

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS

21

EPILEPSIA INDUCIDA POR LA 4-AMINOPIRIDINA EN EL
CIRCUITO CORTEZA ENTORRINAL - HIPOCAMPO Y SU
RELACION CON EL GLUTAMATO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
PRESENTA

M. en C Laura Guadalupe Medina Ceja

Director de Tesis: Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO. D. F. 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neuroquímica del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Laboratorio de Neurobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia y la asesoría del Dr. Alberto Morales Villagrán.

DEDICATORIA

A José Alberto y Adrián Alejandro

Los amo...

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes Instituciones:

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

Universidad de Guadalajara

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

por brindarme el apoyo para seguir adelante en mi desarrollo académico.

A los integrantes del jurado:

Dr. Jorge Aceves

Dra. Clorinda Arias

Dr. Federico Bermúdez

Dr. Julio Morán

Dra. Luisa Rocha

Dr. Francisco Pellicer

Dr. Marcos Velasco

por sus consejos para mejorar este trabajo.

A:

Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia

Dr. Alberto Morales Villagrán

por su comprensión, apoyo y esfuerzo que me brindaron para seguir adelante en este camino.

A los cuates del laboratorio de Ricardo, por ser como son.

A *José Alberto y Adrián Alejandro* por comprender las salidas frecuentes de su mamá para terminar con esta etapa de mi vida.

A *Claudia Farias* por brindarme los momentos más cálidos y agradables de mi niñez, porque en tu partida te llevaste parte de mi ser, gracias en donde estés.

A *Alfredo y Lupita*, por ser los mejores padres y amigos.

A *Pepe y Liz*, por ser los cuates de toda la vida.

A *Tere Montiel*, por todo el apoyo brindado y ser la mejor amiga que he tenido.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN _____	1
ABSTRACT _____	3
LISTA DE ABREVIATURAS _____	5
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS _____	7
INTRODUCCIÓN _____	9
I. Modelos de Epilepsia y microdiálisis _____	9
II. Modelo de crisis por 4-aminopiridina _____	10
1. Modelo de crisis convulsivas _____	10
2. Bloqueo de canales de potasio _____	12
3. Liberación de neurotransmisores _____	14
III. Transportadores de glutamato _____	16
Trabajo "On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo" (1999). Tapia, R., Medina- Ceja, L. y Peña, F. <i>Neurochemistry International</i> , 34 : 23-31.	
IV. Circuito corteza entorrinal-hipocampo _____	21
1. Anatomía del circuito corteza entorrinal-hipocampo _____	21
1.1 Características generales _____	21
1.2 Organización y tipos celulares _____	21
1.3 Conexiones intrínsecas y extrínsecas _____	25
2. Neuroquímica del circuito corteza entorrinal-hipocampo _	30
2.1 Glutamato _____	30

2.2 Ácido γ -aminobutírico _____	31
2.3 Acetilcolina _____	32
2.4 Noradrenalina _____	33
2.5 Serotonina _____	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA _____	34
HIPÓTESIS _____	35
OBJETIVOS _____	36
MATERIALES Y METODOS _____	37

Trabajo "Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique" (1999). Morales-Villagrán, A., López-Pérez, S., Medina-Ceja, L. y Tapia, R. *Neuroscience Letters*, **275**: 133-136.

RESULTADOS _____	40
------------------	----

Trabajo "Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: A dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats" (2000). Medina-Ceja, L., Morales-Villagrán, A. y Tapia, R. *Brain Research Bulletin*, **53**: 255-262.

DISCUSION GENERAL _____	41
I. Ventajas de la técnica utilizada _____	41
II. Efectos en las regiones infundidas con 4-AP _____	42
A. Papel de los receptores de glutamato _____	43
B. Papel de los transportadores de glutamato _____	47
III. Efectos en las regiones no infundidas con 4-AP _____	48
REFERENCIAS _____	51

RESUMEN

La administración sistémica o intracerebral de la 4-aminopiridina (4-AP) induce convulsiones generalizadas en diferentes especies de animales. Aunque el mecanismo de su efecto convulsivante no ha sido determinado, se sabe que la 4-AP estimula la liberación de neurotransmisores, incluyendo el glutamato, en varias preparaciones, tales como: la unión neuromuscular, rebanadas de cerebro y sinaptosomas. El bloqueo de los canales de K^+ por la 4-AP puede prolongar la duración de los potenciales de acción, alargando la fase de despolarización y aumentando el influjo de Ca^{++} y la liberación de neurotransmisores.

Con el fin de estudiar el papel de ciertos aminoácidos en el hipocampo y la corteza entorrinal durante el proceso convulsivo inducido por la administración de la 4-AP, se utilizó un dispositivo que nos permitió realizar la microdiálisis y el registro de la actividad eléctrica de manera simultánea en ambas regiones, en ratas en libre movimiento. Encontramos que la infusión de la 4-AP en la corteza entorrinal aumentó los niveles extracelulares de glutamato y glutamina y en menor proporción los de glicina y taurina. Asimismo, la infusión de la 4-AP en el hipocampo aumentó aún más los niveles de glutamato y produjo aumentos pequeños en taurina y glicina. En ambas regiones infundidas, el pico de concentración extracelular de glutamato se observó 15 min después de la administración de la 4-AP. No hubo cambios significativos en el hipocampo o en la corteza entorrinal no infundidas en las mismas ratas. Los registros electroencefalográficos simultáneos mostraron actividad epileptiforme intensa que inició durante la infusión de la 4-AP y se mantuvo durante el resto del experimento (1h), tanto en la corteza entorrinal como el

hipocampo. Las descargas se caracterizaron por poli-espigas y complejos espiga-onda que se propagaron de manera casi inmediata a la otra región estudiada. Estos hallazgos sugieren que el aumento en la función sináptica glutamatérgica en el circuito que conecta ambas regiones está involucrado en las crisis convulsivas inducidas por la 4-AP.

ABSTRACT

The systemic or intracerebral administration of 4-aminopyridine (4-AP) induces generalized tonic convulsions in different animal species. Although the mechanism of its convulsant action has not been completely clarified, it is known that 4-AP stimulates the release of neurotransmitters, including glutamate, in several preparations, such as the neuromuscular junction, brain slices and synaptosomes. Blockade of K^+ channels by 4-AP can prolong the duration of action potentials, which leads to delayed depolarization, increase Ca^{++} influx and thus promote release of neurotransmitters.

In order to study the role of amino acids in the hippocampus and the entorhinal cortex during the convulsive process induced by 4-AP, we have used a device allowing the simultaneous microdialysis and electrical recording of both regions in awake rats. We found that infusion of 4-AP into the entorhinal cortex resulted in a notable increase in extracellular glutamate and glutamine and small increases in glycine and taurine levels. Likewise, infusion of 4-AP into the hippocampus resulted in a major increase in glutamate, as well as slight increases in taurine and glycine. In both infused regions the peak concentration of extracellular glutamate was observed 15 min after 4-AP administration. No significant changes were found in the non-infused hippocampus or entorhinal cortex in the same rats. Simultaneous electroencephalographic recordings showed intense epileptiform activity starting during 4-AP infusion and lasting for the rest of the experiment (1 h), in both the entorhinal cortex and the hippocampus. The discharges were characterized by polyspikes and spike-wave complexes and

propagated almost immediately to the other region studied. These findings suggest that increased glutamatergic synaptic function in the circuit that connects both regions is involved in the epileptic seizures induced by 4-AP.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
AMPA	α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-4-propionato
4-AP	4-Aminopiridina
AP7	(\pm)-2-Amino-7-heptanoato
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
BAS	Bioanalytical Systems
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CNQX	6-Ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona
CNS	Sistema Nervioso Central
CPP	(\pm)-3-(2-Carboxi-piperazin-4-yl)-propil-1-ácido fosfónico
DA	Dopamina
DHK	Dihidrokainato
EAA	Aminoácidos excitadores
EAAC1	Trasportador a aminoácidos excitadores 1
EEG	Electroencefalograma
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GLAST	Transportador de glutamato y aspartato
GLT1	Transportador de Glutamato tipo1
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
I_A	Corriente de potasio tipo A
I_D	Corriente de potasio de inactivación lenta tipo D

i.c.	Intracerebral
i.p.	Intraperitoneal
IS	Interneurona selectiva
KA	Ácido kaínico
MK-801	Maleato de dizocilpina
NBQX	2,3-Dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina
NE	Norepinefrina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PDC	L-Trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato
SEM	Error estándar de la media
TEA	Tetraetilamonio
TTX	Tetrodotoxina
PIV	Péptido intestinal vasoactivo
VMA	Ácido vanil mandélico

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Este trabajo esta dividido en cuatro partes. La primera de ellas corresponde a una introducción, donde se destacan los aspectos básicos de la epilepsia, los modelos experimentales de epilepsia relacionados con la técnica de microdiálisis y los estudios que hasta la fecha se han realizado con la 4-aminopiridina (4-AP), incluyendo su efecto convulsivante. En esta sección se anexa el artículo de revisión "On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo" (1999) Tapia, R., Medina-Ceja, L. y Peña, F. *Neurochemistry International*, **34**: 23-31, donde se relacionan los efectos excitador y neurodegenerativo de la 4-AP, y se describe también el bloqueo de canales de K⁺ y la estimulación de liberación de neurotransmisores por esta droga. En la Introducción se presenta asimismo una descripción de la anatomía del circuito corteza entorrinal-hipocampo, en donde se destacan los tipos celulares y conexiones del circuito y la neuroquímica del mismo.

La segunda parte corresponde a los Materiales y Métodos, para lo cual se anexa el artículo titulado "Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique" (1999) Morales-Villagrán, A, López-Pérez, S., Medina-Ceja, L. y Tapia R. *Neuroscience Letters*, **275**: 133-136, en el cual se describe de manera detallada la metodología empleada en este trabajo; se anexa además un diagrama del dispositivo utilizado.

En la tercera parte se presentan los Resultados de este estudio, que estan contenidos en la publicación titulada "Action of 4-aminopyridine on extracellular

amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: A dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats” (2000) Medina-Ceja, L., Morales-Villagrán, A., Tapia, R. *Brain Research Bulletin*, **53**:255-262. La última parte contiene una discusión global del trabajo realizado.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un síndrome de disfunción cerebral, de carácter recurrente, que se caracteriza por la descarga sostenida y anormalmente sincrónica de un grupo de neuronas cerebrales. Desde el punto de vista de la neurotransmisión sináptica, la epilepsia ha sido considerada tanto como un trastorno de la inhibición (por deficiencia), como de la excitación (por exceso); la complejidad de la epilepsia incluye ambos sistemas. La mayoría del conocimiento acerca de los mecanismos del fenómeno epiléptico y de la terapia con fármacos anticonvulsivantes ha sido obtenido a través del estudio de modelos de epilepsia experimental (Dichter, 1989); cada uno de estos modelos presenta algunas de las manifestaciones de la epilepsia humana.

I. MODELOS DE EPILEPSIA Y MICRODIALISIS

La técnica de microdiálisis cerebral nos permite medir la concentración extracelular de cualquier neurotransmisor y relacionarla con ciertos aspectos conductuales del fenómeno epiléptico. En varios modelos de epilepsia experimental se han demostrado cambios en los niveles de aminoácidos con la técnica de microdiálisis (Cavalheiro y col., 1991; Sayin y col., 1995), y recientemente se ha trabajado con la microdiálisis dual para determinar la neuroanatomía funcional de la vías nigro-estriatal y estriado-nigral y su relación con la función motora (Morari y col., 1996 a,b). Sin embargo, estos últimos estudios no han sido llevados a cabo en modelos de epilepsia experimental.

Por otro lado, existen trabajos en los que se ha intentado combinar la técnica de microdiálisis con el registro electroencefalográfico (EEG), para lo cual se han

utilizado electrodos adosados o anclados a la sonda de microdiálisis (Sandberg y col., 1986; Szerb, 1991; Ludvig y col., 1992). Estas estrategias intensifican el daño tisular causado por la cánula en la región de estudio. Trabajos de Obrenovitch y col. (1993, 1994, 1995) han permitido disminuir el daño por la implantación de cánulas y evaluar de manera adecuada el EEG, a través de un diseño en el cual se incorpora un microelectrodo en la sonda de microdiálisis. Estos trabajos han permitido evaluar la relación entre la actividad convulsiva (inducida por la administración de picrotoxina) y los niveles de glutamato extracelular. Los resultados muestran que estas crisis convulsivas no necesariamente se acompañan de un aumento en el glutamato extracelular y que la sobreexcitación puede deberse a otro tipo de anomalías, como un aumento en la densidad de receptores a glutamato o por esparcimiento de las sinapsis glutamatérgicas (Obrenovitch y col., 1996). Sin embargo, hasta el momento no se han realizado experimentos combinando la técnica de microdiálisis dual y el registro EEG simultáneo, en modelos de epilepsia experimental.

II. MODELO DE CRISIS POR 4-AMINOPIRIDINA (4-AP)

1. MODELO DE CRISIS CONVULSIVAS

La 4-aminopiridina (4-AP) es una droga que cuando se administra por vía intraperitoneal (i.p.) o intracerebral (i.c.) es capaz de inducir crisis convulsivas en diferentes especies de animales (Spyker y col., 1980; Pasantés-Morales y Arzate, 1981; Tapia y Sitges, 1982; Glover, 1982; Pasantés-Morales y col., 1987; Milhały y col., 1990). El patrón de crisis convulsivas inducido por la administración i.p. de 4-AP en la rata, es muy similar al que se produce por la administración i.c. de ácido

kaínico (Ben-Ari, 1985). Este tipo de crisis se caracterizan por la aparición de un período convulsivo largo, con una etapa inicial de hiperexcitación, seguido de convulsiones clónicas, tónico-clónicas y muerte durante una convulsión tónica en algunos casos, mientras que los animales que sobreviven presentan movimientos clónicos alternados frecuentemente con contracciones tónicas de mediana intensidad (Fragoso-Veloz y col., 1990). De manera similar, la 4-AP ejerce un efecto convulsivante cuando se administra i.c., ya sea en el hipocampo (Fragoso-Veloz y col., 1990) o en el ventrículo cerebral lateral de la rata (Gandolfo y col., 1989).

Los estudios *in vitro* han permitido observar que el efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores es de espectro amplio, es decir, independiente de la sustancia mediadora, tipo de sinapsis o especie (Thesleff, 1980). Mediante estudios electrofisiológicos se ha demostrado que la 4-AP bloquea la corriente transitoria de K^+ (I_A) y de inactivación lenta (I_D), lo cual conduce a una prolongación del potencial de acción a través de un retardo en la fase de repolarización membranar, fenómeno que mantiene los canales de Ca^{++} sensibles al voltaje abiertos (Rogawski y Barker, 1983), lo que podría explicar la inducción del aumento en la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, otras evidencias demuestran que la 4-AP aumenta también la corriente de Ca^{++} (Agoston y col., 1983; Gibson y Manger, 1988).

En trabajos realizados por Morales-Villagrán y Tapia (1996) se demostró que infusiones de 4-AP a través de cánulas de microdiálisis en el núcleo caudado, inducen crisis convulsivas y una liberación notable de glutamato significativamente más alta que la de los demás aminoácidos evaluados. Además, las alteraciones motoras producidas por la 4-AP se bloquean por antagonistas del receptor N-metil-

D-aspartato (NMDA) (Morales-Villagrán y col., 1996). Sin embargo, hasta el momento, no se ha estudiado la liberación de neurotransmisores durante las crisis inducidas por 4-AP en relación con algún circuito anatómico de importancia para la generación de las crisis convulsivas, como puede ser el hipocampo y sus conexiones.

Trabajos recientes del laboratorio (Morales-Villagrán y col., 1999) han demostrado, con la técnica de microdiálisis dual y registro electroencefalográfico simultáneo en ratas despiertas, que la infusión de 4-AP en la corteza motora produce convulsiones intensas y crisis electroencefalográficas tanto en la corteza motora infundida como en la contralateral en la que solo se administra medio Ringer normal. Esta acción convulsivante se acompaña de un incremento extracelular en la concentración de dopamina (15 veces), norepinefrina (2.4 veces) y ácido vanil mandélico (1.8 veces) en la corteza motora infundida.

2. BLOQUEO DE CANALES DE POTASIO

El papel de los canales de K^+ en el control del potencial de membrana y la excitabilidad de las neuronas esta bien establecido (Hille, 1984). Las membranas de las neuronas presentan varios subtipos de los canales de K^+ que participan de varias maneras en las propiedades de conductancia eléctrica de las neuronas (Rogawski, 1985). La actividad del canal de K^+ participa en el control de la liberación del neurotransmisor de las terminales nerviosas determinando el curso temporal de la repolarización. El bloqueo de los canales de K^+ puede prolongar la duración de los potenciales de acción, lo que favorece el retardo en el cierre de los canales de Ca^{++} , incrementando la entrada de este catión y la liberación del neurotransmisor. Existen varios bloqueadores del canal de K^+ , como la 4-AP, el tetraetilamonio (TEA)

y la quinina o toxinas naturales como la dendrotoxina, caribdotoxina y apamina. Se ha demostrado que estos bloqueadores incrementan la liberación *in vitro* en rebanadas de cerebro y en sinaptosomas, de la acetilcolina (ACh), el ácido γ -aminobutírico (GABA), el glutamato, la noradrenalina y la dopamina (Hu y col., 1991; Jin y Fredholm, 1994; Tapia y Sitges, 1982; Tapia y col., 1985). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que en particular el efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores es de espectro amplio, independiente de la sustancia mediadora, tipo de sinapsis o especie (Thesleff, 1980).

En otras palabras, se sabe que la 4-AP bloquea los canales de K^+ activados por voltaje en una gran variedad de células, incluyendo las neuronas, el músculo cardíaco, músculo esquelético y liso (Kenyon y Gibbons, 1979; Gillespie y Hunter, 1975; Hara y col., 1980). La 4-AP actúa en el lado citoplásmico de los canales de K^+ (Kirsch y Drewe, 1993), pero el mecanismo del bloqueo aún no se ha caracterizado completamente. Al respecto algunos estudios han postulado que la 4-AP se une preferencialmente al estado abierto de los canales rectificadores de K^+ (Kirsch y col., 1993). En el trabajo de Russell y col. (1994) han observado que el bloqueo de la 4-AP del canal de K^+ Kv 1.2 ocurre solo después de la activación de la corriente, debido probablemente a que el sitio al cual se une la 4-AP no es accesible cuando el canal está cerrado. En otros estudios se ha obtenido resultados similares en canales de K^+ tipo Kv 2.1 y Kv 3.1 (Kirsch y Drewe, 1993). Trabajos de Bouchard y Fedida (1995) han encontrado que la 4-AP suprime la corriente saliente al unirse al canal de K^+ tipo Kv 1.5 en la superficie interna de la membrana. La unión y la disociación de la 4-AP del canal requieren del estado abierto, aunque se puede unir

a diferentes sitios de este canal en el estado abierto o cerrado, modulando la transición aparente del canal del estado final cerrado al estado abierto. Asimismo, se ha encontrado que la 4-AP mueve aproximadamente un 20% el potencial de membrana eléctrico para alcanzar su sitio de unión. Por otro lado, la profundidad a la cual la 4-AP se une al canal de K^+ , aumenta cuando la concentración de la 4-AP se incrementa (Bouchard y Fedida, 1995).

La 4-AP atraviesa la membrana en su forma no cargada y se asocia con un protón en el citoplasma (Choquet y Korn, 1992; Kirsch y Narahashi, 1983). Los canales de K^+ sienten el gradiente de voltaje local a través de la membrana y la forma activa de la 4-AP (catiónica). Es probable que la 4-AP altere el perfil del potencial local cerca de los canales de K^+ , al unirse a las cargas negativas fijas localizadas en la superficie interna de la membrana o en el vestíbulo del poro, ya que la 4-AP parece estar cercana a las cargas negativas asociadas con las regiones 5'S5 o 3'S6 en la cara interna del poro del canal de K^+ (Shieh y Kirsch, 1994). El sitio de unión de la 4-AP está fuera de la región sensible a voltaje S4, muy cercana a la compuerta del canal (Fig. 1) (McCormack y col., 1994; Shieh y Kirsch, 1994). Por lo anterior puede ser que la 4-AP se asocie a las cargas negativas de la cara interna de la membrana plasmática (Bouchard y Fedida, 1995).

3. LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES

El efecto estimulador de las aminopiridinas sobre la liberación espontánea del neurotransmisor depende de la presencia de Ca^{++} extracelular (Tapia y Sitges, 1982), y se ha sugerido que además del Ca^{++} extracelular, otros depósitos de calcio así como otros iones, también participan (Huang y col., 1989; Tapia y Sitges, 1982). Las aminopiridinas causan corrientes entrantes de Ca^{++} , sin embargo las

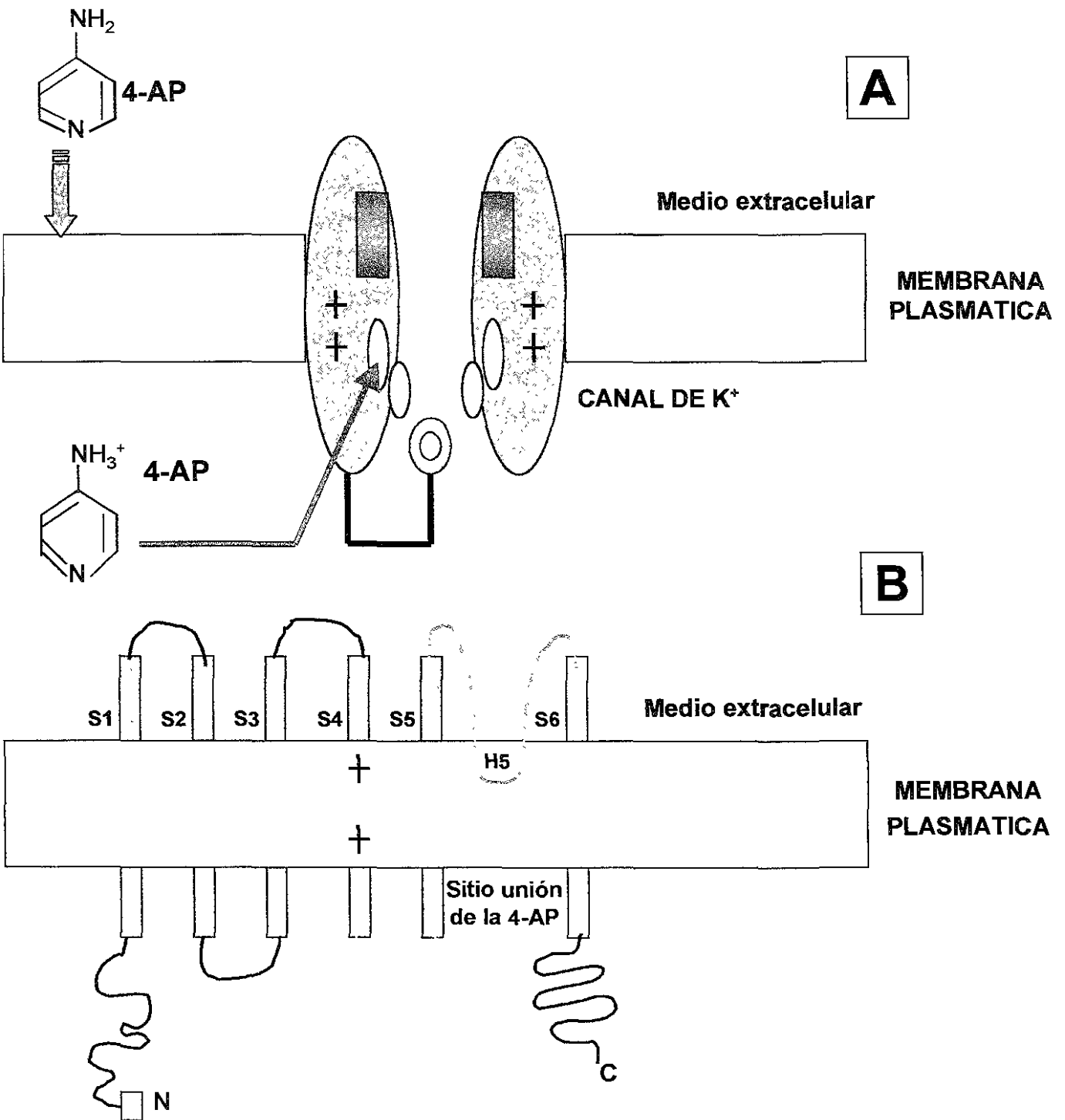


Fig. 1 Los esquemas A y B representan el mecanismo posible del bloqueo de los canales de K^+ por la 4-AP. A) La 4-AP atraviesa la membrana plasmática en su forma no cargada y una vez en el citoplasma de la célula se asocia con un protón. La forma activa de la 4-AP se une a la región cargada negativamente del canal. B) Estructura molecular de una de las subunidades del canal de K^+ donde se muestra el sitio de unión de la 4-AP activada (5'S5 o 3'S6) (Shieh y Kirsch, 1994).

concentraciones requeridas para estos efectos ($>1\text{mM}$) son mucho más altas que las requeridas para inducir actividad convulsiva (Segal y Barker, 1986; Ahnert-Hilger y Habermann, 1981). Otros estudios no han observado efecto alguno de la 4-AP sobre la captura de Ca^{++} (Agoston y col., 1983; Freedman y col., 1984; Tapia y col., 1985) y postulan que la 4-AP facilita el acoplamiento entre el Ca^{++} intracelular y la liberación del neurotransmisor en la membrana presináptica, debido a que la droga es capaz de inducir la liberación del neurotransmisor sin el estímulo despolarizante. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que el bloqueador de canales de K^+ TEA, tiene un efecto similar al de la 4-AP sobre las corrientes de K^+ y el efecto despolarizante en la membrana, no induce los efectos conductuales y bioquímicos que se presentan con la administración de la 4-AP (Morales-Villagrán y Tapia, 1996). En este sentido, Tibbs y col. (1989) propusieron que la 4-AP induce potenciales de acción repetitivos que permiten abrir transitoriamente los canales de Ca^{++} . Algunos estudios han observado la posibilidad de la participación de los canales tipo N- en la entrada de Ca^{++} inducida por la 4-AP en sinaptosomas (Nayler, 1988; Nowycky y col., 1985; Turner y col., 1993). Asimismo, las diferencias en la sensibilidad de los neurotransmisores a la influencia de la 4-AP pudiera ser un reflejo de las diferencias en las poblaciones de canales de Ca^{++} presentes en las terminales o diferencias en la cinética de entrada de Ca^{++} entre las terminales catecolaminérgicas y aminoacidérgicas (Verhage y col., 1991). Al mismo tiempo, se ha encontrado que el efecto sobre la liberación del glutamato, con tres agentes despolarizantes (K^+ alto, 4-AP y veratrina) presenta variaciones regionales en la liberación de glutamato, debido a sus mecanismos diferentes para inducir el efecto

despolarizante y al proceso de transporte del glutamato (Patterson y col., 1995). Así, la liberación de glutamato y su captura parecen variar grandemente de región en región debido a la presencia de estos mecanismos.

En resumen, las acciones celulares y biofísicas relevantes de la 4-AP incluyen los siguientes pasos, en el caso de las preparaciones *in vitro*: 1) bloqueo de las corrientes transitorias de K^+ en la membrana post-sináptica soma-dendrita, incluyendo la corriente tipo A rápida y la corriente lenta tipo D. Las concentraciones de 4-AP epileptogénicas ($75\mu M$) probablemente no bloqueen la corriente tipo A (Storm, 1988), pero sí las corrientes tipo D; 2) Un incremento en la excitabilidad de los axones y las terminales presinápticas causadas por la 4-AP aumenta la liberación de neurotransmisores en respuesta a los potenciales de acción presinápticos, como en los potenciales de acción espontáneos originados en las terminales o en los axones (Fig. 2) (Kocsis y col., 1983; Buckle y Haas, 1982; Flores-Hernandez y col., 1994).

III. TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC y se presenta en concentraciones altas en las terminales nerviosas, mientras que en el espacio extracelular se encuentran niveles bajos ($<1\mu M$) (Fonnum, 1984; Ottersen y Storm-Mathisen, 1984). El transportador de glutamato mantiene los niveles extracelulares bajos de este aminoácido previniendo la neurotoxicidad mediada por este neurotransmisor (Choi, 1992). Tanto las neuronas como las células gliales presentan estos sistemas de captura de glutamato, por lo que ambos tipos celulares

participan en la regulación de los niveles extracelulares del neurotransmisor (Arriza y col., 1994; Kanai y col., 1995; Rothstein y col., 1996). Este transporte de alta afinidad depende tanto de Na^+ como de K^+ , pero no requiere del Cl^- (Danbolt, 1994).

