los receptores D₁ (D₁ y D₅ clonados) y con los receptores D₂ (D₂, D₃ y D₄ clonados) propuestos inicialmente por Keabian y Calne en 1979. Recientemente, Sibley y Monsma (1992) han propuesto otra nomenclatura que está siendo ampliamente aceptada, para designar a estas sub-familias de receptores: D_{1A} y D_{1B} (anteriormente D₁ y D₅) y D_{2A}, D_{2B} y D_{2C} (anteriormente D₂, D₃ y D₄).

C.2 Similitudes y Diferencias de los Receptores Dopaminérgicos

Las diferentes isoformas de los receptores dopaminérgicos comparten características comunes, todos ellos contienen alrededor de 400 aminoácidos, correspondientes a un peso molecular de alrededor de 50, 000 daltons (Strange, 1993). Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de genes de receptores los cuales se acoplan a las proteínas de unión de nucleótidos de guanina, la llamada familia de receptores acoplados a la proteína G. El análisis hidropático de esta clase de familias de receptores, predice la presencia de siete regiones de 20-25 aminoácidos relativamente hidrofóbicos, los cuales se ha propuesto forman dominios membranales ó regiones alfa helices transmembranales (Tm). Estos dominios Tm se conectan entre sí alternando asas citoplásmicas y extracelulares, las cuales están compuestas de residuos hidrofílicos, donde el N-terminal está localizado en la superficie extracelular y el C-terminal se proyecta dentro del citosol (Véanse Figura 6 y Figura 7). Esta topografía membranal ha sido propuesta para todos los receptores unidos a proteínas G que han sido clonados (Sibley y Monsma, 1992; O'Dowd y cols., 1989; Todd y O'Malley, 1993). Las regiones transmembranales tienen una secuencia de identidad relativamente alta entre los subtipos de receptores, mientras que las regiones hidrofílicas poseen una mayor diversidad en las secuencias entre los miembros de las sub-familias (Schwartz y cols., 1992). Los dominios citoplasmáticos, particularmente el tercero, exhiben la mayor disimilitud de secuencias entre los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos. La tercera asa citoplasmática parece ser el sitio principal de interacción con las proteínas G. Esto podría reflejar una interacción selectiva de cada subtipo con un miembro de la gran familia de proteínas G, lo que conduciría a señales intracelulares diferentes.

Los receptores dopaminérgicos pueden ser subdivididos por la longitud de esta tercera asa (Schwartz, 1992). Así, los receptores D₁ y D₅ se caracterizan por una tercera asa citoplásmica corta y una gran cola C-terminal (Véase Figura 6), parecen además estar acoplados a proteínas G_s. Por el otro lado, los receptores D₂, D₃ y D₄ los cuales poseen una gran tercera asa citoplásmica y una cola C-terminal corta (Véase Figura 7), parecen estar acoplados a proteínas G_i (ó a otra proteína G denominada G_o). Esta subdivisión corresponde también a la ausencia de intrones en los genes para los receptores D₁ y D₅ y a su presencia en los genes para los receptores D₂, D₃ y D₄ (Schwartz, 1992). Se cree que la gran asa citoplásmica entre las regiones transmembranales Tm 5 y Tm 6 presente en

la mayoría de los receptores conocidos, está involucrada en la unión de las proteínas G_{α} , mientras que se piensa que dos residuos de serina conservados en las regiones transmembranales Tm 3 y Tm 5 (y quizá Tm 2 y Tm 7) conservados en cada receptor dopaminérgico son importantes para la interacción con los grupos catecol-hidroxil de la dopamina (Todd y O'Malley, 1993; Strange, 1993). A pesar de la alta heterogeneidad en la secuencia de la tercera asa citoplasmática entre los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos, todos ellos tienen un sitio consenso para la fosforilación dependiente de cAMP (Schwartz, 1992).

De las isoformas de receptores conocidos, el D_2 fué el primero en ser clonado a finales de 1988 (Bunzow y cols., 1988). Pronto se hizo aparente la existencia de dos formas de este receptor, los cuales han sido denominados D_2 corto (D_{2S} por sus siglas en inglés "short") y D_2 largo (D_{2L} por sus siglas en inglés "long"), referidos también como D_{2-415} y D_{2-444} respectivamente (Todd y O'Malley, 1993). Ambas formas de receptores D_2 se derivan del empalme de una secuencia genómica común. Las dos variantes codifican para proteínas que son idénticas excepto por una inserción de 29 aminoácidos en la tercera asa intracelular del receptor D_{2L} , la cual se piensa está involucrada en el acople de la proteína G_{α} (Todd y O'Malley, 1993). Esta inserción es codificada por un único exón ya que el gene que codifica para el receptor D_2 contiene múltiples exones e intrones (Gandelman y cols., 1991). Esta última característica no es usual para los receptores unidos a proteínas G, ya que la mayoría de ellos son expresados de un único exon (Todd y O'Malley, 1993). Por otro lado, se ha demostrado que ambas formas la corta y la larga del receptor D_2 clonado se acoplan a la inhibición de la adenilato ciclasa y a la activación de los canales de K^+ (Gingrich y Caron, 1993). El forma D_{2S} parece acoplarse más efectivamente a la inhibición de la adenilato ciclasa que la forma D_{2L} , apoyando la idea de que existe una diferencia en el acople con las proteínas-G entre las dos isoformas (Strange, 1993). Se ha reportado también que la forma larga del receptor D_2 potencia la liberación de ácido araquidónico de las células de Ovario de Hamster Chino (CHO), cuando es estimulado con el ionóforo de calcio A23187 (Kanterman y cols., 1991; Piomelli y cols., 1991). El mecanismo de esta potenciación parece ser independiente del AMPc, no es bloqueable por la toxina pertussis, pero involucra la activación de la proteína cinasa C (PKC).

Subsecuentemente fueron identificados las isoformas D_3 y D_4 del receptor dopaminérgico por clonación de genes (Strange, 1993). En ambos casos los genes contienen múltiples exones e intrones,

así que la sub-familia D_2 puede ser identificada por la complejidad de su estructura genómica. Hasta el momento no se conoce si existen variantes del tipo "corto" ó "largo" de las isoformas D_3 y D_4 .

El receptor D_3 clonado esta conformado por 446 aminoácidos y contiene también siete dominios transmembranales putativos. La secuencia aminoácida del receptor D_3 es muy similar al del subtipo D_2 y exhibe una homología del 46-52% del total y del 72-80% cuando se consideran exclusivamente las regiones transmembranales (Sibley, 1991).

La gran homología entre la secuencia de la proteína y la organización genómica sugiere que los genes de los receptores D_2 y D_3 divergieron de un gene precursor común en reciente historia evolutiva (Sibley, 1991).

Por otro lado, aún no ha sido bien caracterizado el sistema de segundos mensajeros acoplado a los receptores D_3 y D_4 . Cuando se examina el receptor D_3 en células CHO transfectadas, éste no tiene efecto inhibitorio ó estimulante sobre la adenilato ciclasa. Esta observación sorprendió mucho en vista de la similitud estructural entre las isoformas D_2 y D_3 . El receptor D_3 podría estar asociado a la inhibición de la adenilato ciclasa como en el caso del receptor D_2 , pero a través de una proteína G_i diferente que no es expresada en las células CHO.

Alternativamente, se ha propuesto que el receptor D_3 podría estar acoplado a diferentes mecanismos de señalamiento, tal como los involucrados en la regulación de los canales de K^+ y de Ca^{2+} , como se ha sugerido para el sistema del receptor D_2 (Sibley, 1991).

C.3 Farmacología de los Receptores Dopaminérgicos

Cada miembro de las subfamilias de receptores difieren en su aparente afinidad por la dopamina. Siendo el receptor D_3 el que posee una inusualmente alta afinidad por ella, mientras que los receptores D_1 y D_2 se unen a la dopamina con valores de K_i micromolares, 5 a 10 veces más baja que los receptores D_4 y D_5 (Schwartz, 1992). Entre los agonistas dopaminérgicos, únicamente la apomorfina despliega afinidades similares en todos los subtipos de receptores.

Los receptores D_1 y D_5 , expresados de sus genes clonados, muestran el perfil farmacológico esperado para los receptores tipo D_1 , alta afinidad para el SCH-23390 y baja afinidad para la spiperona. Las principales diferencias en sus propiedades farmacológicas son que el D_5 muestra una afinidad mayor por algunos agonistas, incluyendo una afinidad 10 veces más alta para la dopamina.

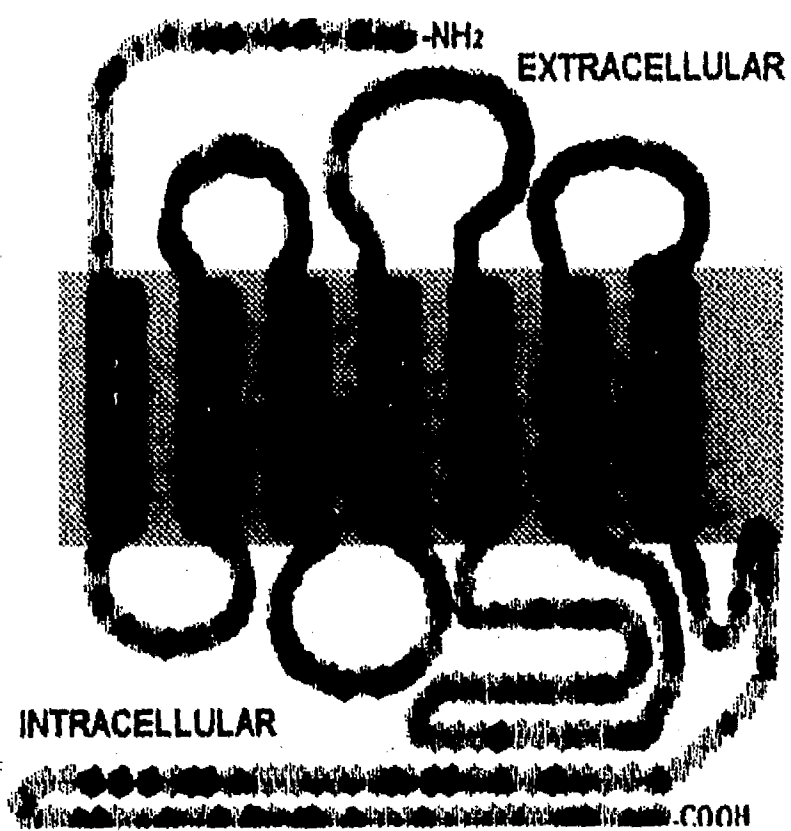
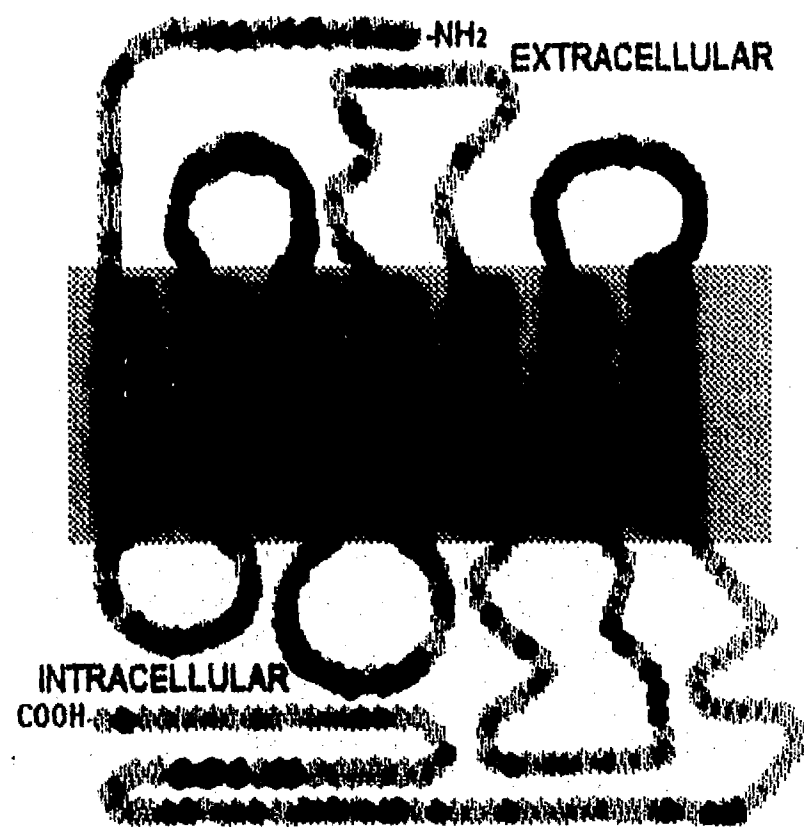
A**B**

FIGURA 6. Representación esquemática de la Topografía Membranal propuesta para dos miembros de la subfamilia D_1 de receptores dopaminérgicos. A. El receptor dopaminérgico D_1 (D_{1A}) humano y B. El receptor dopaminérgico D_5 (D_{5B}) de rata. Las áreas sombreadas representan la bicapa lipídica de la membrana neuronal. Los rectángulos negros representan los siete dominios transmembranales (Tm). Los círculos grises claros y oscuros representan la cadena de aminoácidos, con su terminal aminérgica (NH_2) en la parte extracelular y la del carboxilo ($COOH$) en la parte intracelular. (modificado de Sibley y cols., 1992).

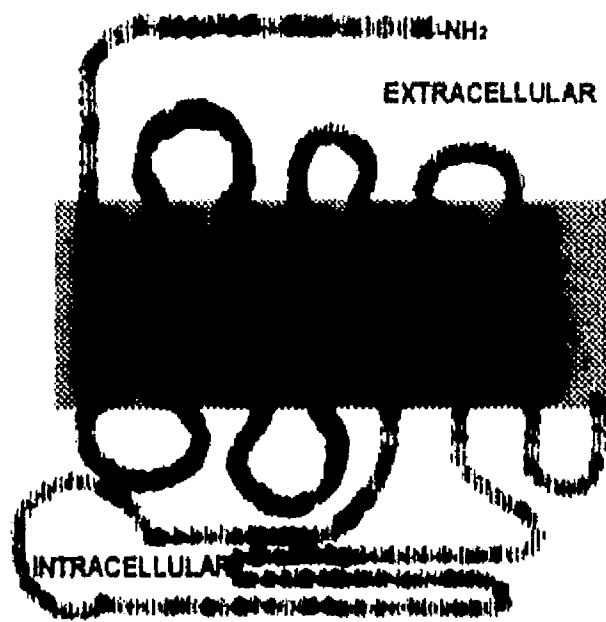
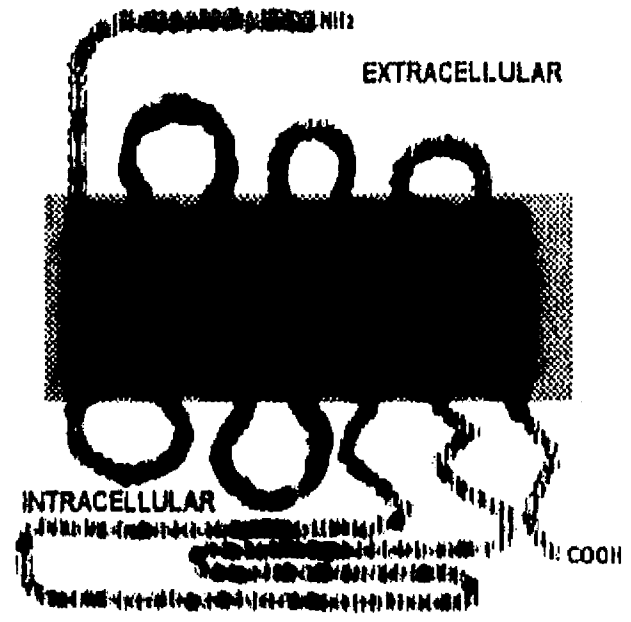
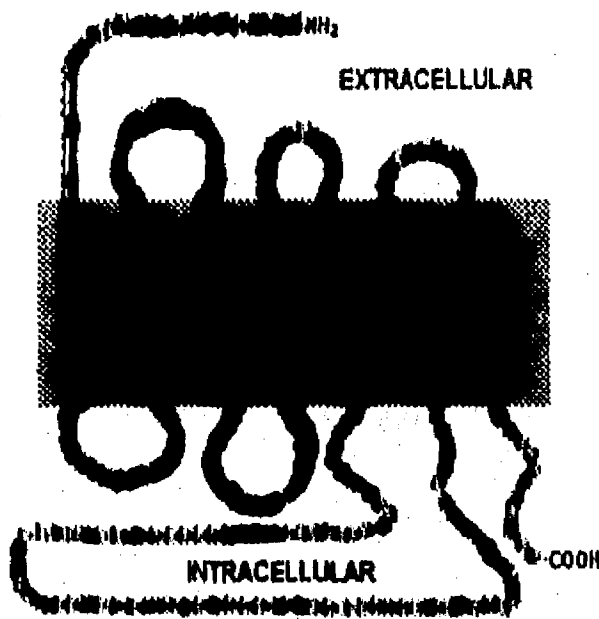
A**B****C**

FIGURA 7. Representación esquemática de la topografía membranal de tres miembros de la subfamilia D₂ de receptores dopaminérgicos. A. El receptor dopaminérgico D₂ (D_{2A}) humano. B. El receptor dopaminérgico D₃ (D_{2B}) de ratón y C. El receptor dopaminérgico D₄ (D_{2C}) humano. Los rectángulos negros representan los siete dominios transmembranales (Tm). Los círculos grises claros y oscuros representan la cadena de aminoácidos, con su terminal aminérgica (NH₂) en la parte extracelular y la del carboxilo (COOH) en la parte intracelular (modificado de Sibley y cols., 1992).

Asimismo la afinidad por el (+) butaclamol es más baja para el receptor D_5 que para el receptor D_1 .

Cuando se expresan de sus genes clonados, ambas isoformas el D_1 y el D_5 , estimulan la adenilato ciclasa a través de cualquiera de los tipo de proteína G: G_s o G_{OLF} (Herve y cols., 1993), nuevamente una característica de los receptores tipo D_1 (Strange 1990b, 1991a,b,c). El SKF-38393 considerado como un "agonista selectivo tipo D_1 " y el SCH-23390 un "antagonista selectivo tipo D_1 " son equipotentes para ambos receptores D_1 y D_5 , pero 10^2 - 10^4 veces menos potentes para los receptores "tipo D_2 " (Schwartz, 1992). Como antagonista por otro lado, el sulpiride un antagonista considerado como "tipo D_2 " es aproximadamente 1000 veces más potente para los receptores D_2 , D_3 ó D_4 que para los receptores D_1 ó D_5 (Schwartz, 1992).

Por otro lado, la diferencia estructural entre las isoformas D_{2S} y D_{2L} parece influir en la unión de agonistas pero no de antagonistas (Strange, 1993). Ambas isoformas D_{2S} y D_{2L} despliegan idéntica farmacología pero poseen diferentes patrones de expresión entre las regiones cerebrales, aunque la forma $D_{2.444}$ predomina (Schwartz y cols., 1992). El receptor D_2 contiene un aspartato en el segundo dominio transmembranal (Asp 80), el cuál se ha mostrado por mutagénesis dirigida a un sitio, que es responsable de la modulación dependiente de sodio de la unión de agonistas y de antagonistas (benzamida-sustituídos). El receptor D_3 también presenta un residuo similar, el cuál también despliega el "efecto-sodio" (Schwartz y cols., 1992).

Estudios de expresión y unión llevados a cabo en las células CHO, demostraron que el receptor D_3 exhibe una farmacología similar pero aún distinta a la del receptor D_2 (Strange, 1993). Se ha reportado que en general, los agonistas parecen ser más potentes para el receptor D_2 que para el receptor D_3 . El receptor D_3 posee afinidad más baja para unir antagonistas dopaminérgicos típicos, incluyendo el spiperone y la raclopride. Así, entre los antagonistas únicamente los autoreceptores putativos, agentes selectivos A176 y UH 232 son más potentes para el receptor D_3 (Sibley, 1991). Para los agonistas, las afinidades son notablemente más altas para el receptor D_3 que para el receptor D_2 (Strange, 1993). Los sistemas de transducción intracelular, han sido determinados para los receptores D_2 (D_{2A}) y D_4 (D_{2C}), siendo aún desconocido para el receptor D_3 (D_{2B}). En el caso del receptor D_2 (D_{2A}) se sabe que puede estar asociado a una inhibición de la formación de AMPcíclico, ó a una disminución de las conductancias de Ca^{2+} ó de K^+ ; mientras que para el caso del receptor D_4 (D_{2C}), éste podría estar asociado a una inhibición de la formación del AMPcíclico (Strange, 1993).

Adicionalmente, se ha observado que muchos de los neurolépticos "típicos" (i.e. haloperidol) inducen efectos extrapiramidales colaterales y son 10 a 20 veces más potente en los receptores D_2 que en los receptores D_3 respectivamente, mientras que algunos neurolépticos "atípicos" (i.e. clozapine) los cuales inducen leves síntomas extrapiramidales tienen afinidad más alta por el receptor D_4 que por los receptores D_3 y D_2 , respectivamente, esto sugiere que el bloqueo diferencial de los receptores D_2 y D_3 puede jugar un papel importante en la terapia antipsicótica (Sokoloff y cols., 1990; Sibley, 1991). Muchos de los efectos de las drogas dopaminérgicas sobre el sistema nervioso central que han sido atribuidas a la estimulación ó al bloqueo del receptor D_2 , pueden deberse a su interacción con el receptor D_3 , ésto se ha sugerido debido a la similitud farmacológica entre los receptores D_2 y D_3 (Sibley, 1991).

El receptor D_4 por otro lado, despliega las afinidades más bajas para la mayoría de los antagonistas dopaminérgicos (Sibley, 1991; Gingrich y Caron, 1993), con una afinidad menor por los antagonistas benzamide substituídos entre otros (Strange, 1993) y uniendo algunos antagonistas dopaminérgicos típicos con una afinidad similar a la del receptor D_2 . Mientras que despliega afinidades mayores para agonistas como la clozapina (Strange, 1993).

Aunque las técnicas de biología molecular han permitido recientemente la identificación de seis isoformas de receptores dopaminérgicos (las cuales se ha sugerido por análisis de hibridización *in situ* y de Northern blot están expresadas en el Ne), desde el punto de vista farmacológico, aún no contamos con las herramientas necesarias que nos permitan diferenciar entre las diferentes isoformas de las subfamilias D_1 y D_2 . Por tal motivo, en la presente tesis sólo se analizarán las acciones que involucren a las isoformas D_1 y D_2 ya que actualmente sólo contamos con agonistas y antagonistas específicos para tales isoformas.

C.4 Localización de los Receptores Dopaminérgicos en el Sistema Nervioso Central

Algunos autores han clasificado a los receptores dopaminérgicos tomando en cuenta las diferencias en la localización anatómica celular y cerebral de las diferentes isoformas de los receptores, además de la clasificación molecular antes vista. Esto es, se han basado por un lado en la diferencia entre aquellos receptores localizados en las terminales presinápticas dopaminérgicas (controlando la síntesis y liberación de la dopamina) y el soma celular (regulando el flujo del

impulso nervioso dopaminérgico) a los cuáles se les ha denominado "autorreceptores" (Carlsson, 1975) y aquellos localizados postsinápticamente sobre el cuerpo celular, dendritas y terminales axónicas en regiones inervadas por las neuronas dopaminérgicas.

Se ha mostrado que la sensibilidad selectiva de los agonistas y antagonistas dopaminérgicos depende de esta diferencia en la localización anatómica. Por ejemplo, se conoce que los autorreceptores dopaminérgicos son más sensibles a la estimulación por agonistas dopaminérgicos que sus contrapartes postsinápticas (Skirboll y cols., 1979) y por otro lado se han descrito compuestos que pueden ejercer efectos tanto agonísticos como antagonísticos en dichos sitios (Clark y White, 1987). Los autorreceptores han sido identificados farmacológicamente como receptores D_2 . Por otro lado, se ha mostrado que el RNAm del receptor D_2 es expresado en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta y el área ventral tegmental. En la sustancia nigra de la rata ambas isoformas del receptor D_2 : el D_{2S} y el D_{2L} , son expresados, demostrando la diversidad de autorreceptores (Schwartz, 1992).

También se ha observado que el RNAm del receptor D_3 es expresado en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, particularmente en la parte lateral y en el área ventral tegmental, indicando que el receptor D_3 puede ser también un autorreceptor (Sokoloff, 1990; Schwartz y cols., 1992).

La distribución regional de los subtipos de receptores D_1 y D_2 en el cerebro de rata, el mono y en el cerebro humano es muy similar, con la tinción más intensa en el estriado, el bulbo olfatorio y la sustancia nigra. Sin embargo, la distribución precisa de cada subtipo es distinta y frecuentemente complementaria. Se encontró que los receptores D_1 y D_2 se encontraban preferencialmente localizados en los compartimentos del parche y la matriz estriatal, así como en la sustancia nigra pars compacta ó reticulata. Estudios de microscopía electrónica han demostrado que los receptores D_1 y D_2 tienen también una distribución sub-celular altamente selectiva. La mayor parte de la inmunoreactividad a los receptores D_1 y D_2 en el neostriado de rata, fué localizada en sitios postsinápticos en subconjuntos de espinas dendríticas y en las cabezas de las espinas dendríticas. Con esta técnica también se han observado receptores D_1 y D_2 presinápticamente, indicando que ambos subtipos de receptores pueden regular la liberación del neurotransmisor. Los receptores D_1 también se encuentran presentes en las terminales axónicas de la sustancia nigra

(Levey y cols., 1993).

Por el otro lado, se han empleado técnicas de autoradiografía, análisis tradicional de northern blot (Bunzow y cols., 1988; Giros y cols., 1989; Monsma y cols., 1989), amplificación de RNAm por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Giros y cols., 1989), hibridización *in situ* (Mansour y cols., 1990; Meador-Woodruff y cols., 1991; Mengod y cols., 1989) ó por el uso de ligandos fluorescentes (Ariano, 1989) para visualizar la localización de las diferentes isoformas de los receptores en el sistema nervioso central. Así, se ha mostrado que el RNAm que codifica para los receptores D₁ se encuentra en altas concentraciones en el neostriado y en el núcleo accumbens como era de esperarse según lo observado de los estudios de unión de ligando. Por otro lado, el RNAm del receptor D₅ se ha localizado a niveles menores en ciertas áreas cerebrales como: el caudo/putamen, el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, el hipocampo, el hipotálamo y la corteza frontal. Las isoformas del receptor tipo D₂ son también expresadas en el sistema nervioso central. En términos de expresión, existen grandes diferencias en la relativa abundancia del RNAm de las dos formas del receptor D₂; así, el RNAm del receptor D₂₋₄₄₄ es más abundante en las regiones clásicas ricas en el receptor D₂, tal como el estriado y la pituitaria, aunque ambas formas la D₂₋₄₄₄ y la D₂₋₄₁₅ son expresadas igualmente en otras regiones cerebrales blanco dopaminérgicas tales como el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio y la corteza cerebral (Todd y O'Malley., 1993).

El RNAm del receptor D₃, por otro lado, tiene una prominente expresión en muchas áreas límbicas tales como el núcleo accumbens, los núcleos mamilares y las islas de calleja. Esto también es expresado en muchas regiones clásicas ricas en el receptor D₂ tal como el bulbo olfatorio y a niveles menores en la corteza cerebral (Strange, 1993; Todd y O'Malley, 1993).

Las isoformas del receptor D₄ se han localizado en niveles bajos pero significativos, en la corteza frontal, la amígdala, el hipotálamo, el tálamo, el bulbo olfatorio y la médula oblongada (Strange, 1993; Todd y O'Malley, 1993). En el sistema nervioso central del humano comparado con el de la rata, el RNAm del receptor D₄ es mucho más abundante, con niveles de expresión relativamente altos en la retina, el hipotálamo, el mesencéfalo, la corteza y la pituitaria (Todd y O'Malley, 1993).

C.5 Sinergismo entre los Receptores D_1/D_2

El sinergismo entre los receptores D_1/D_2 se refiere a una estimulación concomitante de ambos subtipos de receptores D_1 y D_2 , lo cual generalmente es requerido en condiciones normales para la manifestación conductual y electrofisiológica de los ganglios basales (Clark y White, 1987). Algunas investigaciones han mostrado que la coactivación de ambos tipos de receptores en los efectos postsinápticos mediados por la dopamina, podrían estar reflejando la interacción de los receptores en una sola célula, en células diferentes de la misma región cerebral ó en células de diferentes regiones cerebrales (Bertorello y cols., 1990).

El sinergismo entre los receptores D_1/D_2 puede tomar al menos tres formas: 1) cuantitativa, 2) cualitativa y 3) a nivel de sistema (Hu y White, 1994). Ambas formas de sinergismo D_1/D_2 cualitativo y cuantitativo, observadas típicamente en las neuronas neostriatales, son eliminados luego de la depleción crónica de dopamina producida por las lesiones con 6-hidroxidopamina de las neuronas dopaminérgicas ó por tratamiento repetido con reserpina (Hu y White, 1994). No se conoce si estas dos formas de sinergismo, las cuales pueden distinguirse a través de ciertos procedimientos, representan fenómenos similares ó distintos (Hu y White, 1994). La supersensibilidad funcional de cualquiera de los receptores D_1 ó D_2 son capaces de inducir un desacople de un sinergismo D_1/D_2 normal, sugiriendo una relación causal entre la sensibilización de un receptor y el fenómeno de desacople (Hu y White, 1994).

En el sinergismo cuantitativo, dosis bajas de agonistas dopaminérgicos tipo D_1 aumentan la habilidad de los agonistas tipo D_2 de inhibir a las neuronas estriatales y de excitar a las neuronas del globo pálido (Hu y White, 1994), así como de convertir ciertas conductas orales estereotipadas en formas más intensas (Waddington y Daly, 1993).

El sinergismo cualitativo por el otro lado, es llamado también el papel permisivo de los receptores D_1 , debido a la evidente habilidad de los antagonistas selectivos al receptor D_1 para prevenir o reducir ciertos efectos conductuales y electrofisiológicos de los agonistas D_2 (Hu y White, 1994).

La tercera forma de sinergismo D_1/D_2 , que puede ser observado en ratas después de las lesiones unilaterales del sistema nigroestriatal dopaminérgico con 6-hidroxidopamina, involucra la interacción a nivel de sistemas entre los receptores localizados dentro del neostriado y los receptores

D₁ localizados dentro de la sustancia negra pars reticulata, en lugar de la interacción entre los receptores estriatales D₁ y D₂ adyacentes (Hu y White, 1994). Este tipo de sinergismo también ha sido demostrado para la inducción del gen temprano inmediato c-fos (immediate early gene c-fos) y las proteínas semejantes al Fos (Fos-like proteins) en el estriado denervado por los agonistas D₁ y D₂ (Paul y cols., 1992). Recientemente, la caracterización de la modulación de las corrientes de sodio y de potasio producidas por los receptores D₁ y D₂ en neuronas neostriatales aisladas agudamente, sugiere que ambas acciones antagonistas y sinergistas pueden ser llevadas a cabo por los agonistas D₁ y D₂ en el neostriado (Surmeier y kitai, 1993).

D. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS EN EL NEOESTRIADO

Se sabe a través del análisis por hibridización *in situ* y Northern blot, que las neuronas espinosas medianas de proyección del NE expresan las seis isoformas de receptores dopaminérgicos hasta hoy clonados. Siendo los receptores D₁ y D₂ los que se expresan principalmente en el NE dorsal (Filloux y cols., 1988a; DeKeyser y Ebinger, 1990, Surmeier y Kitai, 1993). Actualmente la localización de los receptores tipo D₁ y tipo D₂ sobre estas neuronas estriatales es muy controvertida.

Basados en estudios de lesión de las neuronas dopaminérgicas mesoestriatales, de histoquímica, de hibridización *in situ* y farmacológicos, se ha postulado que existe una segregación preferencial de los receptores dopaminérgicos sobre estas neuronas. En donde el receptor tipo D₂ está presente en la mayor parte de las neuronas estriato-palidales positivas a la encefalina y el receptor tipo D₁ en la mayoría de las células estriato-nigrales positivas a la sustancia P y a la dinorfina (Gerfen y cols. 1990a, 1992a, 1992b, 1992c, 1992d), dando lugar así a dos vías independientes: la "Vía Directa" que une el caudo/putamen con el segmento interno del globo pálido/substancia negra pars reticulata (GPi/SNr) y la "Vía Indirecta" que se dirige a través del segmento externo del globo pálido (GPe) y el núcleo subtalámico (STN) hacia la sustancia negra pars reticulata (SNr) (Véase Figura 2) (Gerfen y cols., 1990, 1992a, 1992b; Strange, 1993). Sin embargo, contrario a la hipótesis de segregación de los receptores dopaminérgicos, se ha concluido de experimentos electrofisiológicos y de la amplificación del RNAm de los receptores dopaminérgicos en células estriatales únicas, que

muchas de las neuronas estriatales co-expresan los receptores dopaminérgicos D₁, D₂ y D₃, es decir estos hallazgos se oponen a la estricta segregación en estas neuronas. Así, ha empezado a definirse a nivel celular la localización de las principales isoformas de los receptores dopaminérgicos en el neostriado, aunque la estimación precisa del grado de colocación queda por realizarse en trabajos posteriores (Surmeier y cols., 1992). Asimismo, esta localización permitirá la especulación acerca de la función de las isoformas de los receptores.

Recientemente las técnicas de biología molecular también han sido utilizadas para localizar los genes que codifican para los diferentes receptores dopaminérgicos, esto es, los genes para ambos receptores D₂ y D₄ se encuentran localizados en el humano en el cromosoma 11; para el receptor D₁ en el cromosoma 5; para el receptor D₃ en el cromosoma 3 y para el receptor D₅ en el cromosoma 4 (Schwartz, 1992).

El conocimiento conjunto de las propiedades bioquímicas, farmacológicas y anatómicas así como las electrofisiológicas de la familia de receptores dopaminérgicos, es de enorme relevancia clínica debido al uso potencial de agonistas y antagonistas selectivos a las diferentes subfamilias de receptores D₁ y D₂, en el tratamiento de estados psicóticos y disturbios motores y endocrinos.

Se sabe también que los receptores tipo-D₂ existen en las interneuronas colinérgicas y sobre las terminales de las neuronas dopaminérgicas mesostriatales. Estos receptores tipo D₂ han sido también descritos sobre las terminales de las neuronas glutamatérgicas cortico-estriatales (Strange, 1993).

E. FISILOGIA DE LAS NEURONAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El procesamiento de la información en el sistema nervioso central no depende únicamente del substrato anatómico de los circuitos sinápticos, sino también de las propiedades electrofisiológicas de los elementos neuronales que los integran; así como de la manera en como estas propiedades se ven alteradas por la plétora de sustancias neuroactivas que coinciden en ellas (McCormick, 1990).

Una neurona puede considerarse como un transductor que transforma las entradas sinápticas sostenidas y graduadas, en señales de salida. Estas señales de salida consisten en espigas repetitivas

todo ó nada, codificadas como diferentes patrones de disparo. Como sabemos, la conducta electrofisiológica de las neuronas está determinada por la presencia y distribución de las diferentes corrientes iónicas en una célula dada y por la habilidad de los neurotransmisores y neuromoduladores de aumentar ó disminuir la amplitud de dichas corrientes iónicas (McCormick, 1990; Lacey, 1993; Surmeier y Kitai, 1993; Wilson, 1993).

Por lo tanto, el entendimiento de la organización sináptica y de la función de los diferentes núcleos del sistema nervioso central requiere del estudio y de la comprensión conjunta de las propiedades morfológicas, electrofisiológicas y farmacológicas de cada uno de los elementos neuronales que constituyen dichos circuitos (McCormick, 1990).

E.1 Propiedades Membranales Intrínsecas de las Neuronas

El desarrollo de los conceptos relacionados con la excitabilidad neuronal se iniciaron a mediados del siglo pasado y principios de éste con el trabajo pionero de Bernstein (Bernstein, 1902 y 1912), quién indicó que el potencial generado a través de la superficie membranal en células musculares y nerviosas, está determinado por los gradientes de concentración del K^+ . Fué hasta los años 50's, cuando Hodgkin, Huxley y Katz demostraron la importancia de las conductancias iónicas membranales dependientes de voltaje en la generación de los impulsos nerviosos tanto en el axón gigante de calamar como en el nervio y en el músculo (Hodgkin, Huxley y Katz, 1949; Hodgkin, 1951; Hodgkin y Huxley, 1952d).

Posteriormente Coombs, Eccles y Fatt (1955), concluyeron de sus estudios en las motoneuronas espinales de mamífero que las bases iónicas de la actividad eléctrica en las motoneuronas eran muy similares a la de las fibras nerviosas periféricas, es decir que los potenciales de acción eran producidos por una corriente entrante de Na^+ transitoria y una corriente saliente de K^+ , semejante a las encontradas por Hodgkin y Huxley en el axón gigante de calamar y en el nervio y músculo.

Como consecuencia a estos estudios iniciales, se llegó a suponer posteriormente que todas las células nerviosas en el sistema nervioso central (SNC) eran electrofisiológicamente similares a las motoneuronas, es decir que todas las neuronas del SNC generaban potenciales de acción únicamente a través de las corrientes previamente descritas de Na^+ y de K^+ dependientes de voltaje.

Nunca se consideró que los diferentes tipos neuronales presentes en el sistema nervioso central, pudieran tener propiedades membranales eléctricas intrínsecas, propias de cada tipo neuronal y que ellas fueran las responsables de generar determinado tipo de actividad (Llinás, 1988). Es decir, aunque se sabía desde hace mucho tiempo, que las diferentes clases de neuronas en el sistema nervioso central diferían en sus características morfológicas (Cajal, 1899), sólo hasta recientemente se ha reconocido que las neuronas también difieren en la manera de disparar potenciales de acción (Llinás, 1988). Actualmente se sabe, que estas diferencias dependen en gran medida tanto de las propiedades membranales pasivas (resistencia de entrada neuronal, constante de tiempo y constante de espacio) como de las activas (conjunto de conductancias iónicas ó canales iónicos presentes en cada tipo neuronal) (Llinás, 1988).

En este sentido, el advenimiento de las técnicas electrofisiológicas en preparaciones *in vitro* como la rebanada de cerebro y las neuronas disociadas ó cultivadas, en las cuales el medio iónico extracelular puede ser controlado, ha permitido un cambio fundamental en el conocimiento relacionado con las propiedades membranales intrínsecas de las neuronas de los mamíferos. Por ejemplo, con estas técnicas electrofisiológicas *in vitro*, en años recientes se han descubierto una gran cantidad de conductancias iónicas membranales, las cuales parecen estar jugando un papel muy importante a nivel subumbral y supraumbral, ya que son las que deciden cómo y cuándo dispararán las neuronas los potenciales de acción (Bargas y cols., 1993). Así, estas conductancias parecen no sólo determinar el patrón de disparo neuronal sino que explican varias propiedades neuronales como son: grandes latencias al disparo neuronal, adaptación en la frecuencia de disparo, marcapaso, disparo en ráfagas, umbrales múltiples, integración sináptica y modulación a largo plazo por transmisores y péptidos (Bargas y cols., 1993).

E.2 Conductancias Iónicas Presentes en las Neuronas del SNC

Las neuronas del sistema nervioso central de los mamíferos no se encuentran simplemente en reposo y ocasionalmente generan potenciales de acción, sino que son elementos dinámicos con propiedades electroresponsivas, debido a que sus membranas están en constante estado de flujo gracias a la presencia de una gran variedad de conductancias iónicas (Tablas 1, 2, 3 y 4).

Las conductancias iónicas pueden distinguirse no sólo por los iones que sus canales conducen

(e.g. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) sino también por sus características de curso temporal, sensibilidad al potencial de membrana y a su sensibilidad a los neurotransmisores y otros agentes químicos (Hille, 1992; Adams y Galvan, 1986; Rudy, 1988; Tsien y cols., 1988). Las corrientes iónicas han sido divididas en general dentro de dos categorías: a) aquellas que son sensibles a los cambios en el potencial de membrana ó dependientes de voltaje y b) aquellas que son alteradas por los neurotransmisores ó dependientes de ligando; sin embargo, recientemente se ha hecho aparente que existe una sobreposición entre los dos grupos, es decir que existe un número de canales iónicos sensibles al voltaje que también son susceptibles de ser moduladas por neurotransmisores. Las corrientes que poseen ambas sensibilidades al voltaje- y al ligando- han sido objeto de mucha atención, debido a su habilidad de modular la conducta eléctrica de las neuronas de manera poco usual (McCormick, 1990).

Los nombres designados a las corrientes iónicas frecuentemente reflejan una propiedad que distingue a tal corriente de las demás. La mayoría de las corrientes iónicas sensibles al potencial de membrana son activadas por despolarizaciones. La proporción y el potencial de membrana en los cuales las corrientes iónicas se activan, constituyen características importantes que definen a los diferentes tipos de corrientes (McCormick, 1990; Hille, 1992). Si la corriente es activada desde el reposo por desviaciones relativamente pequeñas del potencial de membrana, entonces tales corrientes serán denominadas como de bajo umbral; es decir, la probabilidad de apertura de los canales que conducen a estas corrientes es mayor cuando la neurona se encuentra a potenciales más hiperpolarizados. Por el contrario, si la corriente es activada desde el reposo únicamente a niveles más despolarizados, entonces dichas corrientes serán referidas como de alto umbral; es decir, la probabilidad de apertura de los canales que conducen a estas corrientes es mayor a umbrales más altos. Adicionalmente, si la activación de la corriente a lo largo de un cambio constante y estable en el potencial de membrana, conduce únicamente a una respuesta transitoria, entonces uno se referirá a ellas como transitorias ó rápidamente inactivantes. Asimismo, si una corriente persiste durante una activación constante (es decir que no es inactivante) se le denominará como persistente, sostenida ó de larga duración (McCormick, 1990).

Las neuronas del sistema nervioso central poseen también conductancias iónicas que son activadas por hiperpolarización membranal y que son las responsables de llevar a las células que se

encuentran a potenciales de membrana más positivos, de regreso hacia el potencial de reposo. Esta familia de corrientes ha sido denominada de varias formas como I_Q ("queer"), I_h ("activada por hiperpolarización") ó I_f ("funny") (McCormick, 1990).

Resumiendo, de acuerdo a sus propiedades de activación e inactivación podemos clasificar a las conductancias iónicas entrantes y salientes en las siguientes familias:

TABLA 1. FAMILIAS DE CONDUCTANCIAS IÓNICAS MEMBRANALES

ACTIVADAS POR DESPOLARIZACIÓN	
ENTRANTES	
	Persistentes ó de Inactivación Lenta
	Transitorias
SALIENTES	
	Persistentes ó de Inactivación Lenta
	Transitorias
ACTIVADAS POR HIPERPOLARIZACIÓN	
	Rectificadores Entrantes - I_Q ó "Queer" ó I_f ó "funny" ó I_h "hiperpolarizante"

Modificada de Bargas, J. y cols., Neuronal Networks of The Mammalian Brain Have Functionally Different Classes of Neurons, 1993.

También se ha tratado de clasificar a las corrientes iónicas neuronales de acuerdo con sus propiedades funcionales, ya que diferentes arreglos de ellas parecen estar presentes en diferentes tipos neuronales y distribuidas a lo largo del axón y/ó del soma y las dendritas (para una revisión mayor, consultar el artículo de Llinás, 1988).

Como se mencionó anteriormente, aunque la mayoría de las neuronas disparan potenciales de acción de una manera todo ó nada y todos ellos son generados de forma muy similar, el

paradigma funcional de disparo es muy diferente. Por ejemplo, algunas neuronas disparan espontáneamente mientras que otras no, algunas pueden adaptarse y otras no, algunas disparan en ráfagas mientras que otras disparan con espigas únicas, algunas otras poseen propiedades biestables, ó poseen grandes latencias de disparo, etc. Más aún, una neurona dada puede cambiar de una forma de disparo a otra, así una neurona que dispara ráfagas a un potencial de membrana dado, puede disparar tónicamente si el potencial cambia (Bargas y cols., 1993). Experimentalmente se ha hecho aparente que familias de canales iónicos subyacen a la variabilidad de estas propiedades de disparo (Crill y Schwindt, 1983; Llinás, 1988; Schwindt y Crill, 1989) (para revisión consultar Bargas y cols., 1993). Estudios recientes han mostrado que la función ó las funciones que estas conductancias desempeñan en un determinado tipo neuronal, no necesariamente tienen que ser iguales para otro tipo neuronal diferente, por ejemplo, se ha establecido que las conductancias de K^+ activadas por Ca^{2+} son las responsables de la adaptación de la frecuencia de disparo en las neuronas, sin embargo, se ha observado que este no parece ser el caso en algunos tipos neuronales como en el neocórtex (Pineda y cols., 1992; Bargas y cols., 1994).

E.2.1 Corrientes Entrantes Persistentes ó de Inactivación Lenta

La mayoría de estas conductancias son supraumbrales, es decir, que los canales son activados a potenciales de membrana positivos al del umbral que genera la espiga somatodendrítica. Estas corrientes, producen despolarización membranal, la cual se adiciona al estímulo despolarizante y lo aumenta. De esta manera, a veces puede ser obtenido un sistema positivo de retroalimentación, es decir, cada despolarización activa más corriente entrante, la cual causa más despolarización y así hasta que se generan espigas todo ó nada diferentes de los potenciales de acción somatodendríticos (Bargas y cols., 1994). Estas conductancias como su nombre lo indica se inactivan lentamente y la despolarización persiste después de que el estímulo ha terminado, lo que origina "biestabilidad" (Hounsgaard y Kiehn, 1985). Un ejemplo de esta propiedad de "biestabilidad" son las neuronas de Purkinje en el cerebelo, gracias a que poseen canales de sodio lentamente inactivantes ó persistentes, sensibles al TTX (Bargas y cols., 1994). Las corrientes iónicas que determinan el disparo neuronal en diferentes regiones del sistema nervioso central, han sido intensamente investigadas.

Otra función de esta clase de corrientes entrantes es la generación de espigas dendríticas ó

de alto umbral (McCormick, 1990), este es el caso del neostriado (Bargas y cols., 1991). En muchas neuronas de vertebrados, se ha encontrado que este tipo de corrientes presentan una farmacología muy característica, es decir que una parte de estas corrientes son sensibles a un determinado bloqueador, mientras que otra parte de esas mismas corrientes son sensibles a otro tipo de bloqueador. Esta es la razón principal por la cual los canales de calcio lentamente inactivantes han sido divididos como tipos L, N y P (Tabla 2) (Tsien y cols., 1988; 1991; Bargas y cols., 1994). Las corrientes de calcio de alto umbral de activación (HVA, de sus siglas en inglés high voltage activated), están localizadas preferencialmente pero no exclusivamente sobre las dendritas de ciertos tipos neuronales como son: la corteza somatosensorial y las células piramidales hipocámpales de la rata y del cobayo; las dendritas de las neuronas de otros núcleos cerebrales del cobayo como: la sustancia negra pars compacta, la oliva inferior, el tálamo, las células de purkinje del cerebelo y probablemente en el núcleo locus coeruleus de la rata (Llinás, 1988; Bargas y cols., 1991b, 1994).

Las neuronas del sistema nervioso central de los mamíferos, poseen además de las corrientes entrantes generadas por los iones de Na^+ y de Ca^+ , una gran variedad de corrientes salientes generadas por las conductancias de K^+ . Dos conductancias de K^+ son las que prevalecen en las neuronas del SNC: 1) la corriente A (I_A) inactivante rápida, descrita inicialmente en invertebrados (Llinás, 1988) y 2) las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} (I_{AHP}), también inicialmente descritas en invertebrados (Llinás, 1988). Adicionalmente, otras conductancias de K^+ como las activadas por ligando-dependientes de voltaje, las independientes de voltaje y las I_K dependientes de voltaje como la corriente rectificadora entrante (I_{kir}) y la corriente lenta no-inactivante, juegan un papel muy importante en la integración neuronal y en las oscilaciones (Llinás, 1988).

Al igual que las corrientes entrantes, las corrientes salientes pueden clasificarse de acuerdo a su cinética de inactivación y desinactivación, en transitorias y en persistentes (Bargas y cols., 1994).

E.2.2 Corrientes Salientes Persistentes ó de Inactivación Lenta

Las corrientes salientes se oponen a los estímulos despolarizantes y a las corrientes entrantes; ellas decrementan la excitabilidad aumentando el umbral al disparo. Ellas comprenden un sistema de retroalimentación negativo: los canales son activados por despolarizaciones, las corrientes

generadas hiperpolarizan la membrana y la corriente cae. Las corrientes hiperpolarizantes están asociadas con posthiperpolarizaciones prolongadas, aumentando la adaptación en la frecuencia de disparo (Bargas y cols., 1993 y 1995). La activación de los canales de corriente saliente responsables del umbral y de la frecuencia, puede depender del voltaje membranal, del calcio intracelular ó de ambos. Una activación de canales dependiente únicamente de voltaje, abrirá y cerrará una fracción de canales con cada potencial de acción. Una activación de canales puramente dependiente de calcio, abrirá una fracción de canales dependiendo del número de potenciales generados (conversión digital a analógica). Con cada espiga, el calcio entra a la célula y se acumula en el citoplasma. El tamaño y la duración de los potenciales generados dependen de la concentración de calcio intracelular, del amortiguamiento del calcio y de los mecanismos de extrusión del calcio (Bargas y cols., 1994). Por lo tanto, la dependencia en el calcio extracelular confiere propiedades acumulativas, nuevamente el disparo neuronal depende de su historia previa (Bargas y cols., 1994). Asimismo, los neurotransmisores que actúan a través de cambios en el calcio intracelular ó de la entrada de calcio, pueden contribuir a aumentar ó a decrementar las corrientes salientes y de esta forma contribuir en la modulación del patrón de disparo (Bargas y cols., 1993, 1994 y 1995). También se ha observado que los neurotransmisores pueden modular directamente las corrientes salientes persistentes ó lentamente inactivadas (Bargas y cols., 1994; Pineda y cols., 1995; Hernández-López y cols., 1996). Entre las corrientes salientes persistentes ó de inactivación lenta, podemos mencionar a los rectificadores retardados dependientes de voltaje (I_K); a las corrientes de K^+ dependientes de calcio y activadas por voltaje (I_K (BK) (Ca^{2+})_i-activada por voltaje); a las corrientes de K^+ activadas por calcio (I_{AHP} (SK) activada por (Ca^{2+})_i); la corriente M (I_M) sensible al voltaje, a la muscarina, a la sustancia P, a la somatostatina y a otras sustancias. Esta corriente también depende del calcio interno; a las corrientes de Cl^- (de diversas clases, algunas activadas por [Ca^{2+}]_i y/ó voltaje y por último a la corriente aniónica ($I_{aniónica}$), la cual no es muy selectiva. La farmacología y las funciones que estas corrientes desempeñan en las neuronas se resumen en la Tabla 2.

E.2.3 Corrientes Entrantes Transitorias ó de Inactivación Rápida

Podemos decir que la diferencia entre las corrientes persistentes y transitorias depende fundamentalmente de la proporción de inactivación. En general se consideran como opuestas, es

decir, las corrientes transitorias se inactivan rápidamente mientras que las corrientes persistentes se inactivan muy lentamente ó simplemente no se inactivan (Bargas et al., 1993 y 1995).

Este tipo de corrientes se han descrito en neuronas de vertebrados y entre ellas podemos mencionar a la corriente de sodio responsable de la subida del potencial de acción y a las de calcio. En el caso del corazón, Tsien y su grupo (Hille, 1992) denominaron a los canales de calcio de bajo umbral que conducen a este tipo de corrientes, como canales de calcio tipo-T debido a que ellos poseen una conductancia pequeña y transitoria. Estas conductancias también producen espigas: las espigas de bajo umbral (en inglés "low threshold spikes" ó LTS) y están involucradas en el disparo de potenciales de acción de sodio y en la generación de patrones de disparo en forma de ráfaga (Bargas y cols., 1994; McCormick, 1990; Llinás, 1988), aunque en algunos casos, los canales-T no producen espigas LTS todo ó nada, sino que son moduladas gradualmente por el potencial de membrana. Se han reportado ya diferentes variedades de canales de calcio tipo-T (Bargas y cols., 1994), los cuales parecen activarse a niveles subumbrales. Las neuronas talámicas, las pontinas, las de la sustancia nigra y las de otros núcleos, los utilizan para disparar en ráfagas, si el potencial de membrana es más bien negativo (Bargas y cols., 1993 y 1995). Así, por sus propiedades de inactivación a potenciales de membrana en reposo y de desinactivación a potenciales de membrana hiperpolarizantes, estas conductancias de calcio de bajo umbral confieren a las neuronas centrales que las poseen, la propiedad de comportarse como osciladores (Llinás, 1988). Por lo tanto, la misma neurona puede disparar espigas únicas a potenciales despolarizados ó ráfagas a potenciales hiperpolarizados (es decir poseen dos umbrales diferentes), es decir, que las neuronas que poseen estas conductancias son capaces de responder diferencialmente y exhibir patrones de disparo distintos dependiendo del potencial de membrana previo y del medio ambiente químico (Bargas y cols., 1993 y 1995; Galarraga y Bargas, 1995).

E.2.4 Corrientes Salientes Transitorias ó de Inactivación Rápida

Algunas neuronas del SNC poseen adicionalmente a los canales antes mencionados, un tipo de canal de K^+ que se activa transitoriamente en un rango subumbral de los potenciales de membrana (Hille, 1992). La corriente en este importante canal (canal A ó canal K_A) ha sido denominada de varias formas como corriente A (I_A), corriente de K^+ rápida y transitoria, corriente saliente transitoria

ó corriente de K^+ de inactivación rápida. Los canales K_A pueden ser activados cuando una célula es despolarizada después de un período de hiperpolarización. Conceptualmente, esta clase de canales representan lo opuesto a los canales T (Bargas y cols., 1993 y 1995). Se ha considerado que la función principal de los canales A, es su participación en el disparo rítmico neuronal (Bargas y cols., 1993 y 1995). Farmacológicamente, I_A es más susceptible de ser bloqueada por la 4-aminopiridina (4-AP) que por el tetraetilamonio (TEA). Por otro lado, la cinética de inactivación de estos canales es la que determina el marcapaso entre los intervalos interespigas, es decir lo que proporciona a las neuronas que los poseen un rango dinámico de frecuencia de respuestas: desde muy bajas hasta muy altas frecuencias de disparo. La cinética de inactivación de estos canales, puede ser también la causa de que ciertas neuronas posean latencias prolongadas de disparo después de un estímulo dado (Bargas y cols., 1989, 1993 y 1995). Las farmacología y las funciones que estas corrientes desempeñan en las neuronas se resumen en la Tabla 3.

E.2.5 Rectificadores Entrantes

Los canales rectificadores entrantes son un grupo de canales de potasio que fueron descubiertos en el músculo por Katz en 1949. Katz denominó a estos canales como "rectificadores anómalos" debido a las propiedades contrastantes que mostraba esta rectificación con la rectificación retardada "normal", es decir, la anomalía consiste en que la conductancia aumenta durante períodos de hiperpolarización y disminuye durante períodos de despolarización. El nuevo término, "rectificador entrante", describe la tendencia de actuar como una válvula ó un diodo, favoreciendo la entrada de los iones de K^+ y corrientes entrantes durante las hiperpolarizaciones, pero no la salida durante las despolarizaciones. Hille utiliza la abreviación K_{ir} para referirse a estos canales (Hille, 1992).

Los canales K_{ir} se distinguen de otros canales conocidos, por tres propiedades poco usuales: 1) Su apertura depende de un voltaje hiperpolarizante pronunciado; 2) la dependencia de voltaje de la apertura de su compuerta depende de la $[K^+]$ extracelular y 3) parte de su rectificación parece ser "instantánea" ó "rápida", ocurriendo alrededor de menos de 1ms, mientras que otra parte parece ser "tiempo dependiente" variando de milisegundos a 0.5 segundos (Hille, 1992). La carga principal que lleva el rectificador anómalo "instantáneo" es el K^+ y la corriente que lleva se vuelve entrante

una vez que la hiperpolarización ha sobrepasado al potencial de equilibrio del potasio (E_K) (Bargas y cols., 1993 y 1995; Hagiwara y cols., 1974). Los rectificadores anómalos instantáneos poseen propiedades de activación rápida de compuertas, conforme las constantes de tiempo membranales se vuelven más rápidas, cuando la membrana es hiperpolarizada (Bargas y cols., 1993 y 1995). La rectificación entrante "tiempo dependiente" (en oposición a la instantánea), se detecta claramente como una corriente entrante en desarrollo durante la hiperpolarización. Durante los registros intracelulares, esta conductancia se manifiesta como un "sag" que se opone a la hiperpolarización y como un rebote de despolarización en forma de "joroba" cuando la hiperpolarización ha terminado. Este rebote de depolarización puede alcanzar el umbral de disparo del potencial de acción y así contribuir a un rebote de la excitación (Bargas y cols., 1993 y 1995). En muchas células, este rebote está mediado por la corriente rectificante entrante y por la corriente entrante de bajo umbral ocasionada por los canales transitorios de calcio; de tal manera, que una potente ráfaga de espigas puede seguir al final de la hiperpolarización ("exaltación del rebote"). Quizá ésta es la explicación a las "postdescargas postinhibitorias" observadas en muchos núcleos cerebrales (Bargas y cols., 1993 y 1995). La farmacología y las funciones que estas corrientes desempeñan en las neuronas se resumen en la Tabla 4.

Las siguientes tablas resumen los tipos de corrientes descritos anteriormente, así como las funciones que estas desempeñan en las neuronas (Bargas y cols., 1993 y 1995):

TABLA 2.

Tipo de Corriente	Tipo de Ión	Funciones
Corrientes Entrantes Persistentes ó de Inactivación Lenta.	<p>-I_{Na} sensible al TTX</p> <p>-I_{Na} -insensible al TTX</p> <p>-I_{Ca} sensible a la DHP (canales-L) alto ó bajo umbral; sensible a dosis mM de Cd²⁺</p> <p>Inactivación dependiente del calcio intracelular y del voltaje.</p> <p>-I_{Ca} sensible a la w-conotoxina (canales N) resistente a las DHP; sensible a dosis mM de Cd²⁺</p> <p>-I_{Ca} sensible a FTX (canales P); sensible a dosis mM de Cd²⁺ resistente a DHPs y a la w-conotoxina</p> <p>-I_{Catiónica} también denominada como inespecífica ó no-selectiva al menos algunas clases pueden ser activadas por [Ca²⁺]_i</p>	<p>Disparo estable sostenido, bistabilidad, se opone a la caída electrotonica de los potenciales sinápticos, espigas dendríticas ó de alto umbral, potenciales de despolarización lenta y postpotenciales, liberación del neurotransmisor.</p>
Corrientes Salientes Persistentes ó de Inactivación Lenta	<p>-I_K rectificadores retardados dependientes de voltaje; sensibles al TEA y algunos al DTX, CTX, NTX ó</p> <p>-I_K (BK) activada por voltaje y por [Ca²⁺]_i; sensible al CTX y al NTX.</p> <p>-I_{AHP} (SK) corriente de K⁺-activada por [Ca²⁺]_i, insensible al TEA, a la apamina, a la D-tubocurarina (algunas) y quizá al CTX.</p> <p>-I_M corriente de K⁺ sensible al voltaje, la muscarina, LHRH, subst.P.</p> <p>-I_{Cl}. Algunas clases, algunas activadas por voltaje y/o [Ca²⁺]_i, bloqueo por SITS, DIDS, ZIDS</p>	<p>Repolarización del potencial de acción; repolarización de los potenciales despolarizantes lentos; disparo rítmico, adaptación de la frecuencia de disparo, potenciales posthiperpolarizantes, marcan el disparo en ráfagas; baja frecuencia de disparo.</p>

* TTX=tetrodotoxina; DHP=dihidropiridinas; Cd²⁺=cadmio; FTX=toxina de la araña tejedora de redes en forma de embudo (funnel-web spider toxin); DTX=dendrotoxina; CTX=caribdotoxina; NTX=noxiotoxina; SITS= ácido 4-acetomido-4-isotiocianoestilbeno-2',2'-disulfónico; DIDS=ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2',2'-disulfónico; LHRH: hormona liberadora de la hormona luteinizante; subst. P= substancia P; BK= "big K(Ca²⁺) channels or maxi-channels" ó canales grandes de canales de K⁺ dependientes de calcio; SK= "small K(Ca²⁺) channels" ó canales de K⁺ dependientes de calcio, de tamaño pequeño ó intermedio.

TABLA 3.

Tipo de Corriente	Tipo de Ión	Funciones
Corrientes Entrantes Iransitorias	$-I_{Na}$ sensible al TTX $-I_{Na}$ resistentes al TTX $-I_{Ca^{2+}}$ (canales T); sensibles a dosis mM de Ni^{2+} (algunos son mejor bloqueados por Cd^{2+} ó Zn^{2+}); existen quizá algunas clases diferentes, bloqueables por dosis mM de amiloride y por tetramethrin; estas corrientes subyacen a las llamadas espigas de bajo umbral (LTS).	Generación de potenciales de acción y de espigas todo ó nada, potenciales despolarizantes transitorios, disparo en ráfagas, disparo oscilatorio lento, marcapasos, disparo rítmico.
Corrientes Salientes Transitorias	$-I_A$ Corrientes de tipo "A". pueden existir muchas clases; algunas se inactivan completamente y otras no. Muchas de ellas son sensibles a dosis milimolares de la 4-AP; algunas son sensibles al TEA; algunas son sensibles a la $[Ca^{2+}]_i$.	Latencias prolongadas al disparo, frecuencias bajas de disparo, repolarización de espigas y de potenciales despolarizantes, estabilización del potencial de membrana.

* TTX=tetrodotoxina; Ni^{2+} = níquel; Cd^{2+} = cadmio; Zn^{2+} = zinc; 4-AP= 4-aminopiridina; TEA= tetraetilamonio; Ca^{2+} = calcio.

TABLA 4.