Se han clonado tres transportadores de glutamato de rata denominados GLAST1, GLT-1, y EAAC1, así como a sus homólogos en el humano, EAAT1 (GLAST1), EAAT2 (GLT1), y EAAT3 (EAAC1) (Arriza y col., 1994; Kanai y Hediger, 1992; Pines y col., 1992; Storck y col., 1992). Posteriormente se han identificado dos miembros nuevos denominados EAAT4 y EAAT5 en cerebelo y retina de humano, respectivamente (Fairman y col., 1995; Arriza y col., 1997). Asimismo, la clonación molecular ha permitido la identificación de dos transportadores de aminoácidos neutrales, el ASCT-1 y -2 (Arriza y col., 1993; Shafqat y col., 1993; Utsunomiya-Tate y col., 1996).

Los transportadores EAAT-1 y -2 se expresan exclusivamente en el cerebro (Pines y col., 1992; Storck y col., 1992; Nakayama, y col., 1996), mientras que EAAT-3, -4 y -5 se expresan tanto en el cerebro como en otros órganos (Kanai y Hediger, 1992; Nakayama y col., 1996; Fairman y col., 1995; Arriza y col., 1997). La proteína EAAT-1 se presenta abundantemente en la corteza cerebelar (Chaundhry y col., 1995; Lehre y col., 1995; Shibata y col., 1996) y la proteína EAAT-2 se encuentra en regiones como la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, el septo, y el cerebelo. En estas regiones, EAAT-1 y -2 se encuentran primariamente en la membrana plasmática de los astrocitos y la glía de Bergman en el cerebelo (Chaundhry y col., 1995; Lehre y col., 1995; Schmitt y col., 1996, 1997; Torp y col., 1997).

Por otra parte, EAAT-3 y -4 se encuentran solo en las neuronas y, en particular EAAT-3 se presenta tanto en neuronas glutamatérgicas (por ejemplo, las células granulares del giro dentado y las células piramidales en el hipocampo y la corteza cerebral) como GABAérgicas (por ejemplo, las células de purkinje en el cerebelo y neuronas espinosas medias del estriado) (Kanai y Hediger, 1992; Rothstein y col., 1994; Kanai y col., 1995; Velaz-Faircloth y col., 1996; Yamada y col., 1996; Furuta y col., 1997; Nagao y col., 1997; Tanaka y col., 1997; Torp y col., 1997). Por otro lado, el transportador EAAT-5 parece estar restringido a las neuronas de retina (Arriza y col., 1997).

Los transportadores de glutamato parecen jugar un papel triple en regular los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro: 1) la captura de glutamato para disminuir la concentración local extracelular de este aminoácido; 2) la actividad del transportador EAAT4 genera una entrada de Cl⁻ que permite una hiperpolarización local para prevenir la excitación excesiva por el glutamato extracelular y, 3) la acumulación de glutamato en las neuronas (células GABAérgicas de Purkinje) producido por los transportadores localizados a nivel neuronal (EAAC1 y EAAT4), las provee del sustrato para la síntesis de GABA (Furuta y col., 1997). Por lo anterior, los transportadores de glutamato se encuentran estratégicamente distribuidos en el cerebro para controlar los niveles extracelulares de este neurotransmisor.

Por otra parte, la actividad funcional de estos transportadores se ve regulada por la expresión, la localización y la fosforilación de los mismos (Lorter y col., 1999). Varios estudios han demostrado la regulación de los transportadores por cinasas y fosfatasa (Casado y col., 1991; Casado y col., 1993), debido a que presentan en

su estructura primaria varios sitios consenso a la cinasa dependiente de AMPc y a la cinasa C (Kanai y col., 1993; Gegelashvili y col., 1997).

Se ha demostrado una asociación entre deterioros en el transporte de glutamato y el inicio y la progresión de varias enfermedades degenerativas que incluyen la esclerosis amiotrófica lateral (Rothstein y col., 1995), la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson (Masliah y col., 1996; , Beal y col., 1986; Blandini y col., 1996) y la epilepsia (Miller y col., 1997). El deterioro de la actividad de los transportadores es un factor determinante en la susceptibilidad a las crisis epilépticas en algunos modelos experimentales (Watanabe y col., 1999). Además de prevenir la excitotoxicidad bajando los niveles extracelulares de glutamato, los transportadores tienen un papel importante en modular el curso temporal de la transmisión sináptica (Overstreet y col., 1999), ya que el transportador en la membrana post-sináptica puede contribuir a la fase de repolarización del potencial post-sináptico excitador (Meldrum y col., 1999).

Finalmente, en varios modelos de epilepsia experimental se ha demostrado cambios en la expresión de los transportadores de glutamato; en modelos genéticos se ha encontrado una disminución en la expresión del mRNA a GLT-1 en hipocampo, corteza cerebral, estriado y colículo inferior (Akbar y col., 1998). En modelos de epilepsia adquirida, como el kindling o la administración de KA, se ha observado un aumento en la expresión del mRNA a GLT-1 y una disminución en el EAAC-1 (Akbar y col., 1997; Ingram y col., 2000). así como una disminución en la expresión del mRNA y la proteína de EAAT-3 en hipocampo, respectivamente (Simantov y col., 1999).

En vista de estos antecedentes en el presente trabajo se anexa un artículo de revisión donde se describen en detalle los efectos de la administración de la 4-AP en el hipocampo a través de cánulas de microdiálisis. Asimismo, se analiza la relación entre los efectos de la hiperexcitabilidad neuronal y la neurodegeneración inducidos por la 4-AP, con la activación de receptores a aminoácidos excitadores y los transportadores de glutamato.

Review article

On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo

R. Tapia^{a,*}, L. Medina-Ccja^b, F. Peña^a

^a *Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, 04510-México, D.F., México*

^b *Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal., México*

Received 19 June 1998, accepted 28 September 1998

1. Introduction

In recent years there has been an increasing interest in the studies on neurodegeneration, including the physiological or programmed neuronal death and the cell disruption occurring as a consequence of necrosis. This interest has been greatly stimulated by the fact that precipitate and localized neuronal destruction is a central event in the course of many acute and chronic disorders of the central nervous system (CNS). These disorders include stroke (anoxia-ischemia), hypoglycemia, cerebral trauma, epilepsy and several devastating neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and Huntington's disease.

Among the cellular mechanisms possibly involved in neuronal death in the above mentioned disorders, three closely related factors seem to play important roles. (1) the generation of reactive oxygen species or free radicals, (2) the overactivation of synaptic excitatory amino acid (EAA) receptors, and (3) the increase in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration. As shown in Fig. 1, the links between these factors are multiple and an initial event may lead, in a cascade manner, to the generation of further alterations.

One of the key events in this chain of reactions resulting in neuronal damage is an excess of the excitatory synaptic neurotransmission mediated by amino acids, mainly glutamate. Pioneer studies in the decade of the seventies showed that exposure of nervous tissue to high concentrations of glutamate and other EAA produced neuronal degeneration and death, and demonstrated that such effects are related to the ability of these neurotransmitters to depolarize the membrane and therefore

to excite neurons (Olney, 1971; Olney et al., 1971; Rothman and Olney, 1987). This knowledge led to the concept of excitotoxicity, or neuronal damage due to overexcitation, whose mechanisms are presently known in some detail due to the advances in the characterization of the different types of EAA receptors and their functioning. Two groups of EAA receptors located in neuronal membranes have been identified. A first group of receptors, mainly localized postsynaptically, constitute ligand gated ion channels (ionotropic receptors) and includes the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) type and the non-NMDA type. The two types are activated by glutamate and aspartate, but the former is activated by NMDA whereas the latter includes a subtype recognizing kainate acid (KA) and another subtype that is activated by α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA). The second group is that of metabotropic EAA receptors, which are frequently present in the presynaptic membrane and do not form ion channels but are associated to G proteins and coupled to the production of second intracellular messengers (Hollmann and Heinemann, 1994; Miller, 1994, Michaelis, 1998)

Besides its ligand sensitivity, the NMDA receptor differs from that of non-NMDA receptors in its sensitivity to voltage changes, its requirement for glycine as a positive modulator and its ionic selectivity. The NMDA receptor channel is permeable mainly to Na^+ and Ca^{2+} ; in contrast, the non-NMDA receptor channels are voltage insensitive and normally permeable only to Na^+ , although this permeability may vary depending on the subunit composition of the receptor (Hollmann et al., 1991; Bettler and Mülle, 1995, Pellegrini-Giampietro et al., 1997). These differences determine a complex response to glutamate of the postsynaptic neuron possessing the two types of receptors. Under resting conditions, the NMDA receptor is not readily opened by the agonists, because its channel is blocked by Mg^{2+}

* Corresponding author. Fax: 52-5-6225607, E-mail: rtapia@disol.unam.mx

However, because of the voltage sensitivity of this receptor, when the membrane is depolarized Mg^{2+} is expelled out of the channel and the receptor is able to respond to its ligand. Consequently, when the non-NMDA receptor is activated and depolarization occurs due to the entrance of Na^+ through its channel, the overactivation of the NMDA receptor is facilitated.

The hyperactivation of the NMDA receptor results in a massive entrance of Ca^{2+} (Randall and Thayer, 1992; Hartley et al., 1993), which may overcome the intracellular Ca^{2+} buffering mechanisms that, together with plasma membrane Ca^{2+} -ATPases and Na^+ - Ca^{2+} exchangers, are responsible for maintaining a sub-micromolar intracellular concentration of the cation. The resulting accumulation of cytoplasmic Ca^{2+} eventually leads to neuronal death (Mattson, 1994; Siesjö, 1994) due to several factors, such as activation of proteases, lipases and endonucleases, membrane protein and lipid alterations, generation of toxic reactive oxygen species, mitochondrial damage, disruption of energy metabolism, and membrane depolarization. These events potentiate each other in a cascade manner to produce membrane damage and consequently cell death (Fig. 1).

2. Neurotoxicity of EAA receptor agonists

A great deal of the foregoing notions arose from a variety of experiments carried out *in vivo* and in neuronal

cultures, by means of the administration of glutamate or of EAA receptor agonists, such as NMDA and KA (Malva et al., 1998). That neurotoxic effects of these compounds are due to their interaction with EAA receptors is usually ascertained by testing the blockade or prevention of their toxicity in the presence of antagonists specific for the different receptor subtypes. Among the compounds more frequently used are the NMDA receptor antagonists (\pm)-3-(2-carboxy-piperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP), (\pm)-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP7) and (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK-801), and the non-NMDA receptor antagonists 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, more effective on KA receptor), 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline (NBQX, more effective on AMPA receptor; Sheardown et al., 1990), and some 2,3-benzodiazepines (Vizi et al., 1996, 1997).

Important support for a link between the above described mechanisms of excitotoxicity and neuronal death in neuropathological disorders derives from the following findings: (a) excessive EAA-mediated neurotransmission leads to epileptic activity (Choi, 1988; Meldrum, 1991); (b) the cytopathological characteristics of the damage observed after the exposure to EAA resemble those occurring after brain ischemia (Brown and Brierly, 1972; Simon et al., 1984; Van Reempts, 1984) or prolonged seizure activity (Evans et al., 1984); (c)

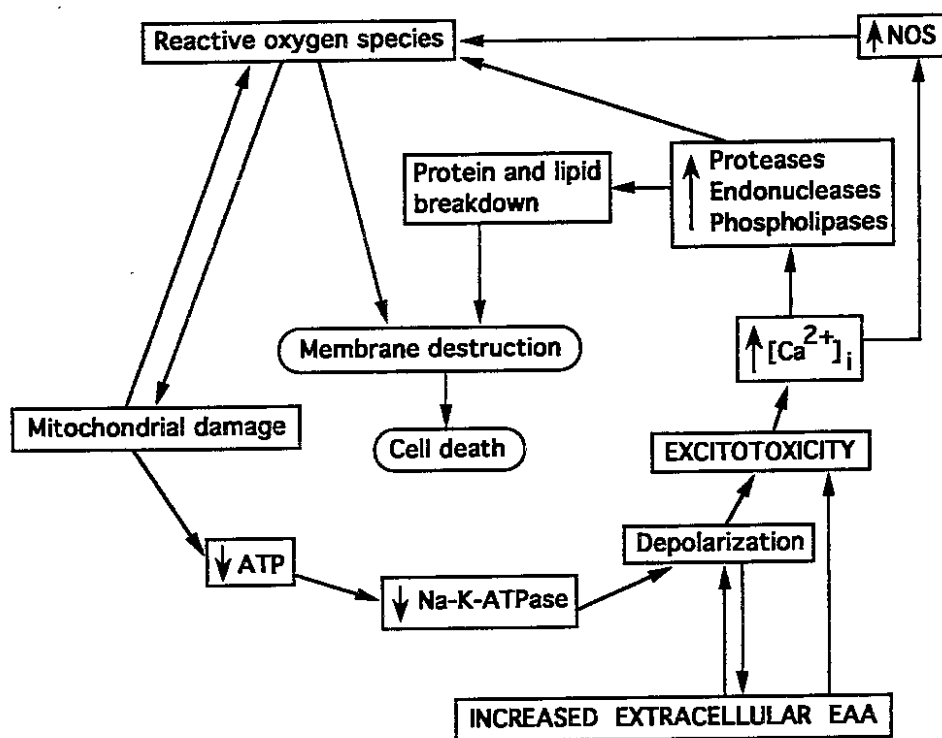


Fig. 1. Factors involved in the mechanisms of neuronal death. This scheme describes mainly death by necrosis due to membrane destruction. NOS = nitric oxide synthase, which may produce reactive oxygen species by oxidation of its product, NO.

microdialysis studies *in vivo* have shown that during cerebral ischemia (Benveniste et al., 1984; Globus et al., 1988; Hillered et al., 1989; Butcher et al., 1990; Graham et al., 1990; Baker et al., 1991), hypoglycemia (Sandberg et al., 1986), and cerebral trauma (Faden et al., 1989), the extracellular concentrations of glutamate and aspartate are highly increased, reaching levels comparable to those which are neurotoxic in cell cultures (Choi et al., 1987); (d) antagonists of both the NMDA and non-NMDA receptor types protect against the neuronal damage associated to these neuropathological conditions (Gill et al., 1988, 1992; Bullock et al., 1990; Sheardown et al., 1990; Swan and Meldrum, 1990).

3. Is the origin of augmented extracellular glutamate important for neurotoxicity?

Most of the studies on glutamate-induced neurotoxicity have been carried out *in vitro*, largely in neuronal or mixed neuronal-glia cultures (Ohno et al., 1997; Rogers and Hunter, 1997; Jensen et al., 1998), whereas *in vivo* the excitotoxicity has been observed in some brain regions mainly after the intracerebral microinjection of EAA receptor agonists, such as NMDA, KA, AMPA or dihydrokainate (DHK, an inhibitor of glutamate transport that seems to have a direct agonist effect on NMDA receptors) (Ben-Ari, 1985; Stein-Behrens et al., 1994; Massieu and Tapia, 1994, 1997; Massieu et al., 1995; Arias et al., 1997). These experimental conditions, however, do not necessarily reflect the situation occurring under pathological states, in which, as implied in the previous section, neuronal destruction by excitotoxicity must be due primarily to an excess of endogenous extracellular EAA capable of overactivating their postsynaptic receptors. It is clear, therefore, that *in vivo* EAA-induced neurodegeneration can occur only when the extracellular concentration of the amino acids increases above a critical value and/or for a certain period of time. During the normal functioning of the glutamatergic synapses this does not occur because after the release of glutamate from the presynaptic terminal its concentration in the synaptic cleft is kept low ($\sim 1 \mu\text{M}$), due to its rapid clearance by an efficient reuptake carried out by specific high affinity transporters (Fagg and Foster, 1983; Fonnum, 1984; Nicholls and Attwell, 1990), of which five types have been cloned (Danbolt, 1994; Fairman et al., 1995; Arriza et al., 1997). It is therefore clear that an augmented glutamate release, such as that probably occurring in certain types of epilepsy, could result in hyperexcitation but would not necessarily induce neurodegeneration, because of the rapid removal of glutamate from the synaptic cleft. On the other hand, one should expect that a deficient reuptake would more easily result in extracellular glutamate levels sufficiently high and long lasting to become toxic. This has been pos-

tulated to occur during ischemia, since the transporter requires extracellular Na^+ , which is co-transported with glutamate, and thus the ischemia-induced energy failure might result in diminished $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity and therefore in an impairment of the transporter. Additionally, glutamate release might occur through the reversal of the carrier-mediated Na^+ -dependent uptake (Pulsinelli and Duffy, 1983; Obrenovitch and Urenjak, 1997). In fact, as already mentioned, it has been shown that extracellular aspartate and glutamate levels increase after experimental transient ischemia.

In the following sections these relationships will be discussed, focused on experiments *in vivo*, which should reflect more closely than those *in vitro* the complexities of the pathological alterations. Indeed, several important factors influencing the possibility of interaction of glutamate with its receptors, for example the volume, constraints and tortuosity of the extracellular space, particularly the synaptic cleft (Rusakov and Kullmann, 1998), may be overlooked by the *in vitro* experimental conditions. These and other problems make it difficult to establish a correlation *in vivo* between alterations in the extracellular concentration of EAA and facilitation of excitatory synaptic transmission. However, a reasonable expectation would be that if increased levels of EAA may indeed hyperactivate the receptors, when such increase occurs an enhanced neuronal excitability should be observed, behaviorally and/or electroencephalographically, accompanied by or followed by neuronal damage of the cerebral region affected.

What procedures could be appropriate to test this presumption? An obvious answer is to design experiments aimed at studying whether a stimulation of EAA release or an inhibition of its transport results in enhanced endogenous extracellular EAA and whether this is related to neuronal hyperexcitability and neurodegeneration. This can be accomplished with the use of the microdialysis technique, which has been extensively used to measure changes in the extracellular concentration of amino acids *in vivo* under a great variety of experimental conditions. However, the origin and consequences of an enhanced EAA concentration, as determined by this technique, have been the subject of considerable controversy (Herrera-Marshitz et al., 1996; Timmerman and Westernick, 1997). In the light of the above discussion, the heart of this controversy lies not only in ascertaining what is the cellular origin of the basal and the increased extracellular EAA (neuronal, synaptic or glial) but also in establishing that they are indeed enhancing the excitatory synaptic efficacy.

3.1 Inhibition of glutamate uptake

Recently, several reports have appeared studying the effect of inhibitors of EAA transporters on the concentration of extracellular amino acids *in vivo*. The most

used compounds are *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC), DHK, and *DL-threo*- β -hydroxy-aspartate. Microdialysis experiments have shown that in the striatum and in the hippocampus the basal levels of glutamate and aspartate are notably increased by PDC (Milan et al., 1993; Bloc et al., 1995; Massieu et al., 1995; Herrera-Marschitz et al., 1996; Obrenovitch et al., 1996; Zuiderwijk et al., 1996; Massieu and Tapia, 1997; Rawls and McGinty, 1997; Lada et al., 1998), but only few investigations have addressed the correlation between the changes observed and electrical activity alterations or neurodegeneration. In one of these studies (Obrenovitch et al., 1996), it was found that PDC-induced increases of extracellular glutamate to more than 20-fold the basal level in the hippocampus did not induce electrophysiological signs of hyperexcitability. In two studies from our laboratory (Massieu et al., 1995; Massieu and Tapia, 1997), we have shown that PDC induced long lasting (over 2 h) large increases of extracellular glutamate (10–20-fold, reaching concentrations comparable to those observed during neuronal damage due to ischemia (Globus et al., 1988; Hillered et al., 1989; Baker et al., 1991; Wahl et al., 1994)), but no neurodegeneration was observed, either in the striatum or in the hippocampus. In these reports, neuronal damage was assessed by histological examination and, in the case of the striatum, by biochemical determination of choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase activities, markers of cholinergic and GABAergic neurons, respectively. The effect of PDC was much higher on glutamate and aspartate than on other amino acids, in agreement with the described potent and selective action of this compound on the glutamate/aspartate transporter (Bridges et al., 1991; Robinson et al., 1991). The elevation of glutamate by PDC could be due to a combination of the blockade of the transporter and a carrier-mediated release of the amino acid, since it has been shown that PDC can be exchanged with glutamate (Bridges et al., 1991; Isaacson and Nicoll, 1993; Sarantis et al., 1993). The important finding was, however, that in spite of the very high levels of extracellular glutamate no neuronal damage was observed (Massieu et al., 1995; Massieu and Tapia, 1997).

In contrast to this lack of effect of PDC, under similar experimental conditions the administration of DHK or KA through the microdialysis probe produced remarkable neuronal damage in the striatum, observed 7 days after treatment. The lesion produced by DHK was partially prevented by treatment with the NMDA receptor antagonist MK-801 or with the non-NMDA receptor antagonist NBQX (Massieu et al., 1995). In addition, the microinjection of DHK in the hippocampus produced a notable neuronal destruction a few hours after treatment, which was, however, restricted to the CA1 area and prevented by MK-801 but not by NBQX (Arias et al., 1997). Altogether, these experiments with DHK suggest that the

neurotoxic effect of the latter is due to a direct activation of glutamate receptors and not to the glutamate accumulated in the extracellular space.

Whatever the mechanism of the neurotoxic effect of DHK may be, the above results with PDC clearly indicate that increased extracellular glutamate *in vivo* by impairment of its transporter is not sufficient by itself to produce neuronal hyperexcitation or neuronal damage. One possible explanation for these unexpected findings is that the extracellular glutamate accumulated as a consequence of PDC action on the transporter does not reach sufficiently high concentrations to overactivate glutamate receptors. In view that five different glutamate carriers have been cloned and they differ in their neuronal or glial localization (Kanai and Hediger, 1992; Pines et al., 1992; Storck et al., 1992; Kanai et al., 1993; Fairman et al., 1995; Arriza et al., 1997), another possibility is that the transporter affected by PDC might not be the one closely involved in the removal of glutamate from synaptic sites. However, it has been reported that PDC inhibits glutamate transport in both synaptosomes and cultured astrocytes (Bridges et al., 1991; Robinson et al., 1991; Rauen et al., 1992; Garlin et al., 1995), and that the extracellular glutamate enhanced under the effect of PDC *in vivo* seems to be of neuronal origin and may possess transynaptic effects in the striatum (Rawls and McGinty, 1997).

Two other models of glutamate transport deficiencies *in vivo* have been described: knockout of the transporters by intracerebroventricular chronic administration in the rat of antisense oligonucleotides specific for the glial (GLAST and GLT-1) or neuronal (EAAC1) transporters (Rothstein et al., 1996), and the generation of mutant mice lacking EAAC1 (Peghini et al., 1997). In both studies, when EAAC1 was affected animals showed some motor and behavioral abnormalities, but no neurodegeneration was observed. In contrast, with the antisense oligonucleotides against GLAST and GLT-1 extracellular glutamate was increased and some signs of neurodegeneration characteristic of excitotoxicity were observed in the striatum and the hippocampus (Rothstein et al., 1996). These studies suggest that the glial glutamate transport may be more efficient in reducing the level of synaptic glutamate. In any case, it seems that in the absence of other potentiating factors the concentration of endogenous glutamate in the synapse must reach very high values in order to produce neurotoxicity (Obrenovitch et al., 1996; Obrenovitch and Urenjak, 1997), since under normal synaptic transmission it may peak at >1 mM concentration (Clements et al., 1992; Clements, 1996).

The problems in understanding the accessibility of endogenous glutamate to the postsynaptic receptors and the role of its clearance by uptake *in vivo* can be illustrated by comparing the lack of neurotoxicity described in the preceding paragraphs with the results of experi-

ments in neuronal and glial cultures. In these mixed cultures, exposure to PDC induced an elevation of glutamate concentration in the culture medium which, differently from the observations *in vivo*, resulted in neuronal damage as assessed morphologically, by the release of lactic dehydrogenase or by the mitochondrial reduction of a tetrazolium salt; this neurodegeneration was attenuated by NMDA receptor antagonists (Blitzblau et al., 1996; Velasco et al., 1996; Volterra et al., 1996). Furthermore, under these *in vitro* conditions the PDC-induced accumulation of extracellular glutamate resulted also in sustained neuronal depolarization (Volterra et al., 1996). Also in contrast to the microdialysis results, under these experiments *in vitro* DHK did not induce neurotoxicity nor produced any increase of extracellular glutamate (Velasco et al., 1996). Since DHK does not affect glutamate transport in cultured astrocytes (Garlin et al., 1995), these data support the participation of the glial transporter as the main site of removal of extracellular glutamate in the mixed cultures.

The most probable explanation for the discrepancy between the lack of neurotoxicity of glutamate accumulation by uptake inhibition *in vivo* and its damaging effect in the mixed neuronal-glial cultures is that, whereas in the former condition the access of the extracellular glutamate to the synaptic receptor sites might be limited, in cell cultures the amino acid readily diffuses and reaches all available receptor sites.

3.2. Excessive glutamate release: experiments with 4-aminopyridine

The second experimental approach to increase the extracellular levels of glutamate and assess its effects on excitability and neuronal integrity is by enhancement of release. Among the drugs capable of stimulating the release of neurotransmitters are certain K^+ channel blockers, such as 4-aminopyridine (4-AP) and some members of the family of dendrotoxin peptides from the venom of the black mamba snake. These compounds prolong the depolarization phase of action potentials, augment the frequency of neuronal firing (Nisenbaum et al., 1994), and induce the release of neurotransmitters in several *in vitro* preparations, such as the neuromuscular junction (Lundh, 1978; Thesleff, 1980), brain slices (Dolezal and Tucek, 1983; Hu et al., 1991; Versteeg et al., 1995; Schechter, 1997) and synaptosomes (Tapia and Sitges, 1982; Tapia et al., 1985; Tibbs et al., 1989a,b). It is interesting that this releasing effect of both dendrotoxins and 4-AP is strictly dependent on external Ca^{2+} , which, together with other pharmacological and ionic studies in brain slices (Thesleff, 1980; Jones and Heinemann, 1987; Perrault and Avoli, 1991), indicate that the neurotransmitters released by these drugs originate from presynaptic nerve endings.

Both 4-AP and dendrotoxins are also potent convul-

sants, that produce intense behavioral signs of hyperexcitability and EEG seizures when administered intracerebrally. These effects have been observed after injection in the rat substantia nigra reticulata, hippocampus, cerebral ventricles and cerebral cortex (Gandolfo et al., 1989; Frago-Veloz et al., 1990; Tapia and Flores-Hernández, 1990; Bagetta et al., 1992, 1994, 1996; Frago-Veloz and Tapia, 1992; Morales-Villagrán et al., 1996). 4-AP produces also intense seizure activity when administered systemically in several mammalian species, including man (Schafer et al., 1973; Spyker et al., 1980; Frago-Veloz et al., 1990; Yamaguchi and Rogawski, 1992; Cramer et al., 1994). Furthermore, this drug induces epileptiform electrical discharges *in vitro*, in rat hippocampal (Perrault and Avoli, 1991; Yonekawa et al., 1995; Avoli et al., 1996) and cortical (Siniscalchi et al., 1997) slices.

An increased glutamatergic transmission in the epileptogenic action of dendrotoxins and 4-AP has been postulated on the basis that EAA receptor antagonists, of both the NMDA and the non-NMDA types, are effective anticonvulsants against seizures induced by these compounds *in vivo* (Gandolfo et al., 1989; Frago-Veloz and Tapia, 1992; Bagetta et al., 1994, 1996; Cramer et al., 1994; Morales-Villagrán et al., 1996) and, in the case of 4-AP, also in brain slices (Perrault and Avoli, 1991; Avoli et al., 1996; Siniscalchi et al., 1997). Further support for the involvement of glutamatergic transmission in the 4-AP-induced seizures stems from our recent finding that 4-AP stimulates the release of glutamate in the striatum and in the hippocampus *in vivo*, and that this release is correlated with intense behavioral convulsive activity (Fig. 2; Morales-Villagrán and Tapia, 1996).

The above discussed findings, particularly in the case of 4-AP, clearly suggest that, differently from the results of uptake inhibition, an increase in the extracellular glutamate resultant from an excessive release may overactivate EAA receptors and thus induce electrical and behavioral hyperexcitation and seizures. Consequently, in accord with the previous sections, it was to be expected that such an increase would produce neurodegeneration. This in fact has been shown to occur with dendrotoxins, which induce notable neuronal destruction when administered in the hippocampus (Bagetta et al., 1994, 1996). Since no similar studies have been reported with 4-AP, we have carried out some experiments in the hippocampus, using microdialysis and simultaneously measuring the release of amino acids and the EEG. As shown in Fig. 2, when we perfused 4-AP through a microdialysis probe in this region, we observed a correlation between the increase in extracellular glutamate collected via the same microdialysis probe and neurodegeneration of the CA1, CA3 and CA4, but not CA2, hippocampal subfields. It must be emphasized that this selective neuronal damage was similar to that observed after the intrahippocampal injection of EAA receptor agonists (Ben-Ari, 1985; Stein-

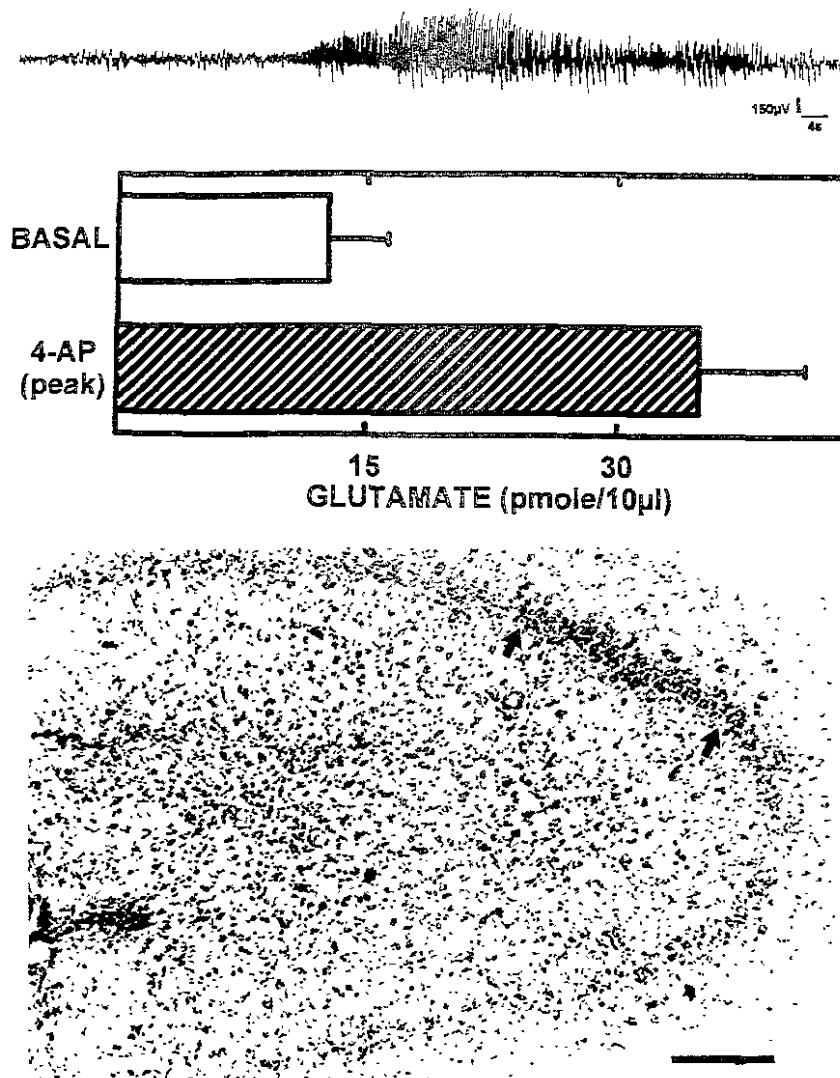


Fig 2. Effects of microdialysis administration of 4-AP in the anesthetized rat hippocampus on electrical activity (top trace), extracellular glutamate (middle graph) and histological appearance (bottom micrograph). After obtaining basal electrical activity (using the microdialysis cannula as the electrode) and three 12.5 min microdialysis fractions (25 μ l each) to determine basal extracellular glutamate values (by HPLC and fluorometric detection), 4-AP (35 mM) was perfused through the microdialysis cannulas during 12.5 min, and three subsequent fractions were collected. The electrical epileptic discharge shown lasted 18 s and occurred at 5 min after 4-AP; it is a representative example of the seizure discharges produced by this 4-AP dose, which occurred with a frequency of about one every 1.5 min and persisted until the end of the experiment. The peak increase in extracellular glutamate (values are means \pm SEM for 13 rats) corresponds to the first microdialysis fraction after 4-AP, and coincides with the onset of seizure discharges. Five days after the experiment rats were fixed by transcardial perfusion and coronal brain sections were stained with cresyl violet. As can be observed in the representative example shown, a notable neuronal loss was observed in CA1, CA3 and CA4, but CA2 (between arrows) was spared. (Scale bar = 200 μ m). The electrical seizures and neuronal damage were very similar in the 13 rats studied. For details on the experimental procedures (see Massieu et al., 1995; Morales-Villagrán and Tapia, 1996; Massieu and Tapia, 1997)

Behrens et al., 1994; Arias et al., 1997). These results strongly suggest that the hippocampal neurodegeneration observed after stimulation of glutamate release is related to an enhanced concentration of the amino acid at glutamatergic synapses, which could permit its interaction with the abundant EAA receptors present in the areas lesioned by 4-AP (Insel et al., 1990; Young et al., 1991).

4. Conclusion

In conclusion, the present article describes some of the problems in correlating the increases in extracellular glutamate in vivo with excitability alterations and neurodegeneration. The origin and mechanisms of glutamate accumulation in the extracellular space appear to be determinant for the access of the amino acid to its post-

synaptic receptors and consequently for the induction of excitotoxic neuronal damage. Even very high concentrations of the amino acid do not seem to be sufficient to produce neurodegeneration, unless they occur at the synaptic space. This clearly differs from the abundant data on glutamate-induced excitotoxicity in tissue culture, and casts some doubts on the generally accepted possibility that increased extracellular glutamate by itself, when originating from cell destruction or glutamate transporter deficiencies, might be responsible for neuronal death.

From the data reviewed in the present article it can be concluded that it would be an oversimplification to relate the occurrence of neurodegeneration only to an augmented concentration of endogenous extracellular glutamate or other EAA. Although there is no doubt that such increase may facilitate neuronal death through the mechanisms outlined here, other concurrent factors that accompany neurological disorders, such as mitochondrial energy deficits or chronic hyperexcitability, seem to be necessary to induce neurodegeneration.

Acknowledgments

The work by the authors' group described in this article was supported by DGAPA, UNAM (project 205095).

References

- Aras, C., Arrieta, I., Massieu, L., Tapia, R., 1997. Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus *in vivo*. *Exp. Brain Res* 116, 467–476.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 94, 4155–4160.
- Avoli, M., Barbarosic, M., Lücke, A., Nagao, T., Lopantsev, V., Kohling, R., 1996. Synchronous GABA-mediated potentials and epileptiform discharges in the rat limbic system *in vitro*. *J. Neurosci.* 16, 3912–3924.
- Bagetta, G., Iannone, M., Palma, E., Nisticó, G., Dolly, J.O., 1996. *N*-Methyl-D-aspartate and non-*N*-methyl-D-aspartate receptors mediate seizures and CA1 hippocampal damage induced by dendrotoxin-K in rats. *Neuroscience* 71, 613–624.
- Bagetta, G., Nair, S., Nisticó, G., Dolly, J.O., 1994. Hippocampal damage produced in rats by α -dendrotoxin—a selective K⁺ channel blocker—involves non-NMDA receptor activation. *Neurochem. Int.* 24, 81–90.
- Bagetta, G., Nisticó, G., Dolly, J.O., 1992. Production of seizures and brain damage in rats by α -dendrotoxin, a selective K⁺ channel blocker. *Neurosci. Lett.* 139, 34–40.
- Baker, A.J., Zornow, M.H., Scheller, M.S., Yaksh, T.L., Skilling, S.R., Smulling, D.H., Larson, A.A., Kuczenski, R., 1991. Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin, and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. *J. Neurochem.* 57, 1370–1379.
- Ben-Ari, Y., 1985. Limbic seizures and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance for human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 375–403.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., Diemer, N.H., 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43, 1369–1374.
- Bettler, B., Mülle, C., 1995. Neurotransmitter receptors II—AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacol.* 34, 123–139.
- Blitzblau, R., Gupta, S., Djali, S., Robinson, M.B., Rosenberg, P.A., 1996. The glutamate transport inhibitor *L*-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate indirectly evokes NMDA receptor mediated neurotoxicity in rat cortical cultures. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1840–1852.
- Bloc, A., Samuel, D., Forni, C., Dusticier, N., Kerkerian-Le Goff, L., 1995. Effects of ionotropic excitatory amino acid receptor antagonists on glutamate transport and transport-mediated changes in extracellular excitatory amino acids in the rat striatum. *J. Neurochem.* 64, 1598–1604.
- Bridges, R.J., Stanley, M.S., Anderson, M.W., Cotman, C.W., Chamberlin, R., 1991. Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. *J. Med. Chem.* 34, 717–725.
- Brown, A.W., Brierly, J.B., 1972. Anoxic ischemic cell change in rat brain: light microscopic & fine structural observations. *J. Neurol. Sci.* 16, 59–84.
- Bullock, R., Graham, D.I., Chen, M.-H., Lowe, D., McCulloch, J., 1990. Focal cerebral ischemia in the cat: pretreatment with a competitive NMDA receptor antagonist, D-CPPene. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10, 668–674.
- Butcher, S.P., Bullock, R., Graham, D.I., McCulloch, J., 1990. Correlation between amino acid release and neuropathological outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 21, 1727–1733.
- Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623–634.
- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., Kriegstein, A.R., 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7, 357–368.
- Clements, J.D., 1996. Transmitter time course in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci.* 19, 163–171.
- Clements, J.D., Lester, R.A.J., Tong, G., Jahr, C.E., Westbrook, C.L., 1992. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258, 1498–1501.
- Cramer, C.L., Stagnitto, M.L., Knowles, M.A., Palmer, G.C., 1994. Kainic acid and 4-aminopyridine seizure models in mice: Evaluation of efficacy of antiepileptic agents and calcium antagonists. *Life Sciences* 54, 271–275.
- Danbolt, N.C., 1994. The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Progr. Neurobiol.* 44, 377–396.
- Dolezal, V., Tucek, S., 1983. The effect of 4-aminopyridine and tetrodotoxin on the release of acetylcholine from rat striatal slices. *Naturyn-Schmid. Arch. Pharmacol.* 323, 90–95.
- Evans, M.C., Griffiths, T., Meldrum, B.S., 1984. Kainic acid seizures and the reversibility of calcium loading in vulnerable neurons in the hippocampus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 10, 285–302.
- Faden, A.I., Demediuck, P., Panter, S.S., Vink, R., 1989. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244, 798–800.
- Fagg, G.E., Foster, A.C., 1983. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 4, 701–719.
- Fairman, W.A., Vandenbergh, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599–603.
- Fonnun, F., 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42, 1–11.
- Frutoso-Velaz, J., Massieu, L., Alvarado, R., Tapia, R., 1990. Seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine and their potentiation by nifedipine. *Eur. J. Pharmacol.* 178, 275–284.

- Fragoso-Veloz, J., Tapia, R., 1992. NMDA receptor antagonists protect against seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 221, 275–280.
- Gandolfo, G., Gottesmann, C., Bidard, J.N., Lazdunski, M., 1989. Ca^{2+} channel blockers prevent seizures induced by a class of K^{+} channel inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 160, 173–177.
- Garlin, A.B., Sinor, A.D., Sinor, J.D., Jee, S.H., Grinspan, J.B., Robinson, M.B., 1995. Pharmacology of sodium-dependent high-affinity L-[3H]glutamate transport in glial cultures. *J. Neurochem.* 64, 2572–2580.
- Gill, R., Foster, A.C., Woodroff, G.N., 1988. MK 801 is neuroprotective in gerbils when administered during the post-ischemic period. *Neuroscience* 25, 847–855.
- Gill, R., Nordholm, L., Lodge, D., 1992. The neuroprotective actions of 2,3-dihydro-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline (NBQX) in a rat focal ischaemia model. *Brain Res.* 580, 35–43.
- Globus, M.Y.T., Busto, R., Dietrich, W.D., Martinez, E., Valdes, I., Ginsberg, M.D., 1988. Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate and γ -aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 51, 1455–1464.
- Graham, S.H., Shiraishi, K., Panter, S.S., Simon, R.P., Faden, A., 1990. Changes in extracellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 110, 124–130.
- Hartley, D.M., Kurth, M.C., Bjerkness, L., Weiss, J.H., Choi, D.W., 1993. Glutamate receptor-induced $^{45}Ca^{2+}$ accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J. Neurosci.* 13, 1993–2000.
- Herrera-Marschitz M., You, Z.B., Gojny, M., Meana, J.J., Silveira, R., Godukhin, O.V., Chen, Y., Espinoza, S., Pettersson, E., Loidl, C.F., Lubec, G., Andersson, K., Nylander, I., Terenius, L., Ungerstedt, U., 1996. On the origin of extracellular glutamate levels monitored in the basal ganglia of the rat by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 66, 1726–1735.
- Hillered, L., Hallström, A., Segersvärd, L., Persson, L., Ungerstedt, U., 1989. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9, 607–616.
- Hollmann M., Hartley, M., Heinemann, S., 1991. Ca^{2+} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252, 851–853.
- Hollmann M., Heinemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31–108.
- Hu, P.-S., Benishin, C., Fredholm, B.B., 1991. Comparison of the effects of four dendrotoxin peptides, 4-aminopyridine and tetraethylammonium on the electrically evoked [3H]noradrenaline release from rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 209, 87–93.
- Insel, T.R., Miller, L.P., Gelhard, R.E., 1990. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain. I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35, 31–43.
- Isaacson, J.S., Nicoll, R.A., 1993. The uptake inhibitor L-trans-PDC enhances responses to glutamate but fails to alter the kinetics of excitatory synaptic currents in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 70, 2187–2191.
- Jensen, J.B., Schousboe, A., Pickering, D.S., 1998. AMPA receptor mediated excitotoxicity in neocortical neurons is developmentally regulated and dependent upon receptor desensitization. *Neurochem. Int.* 32, 505–513.
- Jones, R.S.G., Heinemann, U., 1987. Pre- and postsynaptic K^{+} and Ca^{2+} fluxes in area CA1 of the rat hippocampus in vitro: effects of Ni^{2+} , TEA and 4-AP. *Exp. Brain Res.* 68, 205–209.
- Kanai, Y., Hediger, M., 1992. Primary structure and functional characterization of a high affinity glutamate transporter. *Nature* 360, 467–471.
- Kanai, Y., Smith, C.P., Hediger, M., 1993. The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *Trends Neurosci.* 16, 365–370.
- Lada, M.W., Vickroy, T.W., Kennedy, R.T., 1998. Evidence for neuronal origin and metabotropic receptor-mediated regulation of extracellular glutamate and aspartate in rat striatum in vivo following electrical stimulation of the prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 70, 617–625.
- Lundh, H., 1978. Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. *Brain Res.* 153, 307–318.
- Malva, J.O., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M., 1998. Kainate receptors in hippocampal CA3 subregion: evidence for a role in regulating neurotransmitter release. *Neurochem. Int.* 32, 1–6.
- Massieu, L., Tapia, R., 1994. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline protects against both AMPA and kainate-induced lesions in rat striatum in vivo. *Neuroscience* 59, 931–938.
- Massieu, L., Tapia, R., 1997. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J. Neurochem.* 69, 1151–1160.
- Massieu, L., Morales-Villagrán, A., Tapia, R., 1995. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 64, 2262–2272.
- Mattson, M.P., 1994. Calcium and neuronal injury in Alzheimer disease. Contributions of β -amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 747, 50–76.
- Meidrum, B., 1991. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res.* 10, 55–61.
- Michaelis, E.K., 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progr. Neurobiol.* 54, 369–415.
- Millan, M.H., Chapman, A.G., Meidrum, B.S., 1993. Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res.* 14, 139–148.
- Miller, R.J., 1994. G-protein linked glutamate receptors. *Seminars Neurosci.* 6, 105–115.
- Morales-Villagrán, A., Tapia, R., 1996. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem. Int.* 28, 35–40.
- Morales-Villagrán, A., Ureña-Guerrero, M.E., Tapia, R., 1996. Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 305, 87–93.
- Nisenbaum, E.S., Xu, Z.C., Wilson, C.J., 1994. Contribution of a slowly inactivating potassium current to the transition to firing of neostriatal spiny projection neurons. *J. Neurophysiol.* 71, 1174–1189.
- Nicholls, D., Atwell, D., 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 462–468.
- Obrenovitch, T.P., Urenjak, J., 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Progr. Neurobiol.* 51, 39–87.
- Obrenovitch, T.P., Urenjak, J., Zilkha, E., 1996. Evidence disputing the link between seizure activity and high extracellular glutamate. *J. Neurochem.* 66, 2446–2454.
- Ohno, K., Okada, M., Tsutsumi, R., Kohara, A., Yamaguchi, T., 1997. Kainate neurotoxicity is mediated by AMPA- but not kainate-preferring receptors in embryonic rat hippocampal cultures. *Neurochem. Int.* 31, 715–722.
- Olney, J.W., 1971. Glutamate induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 30, 75–90.
- Olney, J.W., Ho, O.L., Rhee, V., 1971. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 14, 61–76.
- Peghini, P., Janzen, J., Stoffel, W., 1997. Glutamate transporter EAAC1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J.* 16, 3822–3832.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Gorter, J.A., Bennett, M.V.L., Zukin, R.S., 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* 20, 464–470.
- Perrault, P., Avoli, M., 1991. Physiology and pharmacology of epi-

- leptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 65, 771–785.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjørås, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeborg, E., Kanner, B.I., 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360, 464–467.
- Pulsinelli, W.A., Duffy, T.E., 1983. Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. *J. Neurochem.* 40, 1500–1503.
- Randall, R.D., Thayer, S.A., 1992. Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 12, 1882–1895.
- Rauen, T., Jeserich, G., Danbolt, N.C., Kanner, B.I., 1992. Comparative analysis of sodium-dependent L-glutamate transport of synaptosomal and astroglial membrane vesicles from mouse cortex. *FEBS Lett.* 312, 15–20.
- Rawis, S.M., McGinty, J.F., 1997. L-trans-Pyrrolidin-2,4-dicarboxylic acid-evoked striatal glutamate levels are attenuated by calcium reduction, tetrodotoxin, and glutamate receptor blockade. *J. Neurochem.* 68, 1553–1563.
- Robinson, M.B., Hunter-Ensor, M., Sinor, J., 1991. Pharmacologically distinct sodium-dependent L-[³H]glutamate transport processes in rat brain. *Brain Res.* 544, 196–202.
- Rogers, D.C., Hunter, A.J., 1997. Dissociation of effects of glutamate receptor antagonists on excitotoxic and hypoxic neuronal cell death in a novel rat cortical culture system. *Brain Res. Bull.* 44, 131–139.
- Rothman, S.M., Olney, J.W., 1987. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci.* 10, 299–302.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hober, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F., 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675–686.
- Rusakov, D.A., Kullmann, D.M., 1998. Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J. Neurosci.* 18, 3158–3170.
- Sandberg, M., Butcher, S.P., Hagberg, M., 1986. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 47, 178–184.
- Sarantis, M., Ballerini, L., Miller, B., Silver, R.A., Edwards, M., Atwell, D., 1993. Glutamate uptake from the synaptic cleft does not shape the decay of the non-NMDA component of the synaptic current. *Neuron* 11, 541–549.
- Schafer, Jr., E.W., Brunton, R.B., Cunningham, D.J., 1973. A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26, 532–538.
- Schechter, L.E., 1997. The potassium channel blockers 4-aminopyridine and tetraethylammonium increase the spontaneous basal release of [³H]5-hydroxytryptamine in rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 262–270.
- Sheardown, M.J., Nielsen, E.O., Hansen, A.J., Jacobsen, P., Honoré, T., 1990. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247, 571–574.
- Siesjö, B.K., 1994. Calcium-mediated processes in neuronal degeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 747, 140–161.
- Simon, R.P., Swan, J.H., Griffiths, T., Meldrum, B.S., 1984. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226, 850–852.
- Siniscalchi, A., Calabresi, P., Mercuri, N.B., Bernardi, G., 1997. Epileptiform discharge induced by 4-aminopyridine in magnesium-free medium in neocortical neurons: physiological and pharmacological characterization. *Neuroscience* 81, 189–197.
- Spyker, D.A., Lynch, C., Shabanowitz, J., Sinn, J.A., 1980. Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin. Toxicol.* 16, 487–497.
- Stein-Behrens, B., Mattson, M.P., Chang, I., Yeh, M., Sapolsky, R., 1994. Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. *J. Neurosci.* 14, 5373–5380.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W., 1992. Structure, expression and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10955–10959.
- Swan, J.H., Meldrum, B.S., 1990. Protection by NMDA antagonists against selective cell loss following transient ischaemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10, 343–351.
- Tapia, R., Flores-Hernández, J., 1990. Circling behavior induced by intranigral administration of ruthenium red and 4-aminopyridine in the rat. *Neuroscience* 39, 657–663.
- Tapia, R., Sitges, M., 1982. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250, 291–299.
- Tapia, R., Sitges, M., Morales, E., 1985. Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* 361, 373–382.
- Thesleff, S., 1980. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5, 1413–1419.
- Tibbs, G.R., Dolly, O.J., Nicholls, D.G., 1989a. Dendrotoxin, 4-aminopyridine and β -bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanisms to induce Ca²⁺-dependent release of glutamate from guinea-pig cerebrocortical synaptosomes. *J. Neurochem.* 52, 201–206.
- Tibbs, G.R., Barrie, A.P., Van-Mieghem, F., McMahon, H.T., Nicholls, D.G., 1989b. Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release. *J. Neurochem.* 53, 1693–1699.
- Timmerman, W., Westerink, B.H.C., 1997. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* 27, 242–261.
- Van Reempts, J., 1984. The hypoxic brain: histological and ultrastructural aspects. *Behav. Brain Res.* 14, 99–108.
- Velasco, I., Tapia, R., Massieu, L., 1996. Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J. Neurosci. Res.* 44, 551–561.
- Versteeg, D.H.G., Heemskerk, F.M.J., Spierenburg, H.A., de Graan, P.N.E., Schrama, L.H., 1995. 4-Aminopyridine differentially affects the spontaneous release of radiolabelled transmitters from rat brain slices in vitro. *Brain Res.* 686, 233–238.
- Vizi, E.S., Mike, A., Tarnawa, I., 1996. 2,3-Benzodiazepines (GYKI 52466 and analogs): negative allosteric modulators of AMPA receptors. *CNS Drug Rev.* 2, 91–126.
- Vizi, E.S., Mike, A., Tarnawa, I., 1997. The functional study of kainate receptors—hopes and doubts. *Trends Neurosci.* 20, 396.
- Volterra, A., Bezzi, P., Rizzini, B.L., Trotti, D., Ullensvang, K., Danbolt, N.C., Racagni, G., 1996. The competitive transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2019–2028.
- Yamaguchi, S., Rogawski, M.A., 1992. Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* 11, 9–16.
- Yonekawa, W.D., Kapetanovic, I.M., Kupferberg, H.J., 1995. The effect of anticonvulsant agents on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in rat hippocampus in vitro. *Epilepsy Res.* 20, 137–150.
- Young, A.B., Sakurai, S.Y., Albin, R.L., Makowiec, R., Penney, J.B., 1991. Excitatory amino acid receptor distribution: quantitative autoradiographic studies. In: Thompson, W.H. (Ed.), *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission*. Academic Press, New York, pp. 19–31.
- Wahl, F., Obrenovitch, T.P., Hardy, A.M., Plotkine, M., Boulu, R., Symon, L., 1994. Extracellular glutamate during focal cerebral ischaemia in rats: time course and calcium-dependency. *J. Neurochem.* 63, 1003–1011.
- Zuiderwijk, M., Veenstra, E., Lopes da Silva F.H., Ghislen, W.E.J.M., 1996. Effects of uptake carrier blockers SK&F 89976-A and L-nans-PDC on in vivo release of amino acids in rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 307, 275–282.

III. CIRCUITO CORTEZA ENTORRINAL-HIPOCAMPO

1. ANATOMIA DEL CIRCUITO CORTEZA ENTORRINAL-HIPOCAMPO

1.1 Características generales

La formación hipocámpica esta compuesta por seis estructuras que son: el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho (CA₃, CA₂ y CA₁), el subículo, el presubículo y parasubículo (a estas tres estructuras se les ha reunido con el término de complejo subicular) y, finalmente la corteza entorrinal. La formación hipocámpica es una estructura elongada, cuyo eje longitudinal se extiende en forma de C y corre rostródorsalmente del núcleo septal hasta caudoventralmente en el lóbulo temporal (Fig. 3). Se presentan cuatro haces de fibras en la formación hipocámpica que contienen tanto fibras aferentes como eferentes, estas son: el **alveus** que se origina en las células piramidales del hipocampo y subículo, estas fibras se dirigen hacia sitios subcorticales o a la misma formación hipocámpica contralateral; la **fimbria** que se localiza en el extremo lateral del hipocampo, cuando sus fibras salen del hipocampo y descienden al procencéfalo, son referidas como las columnas del **fórnix**. Estas fibras se dirigen hacia el núcleo septal y a otras estructuras del procencéfalo basal y diencefalo. Finalmente el **haz angular** que atraviesa la línea media del esplenio del cuerpo caloso y contiene fibras que se originan desde o proyectan a el presubículo, parasubículo y la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1995).

1.2 Organización y tipos celulares

El **giro dentado** presenta tres capas (Fig. 4,5): la capa molecular, relativamente libre de células, la capa granular y la capa polimórfica que en otros textos la refieren como hilus o CA₄. La **capa molecular** esta ocupada

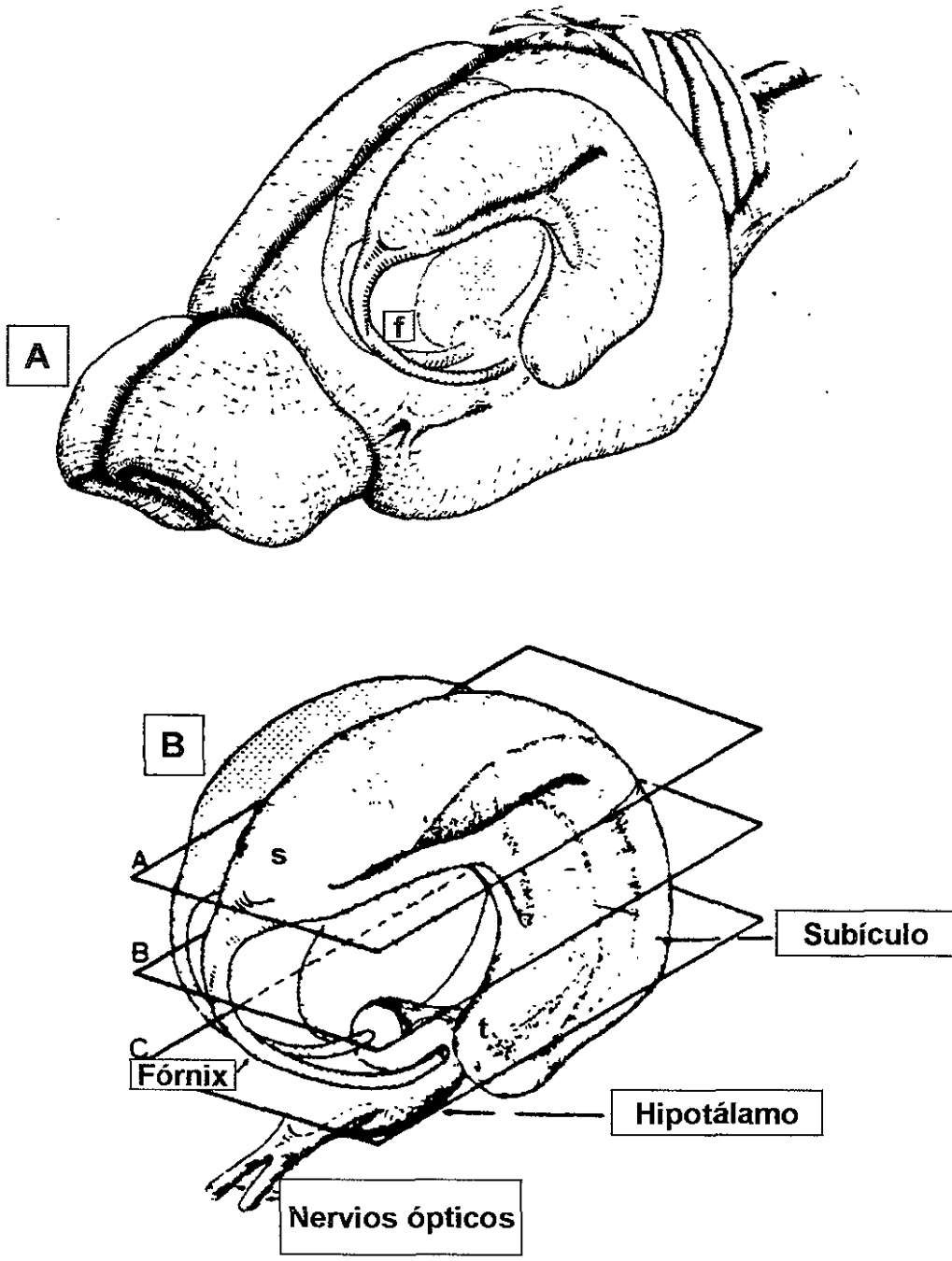


Fig. 3 Organización tridimensional de la formación hipocámpica en el cerebro de la rata. A) Se muestra la forma en C del hipocampo y su posición en el cerebro de la rata. Las columnas del fórnix (f) descienden al polo septal (s) del hipocampo. B) Se muestran tres secciones horizontales (A, B, C) a diferentes niveles dorsoventrales de la formación hipocámpica, la corteza entorrinal se localiza en los niveles medios y ventrales de la formación hipocámpica. Polo temporal (t).

principalmente por las dendritas de las células granulares, células en canasta y varias células polimórficas, así como por las terminaciones axónicas de varias fuentes. Otro tipo celular en canasta se encuentra en la porción profunda de esta capa cuyo axón contribuye al plexo en canasta dentro de la capa de las células granulares. El otro tipo celular que se localiza en esta capa es la célula axo-axónica o "chandelier" cuyo axón termina en los segmentos iniciales del axón de las células granulares y que es GABAérgica, se le considera como el segundo control inhibitorio de las células granulares. **La capa granular** tiene como principal tipo celular la célula granular que está estrechamente relacionada con otras células granulares y es glutamatérgica. En la porción profunda de esta capa se encuentran las células en canasta, la mayoría de las cuales son GABAérgicas y muchas son inmunoreactivas a la parvalbúmina (proteína que atrapa calcio). Otros tipos celulares son multipolares o fusiformes, suplementan con sus axones al plexo en canasta en la capa de células granulares. Finalmente, **la capa polimórfica** cuyo tipo celular más común es la célula musgosa de tipo glutamatérgica y cuyas dendritas proximales presentan espinas complejas denominadas excrescencias que son los sitios de terminación de los axones de las fibras musgosas. Se presentan además en esta capa, las células fusiformes y multipolares que dan origen a un plexo estrellado y son GABAérgicas (Amaral y col., 1990; Boss y col., 1985; Wesy y col., 1988).