Tipo de Corriente	Tipo de Ión	Funciones
Rectificadores Entrantes	<p>$-I_{K(AR)}$ instantáneo. Corriente de K^+ que se vuelve entrante cuando la hiperpolarización sobrepasa al E_K. De rápida activación. Bloqueado por Ba^{2+}, TEA, Cs^+. La conductancia depende del voltaje y de la $[K^+]_o$.</p>	<p>Contribuyen al potencial de membrana de reposo, se oponen a la hiperpolarización membranar Integran las entradas sinápticas dendríticas, disminuyendo a ciertos rangos de voltaje la resistencia de entrada, produciendo cambios en la distancia electrotonica, marcapasos, postdescargas post-inhedorias.</p>
	<p>$-I_h$ (I_f, I_Q) Mezcla de corriente de Na^+ y de K^+ con un potencial de equilibrio de alrededor de +35 mV. Rectificador anómalo dependiente de "tiempo y de voltaje". Bloqueado por Cs^+ extracelular. La conductancia depende del voltaje, de la $[K^+]_o$ y de la $[Cl^-]_o$.</p>	

* Ba^{2+} = Bario; TEA= tetraetilamonio; Cs^+ = cesio. Referencias: Las cuatro tablas fueron tomadas y modificadas de Bargas, J. y cols., Neuronal Networks Of The Mammalian Brain Have Functionally Different Classes Of Neurons, 1993 y de Bargas y Galarraga, Ion Channels: Keys to Neuronal Specialization, 1995. //

Los rectificadores entrantes acarrearán alguna corriente saliente y aunque verdaderamente esta es su función fisiológica usual, raramente permiten que el potencial de membrana de una célula se haga más negativo que el potencial de equilibrio del potasio (E_K) (Hille, 1992).

Los rectificadores entrantes oponen una corriente entrante despolarizadora a la hiperpolarización que causa su propia activación, creando de esta manera un sistema de retroalimentación negativo que "corrige" una hiperpolarización extrema.

F. ELECTROFISIOLOGIA DE LAS NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS DE PROYECCION

F.1 Patrón de Disparo de las Neuronas Espinosas Medianas

De importancia central para el funcionamiento de todas las estructuras de los ganglios basales es la forma en la cual las neuronas neostriatales integran la actividad proveniente de sus aferencias, así como la naturaleza de la salida eferente neostriatal, tipificada como el patrón de disparo característico de estas neuronas.

Las neuronas espinosas medianas poseen un patrón de disparo muy característico en registros realizados *in vivo*. Inicialmente se determinó por registros de actividad unitaria, que las neuronas neostriatales poseen un índice muy bajo de disparo celular (Frigyesi y Purpura, 1967; Connor, 1968). Posteriormente registros extracelulares e intracelulares en animales no-anestesiados (Hull y cols., 1970; Wilson y Groves, 1981), en animales ligeramente anestesiados (Sedgwick y Williams, 1967; Calabresi y cols., 1990) y en animales alertas realizando una tarea (Anderson, 1977; DeLong, 1973), han confirmado que estas células se encuentran la mayor parte del tiempo eléctricamente silentes (Wilson., 1990). Las neuronas espinosas medianas de proyección se encuentran más bien a niveles hiperpolarizados a potenciales de reposo de alrededor de -80 mV (Wilson, 1992) y ocasionalmente disparan trenes de potenciales de acción que surgen de períodos lentos y sostenidos en forma de rampa de despolarización membranal (0.1-3 segundos), eventos que son acompañados por un aumento en el ruido sináptico. Separando estos períodos de despolarización, se han registrado episodios prolongados de hiperpolarización membranal y un gran

decremento en el ruido sináptico, ambos caracterizados como un largo periodo de silencio. En la Figura 8 se observa una muestra de este tipo de patrón de disparo y de los cambios subyacentes del potencial de membrana, (usualmente la proporción de descarga de estas neuronas durante un episodio de disparos, no es mayor a 40 por segundo y generalmente no disparan rítmicamente trenes de potenciales de acción en forma de ráfaga) (Wilson, 1990). Wilson y Kawaguchi, (1996) han denominado al estado de reposo como "down state" y al estado despolarizado ocasional como "up state".

La razón por la cual las neuronas neocorticales se encuentran silentes la mayor parte del tiempo es desconocida. El arreglo anatómico de las neuronas espinosas medianas y del propio neocórtex indica que cada neurona espinosa recibe miles de entradas sinápticas excitatorias y sin embargo, parecería como si las sinapsis que reciben no fueran suficientes para provocar que la célula dispare. Varios factores parecen estar determinando el patrón de disparo característico de estas neuronas, como son: el alto umbral de disparo que poseen, la acción de las entradas sinápticas inhibitorias, las propiedades membranales intrínsecas de estas neuronas, tal como la baja resistencia de entrada neuronal y la naturaleza electrotónica de sus dendritas (Wilson, 1990).

Sin embargo, a este respecto se sabe que a pesar del bajo nivel de actividad espontánea que poseen las neuronas neocorticales de proyección, éstas poseen un conjunto importante de conductancias entrantes lentas involucradas en la generación de potenciales de acción regenerativos (Calabresi y cols., 1987; Wilson, 1993).

En condiciones *in vitro*, también es una propiedad electrofisiológica característica de las neuronas neocorticales de proyección, la de desplegar un potencial despolarizante lento en respuesta a pulsos de corriente intracelulares subumbrales y despolarizantes (Bargas y cols., 1989; Kita et al., 1985a). Este potencial despolarizante lento puede tener una duración que va de cientos de milisegundos a segundos y está asociado a una latencia prolongada en la generación de la primera espiga, cuando es inyectado intracelularmente un pulso cuadrado de corriente despolarizante umbral (Bargas y cols., 1989). Es durante estos episodios de despolarización lenta cuando se puede inducir la interacción entre la actividad sináptica y las propiedades membranales de las neuronas. En condiciones de registro *in vitro* el potencial de membrana en reposo de las neuronas espinosas medianas de proyección es generalmente más negativo que *in vivo*, en promedio de -84 mV. Los

potenciales de acción tienen fase positiva de entre 5 y 20 mV (Kita y cols., 1985, 1985a; Bargas y cols., 1988). La resistencia de entrada de estas neuronas registradas *in vivo* es de 10-20 Mohms (Sugimori y cols., 1978) y en condiciones *in vitro* en rebanadas es de 58 ± 4 Mohms, con una variabilidad de 20 - 97 Mohms determinados a -70 mV (Bargas y cols., 1988).

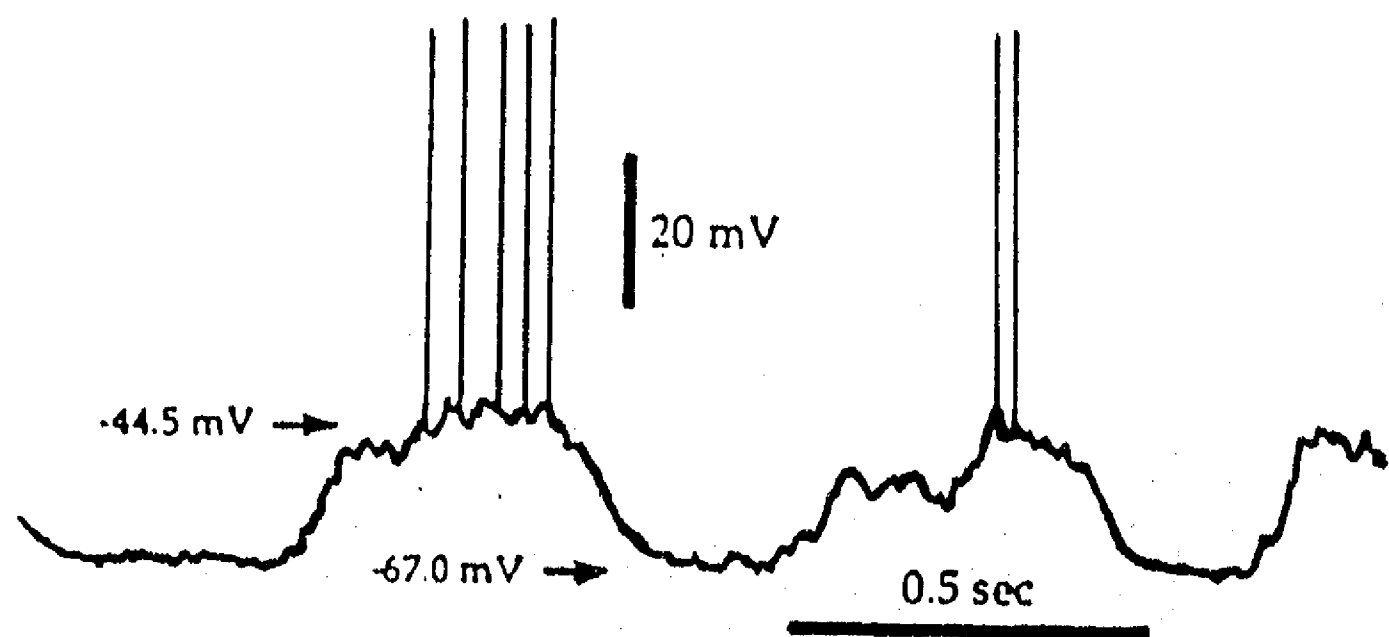


FIGURA 8. Registro intracelular *IN VIVO* que muestra las fluctuaciones del potencial de membrana de una neurona espinosa mediana neocortical y el patrón de disparo espontáneo causado por tales fluctuaciones en un animal anestesiado con uretano. Episodios de despolarización lenta surgen de una hiperpolarización basal. Los potenciales de acción surgen de las fluctuaciones del potencial de membrana, sobreponiéndose a los episodios de despolarización. Las transiciones entre los estados de despolarización y de hiperpolarización son abruptas y ocurren a intervalos regulares. (modificado de Wilson, C.J. 1992).

F.2 Conductancias Iónicas Participantes en el Disparo de las Neuronas Espinosas Medianas

Recientemente, estudios de fijación de corriente y de fijación de voltaje han puesto en evidencia la participación de diversos tipos de conductancias iónicas dependientes de voltaje, en la respuesta subumbral de estas neuronas neocorticales (Bargas y cols., 1988, 1989, 1991b, 1994; Galarraga y cols., 1989; Jiang y North, 1991; Kita y cols., 1985a; Nisenbaum y cols., 1994; Ogata

y Tatebayashi, 1990; Pineda y cols., 1992; Surmeier y cols., 1988,1991). Sin embargo, el papel de estas conductancias en las despolarizaciones lentas que anteceden al disparo neuronal y durante el disparo neuronal, ha sido inferido únicamente de las respuestas de estas células a los pulsos de corriente, más no durante despolarizaciones lentas que mimeticen su activación fisiológica.

Por ejemplo, estudios en los cuales se ha utilizado como protocolo de experimentación pulsos cuadrados de corriente, han indicado que parecen estar involucradas no sólo corrientes entrantes lentas sino también corrientes salientes, en la gran latencia que precede al disparo de las neuronas neocorticales. Así, una conductancia de sodio lenta, resistente al Co^{++} y sensible al TTX parece ser un componente entrante importante durante la fase despolarizante lenta de subida. Este componente entrante es el que llevaría a la neurona hacia el umbral de disparo (Bargas y cols., 1989; Galarraga y cols., 1989). Se sabe adicionalmente que corrientes de K^+ salientes activadas por despolarización, contribuyen de manera importante en el potencial de rampa y en la latencia prolongada al disparo. Se ha dicho que estas corrientes, estarían compitiendo con las corrientes de Na^+ y de Ca^{2+} , provocando una depolarización lenta, aumentando consecuentemente el tiempo requerido para alcanzar el umbral al disparo (Nisenbaum, 1994).

Las neuronas neocorticales, poseen al menos tres tipos de corrientes de K^+ activadas por despolarización, incluyendo dos tipos de corrientes transitorias tipo A y una corriente no-inactivante (Surmeier y cols., 1988, 1991). Las dos corrientes tipo-A: 1) la corriente-A de inactivación rápida (I_{AF}) y 2) la corriente-A de inactivación lenta (I_{AS}), pueden distinguirse una de otra de acuerdo a su dependencia en el voltaje de activación, a su cinética de inactivación y a su sensibilidad para ser bloqueadas por toxinas específicas. Previo a la identificación de estas corrientes en las neuronas espinosas medianas, evidencias experimentales habían mostrado que en la despolarización lenta y la latencia prolongada de estas neuronas, estaba involucrada una corriente sensible a la 4-AP, resistente al tetraetilamonio (TEA) (Bargas y cols., 1989) y que la activación de la rampa de despolarización se hacía más aparente a potenciales de membrana despolarizantes arriba de -65 mV, el cual correspondería al umbral de activación aparente para la I_{AS} (Bargas y cols., 1989; Kawaguchi y cols., 1989). Así, de las tres corrientes de K^+ activadas por despolarización que poseen las neuronas neocorticales, la corriente I_{AS} parecería ser la que está involucrada en la despolarización lenta y en la gran latencia al disparo que presentan estas neuronas, ya que esta corriente está

disponible a potenciales subumbrales (-65mV), se inactiva muy lentamente (cientos de milisegundos a segundos) y es bloqueado selectivamente por bajas concentraciones de 4-AP (Bargas y cols., 1989; Nisenbaum, 1994). En algunas neuronas de otras regiones del SNC, como las del cuerpo geniculado lateral dorsal (McCormick, 1991), las neuronas gigantes de la región CA1 del hipocampo (Storm, 1988) y las de la corteza prefrontal (Hammond and Crepel, 1992), también se ha observado que la aplicación de bajas concentraciones de 4-AP, que se sabe bloquea selectivamente la I_{AS} , reduce significativamente la pendiente del potencial de rampa y la latencia al primer disparo neuronal (Nisenbaum y cols., 1994). A nivel supraumbral, se ha determinado que el postpotencial hiperpolarizante (PPH) juega un papel muy importante en el disparo repetitivo de las neuronas neostriatales y que en estas neuronas el PPH es debido a la participación de dos conductancias de K^+ activadas por Ca^{2+} (Galarraga y cols., 1989; Pineda y cols., 1995; Hernández-López, 1996a).

Diversas conductancias iónicas parecen estar involucradas en las características de despolarización subumbral y de disparo de las neuronas espinosas medianas de proyección, como lo muestran los estudios realizados con pulsos de corriente mencionados anteriormente. Sin embargo, el estudio del comportamiento de las neuronas espinosas de proyección ante la inyección intracelular de corriente que mimetizara la activación fisiológica de estas neuronas (en forma de rampa) y el uso de bloqueadores específicos de canales, permitiría un análisis más fisiológico de las conductancias iónicas que están participando a nivel subumbral y umbral, en las características de disparo de estas neuronas; así como del mecanismo a través del cuál neurotransmisores específicos como la dopamina modulan dichas características. Hasta la fecha no existe ningún estudio, en el cuál ambos aspectos sean estudiados a través de un protocolo con dichas características.

F.3 Relación Corriente-Voltaje

Una herramienta que permite una mejor comprensión de los mecanismos que involucran corrientes iónicas particulares, en la generación y modulación de los patrones de disparo característicos de las neuronas, es la elaboración y análisis de las curvas corriente-voltaje (I-V) subumbrales, obtenidas de datos experimentales (Benson y Adams, 1987). Así, la forma y la pendiente de la curva I-V, reflejan la suma de todas las conductancias que están activas a voltajes particulares, en una neurona determinada (Benson y Adams, 1987) y nos proporcionan información

acerca de la resistencia de entrada neuronal (R_N) así como de la cantidad de rectificación presente en las neuronas estudiadas. Por ejemplo, en la Figura 9 que representa la curva I-V de la neurona R15 del molusco opistobranquio *Aplysia*, se puede observar a potenciales más negativos de -85mV una curva linear. Mientras que a potenciales más positivos la pendiente se hace menos pronunciada, lo que se conoce como rectificación anómala. En la curva I-V de esta neurona, la trayectoria de voltaje entre el umbral del potencial de acción y los voltajes más negativos, puede ser reconstruido por la suma de cuatro conductancias diferentes: 1) la conductancia de potasio rectificadora retardada, con un potencial de reversión cercano a los -75 mV y una activación a potenciales positivos a -70mV; 2) la conductancia de potasio $I_{K(R)}$ que se activa a potenciales más negativos de -80mV que es rectificadora anómala y que despliega una gran habilidad de conducir una gran corriente entrante pero solo una pequeña corriente saliente de potasio 3) la conductancia descrita como corriente I_{NSR} , que se activa entre los -80 y -60 mV y que representa también una fuente de rectificación anómala en estas neuronas y 4) la conductancia "leak" voltaje-independiente (Benson y Adams, 1987).

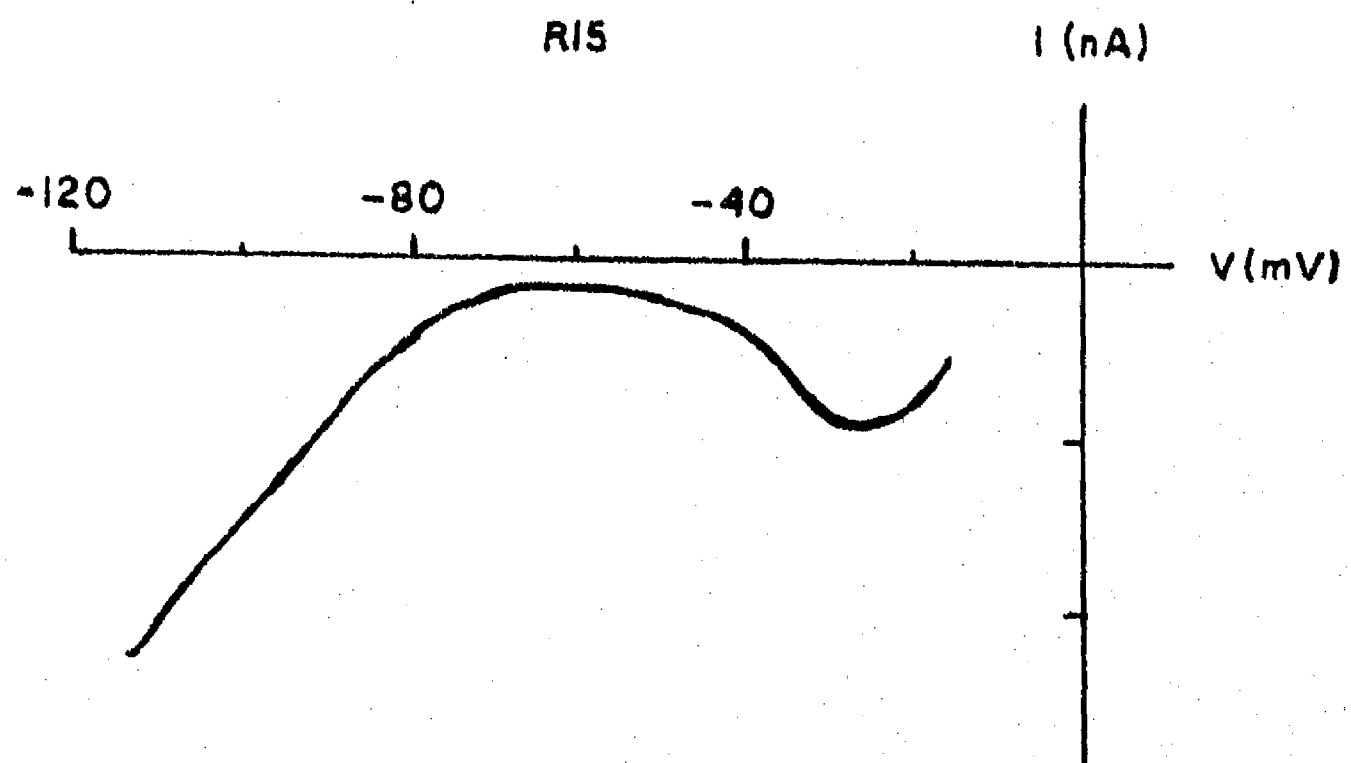


FIGURA 9. Curva Corriente-Voltaje (I-V) para la neurona R-15 del molusco opistobranquio *Aplysia*. El potencial de membrana fué barrido lentamente en un rango de voltajes (abscisa); la corriente que fluye por la membrana celular es graficada en las ordenadas como una función del potencial de membrana. Nótese la aproximación de la curva I-V a una corriente cero entre -70 y -50 mV y la región con resistencia negativa entre -50 y -30 mV (modificado de Benson y Adams, 1987).

G. ACCIONES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LA DOPAMINA EN EL NEOESTRIADO

Los estudios abocados a determinar el papel que ejerce la vía dopaminérgica nigroestriatal y en específico la dopamina sobre las neuronas neoestriatales, han sido conducidos en diferentes direcciones. Inicialmente, se trató de dilucidar el papel de la aferencias nigroestriatales a través de las respuestas de las neuronas espinosas a la estimulación directa de dichas aferentes. Sin embargo, las respuestas obtenidas resultaron ser muy difíciles de caracterizar, debido a dos factores: uno a que las fibras nigroestriatales son notoriamente resistentes a la estimulación eléctrica y otra a que estas fibras se encuentran muy cerca de otros sistemas de fibras (i.e. como las fibras eferentes corticales en el pedúnculo cerebral y en la cápsula interna) por lo que es posible producir grandes respuestas excitatorias en el neoestriado. Por lo tanto, los estudios en los que se ha utilizado la estimulación simple de la vía nigroestriatal, han arrojado resultados mezclados que son difíciles de interpretar tanto en registros extracelulares como intracelulares (Wilson, 1990).

Paralelamente a estos esfuerzos de entender la función de la vía nigroestriatal, otros investigadores han realizado experimentos electrofisiológicos *in vivo* e *in vitro*, en los cuales la dopamina y sus agonistas y antagonistas son aplicados directamente ó por iontoforesis a las neuronas neoestriatales. En la mayoría de estos experimentos, el efecto de la dopamina y sus agonistas D₁ y D₂ ha sido inferido de los cambios observados en el cambio de la frecuencia de disparo. Sin embargo, los resultados observados tanto en registros extracelulares como intracelulares han sido hasta la fecha, múltiples y aparentemente contradictorios.

Utilizando como estímulo pulsos rectangulares de corriente en registros intracelulares, tres tipos de respuestas han sido observadas con la dopamina y sus agonistas D₁ y D₂ en las neuronas espinosas medianas de proyección: 1) despolarización membranal y un aumento en el disparo celular, en una población de estas neuronas (Akaike y cols., 1987); 2) inhibición del disparo neuronal y de la amplitud de los potenciales postsinápticos despolarizantes evocados intraestriatalmente, sin cambios en el potencial de membrana, en otro grupo de células (Akaike y cols., 1987; Calabresi y cols., 1987; Calabresi y cols., 1988a; Calabresi y cols., 1988b) y 3) efectos bifásicos, es decir, despolarización e hiperpolarización membranal, en un tercer grupo de estas neuronas (Akaike y cols., 1987; Herrling y Hull, 1980; Uchimura y cols., 1986). Se ha observado también, que agonistas

dopaminérgicos tipo D_1 , como el SKF 38393 y análogos del AMP cíclico como el 8-Br-cAMP, pueden mimetizar la inhibición del disparo neuronal, mientras que el agonista del receptor D_2 no tuvo ningún efecto (Calabresi y cols., 1987).

Utilizando también como estímulo, pulsos rectangulares de corriente en estudios de fijación de corriente, se ha observado que la dopamina puede inducir inhibición de los potenciales de acción evocados (Calabresi y cols., 1987; Akaike y cols., 1987) acompañada de un aumento del PPH que sigue a un potencial de acción (PA) (Hernández-López y cols., 1996a) ó bien una inhibición del PPH que sigue a un tren de PAs, el cual se acompaña de un aumento en el número de espigas (Akaike y cols., 1987; Rutherford y cols., 1988).

En estudios de fijación de voltaje con pulsos rectangulares de voltaje como estímulo, también se han observado efectos múltiples de la dopamina en estas neuronas, por ejemplo, la dopamina puede actuar aumentando o disminuyendo la misma corriente saliente, dependiendo del tipo de receptor activado, así como modular corrientes de Na^+ (Surmeier y Kitai, 1993). Agonistas específicos del receptor dopaminérgico D_1 , parecen estar modulando las conductancias de calcio activadas por altos voltajes (HVA) en las neuronas espinosas medianas, a través de la estimulación de la adenilato cinasa y la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPcíclico (AMPc) (Surmeier y cols., 1995).

En la mayoría de las células neostriatales espinosas medianas estudiadas, la aplicación de los agonistas al receptor D_1 redujeron reversiblemente las corrientes de Ca^{2+} tipos N y P (Surmeier y cols., 1995); mientras que la aplicación de estos mismos agonistas tipo D_1 indujo un aumento de la corriente de Ca^{2+} tipo L, sólo en un porcentaje de neuronas neostriatales. La modulación producida por los agonistas D_1 fué mimetizada por la aplicación de segundos mensajeros solubles y bloqueada por inhibidores de cinasas y fosfatasas. Por lo que los agonistas a los receptores dopaminérgicos tipo D_1 parecen estar modulando diferencialmente las corrientes tipo N-, P- y L- en las neuronas neostriatales adultas, a través de la activación de la cascada de señalamiento AMPc-PKA (Surmeier y cols., 1995). Aunque en contraste con las corrientes tipo L-, las reducciones en las corrientes N- y P- no parecen estar mediadas directamente por la PKA, sino por un aumento en la actividad de la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Surmeier y cols., 1995).

Se sabe por otro lado, que el potencial de acción de las neuronas neostriatales tiene un

componente en el que están involucrados los iones calcio (Bargas y cols., 1994; Galarraga y cols., 1989).

Recientemente, se demostró que los agonistas al receptor dopaminérgico tipo D_1 , aumentan el PPH y que esta acción esta mediada probablemente por un aumento en el influjo de iones Ca^{2+} a través de los canales tipo L, dado que esta acción es ocluída en presencia del Bay K 8644 (un agonista del canal tipo L). Se ha observado también que esta acción podría ser mediada a través de la proteína cinasa A (dependiente del AMPcíclico), en vista de que la acción dopaminérgica es mimetizada por análogos del AMPc (Hernández-López y cols., 1996a).

En la acción de los neurotransmisores, cuatro vías de señalamiento que involucran a diferentes segundos mensajeros han sido las mejor estudiadas hasta la fecha. En los sistemas neurales, la activación de cualquiera de estas vías de señalamiento ocurre generalmente a través de la unión de un neurotransmisor (ó primer mensajero) con un receptor específico acoplado a una proteína G, desencadenando la activación ó la inhibición de un segundo mensajero (véanse Figuras 10 y 11). En los sistemas neurales y no neurales, los segundos mensajeros más comunes que podemos mencionar son el AMPc, el GMPc, el diacilglicerol y el inositol trifosfato (IP3). La activación de los segundos mensajeros puede a su vez desencadenar la producción de terceros mensajeros. Las vías de señalamiento individuales que involucran segundos y terceros mensajeros, pueden ser activadas en paralelo dentro de la misma célula, pudiendo interactuar entre ellas (Hille, 1992, 1995).

La vía de señalamiento que involucra a la cascada del AMPc puede ser estimulada por una variedad de neurotransmisores ó neuromoduladores como son: la acetilcolina, la adenosina, la dopamina, la histamina, la noradrenalina ó los opiáceos. La producción del segundo mensajero AMPc se lleva a cabo a partir del ATP (adenosin trifosfato) y es catalizada por una gran proteína integrada a la membrana, conocida como la adenilato ciclasa (Hille, 1992). Como resultado de la producción y del aumento del AMPc intracelular se activa la proteína cinasa A (PKA) dependiente del AMPc, catalizando la transferencia de grupos fosfatos a residuos de serina ó treonina, fosforilando proteínas (véase Figura 11). La PKA es un tetrámero complejo, que consiste de dos subunidades reguladoras (R) y de dos subunidades catalíticas (C). La unión del AMPc al tetrámero PKA (véase Figura 11), causa que las dos subunidades catalíticas de la holoenzima se liberen, pasando de esta forma

al estado activo (véase Figura 11). Entre los substratos de la PKA, se pueden incluir a los canales iónicos ligando- y voltaje- dependientes (véase Figura 11) (Zimmermann, 1993).

Diferentes factores parecen estar involucrados en los efectos múltiples y aparentemente contradictorios observados hasta hoy, con la dopamina y sus agonistas D_1 y D_2 en estas neuronas. Por un lado, estudios recientes de hibridización *in situ* y Northern blot han sugerido, que en el neostriado se encuentran expresados los seis tipos de receptores dopaminérgicos identificados hasta el momento, siendo los subtipos D_1 y D_2 las formas predominantes en el estriado dorsal (Surmeier y Kitai, 1993). Este hecho confiere una dificultad mayor al esfuerzo de entender el papel de la dopamina en este núcleo, sobre todo considerando la heterogeneidad anatómica y bioquímica (Gerfen y cols., 1990, 1992) antes mencionadas, de las neuronas espinosas medianas.

Por lo que en un intento de explicar las diferencias en las respuestas observadas, ciertas hipótesis han sido consideradas. Una de ellas es la de la segregación de los receptores, postulada por Gerfen a principios de los 90's. En esta hipótesis, Gerfen propone que los subtipos de receptores D_1 y D_2 se encuentran localizados en dos diferentes tipos de neuronas espinosas medianas; dos tipos de evidencias apoyan esta hipótesis. Primero, Gerfen y cols., (1990,1992), mostraron que en el neostriado de ratas lesionadas de la SNc con 6-hidroxidopamina ó tratadas con haloperidol, los agonistas al receptor D_2 podían alterar selectivamente los niveles del RNA mensajero (RNA_m) que codifica para la encefalina en las neuronas estriatopalidales, mientras que los agonistas al receptor D_1 , alteraban selectivamente los niveles de la sustancia P de las neuronas estriatonigrales; segundo, Gerfen y cols., (1990a, 1992d) reportaron que los RNA_m que codifican para los los receptores D_1 y D_2 son localizados únicamente en las neuronas estriatonigrales ó estriatopalidales respectivamente. Otra tercera alternativa, sería que la variabilidad en los efectos observados pudieran deberse a la presencia de diferentes receptores co-localizados en la misma clase de neurona espinosa, registrada bajo condiciones experimentales muy diferentes (Surmeier y cols., 1993). Una cuarta alternativa sería, la falta de control del potencial de membrana en los estudios de fijación de corriente reportados hasta el momento, ya que muchos de los efectos de la modulación dopaminérgica en estas neuronas, parecen depender del rango del potencial de membrana en el cuál la neurona está operando (Surmeier y Kitai, 1993; DiChiara y cols., 1994). Así, a un potencial de membrana dado, la respuesta global de la neurona a la dopamina puede parecer reproducible y consistente, mientras que a otro potencial,

esta respuesta global puede cambiar.

La separación de estas tres alternativas parece ser una tarea difícil, sin embargo ciertas maniobras experimentales a nivel anatómico, farmacológico y electrofisiológico, aplicadas todas juntas en un solo experimento, podrían arrojar cierta luz acerca de las causas en la variabilidad de las respuestas observadas con la dopamina. Una de esas maniobras podría ser el analizar las acciones que ejerce la DA y sus agonistas D_1 y D_2 en las células neostriatales registradas e identificadas morfológicamente, cuando se aplica un estímulo que mimetice su activación fisiológica como lo es la inyección intracelular de rampas de corriente. Con este estímulo es posible además monitorear dichas acciones a diferentes potenciales de membrana, en un solo trazo. Las acciones ejercidas por los agonistas específicos D_1 y D_2 en estas células, nos permitirá determinar también si los receptores se encuentran segregados ó co-localizados en las neuronas registradas.