El hipocampo propiamente dicho puede dividirse en tres campos CA₃, CA₂ y CA₁ (cornu ammonis, CA); la organización laminar es generalmente similar para todos los campos a excepción de CA₃ que presenta una zona acelular justo por debajo de la capa de células piramidales y que esta ocupada por los axones de las

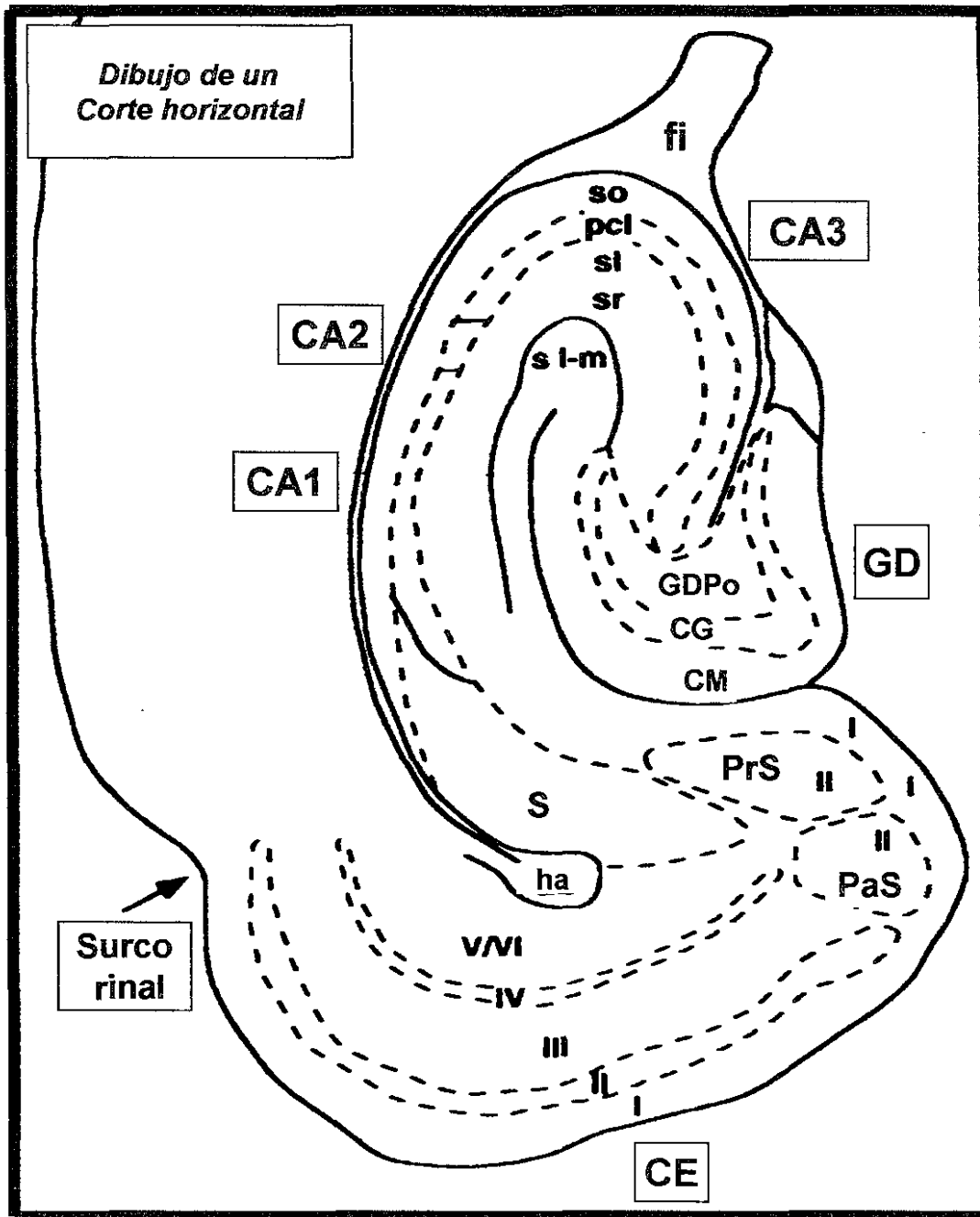


Fig. 4 Dibujo que muestra la posición de varias regiones, capas y vías de la formación hipocámpica de la ratón. Haz angular (ha); parasubículo (PaS); presubículo (PrS); subículo (S); GDPo, CG, CM, capa polimórfica, capa granular y capa molecular del giro dentado (GD), respectivamente; estrato oriens (so); estrato piramidal (sp); estrato lucidum (sl); estrato radiatum (sr); estrato lacunoso-molecular (sl-m) de CA1, CA2 y CA3 del hipocampo; fimbria (fi); corteza entorrinal (CE).

fibras musgosas originadas en el giro dentado, se le denomina **estrato lucidum** (Fig. 4,5). El resto de los campos presenta la siguiente organización laminar: el **estrato oriens**, capa relativamente libre de células que esta ocupada por el árbol dendrítico de las células piramidales; la **capa de células piramidales**, cuyo principal tipo celular es la célula piramidal, además, presenta las células en canasta que forman un plexo en canasta que inerva los cuerpos celulares de las células piramidales; el **estrato radiatum** donde se localizan las conexiones de asociación CA₃-CA₃ y las colaterales de Schaffer de CA₃ a CA₁; el **estrato lacunoso molecular** donde las fibras de la vía perforante que vienen de la corteza entorrinal terminan, además de otras aferencias de otras regiones como las del núcleo reuniens (tálamo). Existe una vasta mayoría de células no piramidales inmunoreactivas a GABA las cuales se considera, forman circuitos locales en el estrato oriens, estrato radiatum y estrato lacunoso molecular del hipocampo (Seress y Ribak, 1984; Amaral y Witter, 1995).

La corteza entorrinal ventralmente se localiza en la porción más caudal del manto cortical. Se extiende ventromedialmente para bordear con el parasubículo, la corteza piriforme y el complejo amigdaloides y, dorsolateralmente con el surco rinal. La mayor porción de la corteza se localiza en los campos de la formación hipocampal. La corteza entorrinal se divide en seis capas (Fig. 4): I. Es la capa molecular o plexiforme más superficial, rica en fibras orientadas transversalmente. Esta capa contiene neuronas GABAérgicas, células estrelladas y horizontales que proyectan al giro dentado e hipocampo, así como neuronas que terminan en las dendritas de las células de la capa II que proyectan al giro dentado (Caballero-Bleda y Witter, 1993). II. Contiene células estrelladas de tamaño medio y largo que

contribuyen principalmente a las fibras de la vía perforante que proyectan al giro dentado y CA₃. También se presentan células piramidales, multipolares y horizontales, las cuales contribuyen a las fibras de la vía perforante (Köhler, 1985; Köhler, 1986; Lingenhohl y Finch, 1991). En esta capa se han encontrado algunas colaterales axónicas que se dirigen a las capas profundas de la corteza entorrinal. Se ha demostrado la presencia de células axo-axónicas (Martinez y col., 1992).

III. Contiene células de varios tamaños y formas que le dan un aspecto heterogéneo a la capa. El tipo celular más abundante es la célula piramidal que proyecta a los campos de CA₁ y el subículo, sus colaterales axónicas se dirigen a las capas III y I. Además se han encontrado células multipolares, estrelladas, fusiformes, horizontales y bipolares que parece contribuyen con la vía perforante (Köhler, 1985; Köhler, 1986; Lingenhohl y Finch, 1991).

IV o lamina *dissecans* se localiza entre la capa III y V. Cercana al surco rinal, particularmente a nivel caudal de la corteza entorrinal.

V. Esta capa se ha dividido en dos, la Va que es una banda larga de neuronas piramidales cuyas dendritas apicales se dirigen a las capas superficiales (I y II), los axones terminan en capas profundas de la materia blanca, también se presentan neuronas pequeñas que se han caracterizado como horizontales, estrelladas y multipolares. Rostralmente la capa Vb presenta una pérdida de células piramidales pequeñas y polimórficas, caudalmente esta capa toma una apariencia columnar (Köhler, 1985; Köhler, 1986; Lingenhohl y Finch, 1991).

VI. Contiene una población heterogénea de células que se han dividido en tres categorías: células que influyen a células de la capa Vb o VI, células cuyas colaterales axónicas influyen la columna vertical de células en las capas I-III y. células cuyos axones se dirigen hacia las áreas profundas de la materia blanca, muchas de ellas contribuyen

a la proyección que va al giro dentado y el hipocampo. Presenta una organización columnar en la región más caudal. En general en todas las capas se han encontrado interneuronas GABAérgicas aunque son más abundantes en las capas superficiales. Algunas de estas neuronas en las capas II y III proyectan al giro dentado (Germroth y col., 1989 a y b).

En general se ha aceptado que la corteza entorrinal puede dividirse en dos regiones, el área entorrinal lateral y el área entorrinal media. El área lateral incluye a la dorsolateral, la dorsal y la ventral, mientras que la media está conformada por la caudal y media.

1.3 Conexiones intrínsecas y extrínsecas

En el giro dentado las células granulares envían sus axones a las células piramidales de CA₃. las denominadas fibras musgosas, sin embargo, antes de llegar a ésta, envían unas colaterales a las células musgosas y en canasta de la capa polimórfica (Ribak y Seress, 1983; Ribak y col., 1985; Scharfman y col., 1990). Estas fibras son glutamatérgicas aunque algunas también presentan péptidos opiáceos como la dinorfina (Storm-Mathisen y Fonnum, 1972; Gall, 1984). Asimismo, las células granulares están inervadas por las células en canasta de la capa granular que son GABAérgicas y que constituyen la primera aferencia inhibitoria (Kosaka y col., 1984). La segunda aferencia inhibitoria de las células granulares la constituyen las células axo-axónicas localizadas en la capa molecular (Kosaka, 1983; Soriano y Frotscher, 1989; Han y col., 1993). Finalmente, un tercer control inhibitorio a las células granulares proviene de neuronas inmunoreactivas a GABA y somatostatina localizadas en la capa polimórfica (Halasy y Somogyi, 1993; Bakst y col., 1986) (Fig. 6).

AFERENCIAS SUBCORTICALES

- Amígdala
- Clastrum
- Núcleo septal
- Núcleo supramamilar
- Hipotálamo lateral
- Tálamo anterior
- Tálamo medio
- Area tegmental ventral
- Núcleo de rafe
- Locus ceruleus

EFERENCIAS SUBCORTICALES

- Regiones olfatorias
- Amígdala
- Núcleo septal
- Núcleo accumbens
- Tálamo anterior
- Tálamo medio
- Hipotálamo
- Núcleo mamilar



FORMACION HIPOCÁMPICA

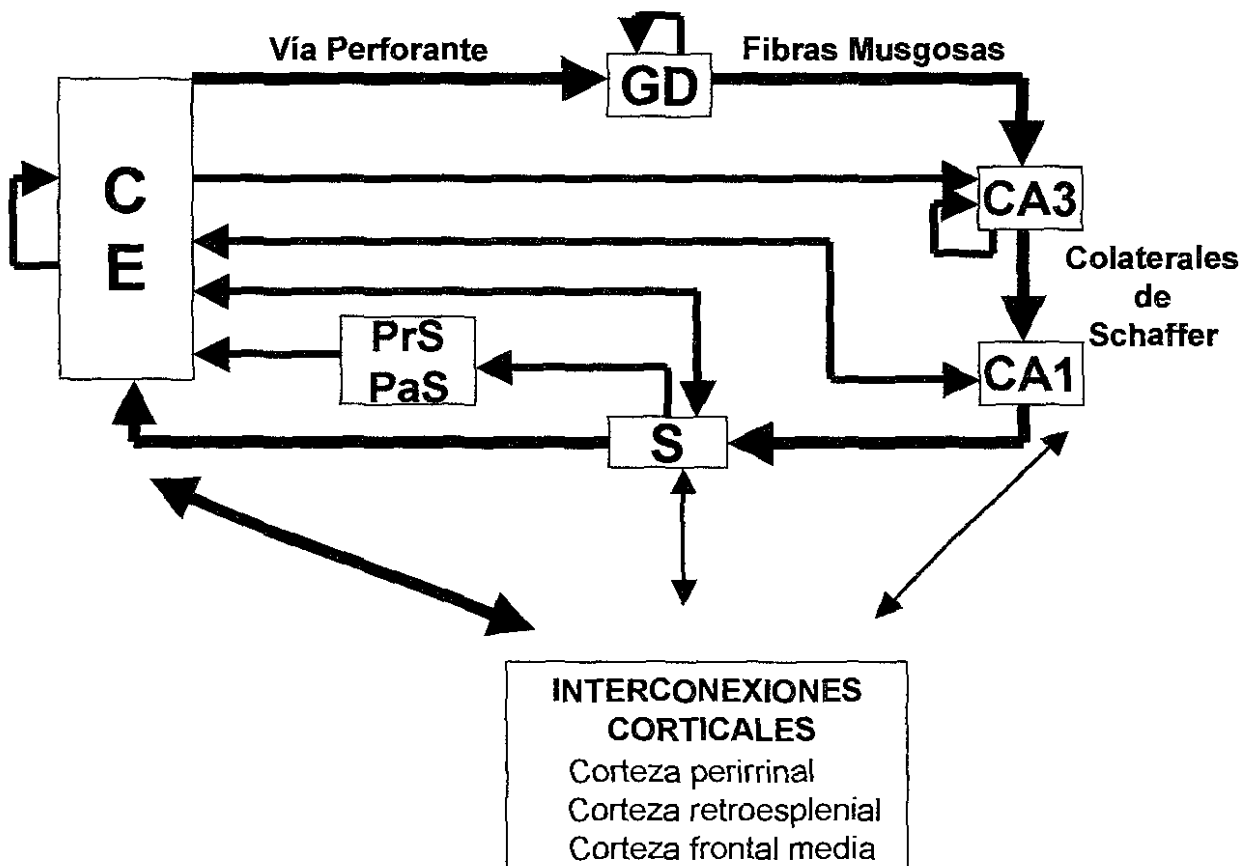


Fig. 6 Diagrama que muestra las principales conexiones internas de la formación hipocámpica de la rata. Muchas de estas vías son unidireccionales (vía perforante, fibras musgosas, colaterales de Schaffer). Se enlistan las principales aferencias y eferencias de regiones corticales y subcorticales de la formación hipocámpica. CE, corteza entorrinal; GD, giro dentado; S, subículo; PrS, presubiculo y PaS, parasubiculo.

La capa molecular del giro dentado recibe fibras que se origina exclusivamente de las células de la capa polimórfica tanto ipsilateral como contralateral, por lo que se les ha denominado proyecciones de asociación-comisurales (Laurberg y Sorensen, 1981), estas son terminales excitadoras de tipo glutamatérgico que provienen principalmente de las células musgosas de la capa polimórfica y se dirigen a las células granulares (Laurberg y Sorensen, 1981; Kishi y col., 1980), y a las células en canasta GABAérgicas (Frotscher y Zimmer, 1983; Seress y Ribak, 1984). Esta proyección asociación-comisural pudiera funcionar como una vía excitadora de retroalimentación y como una vía inhibidora de retroalimentación disináptica; ya que las células musgosas envían colaterales a las células inmunoreactivas a GABA-somatostatina que pudieran dirigir la inhibición a las células granulares o la inhibición-excitación a niveles más distantes del giro dentado (Amaral y Witter, 1995).

Finalmente, las aferencias y eferencias extrínsecas del giro dentado son: de las regiones subcorticales como el núcleo septal medio y el núcleo de la banda diagonal de Broca a la capa polimórfica y en menor proporción a la capa molecular del giro dentado (Amaral y Kurz, 1985; Milner y Amaral, 1984). Esta proyección está topográficamente organizada y las neuronas son de tipo colinérgico (Wainer y col., 1984, 1985). Algunas células septales envían una proyección de tipo GABAérgico y se dirigen preferencialmente a las células no piramidales de tipo GABAérgico (Freund y Antal, 1988). Estas últimas células son inmunoreactivas a colecistoquinina, somatostatina, VIP o a proteínas que unen calcio como la calretinina, la calbindina o la parvalbumina (Gulyas y col., 1990; Acsády y col., 1993). La proyección hipotalámica mayor a la capa granular del giro dentado

proviene de la región supramamilar (Dent y col., 1983). Asimismo, la capa polimórfica del giro dentado recibe proyecciones del núcleo pontino del *locus ceruleus* de tipo noradrenérgico y núcleos del rafe que es serotoninérgico (Moore y col., 1978; Conrad y col., 1974). Finalmente, la vía perforante, que se origina en la corteza entorinal y que llega a través del subículo a las células granulares del giro dentado.

En el hipocampo las conexiones intrahipocámpicas provienen de las células piramidales de CA₃ a los campos CA₃, CA₂ y CA₁ ipsilaterales (proyecciones de asociación) y contralaterales (proyecciones comisurales) y subcorticalmente al núcleo septal lateral. Células del campo CA₃ y CA₂ contribuyen con unas colaterales que se dirigen a la región polimórfica del giro dentado. (Swanson y col., 1978). Las conexiones de CA₃ y CA₂ se les denomina proyecciones de asociación y las de CA₃ a CA₁ son las denominadas colaterales de Schaffer que hacen contacto con las dendritas apicales de las células piramidales en CA₁ en el estrato radiatum como en las dendritas basales del estrato oriens (Amaral y Witter, 1995). Se sabe que el neurotransmisor excitador de la vía perforante y de las colaterales de Schaffer es el glutamato (White y col. 1990). Las conexiones extrínsecas del hipocampo se dirigen de CA₃ al núcleo septal lateral y de este núcleo a CA₃, algunas neuronas que proyectan a la región septal son GABAérgicas (Tóth y Freund, 1992) y el componente GABAérgico de la región septal a CA₃ termina principalmente en interneuronas GABAérgicas (Gulyas y col., 1990). CA₃ recibe aferencias del *locus ceruleus* y núcleos del rafe que son monoaminérgicos. CA₂ por otro lado, recibe una inervación de las partes posteriores del hipotálamo, en particular del área supramamilar (Haglund y col., 1984) y del núcleo tuberomamilar (Köhler y col.,

1985). Con respecto a CA₁ solo un número pequeño de neuronas proyectan a la región de CA₁ contralateral (Van Groen y Wyss, 1990). Este campo recibe una ligera proyección septal, así como noradrenérgica y serotoninérgica (Nyakas y col., 1987). La porción distal de este campo recibe proyecciones del complejo amigdalóide (Krettek y Price, 1977). Del núcleo *reuniens* del tálamo al estrato lacunoso-molecular de CA₁. Asimismo, CA₁ proyecta a las mismas regiones subcorticales y a un número de regiones corticales como la corteza retrosplenial y perirrinal (Van Groen y Wyss, 1990)(Fig. 6).

La principal eferencia de **la corteza entorrinal** a la formación hipocámpica es la vía perforante, que se origina en las neuronas de las capas II y III, aunque existe un componente menor en las capas profundas de esta estructura. Los principales tipos celulares que contribuyen a esta vía son las células estrelladas de la capa II y las células piramidales de la capa III. Existe un número menor de células GABAérgicas que proyectan a varios campos del hipocampo (Caballero-Bleda y Witter, 1993; Amaral y Witter, 1995). Esta vía termina principalmente en las células granulares y en menor proporción en neuronas inmunoreactivas a parvalbúmina-GABA. Existe un componente de esta proyección dirigida a CA₃ y CA₂ (Tamamaki y Nojyo, 1993). Los componentes laterales y medios de la vía perforante terminan en diferentes posiciones transversales en el campo CA₁, esta misma región presenta una proyección de regreso a la corteza entorrinal que termina en la capa V de la región media de esta estructura (Finch y Babb, 1980, 1981; Swanson y Cowan, 1977; Van Groen y Wyss, 1990 b). Se describe la presencia de una proyección de la corteza entorrinal al subículo, por donde pasan las fibras para llegar a la formación hipocámpica, específicamente a las células piramidales del subículo

(Steward, 1976; Wyss, 1981). Asimismo, el subículo presenta proyecciones a la corteza entorrinal, aunque en la rata son estrictamente ipsilaterales (Köhler, 1985, Swanson y col., 1978). Se presenta un componente menor de la vía perforante a la capa molecular del parasubículo y presubículo (Fig. 6) (Van Groen y Wyss, 1990 a, c).

La corteza entorrinal envía una proyección cruzada a la formación hipocámpica contralateral exclusivamente de las células de la capa III (Steward y Scoville, 1976). Presenta conexiones de asociación y comisurales, es decir, fibras intra-entorrinales que se dirigen en una dirección longitudinal y que conectan las regiones transversales o medio-laterales de la corteza entorrinal (Köhler, 1986, 1988).

Las aferencias corticales de la corteza entorrinal provienen fundamentalmente de estructuras olfatorias del telencéfalo (bulbo olfatorio, núcleo anterior olfatorio y corteza piriforme) y la corteza perirrinal, estas fibras se dirigen a las capas superficiales de la corteza entorrinal. La corteza de la región límbica y paralímbica tiene una proyección que llega a las capas profundas de la corteza entorrinal (Lopes da Silva, 1990). Se han encontrado proyecciones de las cortezas del cíngulo anterior, infralímbica y prelímbica que terminan en la porción rostral de la corteza entorrinal (White y col., 1990). Se presenta una proyección de la corteza retroesplénica que termina en las porciones más caudales de la región media de la corteza entorrinal (Wyss y Van Groen, 1992). Finalmente, las aferencias subcorticales de la corteza entorrinal provienen del complejo septal medio (Alonso y Köhler, 1984) para terminar en la capa IV y, del complejo amigdaloides para terminar en las capas I, II y III. La principal aferencia talámica proviene del núcleo reuniens y

núcleo medio-central para terminar en la capa I y III (Wouterlood, 1991). La corteza entorrinal recibe aferencias adicionales de estructuras del hipotálamo y tallo cerebral, de esta última estructura se encuentra, los núcleos del rafe y el núcleo del locus ceruleus que se dirigen a las capas profundas y a la capa I de la corteza entorrinal, respectivamente (Köhler y Steinbusch, 1982; Moore y col., 1978).

Las eferencias corticales se originan de las capas II, III y Va de la corteza entorrinal y se dirigen a las áreas olfatorias, la corteza infralímbica y la corteza perirrinal (DeOlmos y col., 1978; Lopes da Silva y col., 1990). Estudios en la rata han demostrado que la corteza entorrinal proyecta a partes limitadas de la corteza temporal (Kosel y col., 1982). Las eferencias subcorticales se dirigen a la región septal, a la amígdala y a la porción ventral del estriado (Swanson y Cowan, 1977; Ottersen, 1982; Turner y col., 1980; Phillipson y Griffiths, 1985).

2. NEUROQUIMICA DEL CIRCUITO CORTEZA ENTORRINAL-HIPOCAMPO

2.1 *Glutamato*

La vía glutamatérgica por excelencia de este circuito esta constituido por el llamado circuito trisináptico de la formación hipocámpica, donde la principal aferencia glutamatérgica proviene de la corteza entorrinal que hace sinapsis con las células granulares del giro dentado (vía perforante). Estas células envían sus axones a las dendritas de las células piramidales de CA₃ (fibras musgosas). Las células piramidales de CA₃ proyectan a la región dendrítica de las células piramidales de CA₁ a través de las colaterales de Schaffer. Finalmente, se presenta una proyección de las células piramidales de CA₁ a el subículo y la corteza

entorrinal, donde se cierra el circuito corteza entorrinal-hipocampo (Freund y Buzsáki, 1996).

2.2 Ácido γ -aminobutírico

Datos anatómicos han demostrado que todas las interneuronas de la formación hipocámpica son GABAérgicas (Freund y Buzsáki, 1996, 1997). Estas interneuronas conforman aproximadamente el 10% del total de la población neuronal del hipocampo. Las interneuronas hacen contacto no solo con las células principales de esta estructura sino también con otras interneuronas (Acsády y col., 1996; Gulyas y col., 1996). Asimismo, se presentan aferencias y eferencias GABAérgicas. Las células GABAérgicas del septo inervan a una gran cantidad de interneuronas GABAérgicas hipocámpicas (Freund y Antal, 1988; Gulyas y col., 1990). Las células blanco de las eferencias GABAérgicas son neuronas inmunoreactivas a parvalbúmina-GABA en el septo medio y el asta vertical de la banda diagonal de Broca. (Töth y col., 1993). Estas interneuronas hipocámpicas envían también proyecciones comisurales al hipocampo contralateral (Ribak y col., 1986). A nivel de CA₁ se ha demostrado que el 100% de las varicosidades que presentan hacen puntos de contacto con las interneuronas, sugiriendo su participación en este campo (Umbriaco y col., 1995).

Las interneuronas pudieran selectivamente inervar el árbol dendrítico, soma o segmento inicial del axón de las células piramidales y mediar de esta manera la inhibición dendrítica o perisomática (Freund y Buzsáki, 1996). Las células inhibitoras perisomáticas (las células en canasta y axo-axónicas) controlan eficientemente el disparo de las espigas de sodio repetitivas a nivel del soma.

mientras que la inhibición dendrítica pudiera regular la electrogénesis mediada por calcio y la activación de los receptores a glutamato tipo ligando o dependientes de voltaje en las dendritas de las células principales (Freund, 1997). Ambos tipos de interneuronas se pueden incluir en los circuitos excitadores recurrentes. Estos dos tipos de interneuronas difieren en sus características neuroquímicas como el contenido de proteínas que unen calcio, neuropéptidos y receptores a neurotransmisores (Freund y Buzsáki, 1996). En el hipocampo además de los componentes básicos de las células principales excitadoras e interneuronas inhibitoras que regulan su actividad, se suman las interneuronas que inervan otras interneuronas denominadas interneuronas-selectivas (IS). Una de estas interneuronas IS1 contiene calretinina y tiene contactos a nivel perisomático con células inhibitoras. Las tipo IS2 que contienen el neuropéptido PIV, inervan las interneuronas que hacen contacto con las células piramidales. Las IS3 que también tienen PIV, forman múltiples contactos con las interneuronas horizontales del estrato oriens que se sabe inervan las dendritas más distales de las células piramidales, en conjunto con las aferencias entorrinales (Freund y Buzsáki, 1996; Gulyas y col., 1996; Acsády y col., 1996).

2.3 Acetilcolina

Las aferencias colinérgicas del septo medio y de la banda diagonal de Broca se presentan en todas las capas del hipocampo (Frotscher y Leranth, 1985) tanto en células principales como en interneuronas GABAérgicas (Freund y Buzsáki, 1996; Leranth y Frotscher, 1987).

2.4 Noradrenalina

La inervación noradrenérgica proviene exclusivamente del locus ceruleus (Loy y col., 1980), estas proyecciones son ipsilaterales y se presentan en cada capa del hipocampo (Oleskevich y col., 1989). Esta inervación es particularmente densa a nivel de la capa polimórfica, el estrato lucidum de CA₃, el estrato lacunoso molecular de CA₁ (Loy y col., 1980). La mayor concentración de noradrenalina la recibe el giro dentado y la menor el campo CA₁ (Hornnagl y col., 1991; Hornnagl y Hellweg, 1997). Esta proyección está dirigida a las células piramidales como a las interneuronas GABAérgicas; sin embargo, la noradrenalina participa principalmente en interacciones de tipo no sináptico (Milner y Bacon, 1989 a y b; Umbriaco y col., 1995)

2.5 Serotonina

La inervación serotoninérgica proviene de los núcleos del rafe dorsal y medio (Conrad y col., 1974). Las de la región dorsal no hacen contactos sinápticos, sin embargo, la región media presenta solo un 21% de sinapsis con las dendritas y soma de las interneuronas GABAérgicas (Freund y col., 1990; Freund, 1992).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El modelo de crisis inducido por la administración de 4-AP es similar a la epilepsia generalizada que se presenta en el humano. La 4-AP no es específico para algún sistema de neurotransmisión en particular, ya que el efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores es de espectro amplio. En la epilepsia no se puede hablar de algún sistema de neurotransmisión específico, sino de un conjunto de éstos que inicie, mantenga y propague el fenómeno paroxístico. Sin embargo, de acuerdo a los antecedentes descritos previamente, el glutamato participa de manera importante en las crisis convulsivas inducidas por la 4-AP.