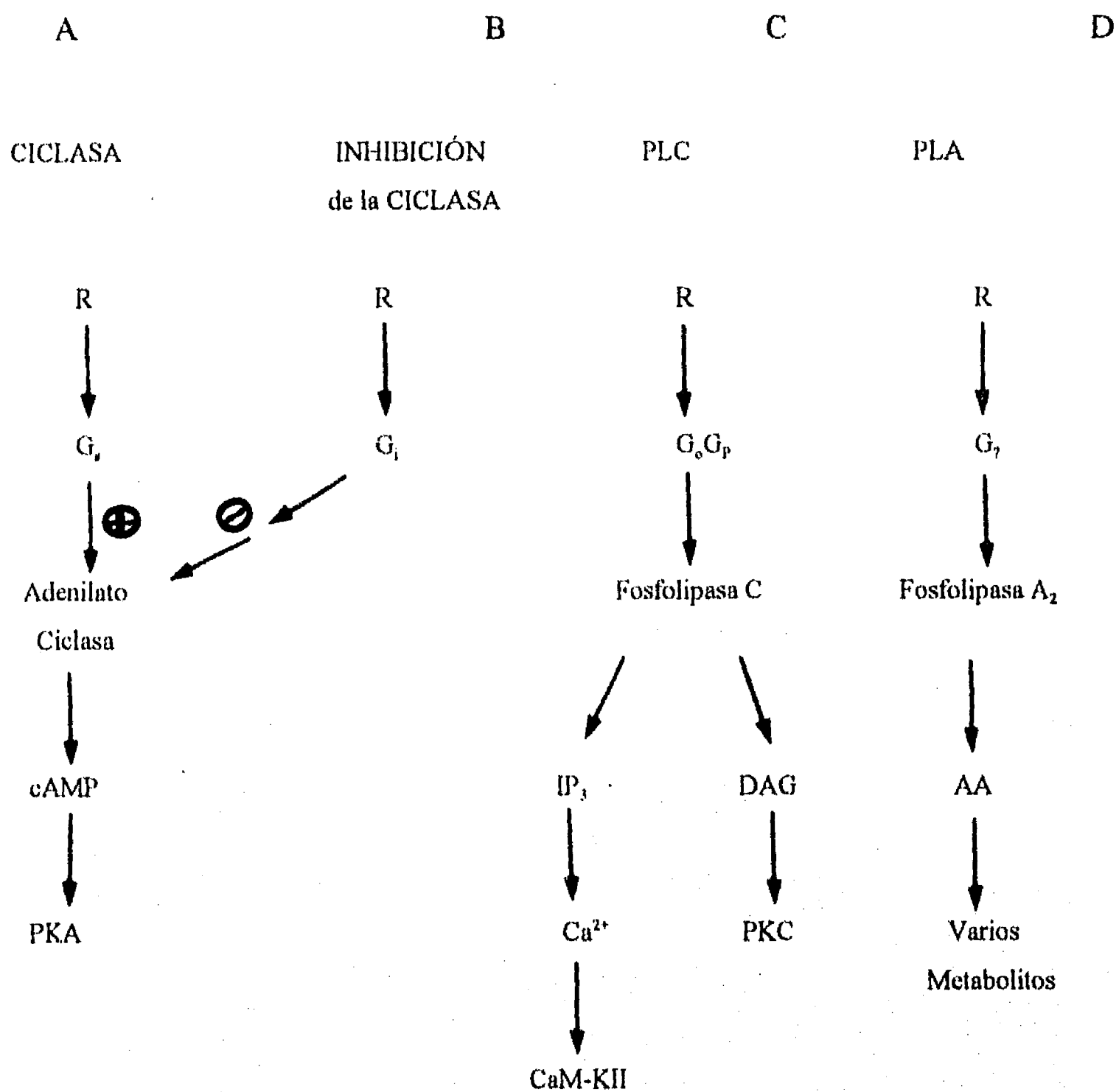


FIGURA 10. CUATRO VÍAS DE SEÑALAMIENTO ACOPLADAS A LA PROTEÍNA G. En la acción de los Neurotransmisores, estas son las vías de segundos mensajeros mejor estudiadas. Cada una de ellas inicia con un tipo específico de receptor (R), el cual puede activar un tipo de proteína G (G_s , G_i , G_o , G_p , G_q , G_{12}). PLC=fosfolipasa C; PLA_2 =fosfolipasa A; AMPc=adenosina 3'5'-monofosfato; PKA=proteína cinasa A; PKC=proteína cinasa C; IP_3 =trifosfato de inositol-1,4,5; DAG=diacilglicerol; AA=ácido araquidónico; Ca^{2+} =calcio; CaM-KII=calcio calmodulina dependiente de proteína cinasa tipo II (modificado de Hille, 1992).

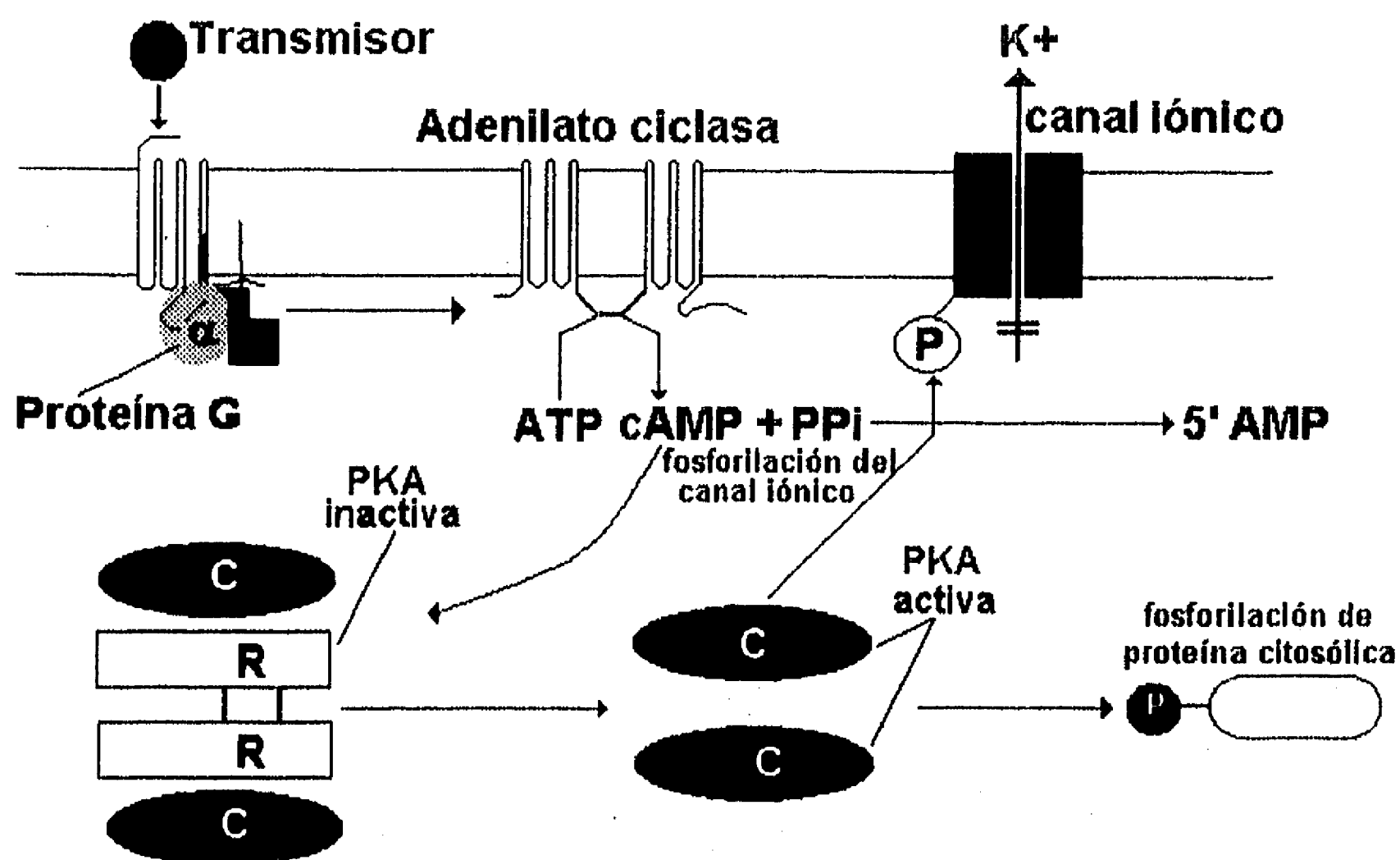


FIGURA 11. Activación de la proteína cinasa dependiente del AMPcíclico (PKA), vía un receptor acoplado a una proteína G. Esta activación puede tener a corto plazo implicaciones funcionales, tales como la fosforilación de una variedad de proteínas citoplasmáticas, fosforilación de canales iónicos, lo cual causa un cambio en la permeabilidad membranar (e.g., reducción en el flujo de iones K^+). (ver detalles en el texto) (modificado de Zimmermann, 1993).

OBJETIVOS

Basándonos en los antecedentes antes mencionados, los objetivos del presente trabajo son:

1. Determinar la respuesta subumbral de las neuronas neostriatales en condiciones de fijación de corriente, utilizando un estímulo que mimetice la activación fisiológica de estas neuronas, como lo es la inyección intracelular de rampas de corriente (IIRC).
2. Analizar en condiciones de fijación de corriente y ante la IIRC, las corrientes iónicas que determinan la respuesta subumbral de estas neuronas, utilizando bloqueadores específicos.
3. Determinar las acciones globales de la dopamina a nivel subumbral, utilizando como estímulo la IIRC, en condiciones de fijación de corriente.
4. Determinar si las acciones de los agonistas dopaminérgicos específicos a los receptores D_1 y D_2 pueden diferenciarse uno de otro, en diferentes neuronas espinosas medianas, bajo las mismas condiciones de fijación de corriente y ante la IIRC.
5. Realizar el análisis morfológico de las neuronas estudiadas a través de la inyección intracelular de biocitina.
6. Correlacionar los hallazgos farmacológicos, electrofisiológicos y morfológicos.

HIPOTESIS

La dopamina y sus agonistas a los receptores D_1 y D_2 inducen acciones electrofisiológicas globales en todas las neuronas espinosas medianas, modulando conductancias iónicas subumbrales independientemente de la morfología celular y de la localización de los receptores.

MATERIALES y METODOS

RESULTADOS

ESTUDIO 1.

SUBTHRESHOLD RECTIFICATION IN NEOSTRIATAL SPINY PROJECTION NEURONS
Exp. Brain Res. (1994) 100: 239-249.

ESTUDIO 2.

**INHIBITORY ACTION OF DOPAMINE INVOLVES A Cs⁺-SENSITIVE SUBTHRESHOLD
CONDUCTANCE IN NEOSTRIATAL NEURONS** Exp. Brain Res (1996)

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 Llinás 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- μ m-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 .

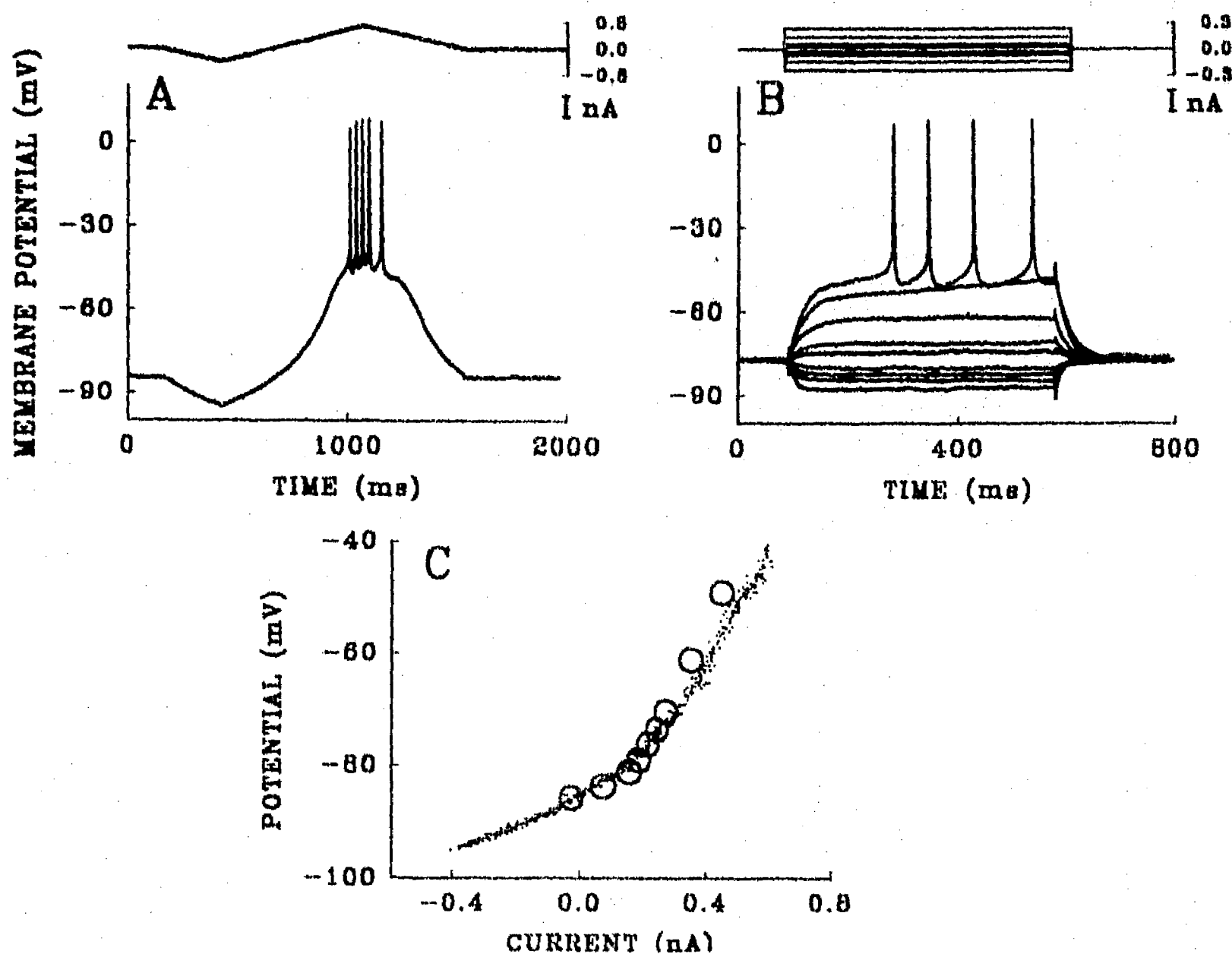
Stimulation consisted of either intracellular injections of current steps or of current ramps. At most times, hyperpolarizing

ramps preceded depolarizing ones. Thus, a continuous depolarization was achieved from a hyperpolarized to a depolarized membrane potential (from –100, –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_N) was obtained from I-V plots as slope- R_N (Jack et al. 1975). In order to restrict variability (see Discussion), R_N reported in this study was measured at around –70 mV [$R_N(-70 \text{ mV})$]. To do this, a polynomial of the form:

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

was first fit to the I-V plot. Where: $V_m(i)$ is the membrane potential response as a function of intracellularly injected current i . A_1 – 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_N 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. $R_N(-70 \text{ mV}) = 39 \text{ M}\Omega$



holding potential. Then, R_N was evaluated as the derivative of this I-V function at -70 mV for all cells, slope- $R_N(-70$ mV Jack et al. 1975). As I-V plots exhibit slope changes, then R_N is seen as dependent on membrane potential. Fits stopped when $r > 0.99$. Positivity of some higher order coefficients (A_1-A_n) 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_N 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. $R_N(-70\text{mV}) = 42 \text{ M}\Omega$

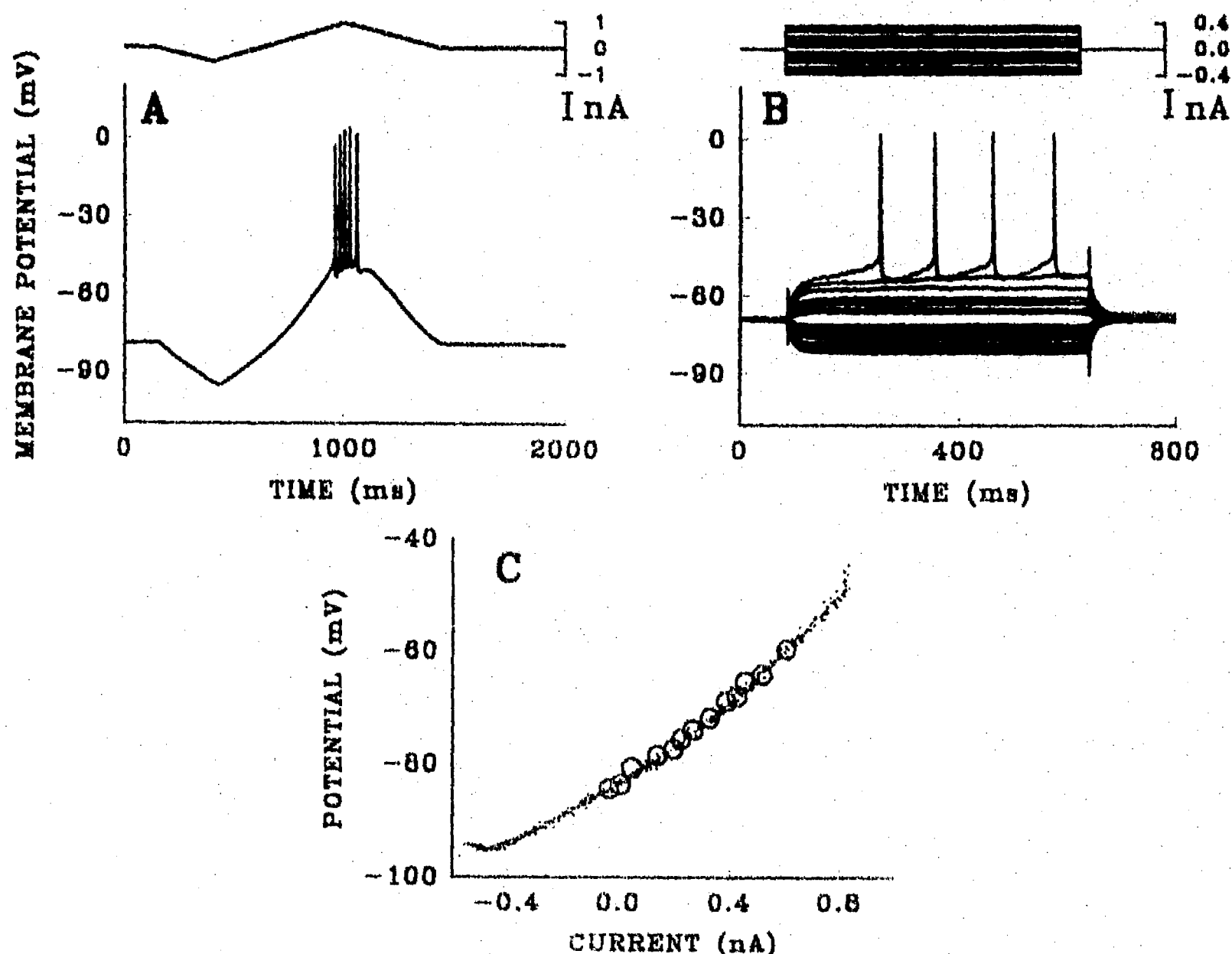


Fig. 3A-D Analysis of the subthreshold response.
A Subthreshold response;
B threshold response.
 Horizontal line in **A** and **B** corresponds to $V_m = 0$ mV.
C Subthreshold ascending and descending I-V plot. Hysteresis is only present in the depolarizing range.
D Threshold I-V plot

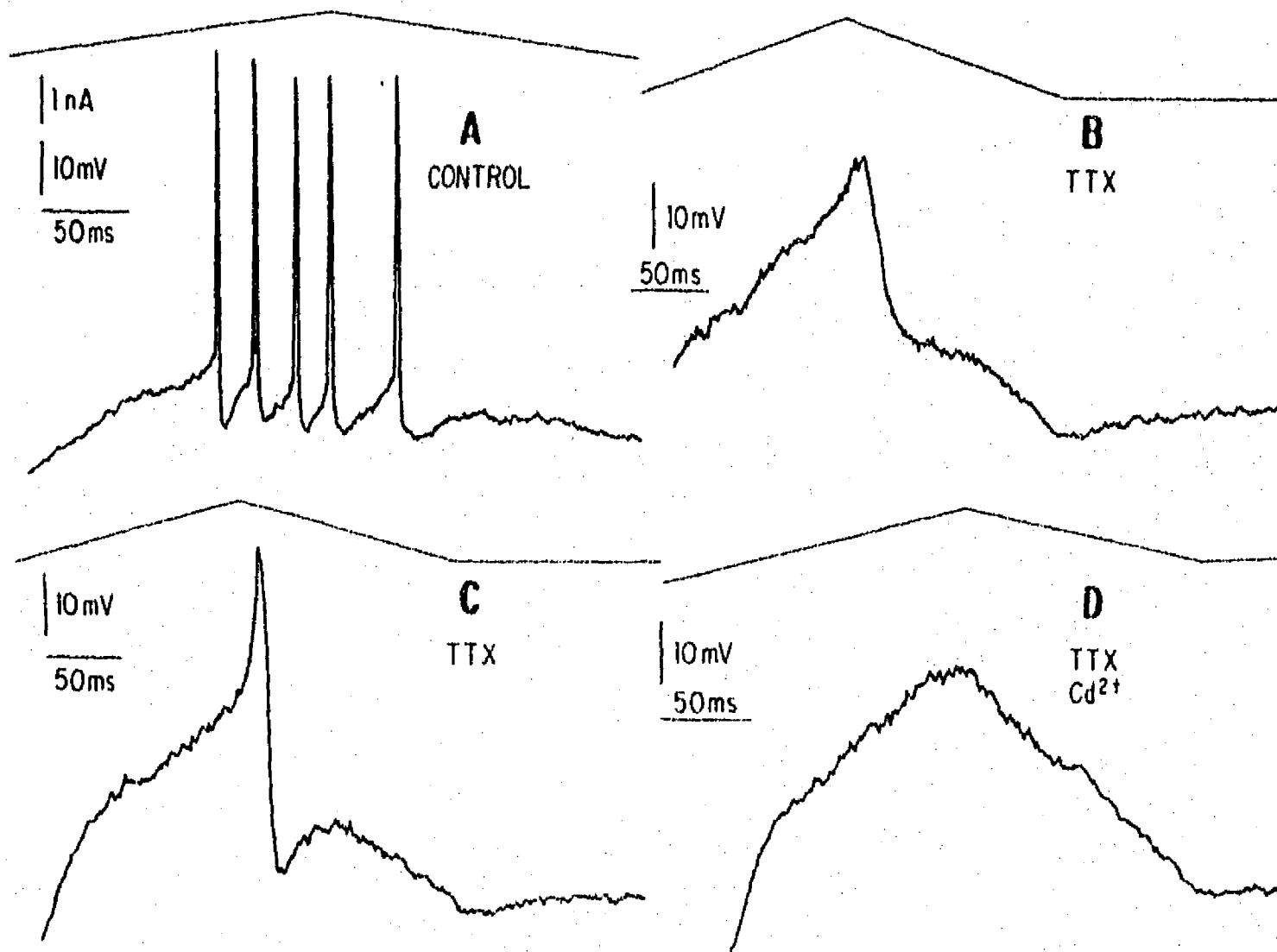
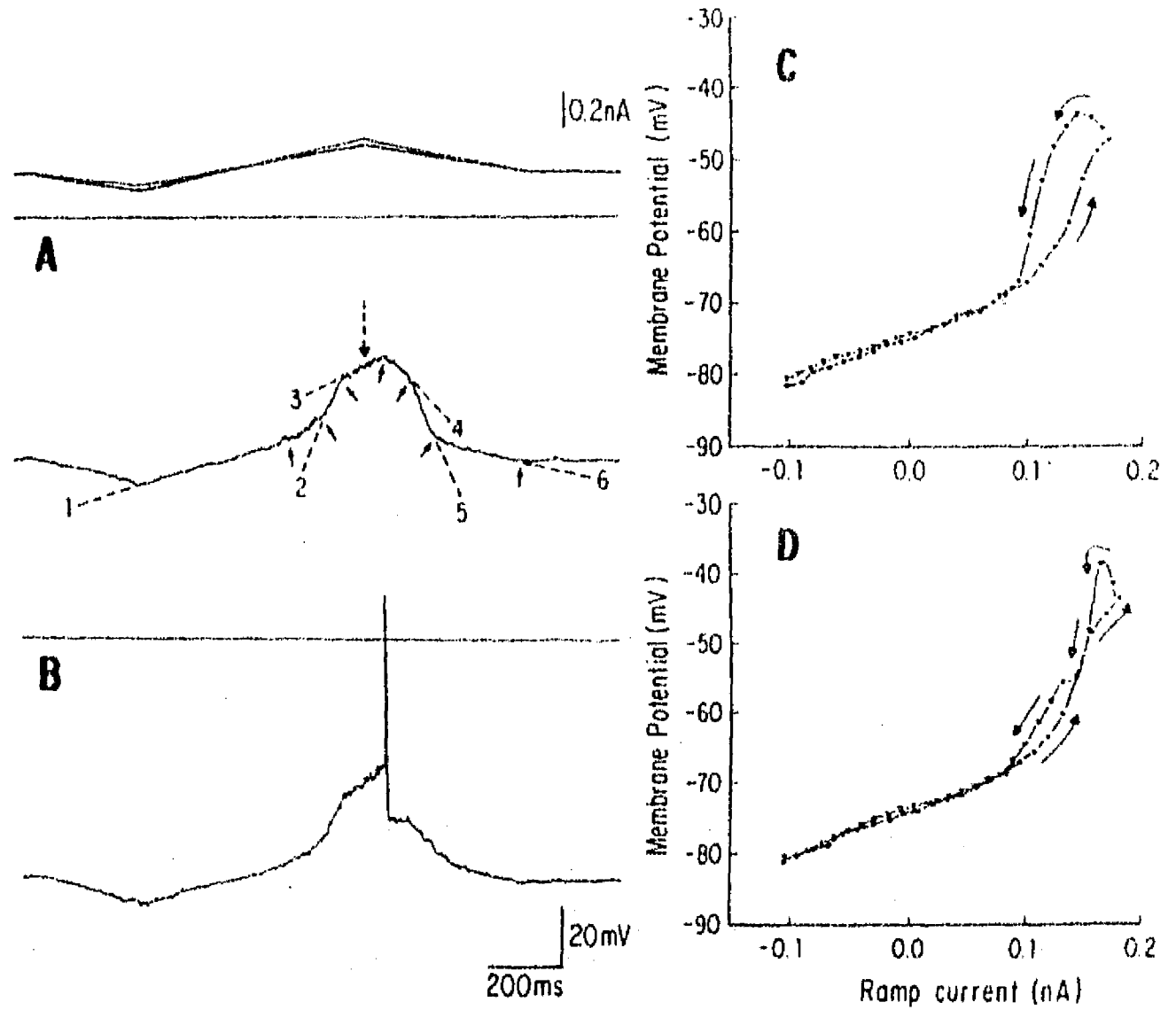
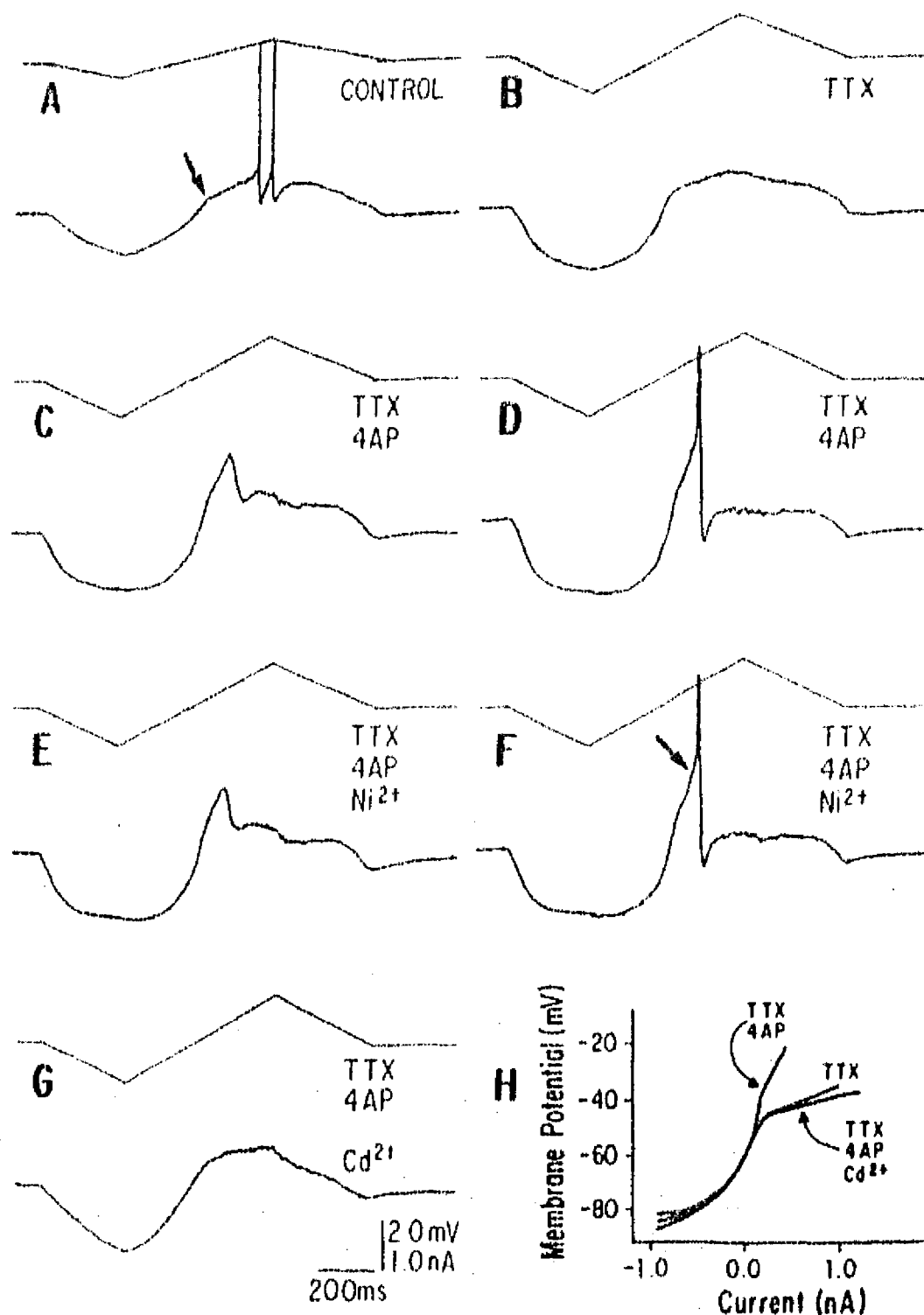


Fig. 4A-D Tetrodotoxin (*TTX*) effects on the ramp response. **A** A train of action potentials is evoked by a suprathreshold ramp current. **B** *TTX* ($1 \mu\text{M}$) blocked the firing of action potentials even if a stronger stimulus was given. However, during a strong suprathreshold stimulation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

during the descending response. **C, D** In a few neurons, a *TTX*-resistant ($1 \mu\text{M}$ *TTX*) (**C**) and Cd^{2+} -sensitive ($50 \mu\text{M}$ 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-Aminopyridine-(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:

$R_N(-70 \text{ mV}; \text{ mean } \pm \text{ SEM})$ 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-

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.

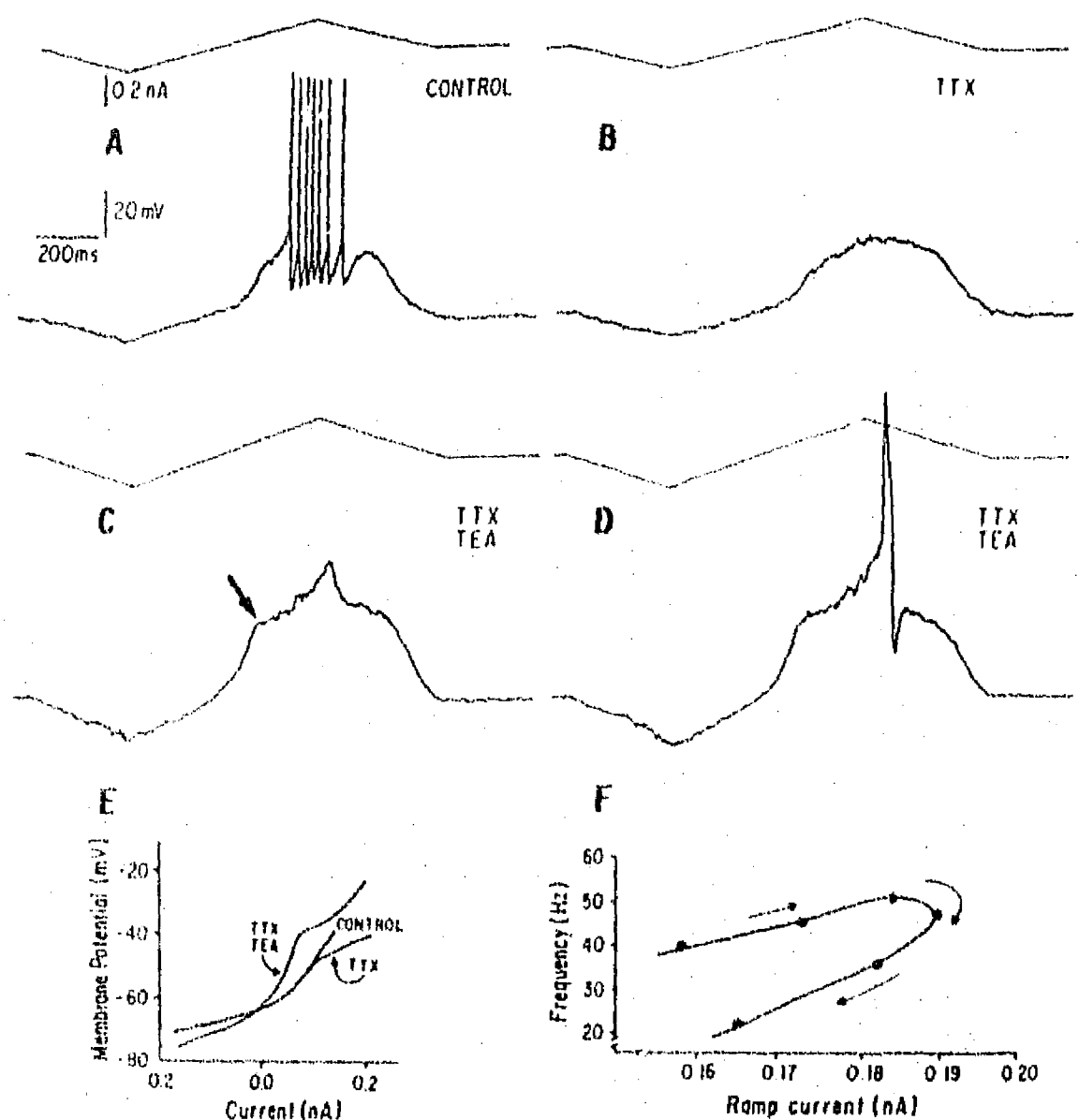
On the other hand, note that the last voltage trajectory during the ascending ramp response (number 3 in Fig. 3A) exhibits a smaller slope than the previous trajectory (number 2). This suggests coactivation and predominance of outward currents during this stage. In-

ward rectification predominates during most of the subthreshold depolarization, but apparent slope- R_N 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



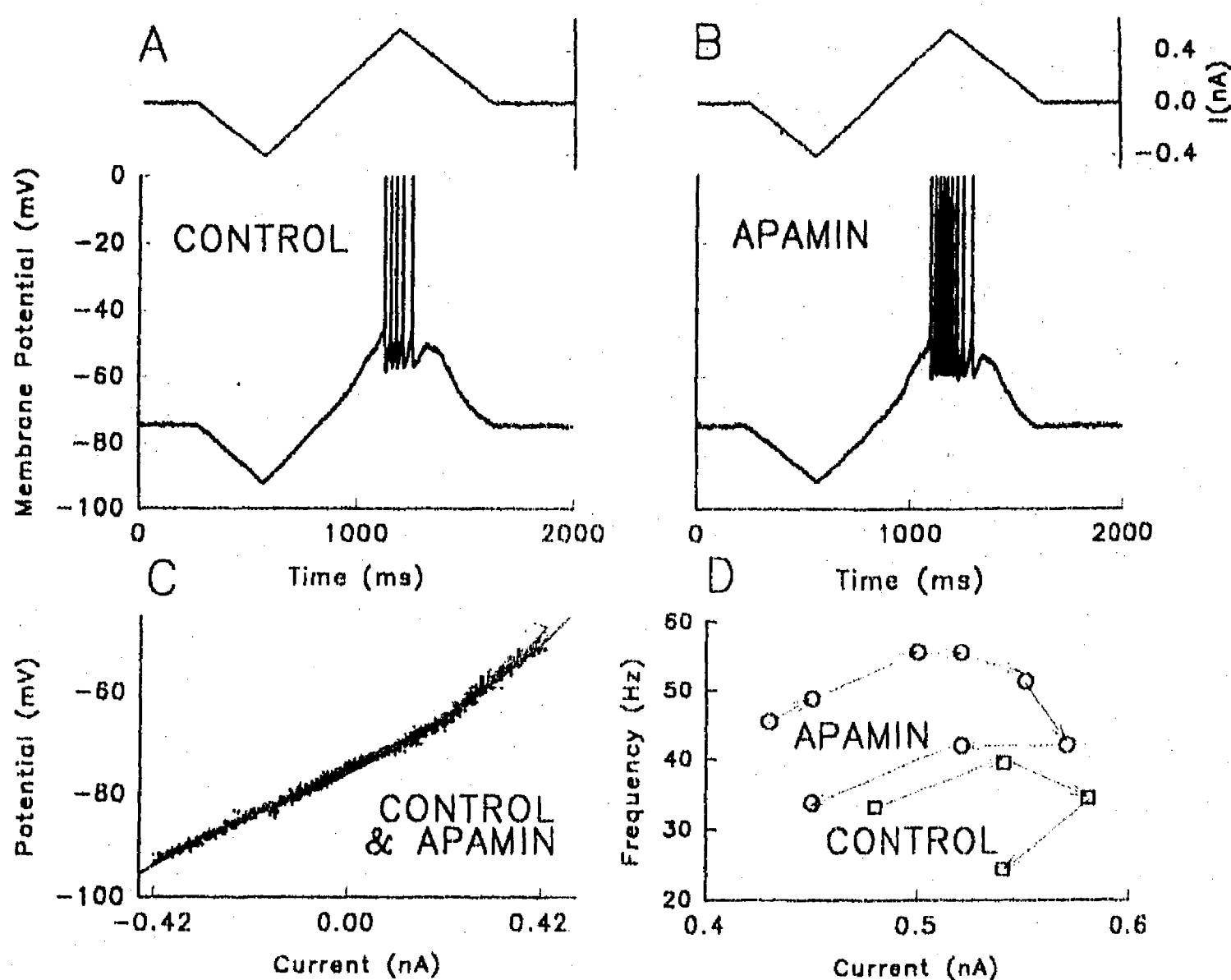
these conditions. This is more positive than the threshold for Ca^{2+} currents in voltage-clamp conditions (Bargas et al. 1994). The repolarization during the descending ramp was also sensitive to Cd^{2+} (Fig. 4D). As a previous report has shown that a part of the afterpotential is Ca^{2+} -activated (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.

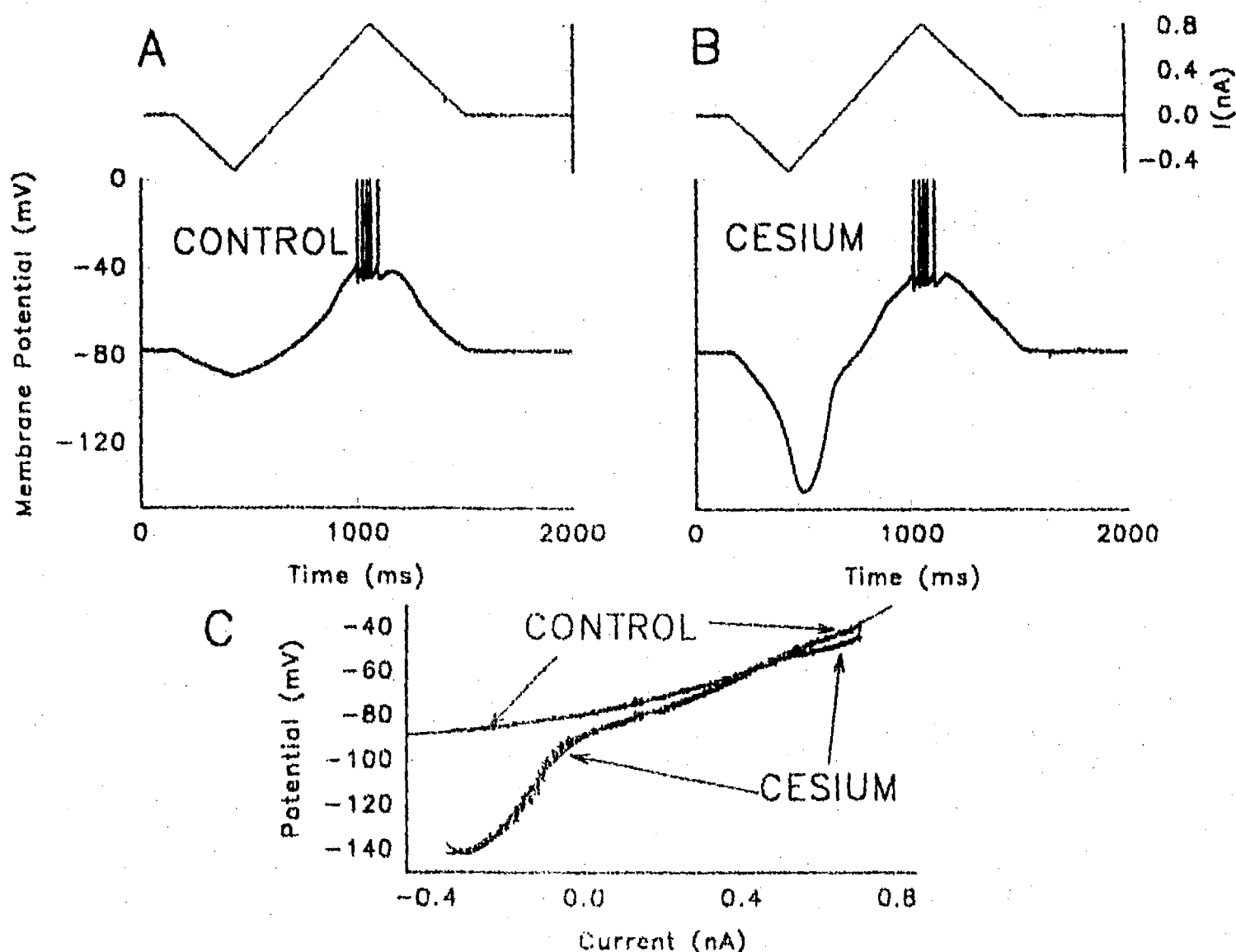
Figure 6 shows the effects of another outward current blocker: TEA (5 mM). Interestingly, its actions were different than 4-AP actions in several respects. The control record in Fig. 6A shows repetitive firing (threshold -44 mV), readily abolished by $1 \mu\text{M}$ TTX (Fig. 6B). In this case, the stimulus 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

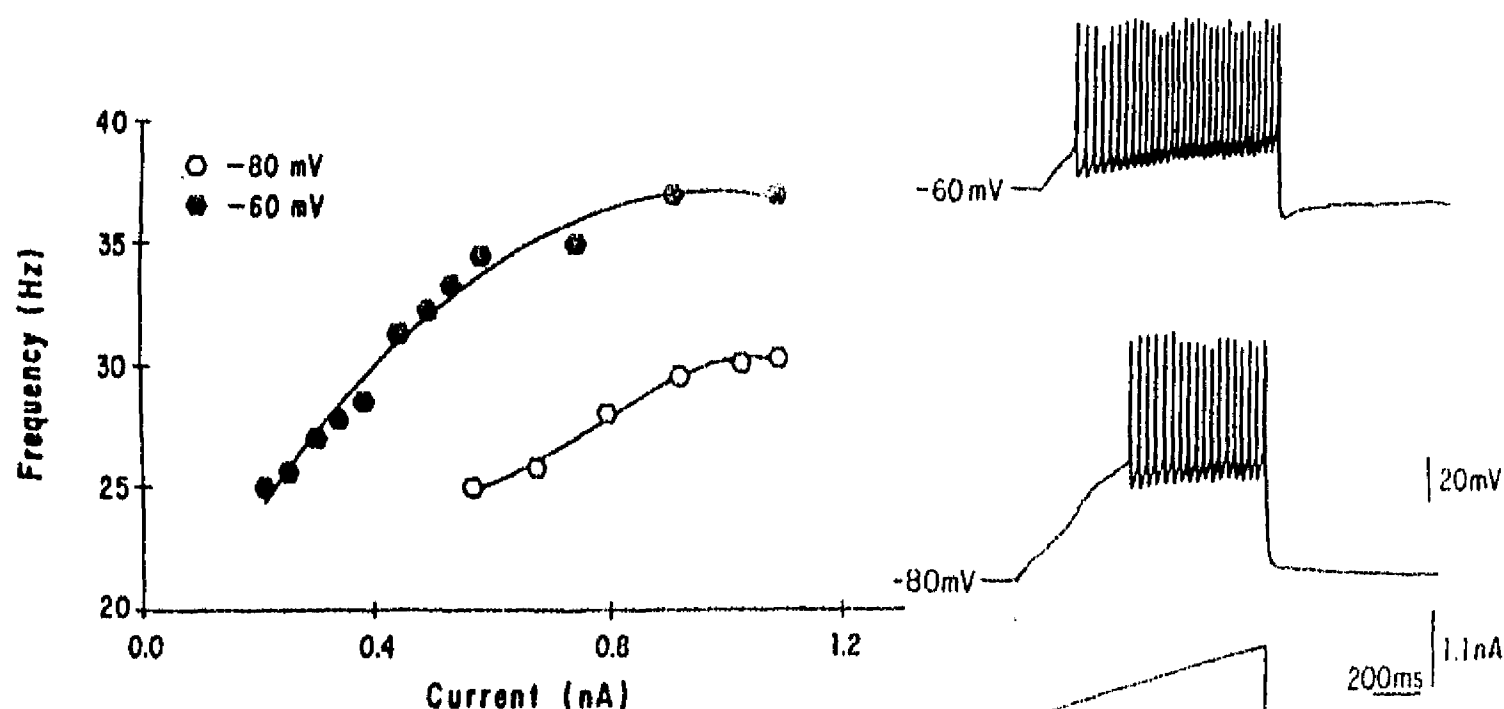
events (Fig. 6D) could be evoked during TEA. However, broad (50 ms) overshooting action potentials would characteristically fire during descending, not ascending, ramps (cf. Figs. 5D and 6D). Again, these TTX-resistant events were blocked by $100 \mu\text{M}$ Cd^{2+} , and not by $100 \mu\text{M}$ Ni^{2+} (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_N 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_N 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

Fig. 9 Firing evoked from different holding potentials. Left, frequency-intensity plots; right, corresponding voltage records (in this case stimulus current is at the bottom)

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-

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_N depends on membrane potential in any given neuron, R_N 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_N 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_N (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_N 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_N 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_N in this potential range have been reported (Pineda et al. 1993).

A sudden drop in slope- R_N 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_N indicates a predominant activation of outward currents in this voltage range. Remarkably, TEA increased slope- R_N 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_N (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_N 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) Electrotonic 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: Kuczmarski 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 JJB, Noble D, Tsien RW (1975) *Electric current flow in excitable cells*. Clarendon, Oxford
- Jahnsen H (1986) Electrophysiological characteristics of neurons in the guinea-pig deep cerebellar nuclei *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 372:129-147
- Jahnsen H, Llinás R (1984) Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an *in vitro* study. *J Physiol (Lond)* 349:205-226
- Jiang ZG, North RA (1991) Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones *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 E S, 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 neurones of the adult guinea pig. *Pflügers Arch* 416:594-603
- Pacheco-Cano MT, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (1993) Comparison of D_1 and D_2 agonist actions on neostriatal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 23:127
- Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J (1992) Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 68:287-294
- Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernández J, Galarraga E (1993) M_1 receptors modulate afterhyperpolarization amplitude (AHP) and excitability in neostriatal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 23:127
- Stelling JW, Jacob TJC (1992) The inward rectifier potassium current underlies oscillatory membrane potential behavior in bovine pigmented ciliary 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 D_1 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 striatal 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
- Uchimura N, Cherubini E, North A (1989) Inward rectification in rat nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol* 62:1280-1286
- Yarom Y, Llinás 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

M. T. Pacheco-Cano · J. Bargas · S. Hernández-Lopez
D. Tapia · E. Galarraga

Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs⁺-sensitive conductance in neostriatal neurons

Received: 4 August 1995 / Accepted: 8 February 1996

Abstract Intracellular recordings in *in vitro* slice preparations of rat brain were used to compare the actions of dopamine and dopamine receptor agonists on the subthreshold membrane properties of neostriatal neurons. A reproducible response for dopaminergic agonists was evoked after firing produced by current ramp injections that induced a subthreshold voltage displacement. Dopamine (10–100 μ M) decreased both firing rate and membrane slope input resistance in virtually all cells tested. Input resistance change appeared as an increase in inward rectification. Approximate reversal potential was around –87 mV. The D₁ receptor agonists SKF 38393 and CI-APB (1–10 μ M) mimicked both dopamine effects with a reversal potential around –89 mV. The effects were blocked by the presence of 5–10 mM caesium (Cs⁺) but not by 1 μ M tetrodotoxin, suggesting that main D₁ effects on input resistance are due to subthreshold Cs⁺-sensitive conductances. cAMP analogues mimicked the actions of D₁ receptor agonists. The D₂ agonist, quinpirole (1–10 μ M), did not produce any input resistance change, nonetheless, it still produced a decrease in firing rate. This suggests that the main D₂ effect on firing is due to actions on suprathreshold ion conductances. All effects were blocked by D₁ and D₂ antagonists, respectively. D₁ or D₂ effects were found in the majority of cells tested.

Key words Neostriatum · Dopamine · Brain slices · Inward rectification · Firing pattern

Introduction

Dopamine actions are still controversial, especially in the neostriatum. Different types of dopamine receptors may

M. T. Pacheco-Cano · J. Bargas · S. Hernández-Lopez · D. Tapia · E. Galarraga (✉)
Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, PO Box 70–253, Mexico City, DF 04510 Mexico;
Tel.: +525 622–5621, Fax: +525 622–5607,
e-mail: egalarra@ifscunl.ifisiol.unam.mx

be present on the same neuron (Civelli et al. 1991; Sibley and Monsma 1992; Surmeier et al. 1993). Each receptor may have different functions (Sibley and Monsma 1992; McGeer and McGeer 1993; Surmeier and Kitai 1993), and voltage-clamp analysis describes simultaneous dopamine actions on both inward and outward currents of the same neuronal type (Freedman and Weight 1988; Surmeier and Kitai 1993; Greif et al. 1995; Surmeier et al. 1995). Sometimes dopamine would act to decrease and increase the same outward current depending on the type of receptor activated (Surmeier and Kitai 1993). Additionally, a calcium inward current may be facilitated at suprathreshold potential levels (Surmeier et al. 1995).

To know which of these actions predominates, or how different actions are integrated to assemble the actual cell response, current-clamp analysis is needed. However, intracellular recordings have not given a clear and reproducible picture. D₁ and D₂ receptor agonists have been reported to be excitatory, inhibitory or ineffective in modulating membrane potential in spiny neurons (Herrling and Hull 1980; Uchimura et al. 1986; Akaike et al. 1987; Calabresi et al. 1987). Using steady rectangular current pulses as stimulus, dopamine produced either an inhibition of the evoked action potentials (Calabresi et al. 1987; Akaike et al. 1987) or an increase in the number of spikes accompanied by inhibition of the afterpotential (Akaike et al. 1987; Rutherford et al. 1988). Also, the action of dopamine on synaptic excitation depends on the type of glutamate receptor activated (Cepeda et al. 1993). A part of these actions may be presynaptic (Calabresi et al. 1987; Floran et al. 1987; García-Munoz et al. 1991).

A question arises about the reason for these varied and sometimes contradictory results. On the one hand, current-clamp experiments do not normally control the membrane potential at which the experiments are done, and modulatory actions may vary according to this variable (e.g. Surmeier and Kitai 1993). On the other hand, the different responses found may correspond either to different receptor subtypes found in different cell classes (Gerfen 1992) or to different receptors found in the same

Ms. No. 569

Author PACHECO-CANO

Ms. 1–24

Pages 1–7

Springer-Verlag, Heidelberg / H. Stürtz AG, Würzburg
Provisorische Seitenzahlen / Provisional page numbers

1. Korr.:

Date:
26-04-96

P

class of spiny neuron recorded under quite different experimental conditions (Surmeier et al. 1993). It is difficult to separate these possibilities.

A way to make sense of multiple responses in current-clamp conditions would be to find a predominant response depending on different potential levels. The hypothesis would be that at a given membrane potential, a global response may appear as reproducible and consistent, whereas receptor heterogeneity is responsible for the fine tuning. However, at another potential level this global response may change. This possibility is important since many transmitters possess different types of receptors on the same target cells, and different neuronal types may have various firing patterns depending on the potential level.

Therefore, this work focused on the actions of dopamine at the subthreshold potential level only. Its aims were first to see whether a reproducible membrane response for dopamine receptor agonists could be found at this level, and second to see whether the actions of D₁ and D₂ receptor agonists can be differentiated from each other in spiny neurons.

To screen the subthreshold potential level in current-clamp conditions a ramp depolarization was found to be suitable (Galarraga et al. 1994). Dopamine action on the response to such a stimulus was very reproducible, and the results suggest that subthreshold conductances make a large contribution to the global response to dopamine. In addition, we found that virtually all spiny neurons tested responded to both D₁ and D₂ receptor agonists under these conditions, and that these agonists could be differentiated in their mode of action, although most probably they act synergistically on a single neuron. A preliminary report of this work has been published (Pacheco-Cano et al. 1993).

Materials and methods

Our protocol follows the *Principles of laboratory animal care* (NIH publication no. 86-23, revised 1985) for animal care and has been described previously (Bargas et al. 1988). Briefly, brain slices were obtained from albino Wistar rats that had been deeply anaesthetized and decapitated. Sagittal brain slices 400 µm thick containing the neostriatum were obtained with a vibratome and incubated (1 h, room temperature) until transferred to a recording chamber. The superfusion saline saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ consisted of (in mM): 120 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 glucose, and 0.1% w/v of ascorbic acid (osmolarity adjusted with glucose to 300 mosmol/l; pH 7.4). Dopamine, D₁ and D₂ agonists (SKF 38393, SKF 82958, i.e. Cl-APB, and quinpirole) and the corresponding antagonists (haloperidol, SCH 23390 and sulpiride) (RBI) were all freshly prepared before each experiment and added from weakly acidic (pH < 4) stock solutions. Tetrodotoxin (TTX; Sigma) was added from stock solutions. Stock solutions of 2-O-dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (db-cAMP; Sigma) were frozen; aliquots were thawed before administration and added to the superfusion solution.

Intracellular recordings were protected from light and performed with microelectrodes filled with biocytin (Sigma, 1–2%) in 3 M potassium acetate. Electrode d.c. resistances ranged from 80 to 120 MΩ. Conventional intracellular techniques used a high input impedance electrometer with an active bridge circuit. Stimulation consisted of intracellular injections of current ramps (0.5–1

nA/s). A hyperpolarizing ramp preceded a depolarizing one. Thus, a continuous depolarization was achieved between very hyperpolarized to rather depolarized membrane potentials (from around -100 mV to around -40 mV). This allowed us to explore a large range of subthreshold membrane potentials in bridge mode. Rate of voltage change was around 1 mV/ms. From this protocol, voltage versus time as well as current versus voltage (I-V) plots could be obtained (Galarraga et al. 1994; Pineda et al. 1995). Since the same rate of change of current was used to compare different conditions, changes in the rate of change of the voltage response were directly interpreted as membrane conductance changes (i.e. changes in slope input resistance; Jack et al. 1975; Benson and Adams 1987; Galarraga et al. 1994). After recordings, neurons were injected with biocytin. Slices containing injected neurons were processed with the ABC-IRP method for serial reconstruction as previously described (e.g. Flores-Hernández et al. 1994).

All experiments were paired. Records in the presence and absence of agonists were compared in the same neurons. Therefore, means, medians and SEM are reported, and statistical treatment was non-parametric (Wilcoxon's *T* test). Comparisons of reversal potentials were illustrated with box plots (for a discussion on box plots see Bargas et al. 1994).

Results

The action of dopamine receptor agonists at the subthreshold level

Fifty-eight medium spiny neurons were intracellularly recorded and 40 of them were intracellularly labelled for this study. All of them were medium spiny projection neurons (e.g. Flores-Hernández et al. 1994). Subthreshold responses to current ramp stimulation in these cells have been characterized previously (Galarraga et al. 1994). As shown in Fig. 1, dopamine (10–100 µM; *n*=10) (Fig. 1A) as well as D₁ (1–10 µM; *n*=10) (Fig. 1B) and D₂ (1–10 µM; *n*=6) (Fig. 1C) receptor agonists decreased the firing response to depolarizing ramps. The decrease in firing frequency in response to dopamine receptor agonists was very reproducible. It was present in all neurons tested using diverse variations of the ramp stimulus (*n*=19 for dopamine, *n*=24 for D₁ and *n*=15 for D₂ receptor agonists), and also using step depolarization (not shown, but see Calabresi et al. 1987; Akaike et al. 1987). The responses to Cl-APB (SKF 82958) and to SKF 38393 (Fig. 1B), full D₁ receptor agonists, were indistinguishable from each other. The responses to dopamine, D₁ receptor agonists or D₂ receptor agonists were lost when 10 µM haloperidol, 10 µM SCH 23390 or 10 µM sulpiride, respectively, were added to the superfusion saline. On some occasions the D₁ response was tested in the presence of D₂ antagonist, and vice versa. This manoeuvre did not change the basic response to each agonist. These dopaminergic responses were seen after 5–10 min of slice superfusion (2 ml/min) and were hardly reversed after 30 min of washing.

If ascending portions of the ramp responses are plotted against injected current, quasi steady-state current-voltage relationships (I-V plots) can be obtained (Galarraga et al. 1994). Examples are shown in Fig. 2, which shows superimpositions of I-V plots before and in the presence of dopamine and dopamine receptor agonists

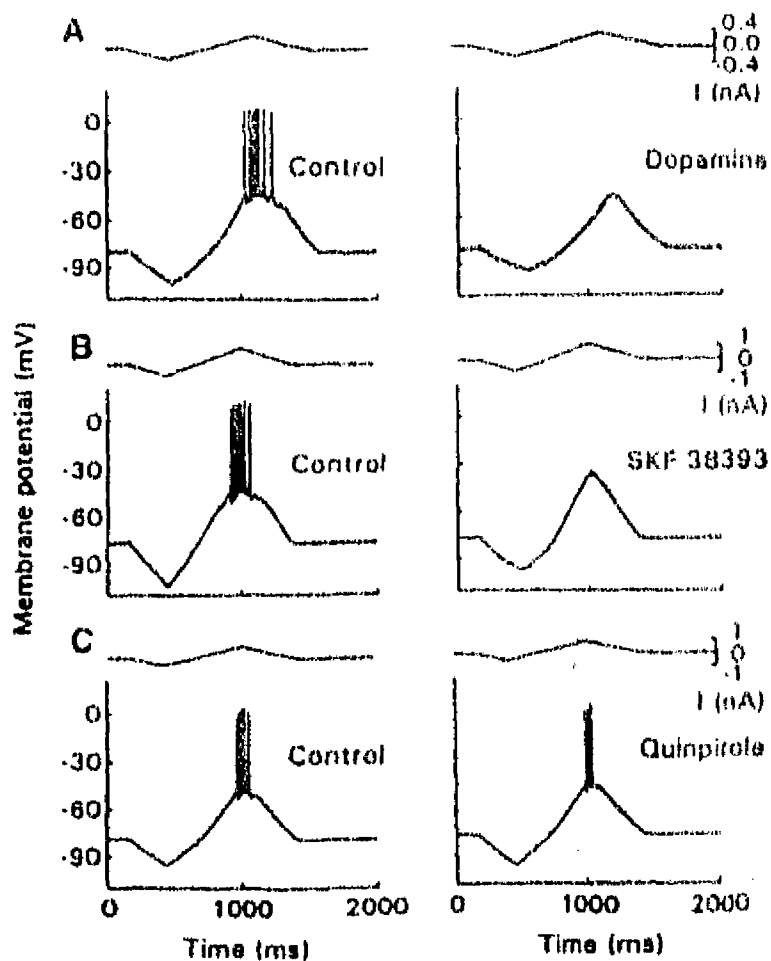


Fig. 1A-C Dopamine receptor agonists inhibit firing. **A** Action of dopamine on the firing response to a ramp of current. *Left:* Control response (current above and voltage response below, in this and all similar frames). *Right:* In the presence of 10 μ M dopamine firing is inhibited. **B** Action of the D_1 receptor agonist SKF 38393. *Left:* Control response. *Right:* In the presence of 10 μ M SKF 38393. The response was identical in the case of 1 μ M SKF 38393 or 1–10 μ M Cl-APB (SKF 82958); not shown. **C** Action of the D_2 receptor agonist quinpirole. *Left:* Control response. *Right:* In the presence of 10 μ M quinpirole

(taken from the records in Fig. 1). Dopamine and D_1 receptor agonists decrease neuronal input resistance (Fig. 2A,B), as can be seen by a change in the slope of the I-V plot during administration of the agonists (Jack et al. 1975). In fact, I-V plots before and during the administration of dopamine or D_1 receptor agonists cross each other (Fig. 2A,B). This effect persists in the presence of 1 μ M TTX (Fig. 3B), which is more than enough to abolish firing (e.g. Bargas et al. 1989) (Fig. 3A). This suggests that dopamine's effect on input resistance in most subthreshold range (Fig. 3A) is not due to a decrease in sodium conductance (see also Galarraga et al. 1994). This result in the presence of TTX also suggests that dopamine agonists are acting directly on the post-synaptic neurons. This change in input resistance was observed in 22 of 24 cells. On the other hand, a change in input resistance in the subthreshold voltage range was never seen in the presence of a D_2 receptor agonist ($n=15$; Fig. 2C).