La técnica de microdiálisis dual y registro EEG simultáneo, que hasta la fecha no se ha utilizado en ningún modelo de epilepsia, nos plantea la posibilidad de indagar con mayor detalle la participación del glutamato y algunos otros aminoácidos sobre los mecanismos posibles de iniciación y propagación de las crisis inducidas por la administración de 4-AP en circuitos anatómicos que sean relevantes para el surgimiento del fenómeno paroxístico como el caso del circuito corteza entorrinal-hipocampo, ya que se tiene la posibilidad de establecer correlación conductual, EEG y bioquímica *in vivo*, durante el desarrollo de las crisis convulsivas.

HIPÓTESIS

Sobre la base de los antecedentes revisados, la hipótesis de trabajo es que un exceso en la transmisión glutamatérgica es un factor importante en la iniciación y en la propagación de las crisis epilépticas producidas por la administración de la 4-AP en el circuito corteza entorrinal-hipocampo de ratas en libre movimiento.

OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes descritos y con el propósito de evaluar el papel de algunos neurotransmisores y su relación con el circuito anatómico corteza entorrinal-hipocampo en las crisis convulsivas inducidas por la administración de 4-AP, se plantearon los siguientes objetivos:

GENERAL:

Determinar el papel de algunos aminoácidos neurotransmisores en las crisis convulsivas inducidas por la administración de 4-AP en el circuito anatómico corteza entorrinal-hipocampo.

PARTICULAR:

1. Cuantificar los niveles de algunos aminoácidos en las regiones de la corteza entorrinal y el hipocampo mediante el uso de la técnica de microdiálisis dual y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), así como, la actividad electroencefalográfica (EEG) de manera simultánea a la evaluación bioquímica.

MATERIALES Y METODOS

Como se indicó en la organización de la tesis, los Materiales y Métodos se presentan en un artículo ya publicado "Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique" (1999) Morales-Villagrán, A., López-Pérez, S., Medina-Ceja, L. y Tapia, R. *Neuroscience Letters*, **275**: 133-136, donde se muestra las características técnicas del dispositivo utilizado para el desarrollo de este trabajo. A continuación se exponen los detalles del procedimiento.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (240-260g de peso) mantenidas en condiciones de bioterio, las cuales se anestesiaron con halotano y se sujetaron a un aparato estereotáxico con la barra incisora posicionada a -3.3 mm. Se colocaron cánulas guía de acero inoxidable (0.5 mm de diámetro interno) a través de perforaciones realizadas en el cráneo de la rata para fijarlas de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas del hipocampo o la corteza entorrinal, y se sujetaron con acrílico y tornillos al hueso. Las cánulas de microdiálisis (previamente lavadas con agua destilada por 20 min a un flujo de 5 μ l/min), se insertaron en las cánulas guía y se fijaron con alambre de acero adjunto a las cánulas guía con acrílico dental utilizado también para fijar el conector al cráneo. Las coordenadas estereotáxicas para la punta de las cánulas de microdiálisis fueron A -8.0 mm, L -4.6 mm de bregma y V 5.4 mm de dura para la corteza entorrinal y A -4.0 mm, L -2.5 mm de bregma y V 4.0 mm de dura para el hipocampo (Paxinos y Watson, 1986). La localización de las dos cánulas de microdiálisis se verificó después de terminado el experimento por examen histológico después de su tinción con violeta de cresilo.

Se descartaron aquellos animales que presentaron una localización errónea de las cánulas.

Una vez retirada la anestesia y con las ratas despiertas, se perfundieron las cánulas implantadas con un medio Krebs-Ringer con la composición siguiente (en mM): NaCl 118, KH_2PO_4 1.25, KCl 4.0, MgSO_4 1.17, NaHCO_3 25, CaCl_2 2.2, glucosa 10, pH 7.4. El flujo de la perfusión fue de 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$, para lo cual se utilizaron dos microjeringas montadas en una bomba de microinyección de BAS. Durante la administración de la 4-AP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), la concentración de NaCl se redujo para mantener la iso-osmolaridad. Después de un periodo de equilibrio de 180 min, se colectaron continuamente fracciones del perfusado de 37.5 μl /15 min. Después de tres fracciones consecutivas, que se utilizaron para determinar los niveles basales de los aminoácidos en las dos regiones estudiadas, el medio de la cánula implantada en la corteza entorrinal o el hipocampo fue cambiado por el medio experimental, el cual contenía 40 mM de 4-AP durante una fracción, para posteriormente regresar al medio Ringer normal para colectar cuatro fracciones más. El medio de perfusión en la otra región implantada no se cambió.

En la fig. 7 se presenta el diagrama experimental general y un esquema del dispositivo utilizado para realizar la técnica de microdiálisis dual y registro electroencefalográfico simultáneo.

Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique

Alberto Morales-Villagrán^a, Silvia López-Pérez^a, Laura Medina-Ceja^a,
Ricardo Tapia^{b,*}

^aDepartamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA., Universidad de Guadalajara, AP 4-160, Guadalajara, Jal., Mexico

^bDepartamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, 04510 México D.F., Mexico

Received 21 April 1999; received in revised form 8 September 1999; accepted 14 September 1999

Abstract

We describe a rotatory electrical device that permits the simultaneous microdialysis and electroencephalographic (EEG) recording, by means of bipolar electrodes attached to the microdialysis probe, in two brain regions of awake rats. Using this device, we have found that the microdialysis infusion of 4-aminopyridine (4-AP) in the motor cerebral cortex produces intense behavioral convulsions and EEG seizures in both the infused and the contralateral cortex. This convulsant action is accompanied by a remarkable increase of extracellular dopamine (about 15-fold), norepinephrine (2.4-fold) and vanillylmandelic acid (1.8-fold) concentration in the infused cortex. Delayed increases of these amines were observed also in the contralateral cortex. The results suggest that 4-AP induces the release of catecholamines either through a direct effect on nerve endings or as a consequence of seizures. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cortical catecholamine; Dual microdialysis-electrical; 4-Aminopyridine; Rat

Besides other neurotransmitters, catecholamines seem to be involved in the modulation of neuronal excitability in several brain regions, both in human epilepsy [3,5], and in some animal models of seizures. Norepinephrine (NE) depletion potentiates seizures induced by kainic acid [1], and lesion-induced loss of the locus coeruleus noradrenergic projections results in increased seizure susceptibility to cobalt topic application [19] or to hippocampal kindling [6].

The convulsant action of the K⁺ channel blocker 4-aminopyridine (4-AP) is well known. The microinjection of the drug in the rat substantia nigra reticulata [16], the CA1 region of the hippocampus [4], or the cerebral cortex and lateral ventricle [11], produces electroencephalographic (EEG) seizures and intense motor alterations. 4-AP also induces the release of neurotransmitters [17,18]. We have shown that 4-AP stimulates the release of glutamate in the striatum *in vivo*, and suggested that at least part of the

convulsant effect of the drug is due to an increased glutamate-mediated excitatory neurotransmission [10,11].

Since as mentioned above some catecholamines seem to play an important role in seizure mechanisms, we considered it of interest to study whether 4-AP could also modify catecholamine release. Furthermore, most of the studies *in vivo* attempting to correlate seizure activity with neurotransmitter release have been carried out in single cerebral regions, and little is known on the secondary effects on other related zones. We have therefore studied the effects of 4-AP on the release of catecholamines in both the cerebral cortex infused with the drug and the contralateral cortex, simultaneously with the EEG recording, in awake rats. For this purpose we have used a technique equivalent to that described by Ludvig et al. [7], using a newly designed electrical rotatory connection system coupled to a swivel.

The device consists of a BAS (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN) teflon swivel for freely moving rats, modified in its top piece (fixed piece) by attaching a series of five 1-mm wide metal grooved rings. A copper wire was fixed to each ring and then stuck between the ring and the

* Corresponding author. Tel.: +52-5-622-5642; fax +52-5-622-5607.

E-mail address: rtapia@ifisiol.unam.mx (R. Tapia)

swivel wall, in such a way that one ring-wire served as ground electrode and the other four as recording electrodes. A teflon cylinder with five smaller metal rings was joined to the bottom mobile part of the swivel, and two stainless steel needles were soldered to each ring, 180° apart; the other end of each needle was placed under a slight pressure into the groove of the corresponding large ring in the fixed piece of the swivel. Wires soldered to the small rings were bunched and coupled to the multipin socketed connector which was fixed to the rat skull. The tubing connections for the microdialysis was as described in the BAS system for freely moving rats.

Concentric microdialysis cannulas (exposed membrane 2 mm length and 0.32 mm diameter) were manufactured in our laboratory with pieces obtained commercially (Small Parts, Inc., Miami, FL), and to each probe a braided pair of varnished copper wire (125 µm diameter) was cemented longitudinally. The varnish-free tips of the two wires were approximately 100 µm apart, and were located close to the distal end of the dialysis membrane to serve as bipolar recording electrodes. The proximal ends of the braided wires were soldered to the connector cemented on the rat skull.

Adult male Wistar rats (240–260 g weight) were used throughout, and were handled in accordance with the Rules for Research in Health Matters (Mexico), with approval of the local Animal Care Committee. Animals were anesthetized with halothane in oxygen and secured in a Stoelting stereotaxic frame with the incisor bar positioned at -3.3 mm. Stainless steel cannula guides (0.5 mm internal diameter) were inserted into skull holes and cemented just above both motor cortices. Microdialysis probes

(previously flushed with distilled water for 30 min at a flow rate of 5 µl/min), were inserted into the cannula guides and secured with steel wires attached to the guide cannulas and immersed in the dental acrylic cement used also to fix the electrode connector on the skull. Stereotaxic coordinates used for the tip of the microdialysis probes were: A -2 mm, L ±2.5 mm from bregma, and V 2 mm from dura [12]. The correct location of the probes was verified after the experiment by gross histological examination.

Anesthesia was disconnected and once the animal were awake the implanted probes were perfused (2.5 µl/min, using two microsyringes mounted on a BAS microinjection pump) with an oxygenated Ringer-Krebs medium of the following composition (in mM): NaCl 118, K₂PO₄ 1.25, KCl 4.0, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.2, glucose 10 (pH 7.4). After a 180-min equilibration period, 37.5 µl (15 min) consecutive fractions of the perfusate were continuously collected. After the first three fractions, which were used to determine the basal extracellular levels of catecholamines, the medium of the probe implanted in the right cerebral cortex was changed for the experimental medium containing 75 mM 4-AP (the NaCl concentration was reduced proportionally in order to maintain isoosmolarity), using a liquid switch (CMA110, Carnegie, Sweden). This concentration has been previously shown to induce intense behavioral and EEG seizures under similar experimental conditions [13]. The 4-AP medium was infused for one 15-min period, then changed again for the normal medium, and five more fractions were collected. The medium of the probe in the contralateral cortex was never changed.

Catecholamine concentration in the dialysis fractions was determined by HPLC and electrochemical detection, as

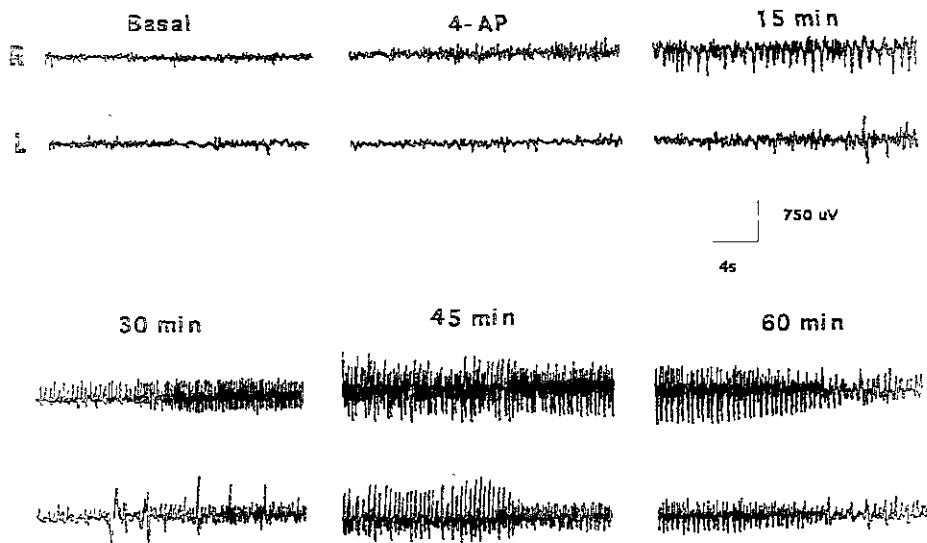


Fig. 1. Representative example of the epileptiform discharges induced by 4-AP microdialysis infusion in the right cerebral cortex. Each set of records show the basal activity, the activity immediately after infusion of 4-AP, and 15, 30, 45 and 60 min afterwards. In each set, the top traces (R) correspond to the infused cortex and the bottom traces (L) to the contralateral cortex. Similar epileptiform activity was observed in all the animals studied ($n = 6$).

described [8], using a Waters pump 515, C18 30 × 0.5 cm columns, and a BAS amperometric detector LC 4B at 0.85 V in 50 nA range. Significant changes were observed only in the case of NE, dopamine (DA) and vanillylmandelic acid (VMA).

The recovery of catecholamines and 4-AP through the dialysis membrane was determined *in vitro*, as previously described for amino acids [9], and the values obtained were $2 \pm 0.70\%$ for NE, $4 \pm 0.51\%$ for DA and $5 \pm 0.42\%$ for VMA ($n = 4$), whereas for 4-AP the recovery was 11.3% [10]. The results were not corrected for these recovery values. Statistical analyses were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA).

About 10 min after the beginning of 4-AP infusion all the animals showed increased locomotor activity and irritability, followed by head nodding, chewing and about 30 min later intense convulsive behavior characterized by bursts of forepaw clonic jerks and occasional generalized tonic-clonic convulsions. This behavior was present during all the experiment, and thus was necessary to hold the animal from the end of 4-AP administration until the experiment had finished.

Similarly to our previous observations [11], the motor alterations were accompanied by epileptiform EEG discharges, which started in the 4-AP infused cortex 15 ± 4 min after the beginning of the infusion period. They were characterized by poly-spikes and spike-wave complexes which were of low frequency and amplitude at the beginning, reached a maximum at about 45 min, and then began to decrease (Fig. 1). However, independently of the changes with time in amplitude and frequency, at 25–35 min the discharges became continuous (status epilepticus) and lasted for the rest of the experiment (120 min). A similar EEG discharge pattern was observed in the contralateral cortex, but the latency to the first discharge was slightly longer (22 ± 7 min) (Fig. 1).

As shown in Fig. 2, extracellular levels of NE and DA in the 4-AP-infused cortex increased during the infusion period and in the subsequent fractions. The maximum enhancement of DA was 15-fold and that of NE was only 2.4-fold. Significant increases in NE and DA were also observed in the contralateral cortex but they occurred with a delay of 60–75 min (four to five fractions). At these times the extracellular concentration of VMA was also enhanced, both in the infused (1.8-fold) and in the contralateral cortex, where it reached a value 4.5-fold higher than the basal (Fig. 2).

The remarkable increase of extracellular DA and the comparatively modest NE increase occurred immediately after 4-AP infusion, which suggests that 4-AP is directly stimulating the release of catecholamines, as has been described for DA in the striatum [2] and for glutamate in the striatum and in the hippocampus [10,13]. An equally plausible explanation, however, is that the enhancement of extracellular DA levels might be secondary to the glutamate released by 4-AP, since it has been recently reported that in

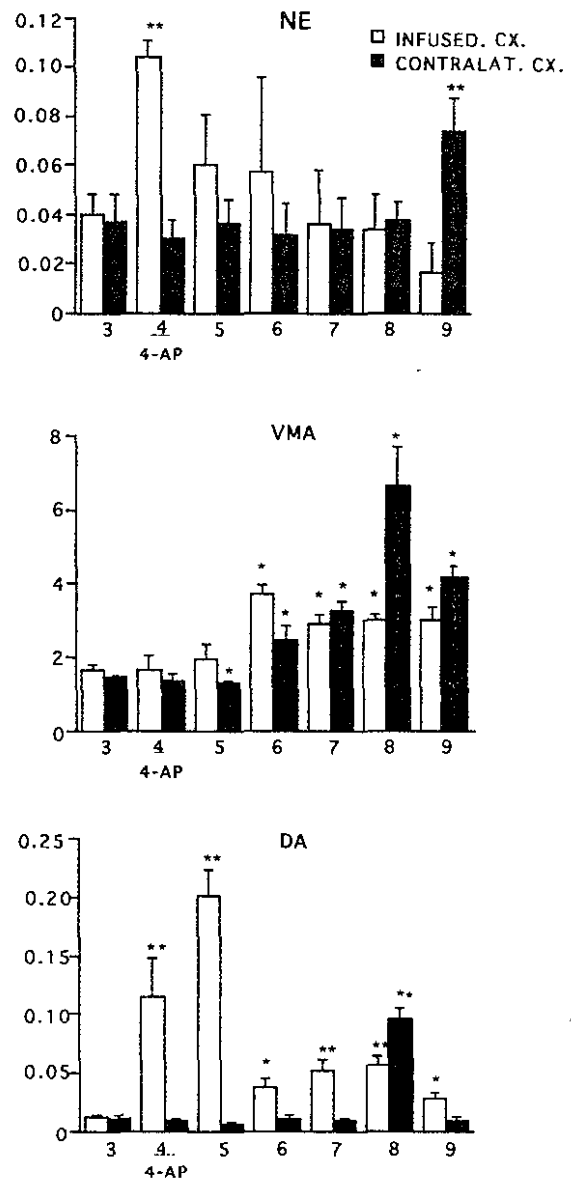


Fig. 2. Changes with time in extracellular NE, VMA and DA in the cerebral cortex infused with 4-AP and in the contralateral cortex, in awake rats. Each set of bars corresponds to one 15 min fraction (37.5 μ l). The concentration of the amines was similar in the first three fractions and their values were averaged to obtain the basal extracellular levels (fraction 3). The values are means \pm SEM for six rats in the infused cortex and for four animals in the contralateral cortex (in two rats these microdialysis fractions were lost). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, as compared with the basal value.

the prefrontal cortex *in vivo* the release of DA seems to be regulated by the activation of glutamate receptors [15].

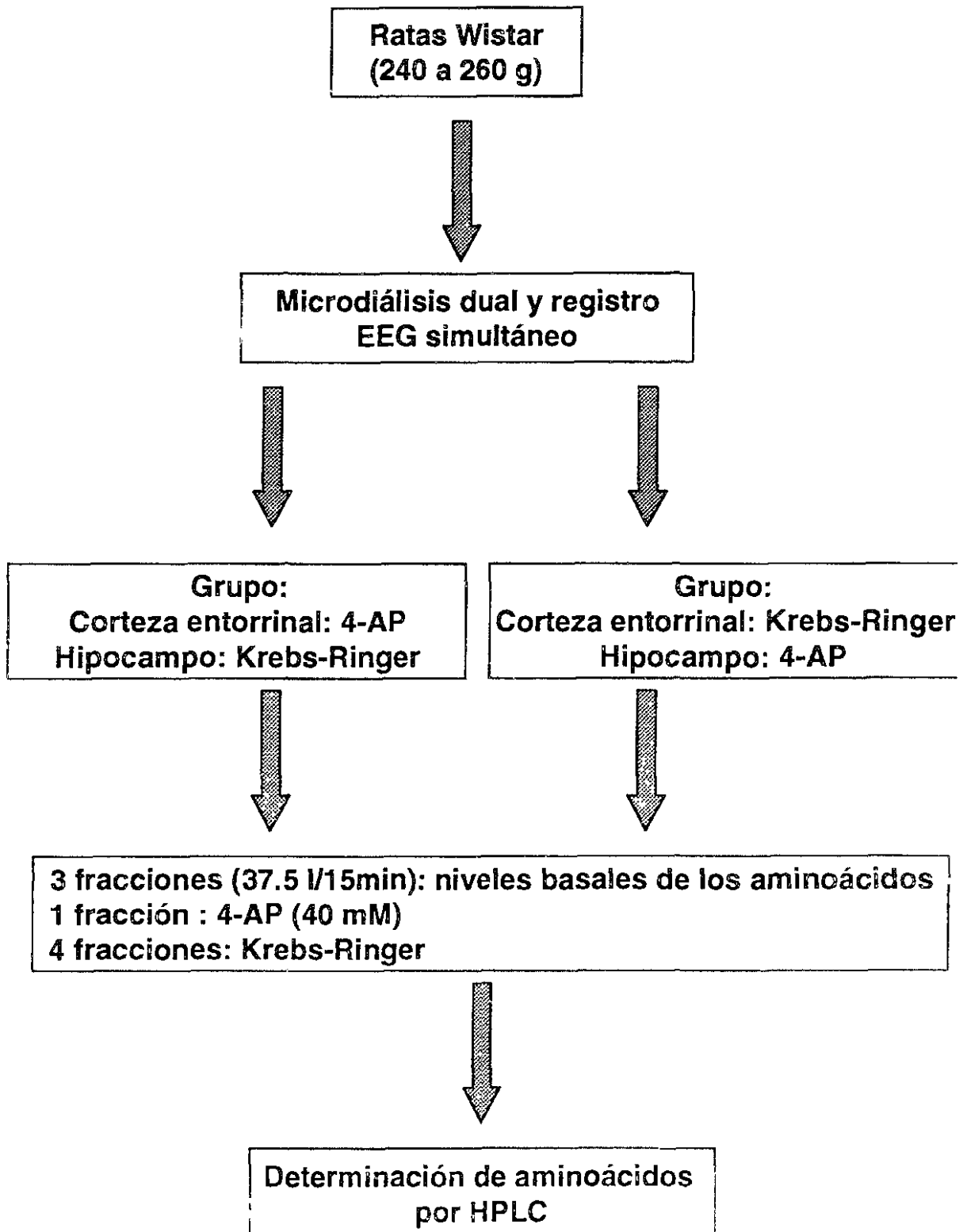
The relationship of the stimulated release of DA with seizures is not clear. Although the activation of D1-like receptors has been found to have proconvulsive action, most of the data in a variety of seizure models favor an anticonvulsant action of DA, which seems to be

exerted by activation of D2-like catecholamine receptors [1,6,14,19]. Since the convulsant action of 4-AP seems to be due mainly to an excessive excitatory glutamatergic transmission as a result of stimulation of glutamate release [4,11,13], it appears that such predominant anticonvulsant action of DA was insufficient to counteract the glutamate-induced convulsive activity. The fact that both DA and NE showed delayed increases in the contralateral cortex is consistent with this interpretation and suggests that catecholamines might be released as a compensatory mechanism against seizures, as has been postulated previously [1,14]. The possibility that 4-AP diffuses to the contralateral cortex is improbable, since its long-term effects after microdialysis infusion, such as neuronal degeneration, seem to be restricted to the infused region (13). The enhancement of extracellular VMA 30 min after 4-AP infusion, in both the infused and the contralateral cortex, suggests an increased turnover of NE, probably related to its augmented release.

This work was supported, in part, by CONACYT, Mexico, project No. 1690P-M9507.

- [1] Baran, H., Hörtnagl, H. and Hornykiewicz, O., Kainic acid-induced seizures: potentiation by α -methyl-*p*-tyrosine. *Brain Res.*, 495 (1989) 253–260.
- [2] Dasma, G., Biessels, P.T., Westerink, B.H., De Vries, J.B. and Horn, A.S., Differential effects of 4-aminopyridine and 2,4-aminopyridine on the in vivo release of acetylcholine and dopamine in freely moving rat measured by intrastriatal dialysis. *Eur. J. Pharmacol.*, 145 (1988) 15–20.
- [3] Devinsky, O., Emoto, S., Goldstein, D.S., Stull, R., Porter, R.J., Theodore, W.H. and Nadi, N.S., Cerebrospinal fluid and serum levels of DOPA, catechols and monoamine metabolites in patients with epilepsy. *Epilepsia*, 33 (1992) 263–270.
- [4] Fragoso-Veloz, J. and Tapia, R., NMDA receptor antagonists protect against seizures and wet dog shakes induced by 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.*, 221 (1992) 275–280.
- [5] Goldstein, D.S., Nadi, N.S., Stull, R., Wyler, A.R. and Porter, R.J., Levels of catechols in epileptogenic and non-epileptogenic regions of the human brain. *J. Neurochem.*, 50 (1988) 225–229.
- [6] Kokaia, M., Cenci, M.A., Elmer, E., Nilsson, O.G., Kokaia, Z., Bengzon, J., Björklund, A. and Lindvall, O., Seizure development and noradrenaline release in kindling epilepsy after noradrenergic reinnervation of the subcortically deafferented hippocampus by superior cervical ganglion of fetal locus coeruleus grafts. *Exp. Neurol.*, 130 (1994) 351–361.
- [7] Ludvig, N., Potter, P.E. and Fox, S.E., Simultaneous single-cell recording and microdialysis within the same brain site in freely behaving rats: a novel neurobiological method. *J. Neurosci. Methods*, 55 (1994) 31–40.
- [8] Marsden, C.A. and Joseph, M.H., Biogenic amines. In C.K. Lim (Ed.), *HPLC of Small Molecules. A Practical Approach*, IRL Press, Washington, 1986, pp. 29–47.
- [9] Massieu, L., Morales-Villagrán, A. and Tapia, R., Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.*, 64 (1995) 2262–2272.
- [10] Morales-Villagrán, A. and Tapia, R., Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem. Int.*, 28 (1996) 35–40.
- [11] Morales-Villagrán, A., Ureña-Guerrero, M. and Tapia, R., Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.*, 305 (1996) 87–93.
- [12] Paxinos, G. and Watson, C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Sydney, 1986.
- [13] Peña, F. and Tapia, R., Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J. Neurochem.*, 72 (1999) 2006–2014.
- [14] Starr, M.S., The role of dopamine in epilepsy. *Synapse*, 22 (1996) 159–194.
- [15] Takahata, R. and Moghaddam, B., Glutamatergic regulation of basal and stimulus-activated dopamine release in the prefrontal cortex. *J. Neurochem.*, 71 (1998) 1443–1449.
- [16] Tapia, R. and Flores-Hernández, J., Circling behavior induced by intranigral administration of ruthenium red and 4-aminopyridine in the rat. *Neuroscience*, 39 (1990) 657–663.
- [17] Tapia, R. and Sitges, M., Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.*, 250 (1982) 291–299.
- [18] Thesleff, S., Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience*, 5 (1980) 1413–1419.
- [19] Trotter, S., Lindvall, O., Chauvel, P. and Björklund, A., Facilitation of focal cobalt-induced epilepsy after lesions of the noradrenergic locus coeruleus system. *Brain Res.*, 454 (1988) 308–314.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



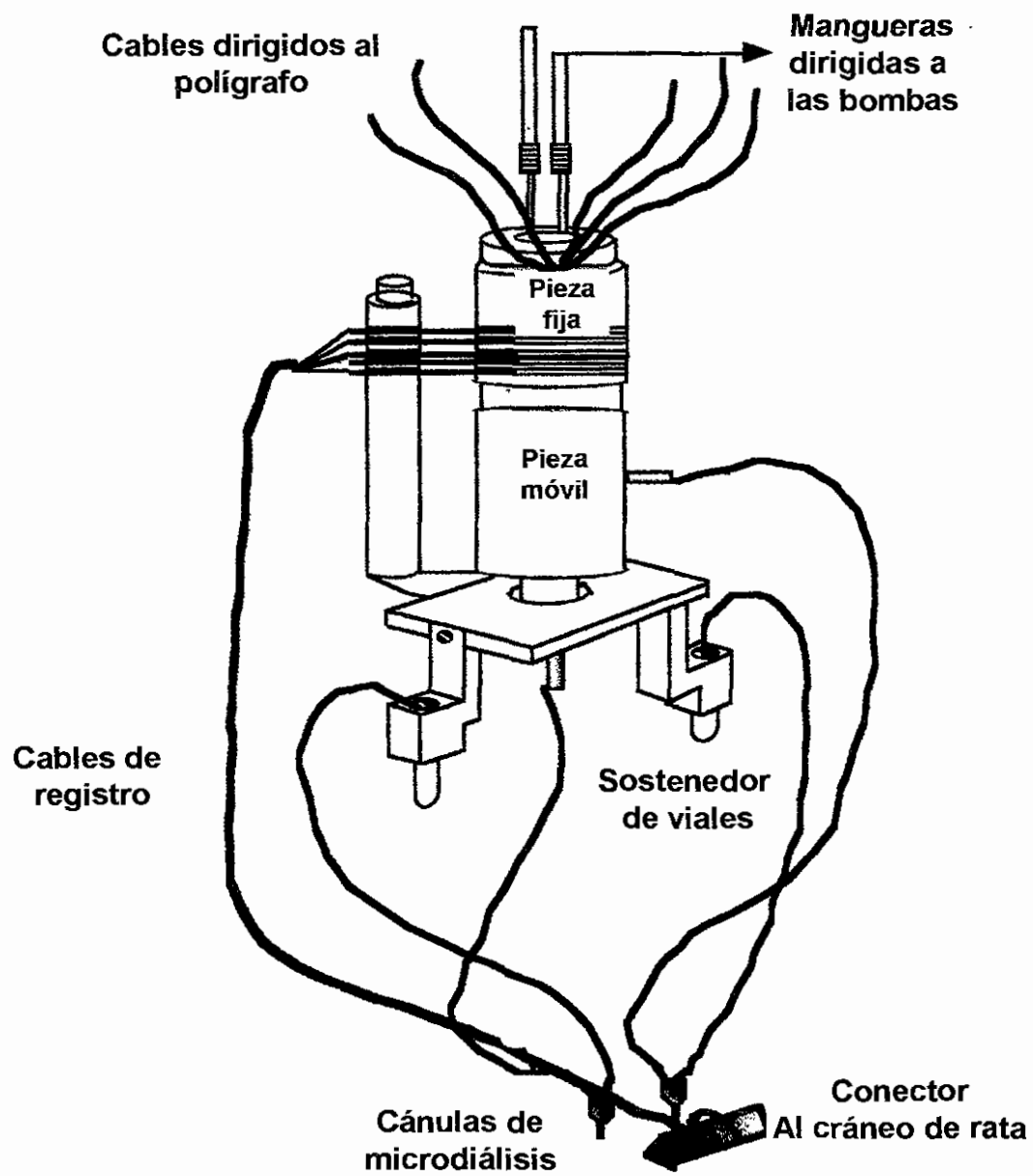


Fig. 7 Dispositivo utilizado para realizar la técnica de microdiálisis dual y el registro electroencefálográfico simultáneo.