If the I-V plot crossing point is taken as an approximation of the apparent reversal potential for dopamine's subthreshold action, it can be seen that it occurs with a relatively polarized membrane (Fig. 2A,B), so that I-V plots run apart from each other over most of the subthreshold range. The values obtained (Fig. 2D) were be-

Fig. 2A-D Current-voltage relationships in the presence of dopamine receptor agonists. The presence of 10–100 μ M dopamine (**A**) and 1–10 μ M SKF 38393 (**B**) decreases slope input resistance, i.e. the slope of the I-V function at negative potentials. I-V plots before and during administration of agonists cross each other. The response was identical in the case of 1–10 μ M Cl-APB or 1–10 μ M 6-Cl-PB. **C** The presence of 10 μ M quinpirole does not decrease subthreshold slope input resistance at these concentrations. I-V plots before and during administration of quinpirole never cross each other. The crossing points of the I-V plots suggest that apparent reversal potentials for the action of dopamine agonists occur far away from the threshold of any Na^+ conductance: between -80 and -90 mV ($[K^+]_o=3$ mM). Same experiments as in Fig. 1 (points). Continuous lines are fitted polynomials (Galarraga et al. 1994)

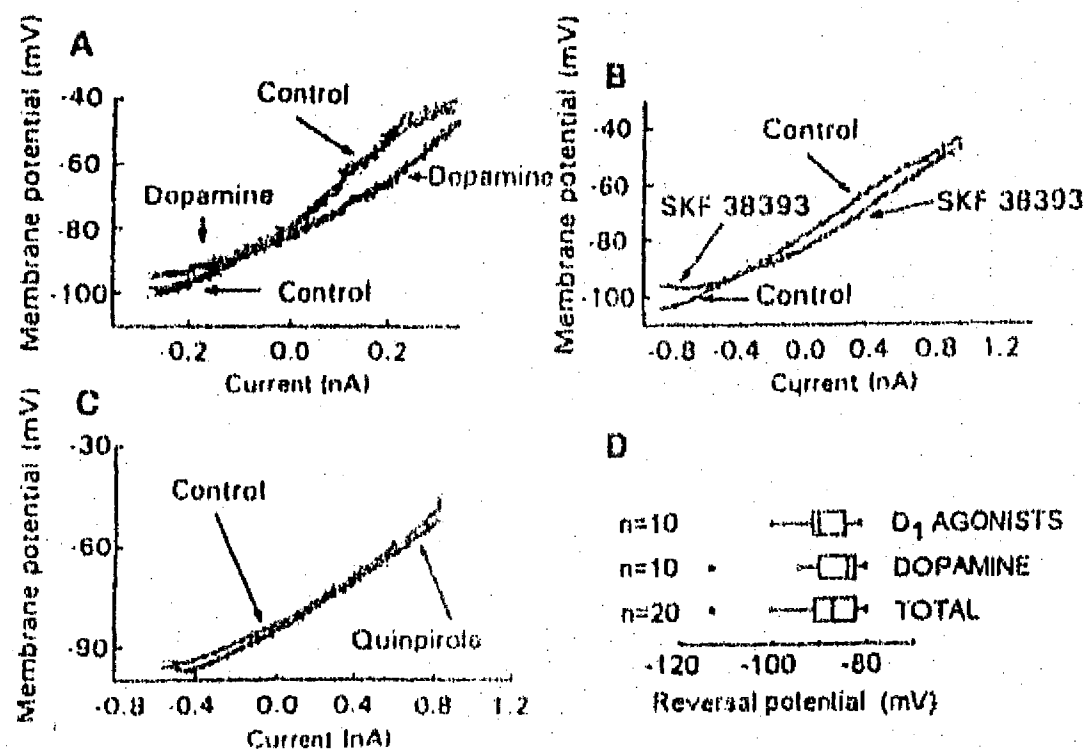
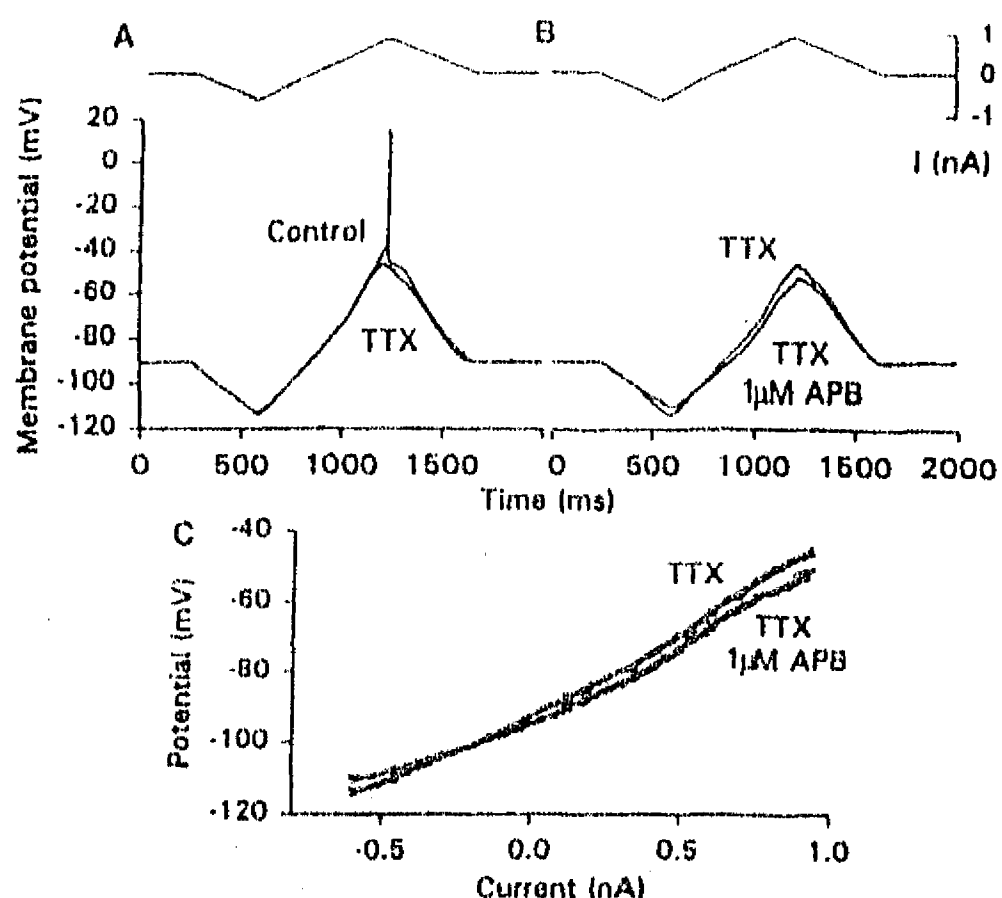


Fig. 3A-C D_1 action persists in the presence of tetrodotoxin (TTX). A, B $1 \mu\text{M}$ TTX blocks action potential firing but does not change the voltage trajectory during most subthreshold range (see also Galarraga et al. 1994) and does not occlude the action of D_1 agonists ($1 \mu\text{M}$ of Cl-APB was used in this case). C I-V plots in the presence of TTX, and TTX plus Cl-APB, cross each other at negative potentials



tween -80 and -90 mV, suggestive of a potassium conductance as the main conductance involved. This is also true if agonists are applied in the presence of TTX (Fig. 3C) – which also argues against sodium being mainly responsible for this subthreshold action (Surmeier and Kitai 1993; Cepeda et al. 1995; Chao and Alzheimer 1995). Moreover, slope input resistance change is more evident around the crossing point. At more positive subthreshold levels both I-V plots seem to run more in parallel, although I-V plots in the presence of D_1 agonists remain hyperpolarized with respect to the control (Fig. 2A,B). In fact, a sample of cells ($n=12$) recorded in the presence of dopamine or D_1 agonists showed that I-V slopes between -90 and -80 mV were (mean \pm SEM) 39 ± 6.6 ($\text{M}\Omega$) for controls and 25 ± 5.7 ($\text{M}\Omega$) in the presence of dopamine or D_1 agonists (medians 33 and 18, respectively; $P=0.003$). However, at membrane potentials near action potential threshold, i.e. between -45 and -55 mV, the slopes were 64 ± 9 ($\text{M}\Omega$) for controls and 57 ± 9.1 ($\text{M}\Omega$) in the presence of agonists (medians 62 and 52, respectively; $P=0.051$). This shows that the main subthreshold action of dopamine and D_1 receptor agonists on input resistance is located at relatively negative potentials (Benson and Adams 1987; Jack et al. 1975; Galarraga et al. 1994). Spiny neostriatal neurons possess a caesium (Cs^+)-sensitive inward rectifier acting at this voltage range (Galarraga et al. 1994; Nisenbaum and Wilson 1995). Therefore, we decided to test whether the action of dopamine was sensitive to Cs^+ .

Subthreshold action of dopamine D_1 receptor agonists is Cs^+ -sensitive

Figure 4 illustrates the finding that 5 – 10 mM Cs^+ completely blocks the decrease in firing response produced

by dopamine or D_1 receptor agonists (Fig. 4A,B). Note that Cs^+ blocks inward rectification at relatively negative potentials (Fig. 4A) (Galarraga et al. 1994; Nisenbaum and Wilson 1995), and that in the presence of Cs^+ , D_1 receptor agonists, or dopamine, are no longer able to reduce slope input resistance (Fig. 4C).

These results suggest that main subthreshold action of dopamine may be on a Cs^+ -sensitive conductance, i.e. it is probably involved in inward rectification. This global action could be sufficient to explain the reduction in firing rate produced by D_1 receptor agonists (Benson and Adams 1987). And in fact, in five of six cells, dopamine or dopamine D_1 receptor agonists *increased* rather than *decreased* the firing rate in the presence of Cs^+ (e.g. Fig. 4). This result was also obtained with depolarizing current steps (not shown). In other words, dopamine action turns out to be excitatory at depolarized potentials if the subthreshold Cs^+ -sensitive conductance has been blocked (see Discussion). The response to D_2 receptor agonists was completely different. It reduced the firing rate without changing the cell's input resistance (Figs. 1C, 2C).

The action of dopaminergic agonists on subthreshold responsiveness is mimicked by a cAMP analogue

The dopaminergic D_1 receptor is known to be linked to the protein kinase A (PKA) signalling system (Kebabian and Calne 1979; Sibley and Monsma 1992; Strange 1993; Surmeier et al. 1995). Thus, a cyclic AMP analogue should be able to mimic dopaminergic actions. This is shown in Fig. 5. The analogue db-cAMP added to the superfusion solution at concentrations up to $500 \mu\text{M}$ was able to both reduce firing rate (cf. Fig. 5A,B) and

Fig. 4A-C Caesium (Cs^+) blocks D_1 actions. A, B 5–10 mM Cs^+ completely abolishes inward rectification for hyperpolarized potentials in spiny projection neurons (cf. Fig. 1 left-hand frames; see also Galarraga et al. 1994; Nicolson and Wilson 1995). D_1 receptor agonists increase firing frequency in the presence of Cs^+ (10 μM Cl-APB was used in this case). C Cl-APB is not longer able to change input resistance in the presence of Cs^+ . Similar responses were seen for responses after step depolarizations and for dopamine and SKF 38393

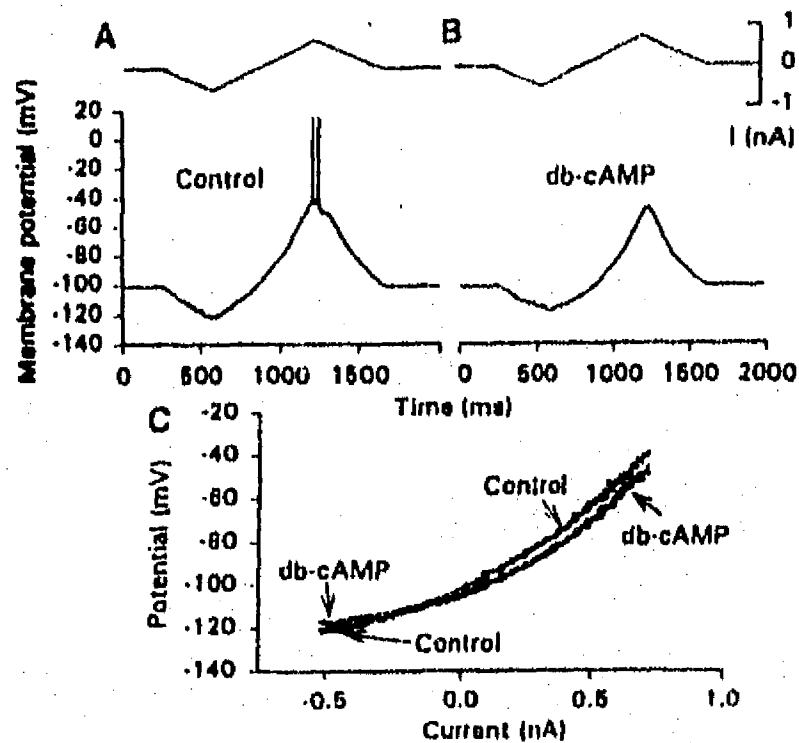
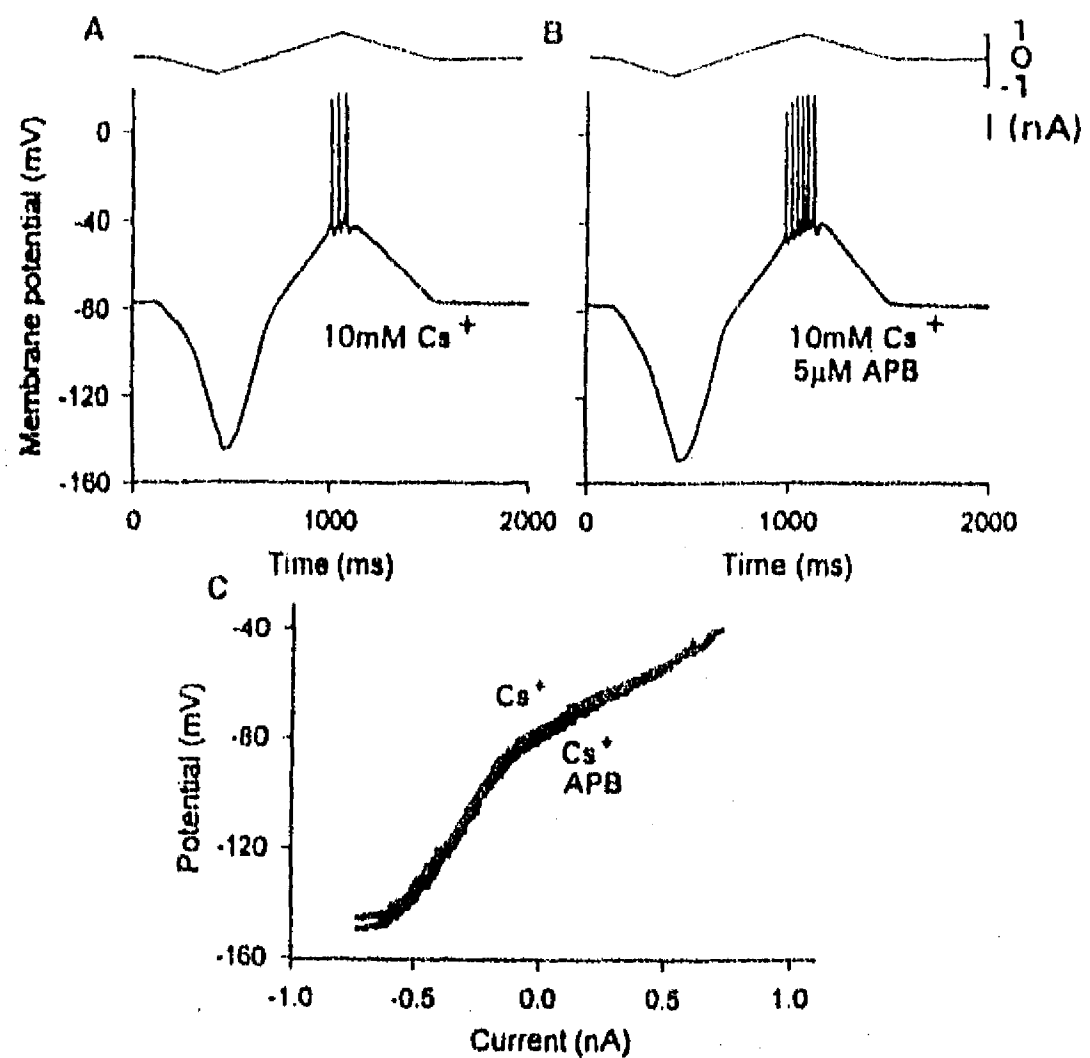


Fig. 5A-C cAMP analogues mimic the actions of D_1 receptor agonists. A, B 500 μM dibutyryl cAMP decreases the firing response to a ramp stimulus. C db-cAMP also decreases slope input resistance at subthreshold potential levels

decrease slope input resistance (Fig. 5C) in neostriatal neurons ($n=4$).

It is noticeable that at higher concentrations, i.e. 1 mM, cAMP analogues may increase, not decrease firing (Galarraga et al. unpublished). In fact, they induce a

slow inward current (Surmeier et al. 1995) whose action on firing at suprathreshold potentials is now a subject under investigation. Nevertheless, note that this action is suprathreshold (Bargas et al. 1994; Galarraga et al. 1994; Surmeier et al. 1995); it occurs at depolarized membrane potentials, and does not occlude the subthreshold action described in the present work (also see Discussion).

Discussion

Dopamine receptor agonists acting at subthreshold potential levels

The experiments presented show that both dopamine D_1 and D_2 receptor agonists acted on practically all neostriatal cells in which they were tested by reducing the firing frequency response to the same stimulus. The response was very reproducible when examined after depolarizing ramps that screened a wide subthreshold voltage range, beginning at very hyperpolarized potentials (Galarraga et al. 1994). Therefore, the two types of agonists may act synergistically on most occasions (Piomelli et al. 1991; Surmeier et al. 1993) when the cells are at this potential level. It is noteworthy that a reduction in firing rate to the same stimulus has been the most consistent finding regarding the action of dopamine agonists in most in vitro studies, whatever the type of stimulus used – current steps, synaptic and chemical (glutamate) (Uchimura et al. 1986; Calabresi et al. 1987; Akaike et al. 1987; Ce-

peda et al. 1993). As previously reported, the decrease in firing is accompanied by an increase in firing threshold (Akaike et al. 1987) and an increase in the action potential afterhyperpolarization (AHP) (Hernández-López et al. 1996). Membrane potential in most studies has been relatively negative.

The present experiments also show that, at saturating concentrations (Sibley and Monsma 1992; Strange 1993; Surmeier et al. 1993, 1995), D₁ receptor agonists but not D₂ receptor agonists were able to mimic dopamine's ability to reduce slope-input resistance at subthreshold potentials. The apparent reversal potential for this D₁ action was near the potassium equilibrium potential. Even if the crossing point of the I-V plots is only an approximation of the reversal potential, it surely makes the point of rejecting Na⁺ as the only ion involved in the inhibition, because it is far away from the threshold of any known Na⁺ current in these cells (Ogata and Tatebayashi 1990; Surmeier and Kitai 1993; Cepeda et al. 1995; Chao and Alzheimer 1995). I-V plots run apart from each other in most of the subthreshold range. Additionally, this action on slope input resistance was suppressed by Cs⁺ (Fig. 2D). Taken together, the most parsimonious interpretation for the present data is that the main subthreshold effect of D₁ receptor modulation could be due to a facilitation, or change in voltage-dependence, of an ion conductance mainly permeable to K⁺. Since Cs⁺ blocks inward rectification at this level (Galarraga et al. 1994; Nisenbaum and Wilson 1995), it can be hypothesized that D₁ receptor agonists are acting on an inward rectifier at the subthreshold level. Alternatively, dopamine may affect a leak channel.

On the other hand, D₂ receptor agonists decreased firing without changing input resistance appreciably (Figs. 1, 2). This suggests that channels activated by D₂ receptor agonists (Freedman and Weight 1988; Surmeier et al. 1993; Greif et al. 1995) on neostriatal neurons are not subthreshold. Alternatively, they may be located in a different subset of neostriatal neurons (Greif et al. 1995). Additionally, the pharmacologically defined D₂ action in the slice preparation may actually not be D₂, but D₃ or D₄ (Sibley and Monsma 1992; Strange 1993), since activation of D₂ receptors induce a decrease in input resistance in other cell types (e.g. Lacey 1993).

Previous studies have shown that depolarizations, hyperpolarizations, biphasic, or no responses may be obtained during dopamine administration in current-clamp conditions (e.g. Herrling and Hull 1980; Uchimura et al. 1986; Akaike et al. 1987). Here it is shown that part of this variability may be due to different resting potentials of the recorded cells, i.e. below, at or above the reversal potential for dopamine's global action. This reversal potential depends on external K⁺ concentration (Nisenbaum and Wilson 1995).

Although a change in inward rectification may be enough to explain a repression in firing (Benson and Adams 1987; Wilson 1993), this mechanism would act only when the cells are stimulated from negative potentials (e.g. at the "down" state; Wilson 1993). Nonetheless, do-

pamine can also have suprathreshold actions on sodium, calcium and potassium conductances (Surmeier et al. 1993, 1995; Surmeier and Kitai 1993). Therefore, it might be that complex dopaminergic modulation of other ion conductances (Surmeier et al. 1993, 1995; Surmeier and Kitai 1993; Hernández-López et al. 1996) may be in charge of fine tuning. Alternatively, a completely different response may be achieved at suprathreshold potentials once the subthreshold action on input resistance has been overcome. In support of the latter argument, other modulators known to be co-localized in the neostriatum, including acetylcholine, may be able to change the main response to dopamine by just blocking inward rectification, as Cs⁺ did (Fig. 4; Galarraga et al. 1994; Pineda et al. 1995; Hsu et al. 1995). In fact, Cs⁺ rendered the dopamine response excitatory (Fig. 4). In addition, both D₁ receptor agonists and cAMP analogues, at higher concentrations than those used in this work, may also favour firing after prolonged depolarization (Galarraga et al. unpublished). It is at suprathreshold potentials where D₁ agonists induce inward currents (Surmeier et al. 1995). Therefore, the actions of dopamine may be different at subthreshold compared with suprathreshold membrane potential levels, being mainly inhibitory at the former.

In conclusion, dopamine increases the threshold for leaving the "down" state by decreasing slope input resistance (Wilson 1993).

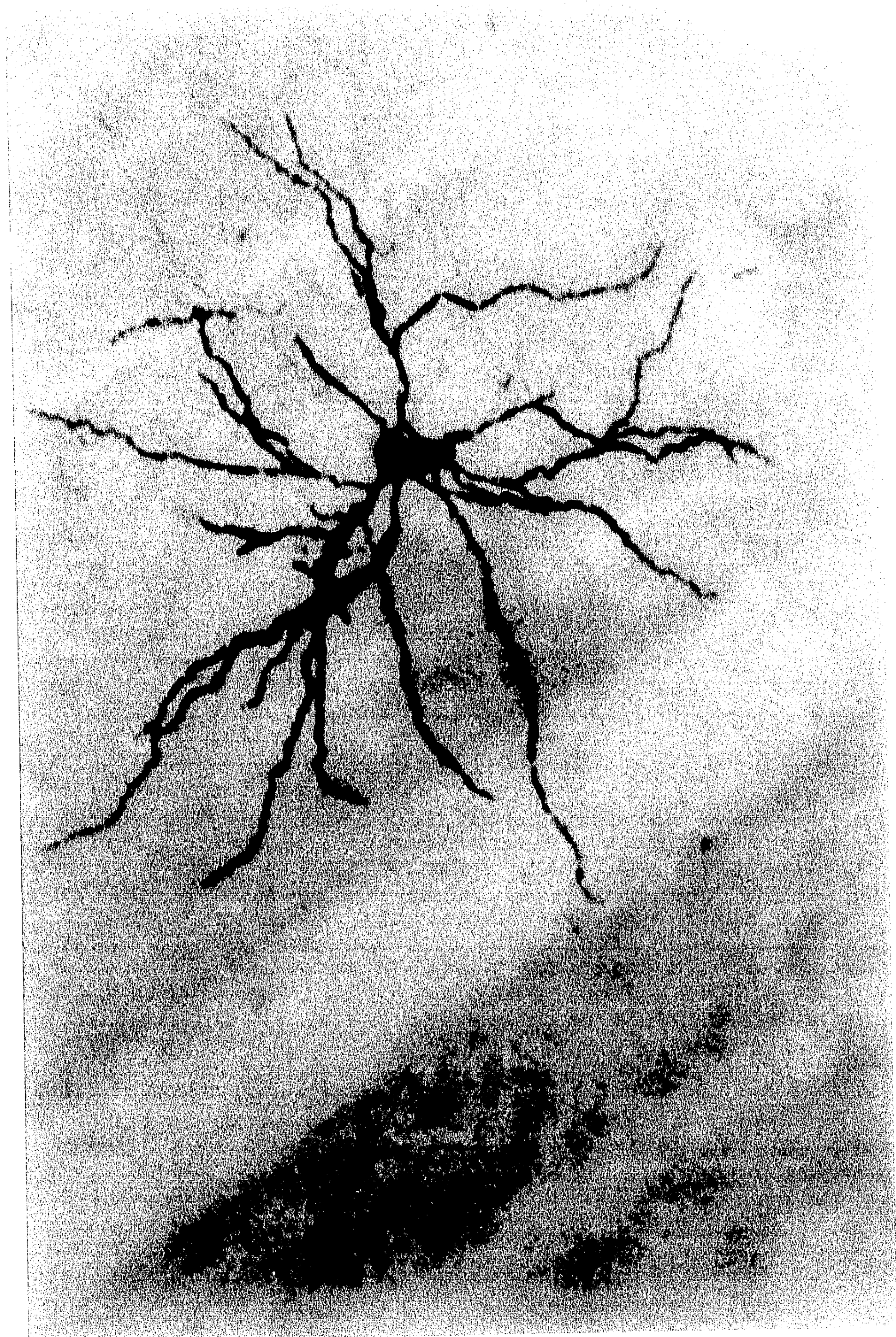
Receptor heterogeneity

Since all cells tested responded to D₁ receptor agonists and, perhaps, only half of the cells express the D₁ (D_{1a}; Sibley and Monsma 1992) receptor (Gerfen 1992), we have to conclude that the cells that do not express the D_{1a} receptor have another receptor that induces the same global response. This may be the D₅ (or D_{1b}; Sibley and Monsma 1992) receptor, since D₁ responses were mimicked by a cAMP analogue, both D_{1a} and D_{1b} receptors use the PKA signalling system, and the D₁ receptor agonists used in this work do not discriminate between D_{1a} and D_{1b} receptor types (Strange 1993). In conclusion, our results suggest that the same subthreshold response to dopamine is present in all projection neurons and that receptor segregation does not explain different responses to dopamine. Differences have to be found in more complex responses or interactions. They also predict that cells with no D_{1a} receptors will have D_{1b} receptors. Alternatively, an as yet uncloned receptor may be present, or a predominance of somatic expression of a particular type of receptor (Gerfen 1992) may be related to its role at the axon terminals (Floran et al. 1990; Surmeier et al. 1993), not at the soma.

Acknowledgements This research was supported by DGAPA-UNAM (IN201094) and CONACyT (México).

References

- Akaike A, Ohno Y, Sasa M, Takaori S (1987) Excitatory and inhibitory effects of dopamine on neuronal activity of the caudate neurons in vitro. *Brain Res* 418: 262-272
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1988) Electrotonic 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, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994) Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14: 6667-6686
- Benson JA, Adams WB (1987) The control of rhythmic neuronal firing. In: Kaczmareck LK, Levitan IB (eds) *Neuromodulation*. Oxford University Press, New York, pp 100-118
- Calabresi P, Mercuri N, Stanzione P, Stefani A, Bernardi G (1987) Intracellular studies on the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons in vitro: evidence for D₁ receptor involvement. *Neuroscience* 20: 757-771
- Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS (1993) Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9576-9580
- Cepeda C, Chandler SH, Shumate LW, Levine MS (1995) Persistent Na⁺ conductance in medium-sized neostriatal neurons: characterization using infrared videomicroscopy and whole-cell patch-clamp recordings. *J Neurophysiol* 74: 1343-1348
- Chao TI, Alzheimer C (1995) Do neurons from rat neostriatum express both a TTX-sensitive and a TTX-insensitive slow Na⁺ current? *J Neurophysiol* 74: 934-941
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK, Zhou QY, Van Tol HHM (1991) Molecular biology of the dopamine receptor. *Eur J Pharmacol* 207: 277-286
- Floran B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D (1990) Activation of D₁ dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 116: 136-140
- Flores-Hernández J, Galarraga E, Pineda JC, Bargas J (1994) Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J Neurophysiol* 72: 2246-2256
- Freedman JE, Weight FF (1988) Single K⁺ channels activated by D₂ dopamine receptors in acutely dissociated neurons from rat corpus striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3618-3622
- Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández J, Bargas J (1994) Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res* 100: 239-249
- García-Munoz M, Young SJ, Groves PM (1991) Terminal excitability of the corticostriatal pathway. I. Regulation by dopamine receptor stimulation. *Brain Res* 551: 195-206
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15: 285-320
- Greif GJ, Lin Y-J, Liu J-C, Freedman E (1995) Dopamine-Modulated potassium channels on rat striatal neurons: specific activation and cellular expression. *J Neurosci* 15: 4533-4544
- Hernández-López S, Bargas J, Reyes A, Galarraga E (1996) Dopamine modulates the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *Neuroreport* (in press)
- Herrling PL, Hull CD (1980) Ionophoretically applied dopamine depolarizes and hyperpolarizes the membrane of cat caudate neurons. *Brain Res* 192: 441-462
- Hsu KS, Yang CH, Huang CC, Gean PW (1995) Carbachol-induced inward currents in neostriatal neurons through M1-like muscarinic receptor. *Soc Neurosci Abstr* 21: 588
- Jack JJB, Noble D, Tsien RW (1975) *Electric current flow in excitable cells*. Oxford University Press, Oxford
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96
- Lacey MG (1993) Neurotransmitter receptors and ionic conductances regulating the activity of neurons in substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Prog Brain Res* 99: 251-275
- McGeer PL, McGeer EG (1993) Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia. *Adv Neurol* 60: 93-100
- Nisenbaum ES, Wilson CJ (1995) Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci* 15: 4449-4463
- Ogata N, Tachibayashi H (1990) Sodium current kinetics in freshly isolated neostriatal neurons of the adult guinea pig. *Pflügers Arch* 416: 594-603
- Pacheco-Cano MT, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (1993) Comparison of D₁ and D₂ agonist actions on neostriatal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 19: 127
- Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernández J, Galarraga E (1995) Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281: 271-277
- Piomelli D, Pilon C, Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Schwartz JCH (1991) Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D₁/D₂ receptor synergism. *Nature* 353: 164-167
- Rutherford A, García-Munoz M, Arbuthnott GW (1988) An after hyperpolarization recorded in striatal cells "in vitro": effect of dopamine administration. *Exp Brain Res* 71: 399-405
- Sibley DR, Monsma FJ Jr (1992) Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13: 61-69
- Strange PG (1993) Dopamine receptors: structure and function. *Prog Brain Res* 99: 167-179
- Surmeier DJ, Kitai ST (1993) D₁ and D₂ dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99: 309-324
- Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS, Ariano MA (1993) Are neostriatal dopamine receptors co-localized? *Trends Neurosci* 16: 299-305
- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC, Nairn AC, Greengard P (1995) Modulation of calcium currents by D₁ dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14: 385-397
- Uchimura N, Higashi H, Nishi S (1986) Hyperpolarizing and depolarizing actions of dopamine via D₁ and D₂ receptors on nucleus accumbens neurons. *Brain Res* 375: 368-372
- Wilson CJ (1993) The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99: 277-297



Neurona Espinosa Mediana de Proyección del Neocóstriado, identificada:
1) Electrofisiológicamente, a través del registro intracelular y **2) Morfológicamente**, a través de la inyección intracelular de biocitina, siguiendo la técnica de Horikawa y Armstrong, 1988, (ejemplo que forma parte de las neuronas registradas).