ANALISIS DE LOS AMINOACIDOS POR HPLC CON DETECCION FLUORIMETRICA

El contenido de los aminoácidos de las fracciones fue determinado por HPLC después de la derivatización con *o*-phtaldialdehido, como se describe previamente (Salazar y col., 1994). La recuperación de los aminoácidos a través de las membranas de diálisis se describió previamente (Massieu y col., 1995) y los valores de recuperación obtenidos fueron: $6.0 \pm 0.5\%$ para aspartato, $6.2 \pm 0.6\%$ para glutamato, $3.3 \pm 0.4\%$ para glutamina, $7.4 \pm 0.7\%$ para glicina, $6.3 \pm 0.4\%$ para taurina, $6.7 \pm 0.6\%$ para alanina y $5.6 \pm 0.5\%$ para el GABA (n=9). Se ha descrito que para la 4-AP la recuperación fue de 11.3% (Morales-Villagrán y Tapia, 1996). Los resultados que se muestran no fueron corregidos para estos valores de recuperación. El análisis estadístico fue determinado por ANOVA de una cola y la comparación de los grupos por pruebas post hoc.

RESULTADOS

Como se indicó en la organización de la tesis, los resultados se presentan en un artículo ya publicado "Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: A dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats", por Medina-Ceja, L., Morales-Villagrán, A., Tapia, R. Brain Research Bulletin, 53:255-262, 2000, que se anexa a continuación.

Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: A dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats

Laura Medina-Geja,¹ Alberto Morales-Villagrán¹ and Ricardo Tapia^{2*}

¹Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal., México; and ²Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

[Received 20 March 2000; Revised 22 June 2000; Accepted 22 June 2000]

ABSTRACT: In order to study the role of amino acids in the hippocampus and the entorhinal cortex during the convulsive process induced by 4-aminopyridine (4-AP), we have used a device allowing the simultaneous microdialysis and the recording of their electrical activity of both regions in freely moving rats. We found that infusion of 4-AP into the entorhinal cortex resulted in a large increase in extracellular glutamate and glutamine and small increases in glycine and taurine levels. Likewise, infusion of 4-AP into the hippocampus resulted in a major increase in glutamate, as well as slight increases in taurine and glycine. In both infused regions the peak concentration of extracellular glutamate was observed 15 min after 4-AP administration. No significant changes were found in the non-infused hippocampus or entorhinal cortex of the same rats. Simultaneous electroencephalographic recordings showed intense epileptiform activity starting during 4-AP infusion and lasting for the rest of the experiment (1 h) in both the entorhinal cortex and the hippocampus. The discharges were characterized by polyspikes and spike-wave complexes that propagated almost immediately to the other region studied. These findings suggest that increased glutamatergic synaptic function in the circuit that connects both regions is involved in the epileptic seizures induced by 4-AP. © 2000 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS: Glutamate, Entorhinal cortex, Microdialysis, 4-Aminopyridine, Hippocampus, Seizures.

INTRODUCTION

The involvement of various neurotransmitter systems in the initiation and spread of epileptic seizures is well documented [16,35]. Seizures are thought to result from an excitatory and inhibitory imbalance subsequent to increased glutamatergic excitation or reduced γ -aminobutyric acid (GABA)ergic inhibition [32]. The systemic, intraventricular or focal brain injections of glutamate agonists can induce seizures [5,17], and in some experimental

models of epilepsy the glutamate receptor antagonists show potent anticonvulsant activity [9,17,23,28].

Further evidence of an important role of glutamate and GABA in the epileptic phenomenon stems from the measurement of their extracellular levels. Decreases in extracellular levels of GABA have been found in microdialysates of kindled rat amygdala [13]. Other microdialysis studies in kindled rats have revealed increases in glutamate concentration in the hippocampus [20,42]. Moreover, *in vivo* microdialysis studies in the cerebral cortex of human epileptic patients have shown elevations in extracellular aspartate, glycine, serine, glutamate and alanine [3,10].

The convulsant action of the K⁺ channel blocker 4-aminopyridine (4-AP), both *in vivo* and in brain slices, is well known [2,4,6,8,31,34]. Microinjection of the drug in the rat substantia nigra reticulata [36], in the CA1 region of the hippocampus [9,30], and in the cerebral cortex and lateral ventricle [23] produces electroencephalographic (EEG) seizures and intense motor alterations, including circling behavior, limbic type seizures and wet-dog shakes.

Another effect of 4-AP is to induce the release of both excitatory and inhibitory neurotransmitters [7,12,38,40]. In several preparations *in vitro*, including brain slices, synaptosomes and neuronal cultures, such stimulation is highly dependent on external Ca²⁺ [1,11,38,39]. *In vivo*, we have recently found that 4-AP stimulates the release of some amino acids in the striatum and in the hippocampus, particularly glutamate, and suggested that at least part of the convulsant effect of the drug is due to an increased glutamate-mediated excitatory neurotransmission [22,30,37].

Some studies have employed a dual microdialysis technique to investigate the functional neuroanatomy of the nigrostriatal dopaminergic and the striatonigral GABAergic pathways [24]. Likewise, other studies have used the intracerebral microdialysis technique combined with electrophysiological recording as a tool for correlating electrophysiological changes with extracellular levels of neurotransmitters [18,19,21,25,26].

* Address for correspondence: Prof. Ricardo Tapia, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-257, 04510-México D.F., México. Fax: +52 5-6225607, e-mail: rtapia@fisiologia.unam.mx

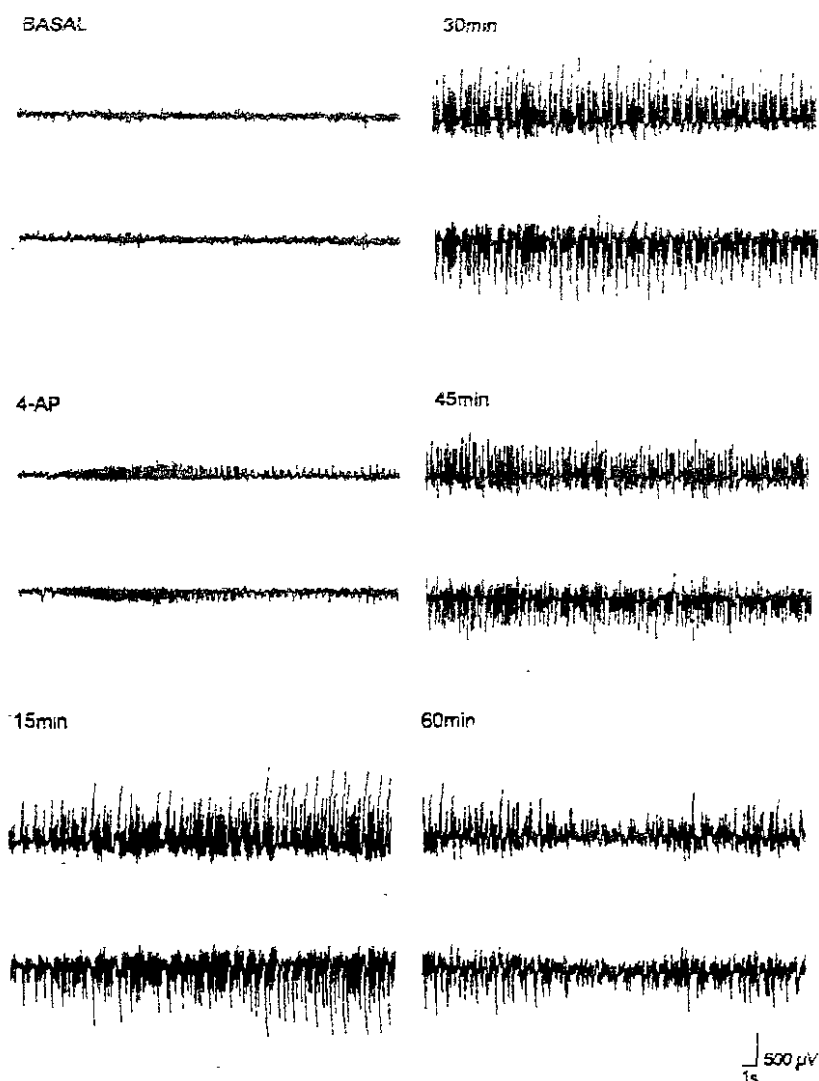


FIG. 1. Representative electroencephalographic recordings before (basal), during (4-aminopyridine [4-AP]) and at the times indicated after the infusion of 4-AP in the entorhinal cortex. A similar epileptiform pattern was observed in all the animals studied ($n = 5$). Upper traces cortex, lower traces, hippocampus.

In view of the well known anatomical relationships between the entorhinal cortex and the hippocampus [41], and of the important neurotransmitter role of glutamate in hippocampal neuronal circuits [43], in the present work we have studied the effects of 4-AP simultaneously in both regions. For this purpose, we used a device which permits a dual microdialysis procedure and the concomitant recording of EEG activity in awake rats. In both regions the most notable change observed was a several-fold increase in extracellular glutamate, which correlated with the appearance of epileptic discharges.

MATERIALS AND METHODS

We have designed a device allowing the simultaneous microdialysis of two regions of the brain and the recording of their

electrical activity with bipolar electrodes. The device consists of a BAS (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA) Teflon swivel for freely moving rats, modified in its top piece as described in detail elsewhere [21]. Briefly, two concentric microdialysis probes (exposed membrane 2-mm length and 0.32-mm diameter, obtained from BAS, were used. For the EEG recording, a pair of braided varnished copper wires (125- μ m diameter) were attached longitudinally to each probe. The varnish-free tips of the two wires were approximately 100 μ m apart, and were located close to the distal end of the dialysis membrane to serve as bipolar recording electrodes. The proximal ends of the braided wires were soldered to the connector cemented on the rat skull.

Adult male Wistar rats (240–260 g weight) were used throughout, and were handled in accordance with the Rules for Research

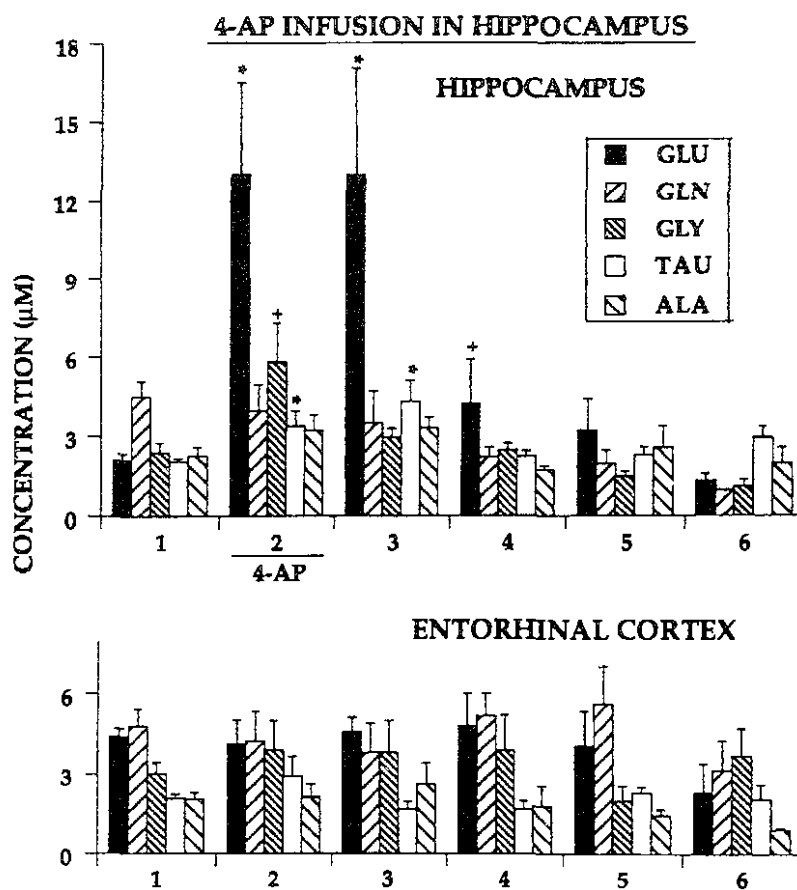


FIG. 4. Changes with time in the extracellular amino acid levels in the hippocampus infused with 4-aminopyridine (4-AP) and in the ipsilateral entorhinal cortex. Details as in Fig. 3. The entorhinal cortex was perfused with normal medium during all the experiment. Mean values \pm SEM for 4 rats (+ < 0.05 , * < 0.001 , as compared to the basal value).

scribed [14] and the recovery values obtained were $6.0 \pm 0.5\%$ for aspartate, $6.2 \pm 0.6\%$ for glutamate, $3.3 \pm 0.4\%$ for glutamine, $7.4 \pm 0.7\%$ for glycine, $6.3 \pm 0.4\%$ for taurine, $6.7 \pm 0.6\%$ for alanine and $5.6 \pm 0.5\%$ for GABA ($n = 9$). We have reported previously that for 4-AP the recovery was 11.3% [22]. The results were not corrected for these recovery values. Statistical analyses were carried out by one-way analysis of variance and group comparison - tests.

RESULTS

Approximately 12 min after the beginning of 4-AP infusion in the entorhinal cortex or in the hippocampus, the animals showed increased locomotor activity and overreactivity when touched. This was followed by head nodding, chewing and wet-dog shakes. Intense convulsive behavior characterized by bursts of forepaw clonic jerks and occasional generalized tonic-clonic convulsions was observed about 30 min later. This behavior was present during the rest of the experiment and, due to its intensity, it was necessary to grasp the animal from the end of 4-AP administration.

Infusion with 4-AP into the entorhinal cortex induced intense EEG epileptiform activity, characterized by high amplitude discharges of about one mV for both the entorhinal cortex and the hippocampus (Fig. 1, Table 1). Once started, the discharges were continuous (status epilepticus) and lasted until the end of experiment. They were characterized by poly-spikes and spike-wave complexes, which were of low frequency and amplitude in the first min and reached a maximum at 45 min. The discharge frequency was similar in both regions. The status epilepticus usually appeared immediately, but in two of the five rats studied there was a period (10-15 min) of short discharges of about 0.5 min of duration before the appearance of status epilepticus (Fig. 1). Infusion with 4-AP into the hippocampus induced epileptiform activity similar to that after entorhinal cortex infusion and propagated to the latter (Fig. 2). The frequency and amplitude of the discharges were similar to those after 4-AP infusion in the entorhinal cortex (Table 1). In this group the status epilepticus appeared immediately in all rats studied.

Four rats were infused in the entorhinal cortex with high K^+ medium during two 15-min fractions, as described in Materials and Methods. In no case was any behavioral or EEG abnormality observed.

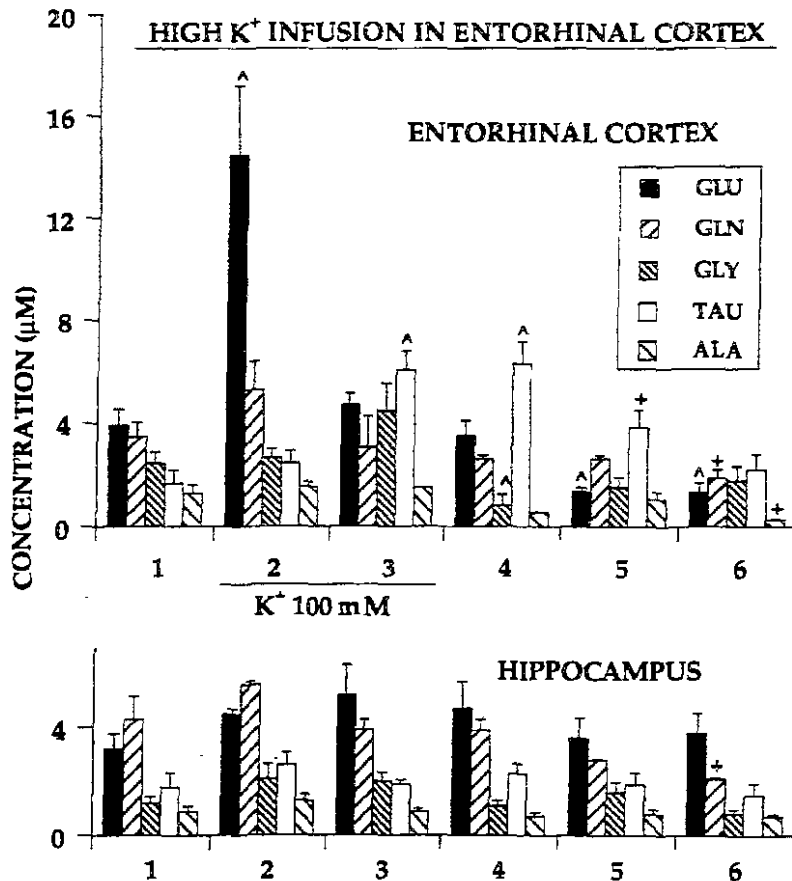


FIG 5. Changes with time in the extracellular amino acid levels of the entorhinal cortex infused with 100 mM K⁺ during two fractions and in the ipsilateral hippocampus. Details as in Fig. 3. The hippocampus was perfused with normal medium during all the experiment. Mean values \pm SEM for 4 rats ([^] < 0.01, ⁺ < 0.05).

The extracellular basal levels of amino acids were obtained from the average of the first three fractions collected before 4-AP or high potassium infusion and are shown in the first set of bars in Figs. 3–5. Basal aspartate and GABA concentrations were too low to be reliably measured in both the entorhinal cortex and the hippocampus. The values obtained for the other amino acids are similar in both regions.

Concomitantly with the appearance of EEG discharges, during 4-AP infusion in the entorhinal cortex there was an increase in extracellular glutamate and glutamine levels of about 600% and 350%, respectively (Fig. 3), which persisted in the next 15 min (fraction 3, Fig. 3) and then returned to the basal value. Glycine and taurine levels also augmented in fraction 3 (184% and 276% of the basal level, respectively). Neither aspartate nor GABA could be detected after 4-AP infusion. No significant amino acid changes were found in the hippocampus of these rats infused with 4-AP in the entorhinal cortex (Fig. 3).

Infusion of 4-AP in the hippocampus induced a remarkable increase in the extracellular glutamate, higher than that observed in the infused entorhinal cortex, that lasted also for 30 min after the cessation of 4-AP infusion (Fig. 4). Taurine and glycine showed

also significant, albeit much smaller increases, whereas glutamine tended to decrease. No significant changes were found in the entorhinal cortex of these rats infused with 4-AP in the hippocampus (Fig. 4).

As shown in Fig. 5, infusion of high potassium in the entorhinal cortex induced a marked but transient increase in extracellular glutamate, which returned to the basal values after just one fraction and reached significantly lower values after 30 min. A significant but delayed increase in taurine levels was also observed, and only marginally significant changes were observed in the other amino acids. In the hippocampus of the same rats only a slight and transient increase in glutamate was detected (Fig. 5).

DISCUSSION

The dual microdialysis technique used here provides a convenient method to study some biochemical correlations between two interconnected regions, such as the hippocampus and the entorhinal cortex, during 4-AP-induced epileptic seizures. Furthermore, the simultaneous EEG recording at the sites of the microdialysis probes permitted to correlate the electrical activity with changes in the extracellular amino acids.

The intense epileptiform activity induced by 4-AP in the hip-

pocampus and the entorhinal cortex, characterized by high amplitude and high frequency discharges that propagated almost immediately to the other region, were similar to those previously reported after intracortical or intracerebroventricular administration of the drug [23].

Also similar to previous findings in the striatum [22] and in the hippocampus [30] is the fact that 4-AP induced a several-fold increase in the extracellular glutamate levels in both regions infused, which was correlated with the initial hyperexcitability of the animals and with the establishment of continuous epileptic discharges. These observations support the hypothesis that there is a causative relationship between the increased glutamate levels and the initiation of seizures, and indicates that this correlation occurs also in the entorhinal cortex and in the hippocampus. Such correlation implies that, as mentioned in the Introduction, the increased extracellular glutamate induced by 4-AP is due to stimulation of its release from presynaptic terminals, as has been repeatedly shown [1,31,38,39], and therefore is able to reach the excitatory amino acids receptors, which become overactivated. Such mechanism is supported also by previous findings showing that seizures induced by 4-AP, both in brain slices, are blocked by glutamate receptor antagonists [2,4,6,9,23,31]. In addition, we have shown that the 4-AP-induced increase of extracellular glutamate in the hippocampus produces also neurodegeneration [30], whereas neither seizures nor neuronal death occur when the enhancement of extracellular glutamate is due to inhibition of its transport or to K^+ -induced depolarization [14,15,27,30,37]. The lack of convulsant action of high K^+ -induced glutamate increase was confirmed in the present study.

We have used here a dose of 40 mM 4-AP in the awake rat. Previous experiments demonstrated that in both the striatum [22] and the hippocampus [30] at least 20 mM 4-AP in the microdialysis medium is required to induce an increase in extracellular glutamate. After correction for the reported recovery of 4-AP through the dialysis membrane (11.3%, [22]), this means that approximately 55 nmoles of the drug in the 15-min period must reach the tissue in order to stimulate glutamate release. However, smaller doses are capable of inducing seizures. For example, bolus microinjection of 2–4 nmoles in the hippocampus [8,9], or microdialysis infusion of 9.8 nmoles (3.5 mM during 15 min) in the same region [30] produce intense convulsive activity. Since with the latter dose no increase in extracellular glutamate was observed in the 15-min microdialysis fractions, it is possible that the sensitivity limits of the method used to measure the amino acid, combined with the relatively long fraction collection time, prevents the detection of small and transient elevations of extracellular glutamate that might be occurring.

It is noteworthy that no significant changes in extracellular amino acids, including glutamate, were observed in the non-infused region (hippocampus or entorhinal cortex) of the animals infused with 4-AP, in spite of the fact that the discharges rapidly propagated to them. Similarly to the above discussed effect of low convulsant doses of 4-AP, it seems probable that in the projection area the enhancement of glutamate release might be small and transient and therefore could not be detected in the 15-min fraction period. This would not be unexpected, in view of the well known rapid reuptake of the amino acid by high affinity transporters, which would prevent its diffusion through the dialysis membrane. In the case of high K^+ , also no significant changes were observed in the projecting area. Because this treatment did not produce seizures, this result was not surprising.

The relatively small increases in glycine and taurine in the hippocampus after 4-AP infusion have been described previously [30]. In contrast, in the entorhinal cortex, 4-AP induced a notable enhancement of glutamate, as high as that of glutamate, whereas

the other amino acids, with the exception of taurine and glycine, were not significantly affected. These differences between hippocampus and entorhinal cortex might reflect some particular metabolic properties of the latter.

The results of the present work suggest an important role of glutamate in the initiation of seizures, in both the hippocampus and the entorhinal cortex, but an involvement of the amino acid in the propagation of epileptic discharges to the corresponding projection area could not be demonstrated with the technique used. A more definitive conclusion should emerge from the use of more sensitive glutamate detection procedures, which should permit to measure changes in the amino acid concentration occurring in shorter time periods.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CONACYT (project 1690-M9507) and DGAPA, UNAM (1N207598).