Discusión

Las neuronas neocorticales espinosas medianas poseen in vivo, un patrón de disparo que se caracteriza por episodios de disparo neuronal separados por grandes períodos de silencio. Registros intracelulares en animales no-anestesiados y en animales ligeramente anestesiados, han mostrado que el disparo neuronal durante estos episodios surge de períodos en forma de rampa de despolarización membranar sostenida de 0.1 a 3 segundos. Estas despolarizaciones son de origen sináptico, muy probablemente comandadas por la corteza cerebral, y dan origen a trenes de potenciales de acción (Wilson, 1990, 1993). Separando estos períodos de despolarización, se pueden registrar grandes períodos de hiperpolarización membranar y de silencio eléctrico (véase Figura 8) (Wilson, 1992). Al estado de reposo se le ha denominado "down state" y al estado de despolarización ocasional se le ha denominado "up state" (Wilson and Kawaguchi, 1996).

En este trabajo se estudiaron en primera instancia, las respuestas subumbrales de membrana de las neuronas espinosas medianas, utilizando como estímulo la inyección intracelular de rampas corriente, ya que éste en registros intracelulares in vitro y en condiciones de fijación de corriente, mimetiza las características fisiológicas de disparo de estas neuronas de proyección. Las respuestas obtenidas ante este estímulo, por las neuronas neocorticales estudiadas fueron complejas, exhibiendo cambios reproducibles en la trayectoria del voltaje. Cuando se hizo el análisis de las respuestas subumbrales, las desviaciones de la linealidad, visualizadas como diferentes transiciones en la trayectoria de voltaje, fueron interpretadas como la presencia de rectificación entrante en estas neuronas.

Aunque se encontraron neuronas fuertemente rectificadoras y otras con poca rectificación, la mayoría de ellas mostraron propiedades membranales no lineares, es decir, que a pesar del cambio constante en la corriente estímulo, el potencial de membrana no respondió linealmente. Por lo tanto estas neuronas mostraron rectificación entrante en la mayor parte del rango fisiológico de la respuesta subumbral (Bargas y cols., 1989; Wilson, 1990, 1992). La cantidad de rectificación entrante observada en las neuronas estudiadas, varió en cantidades considerables de neurona a neurona bajo las mismas condiciones de registro. La variación en cualquier fuente de rectificación subumbral se vió expresado como curvas I-V y R_N diferentes. Como sabemos, la forma de una curva I-V refleja las conductancias que están activas en cada rango de voltaje (Benson y Adams, 1987). Y la forma de la

I-V refleja las conductancias que están activas en cada rango de voltaje (Benson y Adams, 1987). Y la forma de la curva I-V en estas neuronas se vió determinada por tales transiciones. De hecho cada transición en las curvas indica un cambio en la pendiente ó R_N aparente, lo cual señala la participación de diferentes conductancias iónicas durante las despolarizaciones subumbrales (Benson y Adams, 1987). Dado que la R_N depende del potencial de membrana en cualquier neurona, las R_N de las neuronas control estudiadas, fueron siempre evaluadas a -70mV, obteniéndose una distribución unimodal.

Utilizando bloqueadores específicos, se encontraron evidencias de la participación de conductancias sensibles a TTX, a Cd^{2+} , 4-AP, TEA y Cs^+ en el rango subumbral. Sin embargo, la contribución de estas conductancias y el rango de voltaje de activación de cada una de ellas, fué muy diferente. Es posible que estas diferentes conductancias iónicas, ajusten la función de entrada y de salida de estas neuronas para un estímulo dado, actuando en concierto, oponiéndose ó modulándose entre ellas (Bargas y cols., 1989).

Las acciones bloqueadoras del Cs^+ y del TEA, sugieren que las conductancias activadas por hiperpolarización membranal predominan a potenciales relativamente negativos. Estas conductancias se desactivan de -70 a -65 mV. Consecuentemente, cuando la despolarización alcanzó este nivel, se incrementó la proporción de cambio de la subida. De hecho, se obtuvo una pendiente más pronunciada, es decir una R_N mayor cuando la respuesta a la rampa alcanzó potenciales entre -65 y -50 mV. En este rango de voltaje, ni la TTX ni el Cd^{2+} , cambiaron la pendiente de la curva I-V (Figs.5 y 6 del primer trabajo). Por lo tanto, concluimos que la rectificación subumbral, representa en gran medida el cierre de los canales rectificadores entrantes. Esto está de acuerdo con lo observado en los estudios de fijación de voltaje (Jiang y North, 1991) y con el voltaje en el cual disminuye la acción del Cs^+ , alrededor de los -70 mV (Fig. 8 del primer trabajo).

Sin embargo, comparando las acciones del Cs^{2+} y del TEA, se observó que el TEA aumentó la R_N a potenciales de membrana entre los -70 y -50 mV. De hecho, el TEA fué el único bloqueador que actuó en este rango de potencial. Sugiriendo que alguna conductancia sensible al TEA, aún no descrita, juega un papel en este rango de voltaje de la respuesta subumbral de estas células. Evidencias obtenidas del laboratorio, han mostrado que ciertos agentes colinérgicos aumentan la R_N en este rango del potencial (Pineda y cols., 1995).

Cuando la respuesta a la rampa sobrepasó potenciales más positivos que -55 mV ó -50 mV, se observó una caída repentina en la R_N ; marcando el inicio de la última trayectoria del voltaje antes de alcanzar el umbral de disparo (Fig.3, línea punteadas 3 y Figs. 2,5,6 del primer trabajo). En este rango de voltaje, un decremento en la R_N indica la activación predominante de corrientes salientes.

Notablemente, el TEA aumento la R_N en la mayor parte del rango de voltaje subumbral, pero no bloqueó esta última trayectoria (Fig. 6 del primer trabajo). Sin embargo, durante la rampa ascendente, la 4-AP bloqueó la última trayectoria del voltaje (Fig. 5 del primer trabajo). La concentración usada de 4-AP (1mM), afectaría parcialmente las corrientes salientes transitorias rápidas y bloquea completamente las corrientes salientes transitorias lentas (Surmeier y cols., 1991; Nisenbaum y cols., 1994). Esta última trayectoria de voltaje no se observa en las curvas I-V, que se obtienen con pulsos de corriente (Fig.1 primer trabajo). La participación de las corrientes salientes transitorias en este rango de voltaje, es apoyada por el hecho de que el potencial de mantenimiento modifica la ganancia de la función frecuencia-corriente (F-I) (Fig. 9 del primer trabajo). También es compatible con la cinética de inactivación lenta (segundos) reportada para esta clase de corrientes (Surmeier y cols., 1991; Nisenbaum y cols., 1994). Por lo tanto, las presentes observaciones sugieren que las conductancias sensibles a la 4-AP, juegan un papel importante en la integración sináptica, aún cuando se trata de despolarizaciones lentas en forma de rampa, como en condiciones *in vivo*. Será necesario realizar estudios con episodios de despolarización más grandes que 1 segundo, para evitar la fuga de las corrientes salientes transitorias.

Aunque en la última trayectoria de voltaje predominaron las corrientes salientes, también se hizo evidente la participación de las corrientes entrantes como la de Na^+ , como lo sugieren la histeresis contrareloj que se observa en la relación I-V de la figura 3 (primer trabajo) y la reducción de la R_N por la TTX (Fig. 6E del primer trabajo).

Por el otro lado, la repolarización rápida sensible al Cd^{2+} , sugirió también la participación de la entrada de Ca^{2+} (Fig. 4B-D del primer trabajo). Esto ocurrió aún en la ausencia de eventos regenerativos (fig. 4B del primer trabajo). De la misma manera, se ven revelados potenciales de acción y respuestas locales resistentes a la TTX, cuando son bloqueadas las corrientes de potasio con la 4-AP; estos potenciales fueron acompañados por repolarizaciones rápidas y postpotenciales (PPH) pronunciados (Figs. 5C-D del primer trabajo). Todos estos eventos son bloqueados por dosis

micromolares de Cd^{2+} pero no por dosis micromolares de Ni^{2+} (Figs. 5 E-G del primer trabajo). Por consiguiente, ellos deben ser causados por corrientes de Ca^{2+} activadas por alto voltaje (HVA) (Bargas y cols., 1991, 1994). El umbral para la activación de las corrientes de Ca^{2+} y los eventos dependientes de Ca^{2+} , está muy cercano al umbral de disparo de los potenciales de acción de Na^+ . Mas aún, se requieren de estímulos mayores a los necesarios para alcanzar el umbral de disparo (Figs. 4B y 5B del primer trabajo). Por lo que es difícil de evaluar la contribución de estas corrientes de Ca^{2+} , en la respuesta subumbral. No obstante, la falta de acción de la apamina durante las respuestas depolarizadoras a la rampa (Fig.7 del primer trabajo) sugiere que el papel de las corrientes activadas por Ca^{2+} , se lleva a cabo principalmente a voltajes supraumbrales.

Los cambios en la trayectoria del voltaje (Fig.3 del primer trabajo) durante las respuestas a la rampa, no correspondieron exactamente con los voltajes umbrales para la activación de las conductancias descritas cuando se usan como estímulos pulsos de corriente ó en condiciones de fijación de voltaje (Bargas y cols., 1989, 1991b; Surmeier y cols., 1988, 1991; Nisenbaum y cols., 1994). Esto era lo esperado, ya que durante las despolarizaciones muy lentas, todas las conductancias actúan secuencialmente y en concierto, influyéndose una a la otra. Excepto por el hecho de que la integración sináptica fisiológica proviene principalmente de las dendritas, despolarizaciones lentas en forma de rampa representarían más apegadamente la excitación fisiológica que estas neuronas exhiben in vivo.

Entonces, en el primer trabajo se describen las respuestas características de estas neuronas ante un estímulo que mimetiza la excitación fisiológica (como lo es la inyección intracelular de rampas de corriente), antes y después de que las conductancias iónicas que contribuyen a dichas respuestas sean bloqueadas. Dichas conductancias, como se mencionó anteriormente pueden estar trabajando en concierto, oponiéndose ó modulándose una a otra para ajustar la función integradora de la neurona ante un estímulo dado. A este respecto, los transmisores que están presentes en este núcleo, estarían regulando el ajuste que llevan a cabo dichas conductancias (Akins y cols., 1990; Bargas y cols., 1989, 1991; Galarraga y cols., 1989; Surmeier y cols., 1992; Pineda y cols., 1995). De tal manera que el mecanismo de acción de un neurotransmisor dado pueda investigarse, comparando los efectos inducidos por bloqueadores de conductancias iónicas, con aquellos producidos por dicho transmisor. Por lo tanto, el siguiente paso era establecer una comparación

entre los efectos que producen los bloqueadores con los que producen los transmisores, con el propósito de interpretar mejor las acciones modulatorias de los transmisores sobre el disparo, las despolarizaciones inducidas sinápticamente y el procesamiento neural en el neostriado.

Hasta la fecha las acciones de la dopamina sobre las neuronas espinosas medianas de proyección, han mostrado ser múltiples y contradictorias, en tales estudios dichas acciones fueron estudiadas a potenciales muy polarizados y utilizando como protocolo de estimulación pulsos rectangulares de corriente. Con el propósito de obtener resultados más reproducibles y de determinar los mecanismos neuromoduladores de la dopamina, en el presente estudio se investigaron por primera vez las acciones subumbrales *in vitro* de la dopamina y sus agonistas a los receptores D_1 y D_2 sobre las neuronas espinosas medianas, utilizando como estímulo la inyección intracelular de rampas de corriente, el cual mimetiza la activación fisiológica de estas neuronas. Aunque, ya en trabajos anteriores se han analizado en otras clases de neuronas en condiciones de fijación de corriente, las respuestas subumbrales después de aplicar un estímulo de rampa (Jahnsen y Llinás, 1984; Jahnsen 1986; Baldissera y cols., 1987; Yarom y Llinás, 1987; Uchimura y cols., 1989) y en las neuronas neostriatales, en condiciones de fijación de voltaje (Bargas y cols., 1994; Jiang y North, 1991; Surmeier y cols., 1995).

Los resultados mostraron que tanto la dopamina como ambos tipos de agonistas a los receptores D_1 y D_2 , indujeron una reducción en la frecuencia de disparo. Las respuestas obtenidas por estas neuronas en el amplio rango de voltaje subumbral, fueron muy reproducibles cuando se probaron los efectos de la dopamina y sus agonistas D_1 y D_2 bajo el estímulo de la inyección intracelular de la rampa de corriente (0.5nA/s; desde un potencial de membrana de alrededor de -100 hasta alrededor de -40mV). En estudios anteriores en los cuales el potencial de membrana de reposo de las células estudiadas se encontraba más bien muy polarizado, la respuesta principal con la dopamina ó sus agonistas D_1 ó D_2 , fué también una reducción en la frecuencia de disparo neuronal, sin importar el tipo de estímulo empleado (Akaike y cols., 1987; Calabresi y cols., 1987; Cepeda y cols., 1993; Uchimura y cols., 1986). Sin embargo, en el presente estudio se observó que adicionalmente la dopamina redujo la pendiente ó R_N , como se puede observar en la relación I-V de la Figura 2A del 2do. trabajo; únicamente los agonistas tipo D_1 y no los del tipo D_2 , fueron capaces de mimetizar la habilidad de la dopamina en reducir la pendiente ó R_N a potenciales polarizados

(Figura 2B y 2C del 2do. trabajo). El aparente potencial de reversión para esta acción del agonista D_1 , estuvo muy cerca del potencial de equilibrio del potasio. Y cuando se realizaron experimentos de sustitución iónica, la acción de este agonista D_1 sobre la R_N fué suprimida por el Cs^+ , con un aparente potencial de reversión entre los -80 y los -90 mV (Fig. 2D, 2do trabajo).

Una de las propiedades electrofisiológicas que caracterizan a las neuronas neostriatales de proyección, es la pronunciada rectificación que presentan en mayor ó menor grado algunas de estas neuronas, como respuesta evocada a la corriente hiperpolarizante con pulsos rectangulares de corriente (Bargas y cols., 1988; Kawaguchi y cols., 1989) ó con la inyección intracelular de rampas de corriente (primer trabajo de esta tesis). Tomando en conjunto los resultados anteriores, y puesto que en otros tipos de neuronas y en una variedad de preparaciones se han reportado rectificaciones entrantes ó anómalas similares (Kandel y Tauc, 1966; Hagiwara y Takahashi, 1974; Constanti y Galván, 1983), podemos interpretar que el efecto modulador subumbral observado con la dopamina y los agonistas D_1 , podrían ser debidos a la facilitación ó al cambio en la dependencia de voltaje, de una conductancia entrante permeable principalmente al K^+ . Asimismo, como las respuestas observadas con dopamina y sus agonistas D_1 , son bloqueadas por el Cs^+ , y sabemos que el cesio bloquea la rectificación entrante a este nivel (Gay y Stanfield, 1977), en este trabajo podemos hipotetizar que la dopamina y sus agonistas D_1 están actuando sobre un rectificador entrante a nivel subumbral. Un hecho que apoya estas ideas, es que estos efectos persistieron en presencia de la TTX (1mM), la que abolió el disparo neuronal sin ningún cambio en la R_N (Fig. 3B, 2do trabajo). Lo que sugiere que el efecto de la dopamina y de los agonistas D_1 sobre la R_N en la mayor parte del voltaje subumbral (Fig. 3A, 2do. trabajo), no es debido al decremento en la conductancia de sodio (Fig. 5B, primer trabajo), siendo además un efecto postsináptico.

En este trabajo no se caracterizó el subtipo de canal de K^+ rectificador entrante, involucrado en los efectos observados con la dopamina y con el agonista D_1 . Como sabemos, desde 1993 (Kubo y cols., 1993a; Ho y cols., 1993) las técnicas de clonación molecular han puesto en evidencia la existencia de múltiples canales de K^+ rectificadores entrantes (Kir), los cuales pueden considerarse como una familia. Los miembros de la familia de los Kir son codificados por genes separados y aunque presentan regiones de hipervariabilidad en la secuencia de aminoácidos y en el asa extracelular putativa que une a la región (P) (poro) y al dominio transmembranal M1, las

comparaciones entre las secuencias restantes, revelan la presencia de cinco subfamilias de canales Kir, de acuerdo a su grado de identidad. Estas subfamilias pueden ser designadas como Kir1.0, Kir2.0, Kir3.0, Kir4.0 y Kir5.0 de acuerdo a la nomenclatura estandarizada de Chandy y Gutman de 1993 (Doupnik y cols., 1995); aunque en base a su estructura y a sus características fisiológicas los diferentes subtipos pueden ser agrupados tentativamente en tres principales subfamilias (Karshin y cols., 1996): 1) los canales tipo-ROMK (Kir1.0), los cuales son "medianamente" rectificadores, su probabilidad de apertura no es tiempo dependiente y son regulados por el ATP citoplásmico. Cinco variantes son expresadas predominantemente en el riñón, pero también son expresadas en el cerebro (Kir1.1a, Kir1.1b, Kir1.1c, Kir1.1d, Kir1.1e). 2) los canales tipo IRK (Kir2.0), son "fuertemente rectificadores" y su probabilidad de apertura es aparentemente tiempo-dependiente. Debido a sus similitudes estructurales y a sus conductancias unitarias, se pueden definir tres subtipos: el IRK1 (Kir2.1), el IRK2 (Kir2.2) y el IRK3 (Kir2.3), los cuales son expresados en el cerebro de los mamíferos. 3) los canales de la subfamilia tipo GIRK (Kir3.0), comprenden cuatro subunidades diferentes, las cuales están sujetas a la activación de las proteínas G. Los canales GIRK1 fueron aislados inicialmente por expresión de la clonación, del atrio de la rata y se encontró que la probabilidad de su apertura por las subunidades beta-gama es membranalmente regulada. Recientemente, fueron identificados dos canales estructuralmente relacionados del cerebro del ratón: el mbGIRK2 y el mbGIRK3. Un cuarto subtipo (Kir3.4) fué aislado del corazón de la rata y del hipocampo humano (Karschin y cols., 1996).

La distribución celular precisa de las subunidades de los canales IRK1-3 y de los GIRK1-4 en el sistema nervioso central de la rata, fué descrita recientemente a través de un estudio de hibridización *in situ* (Karschin y cols., 1996). El neocórtex, fué de las estructuras cerebrales más prominentemente marcadas con los RNAs mensajeros de los subtipos IRK1 e IRK3, virtualmente todas las células medianas estuvieron fuertemente marcadas con ambos subtipos de RNAs mensajeros. En contraste, el RNAm de IRK2 reveló un patrón de expresión muy diferente. Aunque la mayoría de las células de este núcleo fueron negativas ó débilmente marcadas, todas las células grandes estuvieron marcadas con RNAs mensajeros de IRK2, pero fueron negativas para los RNAs mensajeros de IRK1. Los miembros de la familia de GIRK2 estuvieron ausentes de los ganglios basales, ó se observó únicamente una expresión difusa y débil de los RNAs mensajeros de GIRK1.3

(Karschin y cols., 1996). De gran interés e importancia y quizá el siguiente paso a seguir en nuestro estudio, sería la caracterización fisiológica de los subtipos IRK (1-3) presentes en el neostriado, así como la determinación del subtipo de canal IRK (1-3) a través del cual se llevaron a cabo los efectos observados con la dopamina y sus agonistas D_1 en el presente trabajo.

Por otro lado, observamos que los agonistas al receptor D_2 decrementaron el disparo neuronal, sin un cambio apreciable en la resistencia de entrada (Figs. 1 y 2, 2do. trabajo). Podemos interpretar este hecho de diferentes maneras: que los agonistas a los receptores D_2 no activan canales a nivel subumbral en las neuronas neostriatales (Freedman y Weight, 1988; Greif y cols., 1995; Surmeier y cols., 1993); que los canales activados por los agonistas D_2 se encuentran localizados en un subconjunto diferente de neuronas neostriatales; que la acción farmacológica del agonista D_2 en la rebanada, no fué realmente sobre el receptor D_2 , sino que pudo haber actuado en sus isoformas D_3 ó D_4 (Sibley y Monsma, 1992), ya que la activación de los receptores D_2 inducen un decremento en la resistencia de entrada de otros tipo celulares (Lacey, 1993).

Como mencionamos anteriormente, en estudios previos se ha mostrado que la dopamina puede provocar en condiciones de fijación de corriente, despolarizaciones, hiperpolarizaciones, respuestas bifásicas ó ninguna respuesta. En este trabajo, también se muestra que parte de esta variabilidad, puede deberse a los diferentes potenciales de reposo en los que se encontraban las células registradas, es decir, por abajo, en ó por arriba del potencial de reversión para la acción global de la dopamina. Siendo el potencial de reversión dependiente de la concentración externa de K^+ (Nisenbaum y Wilson, 1995).

Aunque para explicar la represión en el disparo neuronal, no es suficiente un cambio en la rectificación entrante (Benson y Adams, 1987; Wilson, 1993), este mecanismo podría actuar únicamente cuando las células se encuentran a potenciales polarizados (por ejemplo: en el estado "down"; Wilson, 1993). La dopamina puede tener acciones supraumbrales sobre las conductancias de Na^+ , de Ca^{2+} y de K^+ (Surmeier y cols., 1993; Surmeier y Kitai, 1993; Hernández-López y cols., 1996a). Por lo que podría ser que una modulación dopaminérgica compleja sobre otras conductancias iónicas, estuviera a cargo de la afinación del disparo neuronal ó de una respuesta predominante completamente diferente, una vez que la acción subumbral sobre la resistencia de entrada haya sido sobrepasada ó bloqueada. En apoyo a este último argumento, otros moduladores

co-localizados en el neostriado, incluyendo la acetilcolina, pueden ser capaces de cambiar la respuesta principal a la dopamina bloqueando únicamente la rectificación entrante, al igual que lo hizo el Cs^+ (Fig. 4, primer trabajo). De hecho el Cs^+ convirtió la respuesta de la dopamina en excitatoria (Fig.4, 2do. Trabajo). Se ha observado también que a potenciales supraumbrales, los agonistas D_1 inducen corrientes entrantes, por lo tanto las acciones de la dopamina pueden ser diferentes a potenciales de membrana subumbrales que supraumbrales. Siendo principalmente inhibitorias a niveles subumbrales y principalmente facilitatorios a niveles supraumbrales (Hernández-López y cols., 1996b).

En conclusión, aumentando la rectificación entrante, la dopamina aumenta el umbral para alejarse del estado "down" (Wilson, 1993). Sin embargo, si la neurona ya se encuentra en el estado "up", la dopamina puede inducir corrientes entrantes que favorecen el disparo neuronal (Hernández-López y cols., 1996a, 1996b).

Adicionalmente, las acciones observadas con la dopamina y los agonistas D_1 , fueron mimetizadas por el análogo soluble del AMPcíclico (AMPc): dibutilil AMPc (db-cAMP). Como sabemos, este receptor dopaminérgico al igual que otras isoformas, se acopla a efectores intracelulares a través de proteínas G: G_s -ó G_{olr} (Sibley y Monsma, 1992; Herve y cols., 1993) y en el caso de los receptores D_1 , la unión membranal más antigua y mejor conocida es la adenilato ciclasa y la producción de cAMP (Stoof y Keibian, 1984). Nuestros resultados apoyan lo anterior y nos sugieren un posible mecanismo en la acción de la dopamina y del receptor D_1 , el cual involucra elementos de señalamiento citosólico (véase Figura 11).

Análisis Morfológico de las Neuronas Registradas

Siguiendo el método descrito por Horikawa y Armstrong (1988), el análisis morfológico de las células experimentales marcadas con biocitina, mostró que siempre registramos neuronas espinosas medianas de proyección (de acuerdo a los criterios ya establecidos) (Chang y cols., 1982; Wilson, 1992). Las diferencias en las respuestas observadas entre la dopamina-agonistas al receptor D_1 y el agonista al receptor D_2 , no tuvieron ningún correlato con diferentes tipos morfológicos de neuronas (por ejemplo: con diferente densidad de espinas dendríticas, axón restringido ó nó al campo

dendrítico, con diferente diámetro del soma).

Heterogeneidad en los Receptores

En nuestro estudio (2do. trabajo) encontramos que todas las células estudiadas respondieron a uno u otro tipo de agonista dopaminérgico D_1 ó D_2 , es decir no encontramos una correlación entre la acción de un tipo de agonista con un tipo específico de neurona que presentara uno u otro tipo de receptor D_1 ó D_2 .

Dado que todas las células estudiadas respondieron a los agonistas al receptor D_1 y, probablemente únicamente la mitad de las células expresen la isoforma D_{1A} (Sibley y Monsma, 1992; Gerfen, 1992), concluimos que las células que no expresan el receptor D_{1A} poseen la otra isoforma del receptor D_1 : el D_{1B} (Sibley y Monsma, 1992) (como se mencionó en los antecedentes de esta tesis), el cual induce la misma respuesta global. Asimismo, puesto que las respuestas observadas en nuestro estudio (2do. trabajo) con el agonista al receptor D_1 fueron mimetizadas por el db-cAMP, es probable que ambas isoformas D_{1A} y D_{1B} usen el sistema de señalamiento citosólico de la proteína cinasa A-dependiente del AMPc (PKA) (Surmeier y cols., 1995), ya que el agonista al receptor D_1 no discrimina entre los tipos de receptores D_{1A} y D_{1B} (Strange, 1993).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

1. Las respuestas membranales subumbrales de las neuronas espinosas medianas ante la inyección intracelular de rampas de corriente (IIRC), fueron muy complejas, pero reproducibles.
2. En estas neuronas, varios tipos de conductancias iónicas contribuyen a la despolarización subumbral generada por la IIRC.
3. Se determinó que en el rango de voltaje subumbral de estas neuronas, están participando conductancias sensibles a la tetrodotoxina (TTX), al cadmio (Cd^{2+}), a la 4-aminopiridina (4-AP), al tetraetilamonio (TEA) y al cesio (Cs^+). Aunque la contribución y rango de voltaje de activación para cada una de ellas es muy diferente. Todas ellas parecen trabajar en concierto, modulándose u oponiéndose una a la otra, para ajustar la función sináptica de estas neuronas.
4. En casi todas las neuronas espinosas medianas estudiadas, la dopamina y sus agonistas a los receptores D_1 y D_2 , redujeron la frecuencia de disparo evocada por la IIRC.
5. Los agonistas a los receptores D_1 pero no a los D_2 , mimetizaron la habilidad de la DA de reducir la resistencia de entrada neuronal a niveles subumbrales de la trayectoria del voltaje. Esta acción sobre la resistencia de entrada fue suprimida por el Cs^+ .
6. El aparente potencial de reversión para la acción de los agonistas D_1 estuvo cerca del potencial de equilibrio del K^+ .
7. La reducción en la frecuencia de disparo y en la resistencia de entrada inducidas por los agonistas D_1 sobre estas neuronas, involucra conductancias de K^+ sensibles a Cs^+ a nivel subumbral y a nivel postsináptico. En vista de que el Cs^+ bloquea la rectificación entrante a este nivel.
8. El decremento en la frecuencia de disparo inducido por los agonistas D_2 , parece involucrar conductancias iónicas que no se activan a nivel subumbral, ó bien en la rebanada esta acción podría involucrar a las isoformas D_3 ó D_4 y no a la D_2 .

9. Los efectos observados con los agonistas D_{11} , pudieron ser mediados por el receptor D_5 , dado que los agonistas empleados no discriminan entre uno y otro tipo de isoforma. Ambas isoformas parecen utilizar el sistema de señalamiento intracelular de la proteína cinasa A, ya que el dibutilil-AMPC (análogo del AMPcíclico) mimetizó los efectos observados con la DA y los agonistas D_1 .

REFERENCIAS

-A-

- Adams, P.R. and Galvan, M. Voltage-dependent currents of vertebrate neurons and their role in membrane excitability. *Adv. Neurol.* 44: 137-170, 1986.
- Akaike, A., Ohno, Y., Sasa, M. and Takaori, S. Excitatory and inhibitory effects of dopamine on neuronal activity of the caudate neurons in vitro. *Brain Res.* 418: 262-272, 1987.
- Akins, P.T., Surmeier, D.J. and Kitai, S.T. Muscarinic modulation of the transient potassium current in rat neostriatal neurons. *Nature* 344: 240-242, 1990.
- Albin, R.L. Young, A.B. and Penney, J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TINS* 12: 366-375, 1990.
- Alexander, G.E. and Crutcher, M.D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *TINS* 13: 266-276, 1990.
- Anderson, M.E. Discharge patterns of basal ganglia neurons during active maintenance of postural stability and adjustment to chair tilt. *Brain Res.* 143: 325-338, 1977.
- Ariano, M.A., Monsma, Jr., F.J., Barton, A.C., Kang, H.Ch., Haugland, R.P. and Sibley, D.R. Direct visualization and cellular localization of D₁ and D₂ dopamine receptors in rat forebrain by use of fluorescent ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8570-8574, 1989.
- Arnt, J. and Hyttel, J. Differential inhibition by dopamine D-1 and D-2 antagonists of circling behaviour induced by dopamine agonists in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Eur. J. Pharmacol.* 102: 349-354, 1984.

-B-

- Baldissera, F., Campadelli, P. and Piccinelli, L. The dynamic response of cat gastrocnemius motor units investigated by ramp-current injection into their motoneurons. *J. Physiol (Lond)* 387: 317-330, 1987.
- 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.

- Bargas, J., Surmeier, D.J. and Kitai, S.T. High-voltage and low-voltage activated calcium currents are expressed by neurons cultured from embryonic rat striatum. *Brain Res.* 541: 70-74, 1991b.
- Bargas, J., Galarraga, E. and Surmeier, D.J. Neuronal networks of the mammalian brain have functionally different classes of neurons, in *Neuroscience: From Neural Networks to Artificial Intelligence* (P. Rudomín, M.A. Arbib, F. Cervantes and R. Romo, Eds.). Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 3-32, 1993.
- Bargas, J., Howw, A., Eberwine, J., Cao, Y. and Surmeier, D.J. Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely-isolated, adult rat neostriatal neurons. *J. Neurosci.* 14: 6667-6686, 1994.
- Bargas, J. and Galarraga, E. Ion Channels: Keys to neuronal specialization. In: *The Handbook of Brain Theory and Neuronal Networks* (M.A. Arbib, Ed.) Bradford Books. The MIT Press, Massachusetts, pp. 496-501, 1995.
- Beckstead, R.M. Convergent prefrontal and nigral projections to the striatum of the rat, *Neurosci. Lett.*, 12: 59-64, 1979.
- Beckstead, R.M. and Cruz, C.J. Striatal axons to the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra come mainly from separate cell populations in cat. *Neuroscience* 19: 147-158, 1986.
- Benson, J.A. and Adams, W.B. The Control of Rhythmic Neuronal Firing. In: Kaczmarek, L.K. and Levitan, I.B. (Eds.). *Neuromodulation: The Biochemical Control of Neuronal Excitability*. Oxford University Press, pp. 101-118, 1987.
- Bentivoglio, M., Van der Kooy, D. and Kuypers, H.G. J.M. The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res.*, 174: 1-18, 1979.
- Bernstein, J. Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Erster Theil. *Pflügers Arch.* 92: 521-562, 1902.
- Bernstein, J. *Elektrobiologie*. Vieweg, Braunschweig, 215 pp. (1,2,10,18), 1912.
- Bertorello, A.M., Hopefield, J.F., Aperia, A. and Greengard, P. Inhibition by dopamine of $(Na^+ K^+)$ ATPase activity in neostriatal neurons through D_1 and D_2 dopamine receptor synergism. *Nature (London)* 347: 386, 1990.

- Bishop, G.A., Chang, H.T. and Kitai, S.T. Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: An intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 7: 179-191, 1982.
- Bolam, J.P., Clark, D.J., Smith, A.D. and Somogyi, P. A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates [³H] gamma-aminobutyric acid: Combination of Golgi-staining, autoradiography and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 213: 121-134, 1983.
- Bolam, J.P., Ingham, C.A., Izzo, P.N., Levy, A.I., Rye, D.B., Smith, A.D. and Wainer, B.H. 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, 1986.
- Bolam, J.P., Wainer, B.H. and Smith, A.D. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi impregnation and electron microscopy. *Neuroscience*, 12: 711-718, 1984b.
- Bolam, J.P., Smith, Y., Ingham, C.A., von Krosigk, M. and Smith, A.D. Convergence of synaptic terminals from the striatum and the globus pallidus onto single neurones in the substantia nigra and the entopeduncular nucleus. *Prog. Brain Res.* 99: 73-88, 1993.
- Breese, G.R., Duncan, G.E., Napier, T.C., Bondy, S.C., Iorio, L.C. and Mueller, R.A. 6-hydroxydopamine treatments enhance behavioral responses to intracerebral microinjections of D₁- and D₂- dopamine agonists into nucleus accumbens and striatum without changing dopamine antagonist binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 167-176, 1987.
- Bunzow, J.R., Van Tol, H.H.M., Grandy, D., Albert, P., Salon, J., et al. Cloning and expression of a rat D₂ dopamine receptor cDNA. *Nature* 336: 783-787, 1988.
- Butcher, L.L. and Hodge, G.K. Postnatal development of acetylcholinesterase in the caudate-putamen nucleus and substantia nigra of rats. *Brain Res.* 106: 223-240, 1976.

-C-

- Cajal, S.R. *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, Madrid: N. Moya, 1899.
- Calabresi, P., Mercuri, N., Stanzione, P., Stefani, A. and Bernardi, G. Intracellular studies on the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons IN VITRO: evidence for D₁ receptor involvement. *Neuroscience* 20: 757-771, 1987.

- Calabresi, P., Benedetti, M., Mercuri, N.B. and Bernardi, G. Depletion of catecholamines reveals inhibitory effects of bromocryptine and lysuride on neostriatal neurons recorded intracellularly IN VITRO. *Neuropharmacology* 27: 579- , 1988a.
- Calabresi, P., Benedetti, M., Mercuri, N.B. and Bernardi, G. Endogenous dopamine and dopaminergic agonists modulate synaptic excitation in neostriatum: Intracellular studies from naive catecholamine-depleted rats. *Neuroscience* 27: 145- , 1988b.
- Calabresi, P., Mercuri, N. B., Stanzione, P., Stefani, A. and Bernardi, G. Synaptic and Intrinsic Control of Membrane Excitability of Neostriatal Neurons. I. An in vivo Analysis. *J. Neurophysiol.* 63: 651-662, 1990.
- Carlsson, A. Pre- and Postsynaptic Receptors. In: Usdin E., Bunney Jr. E., Eds. New York, Decker, pp 49, 1975.
- Cepeda, C., Buchwald, N.A. and Levine, M.S. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 9576-9580, 1993.
- Clark, D. and White, F.J. Review: D1 Dopamine Receptor-The Search for a Function: A Critical Evaluation of the D₁/D₂ Dopamine Receptor Classification and its Functional Implications. *Synapse* 1: 347-388, 1987.
- Connors, J.D. Caudate unit response to nigral stimuli: evidence for a possible nigro-striatal pathway. *Science* 160: 899-900, 1968.
- Coombs, J.S., Eccles, J.C. and Fatt, P. The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory postsynaptic potential. *J. Physiol. (Lond.)* 130: 326-373, 1955.
- Constanti, A. and Galván, M. A fast inward rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurons. *J. Physiol. (Lond)* 385: 153-178, 1983.
- Crill, W.E. and Schwindt, P.C. Active currents in mammalian central neurons. *TINS* 6: 236-240, 1983.
- Ch-**
- Chang, H.T., Wilson, C.J. and Kitai, S.T. Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: A light and electron microscopic study. *Science* 213: 915-918, 1981.

- Chang, H.T., Wilson, C.J. and Kitai, S.T. A Golgi study study of rat neostriatal neurons: Light microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 208: 107-126, 1982.

- Chang, H.T. and Kitai, S.T. Large neostriatal neurons in the rat: An electron microscopic study of gold-toned Golgi-stained cells. *Brain Res. Bull.* 8: 631-643, 1982.

-D-

- Dahlstrom, A. and Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand. (Suppl.)*, 232: 1-55, 1964.

- Danner, H. and Pfister, C. Untersuchungen zur Struktur des Neostriatum der Ratte. *J. Hirnforsch.* 20: 285-301, 1979a.

- Danner, H. and Pfister, C. Zur Struktur des Neostriatum der Ratte. *Gegenbaurs Morphol. Jahrb.* 125 (3):S. 349-364, 1979b.

- DeKeyser, J. and Ebinger, G. Neostriatal dopamine receptors. *Trends Neurosci.*, 13: 324, 1990.

- DeLong, M.R. Putamen activity of single units during slow and rapid arm movements. *Science* 179: 1240-1242, 1973.

- De Long, M. and Georgopoulos, A.P. Motor functions of the basal ganglia. In: J.M. Brookhart. V.B. Mountcastle. V.B. Brooks and S.R. Geiger (Eds.) *Handbook of Physiology. Sect. 1. The Nervous System Vol.2. Motor Control, Part 2.* American Physiological Society, Bethesda. MA, 1981, pp 1017-1061.

- DiChiara, G., Morelli, M. and Consolo, S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *TINS* 17: 228-233, 1994.

- DiFiglia, M., Pasik, P and Pasik, T. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 114: 245-256, 1976.

- DiFiglia, M., Pasik, T. and Pasik, P. A Golgi study of afferent fibres in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 152: 341-347, 1978.

- DiFiglia, M. and Carey, J. Large neurons in the primate neostriatum examined with the combined Golgi-electron microscope. *J. Comp. Neurol.* 244: 36-52, 1986.

- DiFiglia, M. Synaptic organization of cholinergic neurons in the monkey neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 255: 245-258, 1987.

- DiFiglia, M. and Rafols, J.A. Synaptic organization of the globus pallidus. *J. Electron Microsc.* 10:247-263, 1988.

- Doupnik, C.A. Davidson, N. and Lester, H.A. The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. in Neurobiol.* 5: 268-277, 1995.

- Dubé, L., Smith, A.D. y Bolam, J.P. Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origin in contact with distinct medium size spiny neurons in the rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 267: 455-471, 1988.

-E-

- Enz, A., Goldstein, M. and Meller, E. Dopamine agonist-induced elevation of striatal acetylcholine: Relationship between receptor occupancy and response in normal and denervated rat striatum. *Mol. Pharmacol.* 37: 560-565, 1990.

-F-

- Fass, B. and Butcher L.L. Evidence for a crossed nigrostriatal pathway in rats. *Neurosci. Letters* 22: 109-113, 1981.

- Filloux, F., Dawson, T.M. and Wamsley, J.K. Localization of nigrostriatal dopamine receptor subtypes and adenylate cyclase. *Brain Res. Bull.*, 20: 447-459, 1988a.

- Fox, C.A. and Rafols, J.A. The striatal efferents in the globus pallidus and in the substantia nigra. In: *The Basal Ganglia* (Yahr, M.D., ed.) New York: Raven Press pp.37-55, 1976.

- Freund, T.F., Powell, J.F. and Smith, A.D. Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons with special reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13: 1189-1215, 1984.

- Freedman, J.E. and Weight, F.F. Single K⁺ channels activated by D₂ dopamine receptors in acutely dissociated neurons from rat corpus striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3618-3622, 1988.

- Frigyesi, T.L. and Purpura, D.P. Electrophysiological analysis of reciprocal caudate-nigral relations. *Brain Res.* 6: 440-456, 1967.

-G-

- Gandelman, K.Y., Harmon, S., Todd, R.D. and O'Malley, K.L. Analysis of the structure and expression of the human dopamine D_{2A} receptor gene. *J. Neurochem.*, 56: 1024-1029, 1991.

- Galarraga, E., Bargas, J. and Aceves, J. Slow sodium and I_A currents in neostriatal neurons. Soc. Neurosci. Abstr. 11: 202, 1985.
- 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.
- Galarraga, E. and Bargas, J. Firing patterns in substantia nigra compacta identified neurons in vitro. J. Arch. Med. Res. 26: 191-199, 1995.
- Gay, L.A. and Stanfield, P.R. Cs^+ causes a voltage-dependent block of inward K^+ currents in resting skeletal muscle fibres. Nature 267: 169-170, 1977.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma Jr. F.J. and Sibley, D.R. D_1 and D_2 Dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. Science 250: 1429-1435, 1990a.
- Gerfen, C.R. The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. Science 246: 385-388, 1990b.
- Gerfen, C.R., McGinty, J.F. and Young III, W.S. Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P and enkephalin expression in striatal neurons: In situ hybridization histochemical analysis. J. Neurosci. 11: 1016-1031, 1992a.
- Gerfen, C.R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. Ann. Rev. Neurosci. 15: 285-320, 1992b.
- Gerfen, C.R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. Trends Neurosci. 15: 133-139, 1992c.
- Gerfen, C.R. D_1 and D_2 dopamine receptor regulation of striatonigral and striatopallidal neurons. Semin. Neurosci., 4: 109-118, 1992d.
- Gingrich, J.A. and Caron, M.G. Recent Advances in the Molecular Biology of Dopamine Receptors. Annu. Rev. Neurosci. 16: 299-321, 1993.
- Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J. and Schwartz, J.C. Alternative splicing directs the expression of two dopamine receptors isoforms. Nature 342: 923, 1989.
- Graybiel, A.M. Neurotransmitters and Neuromodulators in the basal ganglia. TINS 13: 244-254, 1990.

- Graveland, G.A. and DiFiglia, M. The frequency and distribution of medium sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res.* 327: 307-311, 1985.
- Greif, G.J., Lin, Y.J., Liu, J.C. and Freedman, E. Dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons: specific activation and cellular expression. *J. Neuroscience* 15: 4533-4544, 1995.
- Grofova, I. Types of striatonigral neurons labeled by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Appl. Neurophysiol.*, 42: 25-28, 1979.
- Groves, P. M. Synaptic endings and their postsynaptic targets in neostriatum: Synaptic specializations revealed from analysis of serial sections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2629-2669, 1980.

-H-

- Hagiwara, S. and Takahashi, K. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of starfish egg cell. *J. Membr. Biol.* 18: 61-80, 1974.
- Hammond, C. and Crepel, F. Evidence of a slowly inactivating K^+ current in prefrontal cortical cells. *Eur. J. Neurosci.*, 4: 1087-1092, 1992.
- Hedreen, J.C. and DeLong, M.R. Organization of striatopallidal and striatonigral and nigrostriatal projections in the macaque. *J. Comp. Neurol.* 304: 569-595, 1991.
- Heikkila, R.E., Shapiro, B.S. and Duvoisin, R.C. The relationship between loss of dopamine nerve terminals, striatal [3H] spiroperidol binding and rotational behavior in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.* 211: 285-292, 1981.
- Herrling, P.L. and Hull, C.D. Iontophoretically applied dopamine depolarizes and hyperpolarizes the membrane of cat caudate neurons. *Brain Res.* 192: 441-462, 1980.
- Hernández-López, S., Bargas, J., Reyes, A. and Galarraga, E. Dopamine modulates the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *Neuroreport* 7: 454-456, 1996a.
- Hernández-López, S., Bargas, J., Reyes, A. and Galarraga, E. Excitatory action of dopamine in neostriatal neurons involves a Ca^{2+} conductance of the L type. 26th Annual Neuroscience Meeting 1996b.
- Herve, D., Levi-Strauss, M., Marey-Semper, I., Verney, C., Tassin, J.P., Glowinski, J. and Girault, J.A. G_{off} and G_s in rat basal ganglia: possible involvement of G_{off} in the coupling of dopamine D_1 receptor with adenylyl cyclase. *J. Neurosci.* 13: 2237-2248, 1993.

- Hille, B. Ionic Channels of Excitable Membranes. In: Sinauer associates (Eds.) 2nd. Edition. Sunderland, Massachusetts, 1992.
- Hille, B. and Seeburg, P.H. Signalling mechanisms. *Curr. Opinion in Neurobiol.* 5: 265-267, 1995.
- Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V. and Hebert, S.C. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362: 31-38, 1993.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. and Katz, B. Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch. Sci. Physiol.* 3: 129-150, 1949.
- Hodgkin, A.L. The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. *Biol. Rev.* 26: 339-409, 1951.
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 117: 500-544, 1952d.
- 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.
- Hornykiewicz, O. Dopamine and Brain Function. *Pharmacol. Rev.* 18: 925-964, 1966.
- Hounsgaard, J. and Kiehn, O. Ca²⁺-dependent bistability induced by serotonin in spinal motoneurons. *Exp. Brain Res.* 57: 422-425, 1985.
- Hu, X.T., Wachtel, S.R., Galloway, M.P. and White, F.J. Lesions of the nigrostriatal dopamine projection increase the inhibitory effects of D₁ and D₂ dopamine agonists on caudate-putamen neurons and relieve D₂ receptors from the necessity of D₁ receptor stimulation. *J. Neurosci.* 10: 2318-2329, 1990.
- Hu, X.T. and White, F.J. Loss of D₁/D₂ dopamine receptor synergisms following repeated administration of D₁ or D₂ receptor selective antagonists: Electrophysiological and Behavioral studies. *Synapse* 17: 43, 1994.
- Hull, C.D., Bernardi, G., and Buchwald, N.A. Intracellular responses of caudate neurons to brain stem stimulation. *Brain Res.* 22: 163-179, 1970.
- Hull, C.D., Levine, M.S., Buchwald, N.A., Heller, A. and Browning, R.A. The spontaneous firing pattern of forebrain neurons. I. The effects of dopamine and non-dopamine depleting lesions on caudate unit firing patterns. *Brain Res.* 73: 241-262, 1974.

-J-

- Jahnsen, H. and Llinás, R. Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurons: an in vitro study. *J. Physiol. (Lond)* 349: 205-226, 1984.
- Jahnsen, H. Electrophysiological characteristics of neurons in the guinea-pig deep cerebellar nuclei in vitro. *J. Physiol. (Lond)* 372: 129-147, 1986.
- Jiang, Z.G. and North, R.A. Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro. *J. Physiol. (Lond)* 443: 533-553, 1991.
- Jungberg, T.I. and Ungerstedt, U. Sensory inattention produced by 6-hydroxydopamine-induced degeneration of ascending dopamine neurons. *Exp. Neurol.* 53: 585-600, 1976.

-K-

- Kandel, E.R. and Tauc, L. Anomalous rectification in the metacerebral giant cells and its consequences for synaptic transmission. *J. Physiol. (Lond)* 183: 287-304, 1966.
- Kanterman, R.Y., Mahan, L.C., Briley, E.M., Monsma, F.Jr., Sibley, D.R., Axelrod, J. and Felder, C.C. Transfected D₂ Dopamine Receptors Mediate the Potentiation of Arachidonic Acid Release in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol. Pharmacol.*, 39: 364-369, 1991.
- Karschin, Ch., Dibmann, E., Stühmer and Karschin, A. IRK (1-3) and GIRK (1-4) Inwardly Rectifying K⁺ Channel mRNA Are Differentially Expressed in the Adult Rat Brain. *J. Neurosci.* 16: 3559-3570, 1996.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J. and Emson, P.C. Intracellular recordings of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *J. Neurophysiol.* 62: 1052-1068, 1989.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J. and Emson, P.C. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. of Neurosci.* 10: 3421-3436, 1990.
- Keibian, J.W. and Calne, D.B. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96, 1979.
- Kemp, J.M. and Powell, T.P.S. The structure of caudate nucleus of the cat: Light and Electron microscopy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol]* 262: 383-401, 1971.
- Kemp, J.M. and Powell, T.P.S. The synaptic organization of the caudate nucleus. *Philos. Trans. Soc. Lond. [B]* 262: 403-412, 1971a.

- Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. and McGeer, E.G. The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 200: 151-201, 1981.
- Kita, H., Kita, T. and Kitai, S.T. Regenerative potentials in rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparations. *Exp. Brain Res.* 60: 54-62, 1985.
- Kita, H., Kita, T. and Kitai, S.T. Active membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparations. *Exp. Brain Res.* 60: 54-62, 1985a.
- Kita, H. GABAergic circuits of the striatum. *Progr. Brain Res.* 99: 51-72, 1993.
- Kubo, Y., Baldwin, T.J., Jan Y.N. and Jan, L.Y. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362:127-133, 1993a.
- Kubota, Y. and Kawaguchi, Y. Spatial Distributions of Chemically Identified Intrinsic Neurons in Relation to Patch and Matrix Compartments of Rat Neostriatum. *J. Comp. Neurology* 332: 499-513, 1993.
- L-**
- Lacey, M.G. Neurotransmitter receptors and ionic conductances regulating the activity of neurons in substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area, *Prog. Brain Res.* 99: 251-275, 1993.
- Langer, S.Z., Pimoule, C., Reynolds, G.P. and Shoemaker, H. Dopaminergic denervation does not affect [³H]-SCH23390 binding in the rat striatum. *Br. J. Pharmacol.* 87: 161, 1986.
- Levey, A.I., Hersh, S.M., Rye, D.B. Sunahara, R.K., Niznik, H.B., Kitt, Ch.A., Price, D.L., Maggio, M.R. and Ciliax, B.J. Localization of D₁ and D₂ dopamine receptors in brain with subtype specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8861-8865, 1993.
- Ljungberg, T. and Ungestedt, U. Sensory inattention produced by 6-hydroxydopamine-induced degeneration of ascending dopamine neurons in the brain. *Exp. Neurol.* 53: 585-600, 1976.
- Llinás, R.R. The Intrinsic Electrophysiological Properties of Mammalian Neurons: Insights into Central Nervous System Function. *Science* 242: 1654-1664, 1988.
- Loughlin, S.E. and Fallon, J.H. Mesostriatal projections from ventral tegmentum and dorsal raphe: cells project ipsilaterally or contralaterally but not bilaterally. *Neuroscience Lett.* 32: 11-16, 1982.
- Lu, E.J. and Brown, W.J. The developing caudate nucleus in the euthyroid and hypothyroid rat. *J. Comp. Neurol.* 171: 261-284, 1977.

-M-

- Mansour, A., Meador-Woodruff, S.H., Bunzow, J.R., Civelli, O., Akil, H. and Watson, S.J. Localization of dopamine D₂ receptor mRNA and D₁ and D₂ receptor binding in rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiography analysis. *J. Neurosci.*, 10: 2587-2600, 1990.
- Marsden, C.D. Function of the basal ganglia as revealed by cognitive and motor disorders in Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.*, 11: 129-135, 1984.
- Meador-Woodruff, S.H., Mansour, A., Healy, D.J., Kuehn, R., Zhou, Q., Bunzow, J.R., Akil, H., Civelli, O. and Watson, S.J. Comparison of the distribution of D₁ and D₂ dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5: 231-242, 1991.
- Mengod, G., Martínez-Mir, M.I., Vilaro, M.T. and Palacios, J.M. Localization of the mRNA for the dopamine D₂ receptor in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8560-8564, 1989.
- Martin, L.J., Hadfield, M.G., Dellovade, T.L. and Price, D.L. The striatal mosaic in primates: Patterns of neuropeptide immunoreactivity differentiate the ventral from the dorsal striatum. *Neuroscience* 43: 397-417, 1991.
- McCormick, D.A. Membrane Properties and Neurotransmitter Actions. In: Gordon M. Shepherd (ed.) *The synaptic Organization of the Brain.*, Oxford University Press, New York, pp 32-66, 1990.
- McCormick, D.A. Functional properties of a slowly inactivating potassium current in guinea pig dorsal lateral geniculate relay neurons. *J. Neurophysiol.* 66: 1176-1189, 1991.
- McGeer, P.L., McGeer, E.P., Scherer, U. and Singh, K. A glutamatergic corticostriatal path? *Brain Res.*, 128: 369-373, 1977.
- Mensah, P. and Deadwyler, S. The caudate nucleus of the rat: Cell types and the demonstration of a commissural system. *J. Anat.* 117: 281-293, 1974.
- Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Levey, A.I. and Wainer, B.H. Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience*, 12: 669-686, 1984.

- Monsma, F.J., McVittie, L.D., Gerfen, S.C., Mahan, S.C. and Sibley, D.R. Multiple D₂ dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342: 926, 1989.

-N-

- Nagai, T., Pearson, T., Peng, F., McGeer, E.G. and McGeer, P.L. Immunohistochemical staining of the human forebrain with monoclonal antibody to human choline acetyltransferase. *Brain Res.* 265: 300-306, 1983.

- Nicoll, R.A., Malenka, R.C. and Kauer, J.A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Reviews*, 70: 513-565, 1990.

- 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.

- Nisenbaum, E.S. and Wilson, C.J. Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J. Neurosci.* 15: 4449-4463, 1995.

-O-

- O'Dowd, B.F., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. Structure of the adrenergic and related receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 12: 67-83, 1989.

- Oertel, W.H. and Mugnaini, E. Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci. Lett.* 47: 233-238, 1984.

- Ogata, N. and Tatebayashi, H. Sodium current kinetics in freshly isolated neostriatal neurons of the adult guinea pig. *Pflugers Arch.* 416: 594-603, 1990.

-P-

- Parent, A. and O'Reilly-Fromentin, J. Distribution and morphological characteristics of acetylcholinesterase-containing neurons in the basal forebrain of the cat. *Brain Res. Bull.*, 8: 183-196, 1982.

- Parent, A., Bouchard, C. and Smith, Y. The striatopallidal and striatonigral projections: two distinct fiber systems in primate. *Brain Res.* 303: 385-390, 1984.

- Parent, A. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends in Neurosci.* 13 (7): 254-258, 1990.

- Parent, A. and Hazrati, L-N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Reviews* 20: 91-127, 1995.

- Paul, M.L., Graybiel, A.M., David, J. and Robertson, H.A. D₁-like and D₂-like dopamine receptors synergistically activate rotation and c-fos expression in the dopamine depleted striatum in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neuroscience* 12: 3729, 1992.
- Phelps, P.E., Houser, C.R. and Vaughn, J.E. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J. Comp. Neurol.*, 238: 286-307, 1985.
- Pineda, J.C., Galarraga, E., Bargas, J., Cristancho, 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.
- Pineda, J.C., Bargas, J., Flores-Hernández, J. and Galarraga, E. Muscarinic receptors modulate the after-hyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 281: 271-277, 1995.
- Piomelli, D., Pilon, C., Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P. and Schwartz, J.Ch. Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D₁/D₂ receptor synergism. *Nature* 353: 164-167, 1991.
- Precht, W. and Yoshida, M. Blockage of caudate-evoked inhibition of neurons in the substantia nigra by picrotoxin. *Brain Res.* 32: 229-233, 1971.

-R-

- Ramón y Cajal, S. *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, II*, trans. L. Azoulay. Paris: Maloine, 1911.
- 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.
- Robbins, T.W. and Everitt, B.J. Introduction: Milestones in dopamine research. *Semin. Neurosci.*, 4: 93-97, 1992.
- Royce, G.J. Cells of origin of subcortical afferents to the caudate nucleus: a horseradish peroxidase study in the cat. *Brain Res.*, 153: 465-475, 1978.
- Rudy, B. Diversity and ubiquity of K⁺ channels. *Neuroscience* 25: 729-749, 1988.
- Rutherford, A., García-Muñoz, M. and Arbuthnott, G.W. An afterhyperpolarization recorded in striatal cells "in vitro": effect of dopamine administration. *Exp. Brain Res.* 71: 399-405, 1988.

-S-

- Satoh, K. and Fibiger, H.C. Distribution of central cholinergic neurons in the baboon (*Papio papio*). I. General morphology. *J. Comp. Neurol.*, 236: 197-214, 1985.
- Sedgwick, E.M. and Williams, T.D. The response of single units in the caudate nucleus to peripheral stimulation. *J. Physiol. (London)*, 189: 281-298, 1967.
- Selemon, L.D. and Goldman-Rakic, P.S. Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J. Neurosci.*, 5: 776-794, 1985.
- Schwartz, J.C., Giros, B., Martres, M.P. and Sokoloff, P. The dopamine receptor family: molecular biology and pharmacology. *Semin. Neurosci.*, 4: 99-108, 1992.
- Schwindt, P.C. and Crill, W.E. Transformation of synaptic input into spike trains in central mammalian neurons. In: *Textbook of Physiology Vol. 1*. Patton H.D., Fuchs A.F., Hille, B., Scher, A.M. and Steiner, R. (Eds.) W.B. Saunders Co. Philadelphia. pp.264-284, 1989.
- Sibley, D.R. Cloning of a D₃ receptor subtype expands dopamine receptor family. *TIPS* 12: 7-9, 1991.
- Sibley, D.R. and Monsam, F.J.Jr Molecular biology of dopamine receptors. *TIPS* 13: 61-69, 1992.
- Skirboll, L. R., Grace, A.A. and Bunney, B.S. Dopamine auto- and postsynaptic receptors: Electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists. *Science*, 206: 80-82, 1979.
- Smith, Y. and Parent, A. Distribution of acetylcholinesterase-containing neurons in the basal forebrain and upper brainstem of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain Res. Bull.*, 12: 95-104, 1984.
- Smith, A.D. and Bolam, J.P. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *Trends Neurosci.* 13: 259-265, 1990.
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.P., Bouthenet, M.L. and Schwartz, J.C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 347: 146-151, 1990.
- Stoof, J.C. and Kebabian, J.W. Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sci.* 35: 2281-2296, 1984.

- Storm, J.F. Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. *Nature Lond.* 336: 379-383, 1988.
 - Strange, P.G. Aspects of the structure of the D₂ dopamine receptor. *Trends Neurosci.*, 13: 373-377, 1990b.
 - Strange, P.G. Interesting times for dopamine receptors. *Trends Neurosci.*, 14: 43-45, 1991a.
 - Strange, P.G. Neuroleptic drugs and dopamine receptors. *Am. J. Psychiatry* 148: 1101, 1991b.
 - Strange, P.G. Receptors for Neurotransmitters and related substances. *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2: 269-277, 1991c.
 - Strange, P.G. Dopamine receptors: structure and function. *Prog. Brain Res.* 99: 167-179, 1993.
 - Strange, P.G. New Insights into Dopamine Receptors in the Central Nervous System. *Neurochem. Int.*, 22: 223-236, 1993.
 - Sugimori, M., Preston, R.J. and Kitai, S.T. Response properties and electrical constants of caudate nucleus neurons in the cat. *J. Neurophysiol.* 41: 1662-1675, 1978.
 - Surmeier, D.J., Bargas, J. and Kitai, S.T. Voltage-clamp analysis of a transient potassium current in rat neostriatal neurons. *Brain Res.* 473: 187-192, 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.* 122: 41-46, 1991.
 - Surmeier, D.J., Eberwine, J., Wilson, C.J., Cao, Y., Stefani, A. and Kitai, S.T. Dopamine receptor subtypes co-localize in rat striatonigral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10178-10182, 1992.
 - 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.
 - Surmeier, D.J., Bargas, J., Hemmings, H.C., Nairn, A.C. and Greengard, P. Modulation of calcium currents by a D₁ dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14: 385-397, 1995.
- T-**
- Todd, R.D. and O'Malley, K.L. Family Ties: The Dopamine D₂-Like Receptor Genes. *RBI Neurotransmissions Vol. IX (3)*: 1-4, 1993.
 - Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R., and Fox, A.P. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 11: 431-438, 1988.

- Tsien, R.W., Ellinor, P.T. and Home, W.A. Molecular diversity of voltage dependent Ca^{2+} -channels. TIPS 12: 349-355, 1991.

-U-

- Uchimura, N., Higashi, H. and Nishi, S. Hyperpolarizing and depolarizing actions of dopamine via D-1 and D-2 receptors on nucleus accumbens neurons. Brain Res. 375: 368-372, 1986.

- Uchimura, N., Cherubini, E. and North, A. Inward rectification in rat nucleus accumbens neurons. J. Neurophysiol. 62: 1280-1286, 1989.

- Ungerstedt, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. Acta Physiol. Scand. (Suppl.) 367: 69-93, 1971.

-W-

- Waddington, J.L. and Daly, S.A. Regulation of unconditioned motor behaviour by $D_1:D_2$ interaction. In: $D_1:D_2$ Dopamine receptor interactions. J. Waddington, ed., Academic Press, San Diego, CA. pp. 51-78, 1993.

- Wichmann, T. and DeLong, M. Pathophysiology of Parkinsonian Motor Abnormalities. Adv. Neurology 60: 53-61, 1993.

- Wilson, C.J. and Groves, P.M. 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. 194: 599-615, 1980.

- Wilson, C.J. and Groves, P.M. Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. Brain Res. 220: 67-80, 1981.

- Wilson, C. J. Basal Ganglia. In: The Synaptic Organization of the Brain. Chapter 9, pags.279-316. Gordon M. Shepherd, Oxford University Press. New York-Oxford, 1990.

- Wilson C.J. Dendritic morphology, inward rectification and the functional properties of neostriatal neurons. In: Single neuron computation. Academic, Boston, pp 141-171, 1992.

- Wilson, C.J. The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. Prog. Brain Res. 99: 277-297, 1993.

-Wilson, C.J. and Kawaguchi, Y. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. J. Neurosci. 16: 2397-2410, 1996.

-Y-

- Yarom, Y. and Llinás, R. Long-Term modifiability of anomalous and delayed rectification in guinea pig inferior olivary neurons. *J. Neurosci.* 7: 1166-1177, 1987.

-Z-

- Zimmermann, H. Second messenger cascades. In Zimmerman (ed.). *Synaptic Transmission: Cellular and Molecular Basis.* Thieme/Oxford, pp. 95-95, 1993.