REFERENCES

- Bargas, J., Ayala, G. X.; Hernández, E., Galarraga, E. Ca^{2+} -channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res. Bull.* 45:521–524; 1998.
- Barna, B.; Szász, A.; Világi, I.; Szenté, M. Anticonvulsive effect of AMPA receptor antagonist GYKI 52466 on 4-aminopyridine-induced cortical ictal activity in rat. *Brain Res. Bull.* 51:241–248; 2000.
- Carlson, H.; Ronne-Engstrom, E.; Ungerstedt, U.; Hillered, L. Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. *Neurosci. Lett.* 140:30–32; 1992.
- Cramer, C. L.; Stagnitto, M. L.; Knowles, M. A.; Palmer, G. C. Kainic acid and 4-aminopyridine seizure models in mice: Evaluation of efficacy of antiepileptic agents and calcium antagonists. *Life Sci.* 54:271–275; 1994.
- Dingledine, R.; McBain, C. J.; McNamara, J. O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:334–337; 1990.
- Dóczy, J.; Banczerowska-Pelyhe, I.; Barna, B.; Világi, I. Effect of glutamate receptor antagonist (GYKI 52466) on 4-aminopyridine-induced seizure activity developed in rat cortical slices. *Brain Res. Bull.* 49:435–440; 1999.
- Dolezal, V.; Tucek, S. The effect of 4-aminopyridine and tetrodotoxin on the release of acetylcholine from rat striatal slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 323:90–95; 1983.
- Fragoso-Veloz, J.; Massieu, L.; Alvarado, R.; Tapia, R. Seizures and wet dog shakes induced by 4-aminopyridine, and their potentiation by mifepridone. *Eur. J. Pharmacol.* 178:275–284; 1990.
- Fragoso-Veloz, J.; Tapia, R. NMDA receptor antagonists protect against seizures and wet dog shakes induced by 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 221:275–280; 1992.
- Hamberger, A. C.; Nystrom, B.; Laisson, S.; Silfvenius, H.; Nordborg, C. Amino acids in the neuronal microenvironment of focal human epileptic lesions. *Epilepsy Res.* 9:32–43; 1991.
- Herrero, M. T.; Oset-Gasque, M. J.; Cañadas, S.; Vicente, S.; González, M. P. Effect of various depolarizing agents on endogenous amino acid neurotransmitter release in rat cortical neurons in culture. *Neurochem. Int.* 32:257–264; 1998.
- Hu, P.-S.; Benishin, C.; Fredholm, B. B. Comparisons of the effects of four dendrotoxin peptides, 4-aminopyridine and tetraethylammonium on the electrically evoked [3H]noradrenaline release from rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 209:87–93; 1991.
- Kaura, S.; Bradford, H. F.; Young, A. M. J.; Croucher, M. J.; Hughes, P. D. The effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex. In vivo and in vitro studies. *J. Neurochem.* 65:1240–1249; 1995.
- Massieu, L.; Morales-Villagrán, A.; Tapia, R. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: An in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 64:2262–2272; 1995.
- Massieu, L.; Tapia, R. Glutamate uptake impairment and neuronal

- damage in young and aged rats in vivo. *J. Neurochem.* 69:1151-1160, 1997.
- 16 Meldrum, B. S. GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Br J Clin Pharmacol.* 27:3-11; 1989.
 - 17 Meldrum, B. S. Excitatory amino acids in epilepsy and potential novel therapies. *Epilepsy Res.* 12:189-196; 1992.
 - 18 Millan, M. H.; Chapman, A. G.; Meldrum, B. S. Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res.* 14:139-148; 1993.
 - 19 Millan, M. H.; Obrenovitch, T. P.; Sarna, G. S.; Lok, S. Y.; Symon, L.; Meldrum, B. S. Changes in rat brain extracellular glutamate concentration during seizures induced by systemic picrotoxin or focal bicuculline injection: An in vivo dialysis study with on-line enzymatic detection. *Epilepsy Res.* 9:86-91; 1991.
 - 20 Minamoto, Y.; Itano, T.; Tokuda, M.; Matsui, H.; Janjua, N. A.; Hosokawa, K.; Okada, Y.; Murakami, T. H.; Negi, T.; Hatase, O. In vivo microdialysis of amino acid neurotransmitters in the hippocampus in amygdaloid kindled rat. *Brain Res.* 573:345-348; 1992.
 - 21 Morales-Villagrán, A.; López-Pérez, S.; Medina-Ceja, L.; Tapia, R. Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique. *Neurosci Lett.* 275:133-136; 1999.
 - 22 Morales-Villagrán, A.; Tapia, R. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem. Int.* 28:35-40; 1996.
 - 23 Morales-Villagrán, A.; Ureña-Guerrero, M.; Tapia, R. Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 305:87-93; 1996.
 - 24 Morari, M.; O'Connor, W. T.; Darveid, M.; Ungerstedt, U.; Bianchi, C.; Fuxe, K. Functional neuroanatomy of the nigrostriatal and striatonigral pathways as studied with dual probe microdialysis in the awake rat—I. Effects of perfusion with tetrodotoxin and low-calcium medium. *Neuroscience* 72:79-87; 1996.
 - 25 Obrenovitch, T. P.; Richards, D. A.; Sarna, G. S.; Symon, L. Combined intracerebral microdialysis and electrophysiological recording. Methodology and applications. *J. Neurosci. Meth.* 47:139-145; 1993.
 - 26 Obrenovitch, T. P.; Urenjak, J.; Zilkha, E. Intracerebral microdialysis combined with recording of extracellular field potential: A novel method for investigation of depolarizing drugs in vivo. *Br J Pharmacol.* 113:1295-1302; 1994.
 - 27 Obrenovitch, T. P.; Urenjak, J.; Zilkha, E. Evidence disputing the link between seizure activity and high extracellular glutamate. *J. Neurochem.* 66:2446-2454; 1996.
 - 28 Parsons, C. G.; Quack, G.; Bresinski, I.; Baran, L.; Przegalski, E.; Kostowski, W.; Krzaczk, P.; Hartmann, S.; Danysz, W. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsant and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* 10:1239-1258; 1995.
 - 29 Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney, Academic Press; 1986.
 - 30 Peña, F.; Tapia, R. Relationships between seizures, extracellular amino acid changes and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: A microdialysis and electroencephalographic study. *J. Neurochem.* 72:2006-2014; 1999.
 - 31 Perrault, P.; Avoli, M. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 65:771-785; 1991.
 - 32 Rowley, H. L.; Martin, K. F.; Marsden, C. A. Decreased GABA release following tonic-clonic seizures is associated with an increase in extracellular glutamate in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 68:415-422; 1995.
 - 33 Salazar, P.; Montiel, T.; Bratlawsky, S.; Tapia, R. Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochem. Int.* 24:363-368; 1994.
 - 34 Spyker, D. A.; Linch, C.; Shabanowitz, J.; Sinn, J. A. Poisoning with 4-aminopyridine: Report of three cases. *Chn. Toxicol.* 16:487-497; 1980.
 - 35 Starr, M. S. The role of dopamine in epilepsy. *Synapse* 22:159-194; 1996.
 - 36 Tapia, R.; Flores-Hernández, J. Circling behavior induced by intranigral administration of ruthenium red and 4-aminopyridine in the rat. *Neuroscience* 39:657-663; 1990.
 - 37 Tapia, R.; Medina-Ceja, L.; Peña, F. On the relationship between extracellular glutamate hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem. Int.* 34:23-31; 1999.
 - 38 Tapia, R.; Sitges, M. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250:291-299; 1982.
 - 39 Tapia, R.; Sitges, M.; Morales, E. Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* 361:373-382; 1985.
 - 40 Thesleff, S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5:1413-1419; 1980.
 - 41 Turner, D. A.; Buhl, E. H.; Haider, N. P.; Nusch, R. Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. *Prog. Neurobiol.* 55:537-562; 1998.
 - 42 Ueda, Y.; Tsuru, N. Bilateral seizure-related changes of extracellular glutamate concentration in hippocampi during development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res.* 18:85-88; 1994.
 - 43 Vizi, E. S.; Kiss, J. P. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: Synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus* 8:566-607; 1998.

DISCUSIÓN

I. Ventajas de la técnica utilizada

En el presente trabajo se determinaron los efectos de la administración de la 4-AP a través de cánulas de microdiálisis en el circuito corteza entorrinal-hipocampo, sobre la concentración extracelular de ciertos aminoácidos y su posible relación en la iniciación y propagación de las crisis epileptiformes. Para este propósito se utilizó la técnica de microdiálisis dual y registro EEG simultáneo en ratas en libre movimiento, que hasta la fecha no se ha utilizado en ningún modelo de epilepsia, ya que nos plantea la posibilidad de establecer la correlación conductual con el EEG y con la bioquímica *in vivo*, durante el desarrollo de las crisis convulsivas. Asimismo, la técnica nos ofrece la posibilidad de establecer la relación bioquímica y del EEG en áreas del cerebro que están conectadas, como es el caso de la corteza entorrinal y el hipocampo, lo cual permite apreciar no solo el inicio sino la propagación de las crisis en un circuito de relevancia en la generación del fenómeno paroxístico. A pesar de que ha habido intentos por realizar microdiálisis y registro EEG simultáneo, los dispositivos que adosaban o anclaban electrodos a las cánulas generaban daño tisular (Sandberg y col., 1986; Szerb, 1991; Ludvig y col., 1992). Obrenovitch y col. (1993) han mejorado la técnica, utilizando un dispositivo que evita el daño, pero sólo se ha empleado en animales anestesiados y con una sola cánula de microdiálisis. La técnica que se empleó en este trabajo nos proporciona la ventaja de evaluar de manera simultánea los parámetros señalados en dos regiones del cerebro relacionadas sin los problemas del daño tisular, y además en animales en libre movimiento. Esto ha quedado ya de

manifiesto en el trabajo publicado que aquí se incluye en la sección de Materiales y Métodos (Morales-Villagrán y col., 1999).

II. Efectos en las regiones infundidas con 4-AP

Los resultados del presente estudio mostraron que la 4-AP indujo actividad epileptiforme intensa en el hipocampo y la corteza entorrinal. Esta actividad se caracterizó por la presencia de descargas de frecuencia y amplitud alta que se propagaron casi de inmediato a la otra región, como las previamente publicadas con la administración de la 4-AP a nivel intracortical o intracerebroventricular (Morales-Villagrán y col., 1996). Asimismo, la 4-AP indujo un aumento en la concentración extracelular de glutamato en las regiones infundidas con 4-AP: la corteza entorrinal y el hipocampo. Este aumento del glutamato se correlacionó con el inicio de la hiperexcitabilidad conductual y eléctrica observada en las ratas. Estos resultados apoyan la hipótesis de la relación causal entre los niveles altos de glutamato y las crisis en ambas regiones infundidas, y sugiere que el glutamato liberado de la terminal sináptica es capaz de alcanzar los receptores de glutamato y generar el fenómeno paroxístico, hecho que se apoya en los trabajos previos realizados en el laboratorio (Fragoso-Veloz y col., 1990; Morales-Villagrán y col., 1996). En este trabajo se utilizó una dosis de 40 mM de 4-AP, durante 15 min, que equivale a una cantidad total aproximada de 110 nmoles, tomando en cuenta la recuperación de la droga a través de la membrana de diálisis ($\approx 10\%$), que llegan al espacio extracelular. Esta concentración es suficiente para inducir un aumento en la concentración extracelular de glutamato y la generación de las crisis convulsivas,

como se ha demostrado en los experimentos de inyección de la 4-AP (Fragoso-Veloz y col., 1990; Moraes-Villagrán y col., 1996).

A. Papel de los receptores de glutamato. La evaluación del perfil de aminoácidos por HPLC durante las crisis inducidas por la administración de 4-AP a través de la cánula de microdiálisis en ratas anestesiadas, ha mostrado que el glutamato alcanza la concentración extracelular más alta en comparación con los otros aminoácidos. Asimismo, las alteraciones motoras producidas por la 4-AP se bloquean por antagonistas del receptor a glutamato tipo NMDA (Morales-Villagrán y col., 1996). Este aumento en la concentración extracelular de glutamato debido a una liberación excesiva, pudiera sobreactivar a los receptores de glutamato e inducir los fenómenos de hiperexcitabilidad (eléctrica y conductual) y crisis. Trabajos recientes de Peña y Tapia (1999) han demostrado una correlación entre este aumento de la concentración extracelular de glutamato, las descargas convulsivas y la neurodegeneración producida a nivel de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratas a las que se administró la 4-AP a través de cánulas de microdiálisis. Así, se ha establecido que la neurodegeneración producida por la 4-AP se relaciona con un aumento directo de la concentración del glutamato en las sinapsis glutamatérgicas, lo que le permite la interacción con receptores del aminoácido presentes en el área infundida (Tapia y col., 1999). A este respecto, se ha encontrado que en las neuronas piramidales de CA1 poseen receptores postsinápticos tipo NMDA (Liu y col., 1994), mientras que en CA3 predominan los receptores post-sinápticos tipo KA (Vignes y Collingridge, 1997; Castillo y col., 1997). Ambos tipos de receptores están relacionados con la epilepsia (Meldrum y col., 1999), por lo que es posible postular que su sobreactivación en CA1 y CA3

está relacionado con la generación de las crisis convulsivas inducidas por la 4-AP. Esta hipótesis se ha confirmado en un trabajo muy reciente del laboratorio, en donde se ha demostrado que la administración de antagonistas al receptor de glutamato tipo NMDA, como el MK-801 y el CPP, o no-NMDA, como el NBQX, reducen la intensidad y duración de las crisis y protegen contra la degeneración producida en las células piramidales de CA1 y CA3 del hipocampo (Peña y Tapia, 2000). Asimismo, se ha demostrado que el bloqueador a los canales de Na^+ sensibles a voltaje tetrodotoxina (TTX) previene todos los efectos de la 4-AP en el hipocampo: el aumento en la concentración extracelular de glutamato, las descargas EEG y la neurodegeneración de CA1 y CA3. Estos resultados indican claramente el origen neuronal de la liberación de glutamato por la 4-AP, lo cual se apoya además en el hallazgo de que el bloqueador del canal de Ca^{++} tipo N, ω -conotoxina, disminuye la liberación de glutamato y protege contra la degeneración (Peña y Tapia, 2000). Estos datos, en conjunto, permiten concluir que el aumento en la concentración extracelular de glutamato inducido por la 4-AP ocurre en las sinapsis glutamatérgicas de las células piramidales de CA1 y CA3 del hipocampo y que como consecuencia se sobreactivan los receptores tipo NMDA y no-NMDA que se encuentran en estas células, produciendo así las crisis convulsivas.

Estudios autoradiográficos han demostrado la presencia de receptores de glutamato tipo NMDA en la capa molecular del giro dentado y en el estrato oriens y estrato radiatum de las regiones de CA3 y CA1 del hipocampo. Asimismo, se han encontrado en estas mismas regiones, receptores tipo no-NMDA como el AMPA. Por su parte el receptor de glutamato tipo KA se ha localizado en el estrato lucidum

de la región de CA3 del hipocampo, aunque se presentan en menor proporción en la capa molecular y polimórfica del giro dentado (Young y col., 1991, Insel y col., 1990). Por otro lado, se ha demostrado que las neuronas de las capas IV y V de la corteza entorrinal median sus respuestas sinápticas por receptores de glutamato tipo AMPA y NMDA (Jones, 1987; Jones y Lambert, 1990). Asimismo, las neuronas estrelladas de la capa II, que contribuyen mayoritariamente a la vía perforante que proyecta al giro dentado, median su respuesta sináptica a través de receptores de glutamato tipo NMDA y no-NMDA, como AMPA y KA (Jones, 1990, Jones y Lambert, 1990). En estas capas también se ha demostrado que la actividad epileptiforme inducida al disminuir la concentración de Mg^{2+} depende de la activación de estos receptores tipo NMDA y no-NMDA (Jones, 1987; Jones y Heinemann, 1988). A este respecto se ha encontrado que los receptores de glutamato tipo no-NMDA son los primariamente involucrados en la iniciación de las descargas, mientras que los receptores tipo NMDA están más relacionados con el aumento y duración de las crisis (Jones y Heinemann, 1991). Nuevamente estos datos apoyan la conclusión de que la sobreactivación de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA y no-NMDA es fundamental en el mecanismo de la acción epileptogénica de la 4-AP en el hipocampo y en la corteza entorrinal infundidos, como consecuencia de la liberación de glutamato. Como ya se mencionó, la neurodegeneración producida por la 4-AP en el hipocampo parece deberse también a la sobreactivación de los receptores tipo NMDA. Aunque no se ha estudiado la degeneración producida por la 4-AP en la corteza entorrinal, es probable que las neuronas de sus capas IV y V se encuentren dañadas, de acuerdo con los antecedentes señalados.

Por otro lado, existen varios trabajos que demuestran la presencia de diferentes subtipos de autoreceptores de glutamato en la formación hipocámpica, que regulan de manera diferente la liberación de glutamato, de acuerdo a la región del hipocampo que se trate (CA1, CA3); en el caso de las fibras musgosas (glutamatérgicas) que provienen de las células granulares del giro dentado y que se dirigen hacia las células piramidales de CA3, se ha encontrado receptores tipo AMPA/KA en la región presináptica, cuya activación regula positivamente la liberación del glutamato en CA3 (Gannon y Terrian, 1991; Terrian y col., 1991; Malva y col., 1996, 1998). En cambio, en las colaterales de Schaffer, los receptores tipo KA presinápticos modulan negativamente la liberación del glutamato (Zhou y col., 1995) . Por otra parte, los receptores de glutamato metabotrópicos también parecen tener un papel importante en controlar la liberación del glutamato en el hipocampo. Se han encontrado receptores metabotrópicos presinápticos (mGluR4a, mGluR7a, mGluR7b, mGluR8) en las terminales glutamatérgicas que hacen contactos con las interneuronas, las cuales regulan negativamente la liberación de glutamato (Shigemoto y col., 1997; Scanziani y col., 1997). Asimismo, se ha observado que el glutamato disminuye la liberación del GABA, vía receptores presinápticos tipo KA localizados en las interneuronas GABAérgicas (Rodríguez-Moreno y col., 1997; Cunha y col., 1997). El glutamato también aumenta la liberación del GABA vía receptores tipo NMDA localizados en las interneuronas (Harris y Miller, 1989; Getting y col., 1996). Finalmente, en estas células GABAérgicas se ha observado la presencia de receptores metabotrópicos que regulan de manera diferente la liberación del GABA: los mGluR1/mGluR5 localizados en la zona somatodendrítica tienen un efecto positivo, mientras que los

receptores mGluR2/mGluR3 localizados en las dendritas tienen el efecto opuesto (Poncer y col., 1995). En virtud de estos datos, no podemos descartar la participación de los receptores metabotrópicos en este modelo de inducción de crisis por 4-AP, a pesar de que no se ha evaluado este aspecto.

B. Papel de los transportadores de glutamato. El aumento de los niveles extracelulares de glutamato en la zona de infusión por la 4-AP, encontrado en este trabajo, puede modificar la expresión de los transportadores, ya que se ha visto previamente que en algunos modelos de epilepsia, como el kindling o la aplicación de KA, se ve disminuida la expresión del transcrito a los transportadores GLT-1, EAAC-1 y EAAT-3 en el hipocampo (Akbar y col., 1998; Ingram y col., 2000; Simantov y col., 1999). Sin embargo, en otros trabajos se ha encontrado aumentos en la expresión de los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST, este último en células no-neuronales del hipocampo (CA3 y capa polimórfica del giro dentado), cambios debidos probablemente a un aumento en los niveles extracelulares de glutamato durante las crisis (Akbar y col., 1997; Nonaka y col., 1998), lo que pudiera representar un mecanismo de defensa transitorio para reducir las concentraciones extracelulares de glutamato en la región hiperexcitada (Ingram y col., 2000). A este respecto, el trabajo de Duan y col. (1999) ha demostrado en cultivos de astrocitos, que el glutamato produce un aumento rápido en la captura de glutamato que se asocia con un incremento en la expresión de GLAST. En otro trabajo, se ha observado una disminución y posteriormente un aumento en la expresión del mRNA y la proteína de EAAT3 en el hipocampo de animales tratados con KA. Los autores concluyen que esta regulación diferencial de los transportadores pudiera tener un papel significativo en controlar el nivel de excitabilidad en el hipocampo (Simantov y

col., 1999). De acuerdo con lo anterior, es posible que en nuestro modelo, en la región infundida con la 4-AP, el aumento en la concentración extracelular de glutamato durante y después de 15 min posteriores a la administración de la droga sea suficiente para aumentar la expresión de estos transportadores de glutamato y evitar de esta manera la hiperexcitabilidad generada por el glutamato. Sin embargo de ocurrir este mecanismo, es evidente que no sería suficiente para evitar las crisis.

III. Efectos en las regiones no infundidas con 4-AP

Por otro lado, no se observaron cambios significativos en los niveles extracelulares de glutamato en las regiones de proyección no infundidas con 4-AP de los mismos animales, a pesar de que las descargas se propagaron de manera casi inmediata a estas regiones. Esto se debe probablemente a que en el área de proyección los cambios fueron muy transitorios, ya que el sistema de captura del glutamato, realizado por los transportadores de afinidad alta, no está alterado por la aplicación de la 4-AP. Es posible que por esta razón los cambios no pudieron ser detectados en las fracciones de 15 min, porque la sensibilidad de la técnica de HPLC utilizada es insuficiente para observar cambios muy pequeños. Al respecto, no podemos descartar la posibilidad del hecho de que la neurotransmisión glutamatérgica no esté primariamente involucrada en la propagación de las descargas y que algún otro mecanismo no relacionado con la sobreactivación de los receptores de glutamato pudiera participar en la propagación y mantenimiento de las crisis en las regiones de proyección estudiadas. Entre éstos, se sabe que las vías de asociación y comisurales, GABAérgicas y glutamatérgicas, respectivamente, de la formación hipocámpica, presentan receptores muscarínicos al neurotransmisor acetilcolina (Ach), tipo m2 y m4 , mientras que las células

granulares del giro dentado expresan receptores post-sinápticos tipo m1 y m3 (Rouse y Levey, 1997). Estos receptores están relacionados con el sistema de neurotransmisión colinérgica, la cual influye en la liberación de neurotransmisores como el glutamato y el GABA en el hipocampo. Por ejemplo los receptores m2 parece que están primariamente involucrados en el control de la liberación del glutamato a través de un mecanismo de retroalimentación negativo, y en general, la ACh inhibe la liberación del glutamato (Marchi y col., 1989). Asimismo, se ha encontrado que las interneuronas GABAérgicas de la formación hipocámpica presentan diferentes subtipos de receptores de ACh nicotínicos, se ha sugerido que la activación de las interneuronas GABAérgicas mediada por estos receptores produce un efecto inhibitor sobre las células piramidales que son glutamatérgicas (Alkondon y col., 1997). Por lo anterior, es posible correlacionar un deterioro del sistema colinérgico, que controla la liberación de glutamato en condiciones normales, con el desarrollo y establecimiento de la epilepsia (Vizi y Kiss, 1998). Con los antecedentes señalados, es posible que el sistema colinérgico este participando de manera importante en el establecimiento de las crisis, además del sistema glutamatérgico evaluado en el presente estudio.

Los resultados también mostraron aumentos pequeños en los niveles extracelulares de glicina, taurina, alanina, glutamina y GABA, que previamente habían sido reportados (Peña y Tapia, 1999). En la corteza entorrinal la 4-AP indujo un aumento considerable de la glutamina, semejante al glutamato, mientras que los otros aminoácidos, con excepción de la taurina, no tuvieron un aumento significativo. Aunque no podemos ofrecer una explicación clara de estos hallazgos.

estas diferencias entre el hipocampo y la corteza entorrinal pudieran reflejar distintas propiedades metabólicas.

En resumen, en el presente trabajo se demostró la participación del glutamato en la iniciación de las crisis, tanto en la corteza entorrinal como el hipocampo infundidos con 4-AP. Con la técnica utilizada no se pudo demostrar la participación del glutamato en la propagación de las descargas epilépticas a su correspondiente área de proyección. Sin embargo, se considera que con un sistema de detección de aminoácidos más sensible, sería posible medir cambios en la concentración extracelular de aminoácidos en periodos de tiempo más cortos, y que bajo estas condiciones sí se encontrarán cambios transitorios en la concentración de glutamato extracelular.

REFERENCIAS

Acsády, L., Halasy, K. y Freund, T. F. (1993). Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus. III. Their inputs from the median raphe and medial septal nuclei. *Neuroscience*, **52**: 829-841.

Acsády, L., Arabadzisz, D. y Freund, T. F. (1996). Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience*, **73**: 299-315.

Agoston, D., Hargittai P. y Nagy, A. (1983). Effects of 4-aminopyridine on calcium movements and changes of membrane potential in pinched-off nerve terminals from rat cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry* **41**: 745-751.

Ahnert-Hilger, G. y Habermann, E. (1981). Increase of cGMP accumulation of Ca²⁺ evoked by drugs acting on sodium or potassium channels. *European Journal of Pharmacology*, **70**: 301-310.

Akbar, M.T., Rattray, M., Williams, R.J., Chong, N.W.S., Meldrum, B.S. (1998). Reduction of GABA and glutamate transporter messenger RNAs in the severe-seizure genetically epilepsy-prone rat. *Neuroscience*, **85**: 1235-1251.

Akbar, M.T., Torp, R., Danbolt, N.C., Levy, L.M., Meldrum, B.S., Ottersen, O.P. (1997). Expression of glial glutamate transporters GLT-1 and GLAST is unchanged in the hippocampus in fully kindled rats. *Neuroscience*, **78**: 351-359.

Alkondon, M., Petreira, E.F.R., Barbosa, C.T.F., Albuquerque, E. X. (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric

acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, **283**: 1396-1411.

Alonso, A. y Köhler, C. (1984). A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, **225**: 327-343.

Amaral, D. G. y Witter, M. P. (1995). Hippocampal formation. In: *The rat nervous system*. Paxinos G. Ed., Academic Press. pp 443-494.

Amaral, D. G., Ishizuka, N. Y Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. In: *Progress in brain research: understanding the brain through the hippocampus: the hippocampal region as a model for studying structure and function*. J. Storm-Mathisen, J. Zimmer y O. P. Ottersen, Eds. pp 1-11.

Amaral, D. G. Y Kurz, J. (1985). An análisis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **240**: 37-59.

Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceeding of National Academic of Sciences USA*, **94**: 4155-4160.

Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. (1994). Functional comparison of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *Journal of Neuroscience*, **14**: 5559-5569.

Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Fairman, W.A., Wu, Y.N-, Murdoch, G.H., North, R.A., Amara, S.G. (1993). Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to glutamate transporter gene family. *Journal of Biological Chemistry*, **268**: 15329-15332.

Bakst, I., Avendano, C., Morrison, J. H. y Amaral, D. G. (1986). An experimental analysis of the origins of somatostatin-like immunoreactivity in the dentate gyrus of the rat. *Journal of Neuroscience*, **6**: 1452-1462.

Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Wartz, K.J., Martin, J.B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntingtons disease by quinolinic acid. *Nature*, **321**: 168-171.

Blandini, F., Porter, R.H., Greenamyre, J.T. (1996). Glutamate and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, **12**: 73-94.

Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **14**: 375-403.

Boss, B. D., Peterson, G. M. y Cowan, W. M. (1985). On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. *Brain Research*, **338**: 144-150.

Bouchard, R. y Fedida, D. (1995). Closed-and open-state binding of 4-aminopyridine to the cloned human potassium channel Kv 1.5. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **275**: 864-876.

Buckle, P. J. y Hass, H. L. (1982). Enhancemnt of synaptic transmsission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *Journal of Physiology*, **326**: 109-122.

Caballero-Bleda, M. y Witter, M. P. (1993). Regional and laminar organization of projections from the presubiculum y parasubiculum to the entorhinal cortex: an anterograde tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **328**: 115-129.

Casado, M., Zafra, F., Aragon, C., Giménez, C. (1991). Activation of high-affinity uptake of glutamate by phorbol esters in primary glial cell culture. *Journal of Neurochemistry*, **57**: 1185-1190.

Casado, M., Bendahan, A., Zafra, F., Danbolt, N.C., Aragon, C., Giménez, C., Kanner, B.I. (1993). Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *Journal of Biology Chemistry*, **268**: 27313-27317.

Castillo, P.E., Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1997). Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature*, **388**: 182-186.

Cavalheiro, E. A., Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Turski, W. A., Ikonomidou, C. y Turski, L. (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneously recurrent seizures. *Epilepsia* **32**: 778-782.

Chaundhry, F.A., Lehre, K., Van Lookeren Campagne, M, Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron*,**15**: 711-720.

Choi, D. W. (1992). Bench to bedside: the glutamate conection. *Science*, **258**: 241-243.

Choquet, D. and Korn, H. (1992). Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *Journal of Genetics Physiology*, **99**: 217-240.

Conrad, L. C. A., Leonard, C. M. y Pfaff, D. W. (1974). Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *Journal of Comparative Neurology*, **156**: 179-206.

Cunha, R.A., Constantino, M. D., Ribeiro, J. A., (1997). Inhibition of [³H] gamma-aminobutyric acid release by kainate receptor activation in rat hippocampal synaptosomes. *European Journal of Pharmacology*, **323**: 167-172.

Danbolt, N.C. (1994). The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Progress in Neurobiology*, **44**: 377-396.

Dichter, M. A. (1989). Cellular mechanisms of epilepsy and potential new treatment strategies. *Epilepsia* **30**: S0-S12.

Dent, J. A., Galvin, N. J., Stanfield, B. B. y Cowan, W. M. (1983). The mode of termination of the hypothalamic projection to the dentate gyrus: an EM autoradiographic study. *Brain Research*, **258**: 1-10.

DeOlmos, J., Jardy, H. Y Heimer, L. (1978). The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formation in the rat: an experimental HRP study. *Journal of Comparative Neurology*, **181**: 213-244.

Duan, S., Anderson, C.M., Stein, B.A., Swanson, R.A. (1999). Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *Journal of Neuroscience*, **19**: 10193-10200.

Fairman, W.A., Vandenberg, R.J-, Arriza, J.L-, Kavanaugh. M.P., Amara, S.G. (1995). An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, **375**: 599-603.

Finch, D. M. y Babb, T. L. (1980). Neurophysiology of the caudally directed hippocampal efferent system in the rat: projections to the subicular complex. *Brain Research*, **197**: 11-26.

Finch, D. M. y Babb, T. L. (1981). Demonstration of caudally directed hippocampal efferents in the rat by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Research*, **214**: 405-410.

Flores-Hernández, J., Galarraga, E., Pineda, J. C. y Bargas, J. (1994). Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *Journal of Neurophysiology*, **72**: 2246-2256.

Fonnum, F. (1984). Glutamate: A neurotransmitter in the mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, **42**: 1-11.

Fragoso-Veloz J., Massieu, L. , Alvarado, R. y Tapia, R. (1990). Seizures and wet dog shakes induced by 4-aminopyridine and their potentiation by nifedipine. *European Journal of Pharmacology*, **178**: 275-284.

Freedman, S. B., Dawson, G., Villereal, M. L. y Miller, R. J. (1984). Identification and characterization of voltage-sensitive calcium channels in neuronal clonal cell lines. *Journal of Neuroscience*, **4**: 1453-1467.

Freund, T. F. y Antal, M (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, **336**: 170-173.

Freund, T. F. y Buzsàki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, **6**: 347-470.

Freund, T. F., Gulyas, A. I., Acsàdy, L., Gorcs, T. y Toth. K. (1990). Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proceeding of National Academic of Sciences USA*, **87**: 8501-8505.

Freund, T. F. (1992). GABAergic septal and serotonergic median raphe afferents preferentially innervate inhibitory interneurons in the hippocampus and dentate gyrus. *Epilepsy Research Supplement*, **7**: 79-91.

Freund, T. F. (1997). Interneurons of the hippocampus. *IBRO News*, **25**: 6.

Frotscher, M. y Zimmer, J. (1983). Commissural fibers terminated on non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus- a combined Golgi/EM degeneration study. *Brain Research*, **265**: 289-293.

Frotscher, M. y Leranth, C. (1985). Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology*, **239**: 237-246.

Furuta, A., Martin, L.J., Lin, C.-L.G., Dykes-Hoberg, M., Rothstein, J.D. (1997). Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporters 3 and 4. *Neuroscience*, **81**: 1031-1042.

Gall, C. (1984). The distribution of cholecystinin-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the guinea pig: localization in the mossy fibers. *Brain Research*, **306**: 73-83.

Gandolfo, G., Gottesmann, C., Bidard, J.N. y Lazdunski, M. (1989). Ca^{++} channel blockers prevent seizures induced by class of K^{+} channel inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, **160**: 173-177.

Gannon, R. L., Terrian, D. M. (1991). Presynaptic modulation of glutamate and dynorphin release by excitatory amino acids in the guinea-pig hippocampus. *Neuroscience*, **41**: 401-410.

Gegelashvili, G., Danbolt, N.C., Schousboe, A. (1997). Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *Journal of Neurochemistry*, **69**: 2612-2615.

Germroth, P., Schwerdtfeger, W. K. y Buhl, E. H. (1989 a). GABAergic neurons in the entorhinal cortex project to the hippocampus. *Brain Research*, **494**: 187-192.

Germroth, P., Schwerdtfeger, W. K. y Buhl, E. H. (1989 b). Morphology of identified entorhinal neurons projecting to the hippocampus: a light microscopical study combined retrograde tracing and intracellular injection. *Neuroscience*, **30**: 683-691.

Getting, S. J., Segieth, J., Ahmad, S. Biggs, C.S., Whitton, P. S. (1996). Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. *Brain Research*, **717**: 196-199.

Gibson, G.E. y Manger, T. (1988). Changes in cytosolic free calcium with 1,2,3,4,-tetrahydro-5-aminoacridine, 4-aminopyridine and 3,4,-diaminopyridine. *Biochemistry and Pharmacology*, **37**: 4191-4196.

Gillespie, J. I. y Hunter, O. F. (1975). The action of 4-aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*, **252**: 70-71.

Glover, W.E. (1982). The aminopyridines. *Genetics Pharmacology* **13**: 259-474.

Gulyas, A. I., Görcs, T. J. y Freund, T. F. (1990). Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience*, **37**: 31-44.

Gulyas, A. I., Hajos, N. Y Freund, T. F. (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*. **16**: 3397-3411.

Haglund, L., Swanson, L. W. y Köhler, C. (1984). The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **229**: 171-185.

Halasy, K. y Somogyi, P. (1993). Subdivisions in the multiple GABAergic innervation of granule cells in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, **5**: 411-429.

Han, Z. S., Jul, E. H., Lorinczi, Z. Y Somogyi, P. (1993). A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, **5**: 395-410.

Hara, Y., Kitamura, K. y Kuriyama, H. (1980). Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology*, **68**: 99-106.

Harris, K. M., Miller, R. J. (1989). Excitatory amino acid-evoked release of [³H] GABA from hippocampal neurons in primary culture. *Brain Research*, **482**: 23-33.

Hille, B. (1984). In: *Ionic channels of excitable membranes*. Hille, B., Sunderland, M.A. Eds. Sinauer Assoc. pp 99-116.

Hortnagl, H., Berger, M. L., Reither, H. y Hornykiewicz, O. (1991). Cholinergic deficit induced by ethylcholine aziridinium (AF64A) in rat hippocampus: effect on glutamatergic systems. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **344**: 213-219.

Hornagl, H. y Hellweg, R. (1997). Insights into the role of the cholinergic component of the septohippocampal pathway: what have we learned from experimental lesion studies?. *Brain Research Bulletin*, **43**: 245-255.

Hu, P.-S. y Fredholm, B. B. (1991). 4-Aminopyridine-induced increase in basal and stimulation-evoked [³H]-NA release in slices from rat hippocampus: Ca²⁺ sensitivity and presynaptic control. *British Journal of Pharmacology*, **102**: 764-768.

Huang, H. Y., Hertting, G., Allgaier, C. y Jackisch, R. (1989). 3-4-diaminopyridine-induced noradrenaline release from CNS tissue as a model for action potential-evoked transmitter release: effects of phorbol esters. *European Journal of Pharmacology*, **169**: 115-123.

Ingram, E.M., Tessler, S., Bowery, N.G., Emson, P.C. (2000) Glial glutamate transporter mRNAs in the genetically absence epilepsy rat from Strasbourg. *Molecular Brain Research*, **75**: 96-104.

Insel, T. R., Miller, L. P., Gelhard, R. E. (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain-I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*, **35**: 31-43.

Jin, S. y Fredholm, B. B. (1994). Role of NMDA, AMPA and Kainate receptors in mediating glutamate and 4-aminopyridine induced dopamine and acetylcholine release from rat striatal slices. *Neuropharmacology*, **33**: 1039-1048.

Jones, R. S. G. (1987). Complex synaptic responses of entorhinal cortical cells in the rat to subicular stimulation *in vitro*: demonstration of an NMDA receptor mediated component. *Neuroscience Letters*, **31**: 209-214.

Jones, R. S. G. (1990). Synaptic responses of neurones in layer II of the rat medial entorhinal cortex to stimulation of the parasubiculum *in vitro*. *Journal of Physiology*, **426**: 48P.

Jones, R. S., Lambert, J. D. (1990). Synchronous discharges in the rat entorhinal cortex *in vitro*: site of initiation and the role of excitatory aminoacid receptors. *Neuroscience*, **34**: 657-70.

Jones, R. S. G., Heinemann, U. (1988). Synaptic and intrinsic responses of medial entorhinal cortical cells in normal and magnesium-free médium *in vitro*. *Journal of Neurophysiology*, **59**: 1476-1496.

Jones, R. S. G., Heinemann, U. (1991). Aminoacid-mediated synaptic transmission in temporal lobe structures *in vitro*: implications for the generation and spread of epileptic activity. In: *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission*. Wheal, H. y Thomson, A. eds. San Diego, Academic Press, pp 265-285.

Kanai, Y., Bhide, P.G., DiFiglia, M., Hediger, M.A. (1995). Neuronal high-affinity glutamate transporter in the rat central nervous system. *Neuroreport*, **6**: 2357-2362.

Kanai, Y., Hediger, M.A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, **360**: 467-471.

Kanai, Y., Smith, C.P., Hediger, M.A. (1993). The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *Trends in Neuroscience*, **16**: 365-370.

Kosel, K. C., Van Hoesen, G. W. Y Roseen, D. L. (1982). Non-hippocampal cortical projections from the entorhinal cortex in the rat and rhesus monkey. *Brain Research*, **244**: 201-213.

Kenyon, J. L. y Gibbons, W. R. (1979). 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac purkinje fibres. *Journal of General Physiology*, **73**: 139-157.

Kirsch, G. E. y Drewe, J. A. (1993). Gating-dependent mechanism of 4-aminopyridine block in two related potassium channels. *Journal of General Physiology*, **102**: 797-816.

Kirsch, G. E. y Narahashi, T. (1983). Site of action and active form of aminopyridines in squid axon membranes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **226**: 174-179.

Kirsch, G. E., Vener, D. F., Drewe, J. A. y Brown, A. M. (1993). Modulation of 4-aminopyridine block by mutation of deep pore residues in delayed rectifier K⁺ channels. *Biophysical Journal*, **64**: A226.

Kishi, K., Stanfield, B. B. y Cowan, W. M. (1980). A quantitative EM autoradiographic study of the commissural and associational connections of the dentate gyrus in the rat. *Anatomical Embriology*, **160**: 173-186.

Kocsis, J. D., Ruiz, J. A. y Waxman, S. G. (1983). Maturation of mammalian myelinated fibers: changes in action-potential characteristics following 4-aminopyridine application. *Journal of Neurophysiology*, **50**: 449-463.

Köhler, C. (1985). A projection from the deep layers of the entorhinal area to the hippocampal formation in the rat brain. *Neuroscience Letters*, **56**: 131-19.

Köhler, C. (1986). Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *Journal of Comparative Neurology*, **246**: 149-169.

Köhler, C. (1988). Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. III. The lateral entorhinal area. *Journal of Comparative Neurology*, 271: 208-228.

Köhler, C., Swanson, L. W., Haglund, L. y Wu, Y. Y. (1985). The cytoarchitecture, histochemistry, and projections of the tuberomammillary nucleus in the rat. *Neuroscience*, 16: 85-110.

Köhler, C. y Steinbusch, H. (1982). Identification of serotonin and non-serotonin-containing-neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation: a combined immunohistochemical and fluorescent tracing study in the rat brain. *Neuroscience*, 7: 951-975.

Kosaka, T. (1983). Axon initial segments of the granule cell in the rat dentate gyrus: synaptic contacts on bundles of axon initial segments. *Brain Research*. 274: 129-134.

Kosaka, T., Hama, K. y Wu, J. Y. (1984). GABAergic synaptic boutons in the granule cell layer of rat dentate gyrus. *Brain Research*, 293: 353-359.

Krettek, J. E. y Price, J. L. (1977). Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat. *Journal of Comparative Neurology*, 172: 723-752

Laurberg, S. y Sorensen, K. E. (1981). Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield ca3). *Brain Research*. 212: 287-300.

Lenne, K.P., Levy, L.M., Storm-Mathisen, J., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C. (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain.

Quantitative and immunocytochemical observations. *Journal of Neuroscience*, **15**: 1835-1853.

Leranth, C. y Frotscher, M. (1987). Cholinergic innervation of hippocampal GAD- and somatostatin- immunoreactive commissural neurons. *Journal of Comparative Neurology*, **261**: 33-47.

Lingenhohl, K. y Finch, D (1991) Morphological characterization of rat entorhinal neurons in vivo: soma-dendritic structure and axonal domains. *Experimental Brain Research*, **84**: 57-74.

Liu, H., Wang, H., Sheng, M., Jan, L.Y., Jan, Y. N., Basbaum, A. I. (1994). Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proceeding of National Academic of Science USA*, **91**: 8383-8387.

Lopes da Silva, F. H., Witter, M. P., Boeijinga, P. H. y Lohman, A. H. M. (1990). Anatomical organization and physiology of the limbic cortex. *Physiological Review*, **70**: 453-511.

Lorter, S., Samuel, D., Had-Aissouni, L., Masméjean, F., Kerkerian-LeGoff, L., Pisano, P. (1999). Effects of PKA and PKC modulators on high affinity glutamate uptake in primary neuronal cell cultures from rat cerebral cortex. *Neuropharmacology*, **38**: 395-.

Loy, R., Koziell, D: A., Lindsey, J. D. y Moore, R. Y. (1980). Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. *Journal of Comparative Neurology*, **189**: 699-710.

Ludvig, N., Mishra, P. K., Yan, Q. S., Lasley, S. M., Burger, R. G. y Jobe. P. C. (1992). The combined EEG-intracerebral microdialysis technique: a new tool for

neuropharmacological studies in freely behaving animals. *Journal of Neuroscience and Methods* **43**: 129-137.

Malva, J.O., Ambrosio, A. F., Cunha, R.A., Ribeiro, J.A., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M. (1995). A functionally active presynaptic high-affinity kainite receptor in the rat hippocampal CA3 subregion. *Neuroscience Letters*, **185**: 83-86.

Malva, J.O., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M. (1998). Kainate receptors in hippocampal CA3 subregion: evidence for a role in regulating neurotransmitter release. *Neurochemistry International*, **32**: 1-6.

Martinez, A, Soriano, E. y Farinas, I. (1992). Axo-axonic chandeleir cells in the entorhinal cortex and subicular complex of the rat: a Golgi electron microscopic study. *European Journal of Neuroscience, Suppl.* **5**:70.

Marchi, M., Bocchieri, P., Garbarino, L., Raiteri, M. (1989). Muscarinic inhibition of endogenous glutamate release from rat hippocampus synaptosomes. *Neuroscience Letters*, **96**: 229-234.

McCormack, K., Joiner, W. J. y Heinemann, S. H. (1994). A characterization of the activating structural rearrangements in voltage-dependent *Shaker* K⁺ channels. *Neuron*, **12**: 301-315.

Masliah, E., Alford, M., De Teresa, R., Mallory, M., Hansen, L. (1996). Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annual Neurology*, **40**: 759-766.

Massieu, L., Morales-Villagrán, A. y Tapia, R. (1995). Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an *in vivo* microdialysis study. *Journal of Neurochemistry*, **64**: 2262-2272.

Meldrum, B.S., Akbar, M.T., Chapman, A.G. (1999). Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Research*, **36**: 189-204.

Mihaly, A., Bencsik, K. y Solymon, T. (1990). Naltrexone potentiates 4-aminopyridine seizures in rat. *Journal of Neural Transmition*, **79**: 59-67.

Miller, H.P., Levay, A.I., Rothstein, J.D., Tzingounis, A.V., Conn, P.J. (1997). Alteration in glutamate transporter protein levels in kindling-induced epilepsy. *Journal of Neurochemistry*, **68**: 1564-1570.

Milner, T. A. y Amaral, D. G. (1984). Evidence for a ventral septal projection to the hippocampal formation of the rat. *Experimental Brain Research*, **55**: 579-585.

Milner, T. A. y Bacon, C. E. (1989 a). Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *Journal of Comparative Neurology*, **281**: 479-495.

Milner, T. A. y Bacon, C. E. (1989 b). GABAergic neurons in the rat hippocampal formation: ultrastructure and synaptic relationships with catecholaminergic terminals. *Journal of Neuroscience*, **9**: 3410-3427.

Moore, R. Y., Ziegler, B. y Bayer, S. A. (1978). Monoamine neuron innervation of the hippocampal formation: Alteration by neonatal irradiation. *Experimental Neurology*, **60**: 318-326.

Morales-Villagrán, A. y Tapia, R. (1996). Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochemistry International*, **28**: 35-40.

Morales-Villagrán, A., Ureña-Guerrero, M. E. y Tapia, R. (1996). Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *European Journal of Pharmacology*, **305**: 87-93.

Morales-Villagrán, A., López-Pérez, S., Medina-Ceja, L. Y Tapia, R. (1999). Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique. *Neuroscience Letters*, **275**: 133-136.

Morari, M., O'Connor, W. T., Darvelid, M., Ungerstedt, U., Bianchi, C. y Fuxe, K. (1996). Functional neuroanatomy of the nigrostriatal and striatonigral pathways as studied with dual probe microdialysis in the awake rat- I. Effects of perfusion with tetrodotoxin and low-calcium medium. *Neuroscience*, **72**: 79-87.

Nagao, S., Kwak, S., Kanazawa, I. (1997). EAAT4, a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje cell dendrites, and forms parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neuroscience*, **78**: 929-933.

Nakayama, T., Kawakami, H., Tanaka, K., Nakamura, S. (1996). Expression of three glutamate transporter subtype mRNAs in human brain regions and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*, **36**: 189-192.

Nayler, W. G. (1988). *Calcium antagonists*. Academic Press, London.

Nonaka, M., Kohmura, E., Yamashita, T., Shimada, S., Tanaka, K., Yoshimine, T., Tohyama, M., Hayakawa, T. Increased transcription of glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following kainic acid-induced limbic seizure. *Molecular Brain Research*, **55**: 54-60.

Nowycky, H. C., Fox, A. P. y Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, **316**: 440-443.

Nyakas, C., Luiten, P. G. M., Spencer, D. G. y Traber, J. (1987). Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA₁ and dentate gyrus. *Brain Research Bulletin*, **18**: 533-545.

Obrenovitch, T. P., Richards, D. A., Sarna, G. S. y Symon, L. (1993). Combined intracerebral microdialysis and electrophysiological recording: methodology and applications. *Journal of Neuroscience Methods*, **47**: 139-145.

Obrenovitch, T. P., Urenjak, J. y Zilkha, E. (1994). Intracerebral microdialysis combined with recording of extracellular field potential: a novel method for investigation of depolarizing drugs in vivo. *British Journal of Pharmacology*, **113**: 1295-1302.

Obrenovitch, T. P., Zilkha, E. y Urenjak, J. (1995). Intracerebral microdialysis: electrophysiological evidence of a critical pitfall. *Journal of Neurochemistry*, **64**: 1884-1887.

Obrenovitch, T. P., Urenjak, J. y Zilkha, E. (1996). Evidence disputing the link between seizure activity and high extracellular glutamate. *Journal of Neurochemistry*, **66**: 2446-2454.

Oleskevich, S., Descarries, L. y Lacaille, J. C. (1989). Quantified distribution of the noradrenaline innervation in the hippocampus of adult rat. *Journal of Neuroscience*, **9**: 3803-3815.

Ottersen, O. P. (1982). Connections of the amygdala of the rat. IV. Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology*, **205**: 30-48.

Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. (1984). Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In: *Handbook of chemical neuroanatomy*. Bjorkkiund A, Hokfelt T, Kuhar MJ, Eds. Elsevier, pp 141.

Overstreet, L.S., Kinney, G.A., Liu, Y.-B., Bilups, D., Slater, N.T. (1999), Glutamate transporters contribute to the time course of synaptic transmission in cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience*, **19**: 9663-9673.

Pasantes-Morales, H. y Arzate, M.E. (1981). Effect of taurine on seizures induced by 4-aminopyridine. *Journal of Neuroscience Research*, **6**: 465-474.

Pasantes-Morales H., Arzate, M.E. Quesada, O. y Huxtable, R.J. (1987). Higher susceptibility of taurine deficient rats to seizures induced by 4-aminopyridine. *Neuropharmacology*, **26**: 1721-1725.

Patterson, T. A., Kim, E.-K., Meldrum, M. J. y Dawsdon, R. Jr. (1995). Glutamate efflux from rat brain slices and cultures: A comparison of the depolarizing agents potassium, 4-aminopyridine and veratrine. *Neurochemical Research*, **20**: 225-232.

Peña, F. y Tapia, R. (1999). Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *Journal of Neurochemistry*, **72**: 2006-2014.

Peña, F. y Tapia, R. (2000). Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience*, **101**: 547-561.

Phillipson, O. T y Griffiths, A. C. (1985). The topographic order of inputs to the nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, **16**: 275-296.

Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H, Storm-Mathisen, J., Seeberg, J.S., Kanner, B.I.(1992). Cloning and expression of a rat L-glutamate transporter. *Nature*, **360**: 464-467.

Poncer, J.C., Shinozaki, H., Miles, R. (1995). Dual modulation of synaptic inhibition by distinct metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *Journal of Physiology*, **485**: 121-134.

Ribak, C. E. y Seress, L. (1983). Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined gligi and electron microscopic study. *Journal of Neurocytology*, **12**: 576-597.

Ribak, C. E., Seress, L. y Amaral, D. G. (1985). The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *Journal of Neurocytology*, **14**: 835-857.

Ribak, C. E., Seress, L., Peterson, G. M., Seroogy, K. B., Fallon, J. H. y Schmued, L. C. (1986). A GABAergic inhibitory component within the hippocampal commissural pathway. *Journal of Neuroscience*, **6**: 3492-3498.

Rodríguez-Moreno, A., Herreras, O., Lerma, J. (1997). Kainate receptors presynaptically downregulates GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron*, **19**: 893-901.

Rogawski, M.A. y Barker, J. L. (1983). Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. *Brain Research*, **280**: 180-185.

Rogawski, M. A. (1985). The A current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it?. *Trends in Neuroscience*, **8**: 214-219.

Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncel, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F. (1996). Knockout of glutamate transporter reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, **16**: 675-686.

Rothstein, J.D., Martin, L., Lavey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncel, R.W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, **13**: 713-725.

Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncel, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annual Neurology*, **38**: 73-84.

Rouse, S.T., Levey, A. I. (1997). Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesions: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *Journal of Comparative Neurology*, **380**: 382-394.

Russell, S. N., Publicover, N. G., Padraig, J. H., Carl, A., Hume, J. R., Sanders, K. M. y Horowitz, B. (1994). *Journal of Physiology*, **481**: 571-584.

Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S., y Tapia, R. (1994). Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochemistry International*, **24**: 363-368.

Sandberg, M., Butcher, S. P. y Hagberg, H. (1986). Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycaemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, **47**: 178-184.

Sayin, U., Timmerman, W. y Westerink, B.H.C. (1995). The significance of extracellular GABA in the substantia nigra of the rat during seizures and anticonvulsant treatments. *Brain Research*, **669**: 67-72.

Scanziani, M., Salin, P.A., Vogt, K.E., Malenka, R.C., Nicoll, R.A. (1997). Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature*, **385**: 630-634.

Scharfman, H. E., Kunkel, D. D. Y Schawartzkroin, P. A. (1990). Synaptic connections of dentate granule cells and hilar neurons: results of paired intracellular recordings and intracellular horseradish peroxidase injections. *Neuroscience*, **37**: 693-707.

Schmitt, A., Asan, E., Puschel, B., Jons, Th., Kugler, P. (1996). Expression of the glutamate transporter GLT-1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridisation and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience*, **71**: 989-1004.

Schmitt, A., Asan, E., Puschel, B., Kugler, P. (1997). Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in

situ hybridisation and comparative immunocytochemistry. *Journal of Neuroscience*, **17**: 1-10.

Segal, M. y Barker, J. L. (1986). Rat hippocampal neurons in culture: Ca^{++} and Ca^{++} dependent K^+ conductance. *Journal of Neurophysiology*, **55**: 751-770.

Seress, L. y Ribak, C. E. (1984). Direct commissural connections to the basket cells of the hippocampal dentate gyrus: anatomical evidence for feed-forward inhibition. *Journal of Neurocytology*, **13**: 215-225.

Shafqat, S., Tamarappoo, B.K., Kilberg, M.S., Puranam, R.S., McNamara, J.O., Guadano-Ferraz, A., Fremeau, R.T.J. (1993). Cloning and expression of a novel Na^+ -dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na^+ /glutamate cotransporters. *Journal of Biological Chemistry*, **268**: 15351-15355.

Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., Mizuno, N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptors subtypes in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, **17**: 7503-7522.

Simantov, R., Crispino, M., Hoe, W., Broutman, G., Tocco, G., Rothstein, J.D., Baudry, M. (1999). Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in rat hippocampus following kainate-induced seizure activity. *Molecular Brain Research*, **65**: 112-123.

Shibata, T., Watanabe, M., Tanaka, K., Wada, K., Inoue, Y. (1996). Dynamic changes in expression of glutamate transporters mRNAs in developing brain. *Neuroreport*, **7**: 705-709.

Shieh, C.-C. y Kirsch, G. E. (1994). Mutational analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated K⁺ channels. *Biophysical Journal*, **67**: 2316-1325.

Simantov, R., Crispino, M., Hoe, W., Broutman, G., Tocco, G., Rothstein, J.D., Baudry, M. (1999). Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in rat hippocampus following kainate-induced seizure activity. *Molecular Brain Research*, **65**: 112-123.

Soriano, E. y Frotscher, M. (1989). A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Research*, **503**: 170-174.

Spyker D.A., Linch C., Shabanowitz J. y Jinn J. (1980). Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clinical Toxicology*, **16**: 487-497.

Steward, O. (1976). Topographic organization of the projection from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **167**: 285-314.

Steward, O. y Scoville, S. A. (1976). Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentate of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **169**: 347-370.

Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W. (1992). Structure, expression and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate-aspartate transporter from the rat brain. *Proceeding of National Academic of Sciences USA*, **89**: 10955-10959.

Storm, J. (1988). Temporal integration by slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. *Nature*, **336**: 379-381.

Storm-Mathisen, J. y Fonnum, F. (1972). Localization of transmitter candidates in the hippocampal region. *Progress in Brain Research*, **36**: 41-58.

Swanson, L. W., Wyss, J. M. y Cowan, W. M. (1978). An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *Journal of comparative Neurology*, **181**: 681-716.

Swanson, L. W. y Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **172**: 49-84.

Szerb, J. C. (1991). Glutamate release and spreading depression in the fascia dentata in response to microdialysis with high K^+ : role of glia. *Brain Research* **542**: 259-265.

Tamamaki, N. y Nojyo, Y. (1993). Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus*, **3**: 471-480.

Tanaka, K., Watase, K., Manabe, J., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, **276**: 1699-1702.

Tapia, R. y Sitges, M. (1982). Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Research*, **250**: 291-299.

Tapia R., Sitges M. y Morales E. (1985). Mechanisms of the calcium dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Research*, **361**: 373-382.

Tapia, R., Medina-Ceja, L. Y Peña, F. (1999). On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochemistry International*, **34**: 23-31.

Terrian, D.M., Conner-Kerr, T.A., Privette, T.H., Gannon, R. L. (1991). Domoic acid enhances the K⁺-evoked release of endogenous glutamate from guinea-pig hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Brain Research*, **551**: 303-307.

Thesleff, S. (1980). Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience*, **5**: 1413-1419.

Tibbs, G. R., Dolly, J. O. y Nicholls, D. G. (1989). Dendrotoxin, 4-aminopyridine and α -bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanisms to induce Ca²⁺-dependent release of glutamate from guinea-pig cerebrocortical synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, **52**: 201-206.

Tóth, K. y Freund, T. F. (1992). Calbindin D28-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience*, **49**: 793-805.

Torp, R., Høiover, F., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., Ottersen, O.P. (1997). Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and EAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: An in situ hybridization analysis. *Anatomy and Embryology*, **195**: 317-326.

Turner, T. J., Adams, M. E. y Dunlap, K. (1993). Multiple Ca²⁺ channel subtypes coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release, *Proceedings of National Academic of Sciences USA*, **90**: 9518-9522.

Turner, B. H., Mishkin, M. y Knapp, M. (1980). Organization of the amygdalopetal projections from modality-specific cortical association areas in the monkey. *Journal of Comparative Neurology*, **191**: 515-543.

Umbriaco, D., Garcia, S., Beaulieu, C. y Descarries, L. (1995). Relational features of acetylcholine, noradrenaline, serotonin and GABA axon terminals in the stratum radiatum of adult rat hippocampus (CA1). *Hippocampus*, **5**: 605-620.

Utsunomiya-Tate, N., Endou, H., Kanai, Y. (1996). Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *Journal of Biological Chemistry*, **271**: 14883-14890.

Van Groen, T. y Wyss, J. M. (1990 a) The connections of presubiculum and parasubiculum in the rat. *Brain Research*, **518**: 227-243.

Van Groen, T. Y Wyss, J. M. (1990 b). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical and bilateral hippocampal formation projections. *Journal of Comparative Neurology*, **302**: 515-528.

Van Groen, T. y Wyss, J. M (1990 c) The postsubicular cortex in the rat: characterization of the fourth region of the subicular cortex and its connections. *Brain Research*, **529**: 165-177.

Velaz-Faircloth, M., McGraw, T.S., Alandro, M.S., Fremeau, R.T.J., Kilberg, M.S., Anderson, K.J. (1996). Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1 in rat brain. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, **39**: C67-C75.

Verhage, M., McMahon, H. T., Ghijsen, W. E. J. M., Boomsma, F., Scholten, G., Wiegant, V. M. y Nicholls, D. G. (1991). Differential release of amino acids,

neuropeptides and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron*, **6**: 517-524.

Vignes, M., Collingridge, G.L. (1997). The synaptic activation of kainite receptors. *Nature*, **388**: 179-182.

Vizi, E. S., Kiss, J. P. (1998). Neurochemistry and Pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*, **8**: 566-607.

Wainer, B. H., Levay, A. I., Mufson, E. J. y Mesulam, M. M. (1984). Cholinergic systems in mammalian brain identified with antibodies against choline acetyltransferase. *Neurochemistry International*, **6**: 163-182.

Wainer, B. H., Levay, A. I., Rye, D. B., Mesulam, M. M. y Mufson, E. J. (1985). Cholinergic and non.cholinergic septohippocampal pathways. *Neuroscience Letters*, **54**: 45-52.

Watanabe, T., Morimoto, K., Hirao, T., Suwaki, H., Watase, K., Tanaka, K. (1999). Amygdala-kindled and pentylenetetrazole-induced seizures in glutamate transporter GLAST-deficient mice. *Brain Research*, **845**: 92-96.

West, M. J., Coleman, P. D. y Flood, D. G. (1988). Estimating the number of granule cells in the dentate gyrus with the dissector. *Brain Research*, **448**: 167-172.

White, T. D., Tan, A. M. y Finch, D. M. (1990). Functional reciprocal connections of the rat entorhinal cortex and subicular complex with the medial frontal cortex: an in vivo intracellular study. *Brain Research*, **533**: 95-106.

Wouterlood, F. G. (1991). Innervation of the entorhinal principal cells by neurons of the nucleus reunions thalami: anterograde PHA-L tracing combined with

retrograde fluorescent tracing and intracellular injection with Lucifer yellow in the rat. *European Journal of Neuroscience*, **3**: 641-647.

Wyss, J. M. (1981). An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **199**: 495-512.

Wyss, J. M. y Van Groen, T. (1992). Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: a review. *Hippocampus*, **2**: 1-12.

Yamada, K., Watanabe, M., Shibata, T., Tanaka, K., Wada, K., Inoue, Y. (1996). EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport*, **7**: 2013-2017.

Young, A. B., Sakurai, A. Y., Albin, R. L., Makowiec, R., Penney, J. B. (1991). Excitatory amino acid receptor distribution: quantitative autoradiographic studies. In: *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission*. Wheal, H. V. y Thomson, A. M. eds. San Diego, Academic Press, pp 19-29.

Zhou, M., Peterson, C.L., Lu, Y.B., Nadler, J.V. (1995). Release of glutamate and aspartate from CA1 synaptosomes: selective modulation of aspartate release by ionotropic glutamate receptor ligands. *Journal of Neurochemistry*, **64**: 1556-1566.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA