

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

MECANISMOS QUE MANTIENEN EL ESTADO ACTIVO "UP STATE" EN LAS NEURONAS NEOESTRIATALES DE PROYECCION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS
B I O M E D I C A S

P R E S E N T A :

RAMIRO OSCAR VERGARA FERRARI

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSE BARGAS DIAZ

INSTITUTO DE FISILOGÍA CELULAR



UNAM





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A Miguel y Nora (viejos queridos)

A la Caro, el Chavo y la Silvi (mis hermanos)

A Tricia con todo mi amor (gracias)

A mis cuates, pocos pero poderosos (con la mirada fija en el horizonte)

AGRADECIMIENTOS

A mis viejos, por todo el apoyo, afectivo, anímico y económico

Al Dr. José Bargas. Por haberme dado la oportunidad de vivir esta cantidad de cosas en México, por las charlas y enseñanzas, por orientarme y mostrarme de que se trata la labor científica. Gracias.

A Pablo Cañas. Me fuiste a buscar al aeropuerto, me ofreciste tu casa tu amistad y ahora me das trabajo...que mas? Muchas gracias Pablito!!! Aguante la "T".

A La Universidad Nacional Autónoma de México. Fue un honor.

A la Dirección General de Estudios de Postgrado (DEGEP-UNAM). Por darme una beca completa para la realización de mis estudios. Muchisisisimas gracias!!!!

A la Dra. Elvira Galárraga. Por todo su apoyo, no solo académico sino humano, por ayudarme a establecerme en el DF.

A Carmen Vilchis. Por hacerme el favor de alquilarme tu depto superbarato; mi primera morada en el DF. Espero que estes en paz.

A Antonio Laville. Por enseñarme como registrar y como analizar mas de una vez y con paciencia.

A Jaime Guzmán. Por tu amistad y alegría. Suerte Jaime.

A Velia. Por tu amistad siempre y por algunas sugerencias durante los experimentos (¿por que no lavas Ramiro?).

A Tamara Pérez. Por tu amistad y buenísima onda.

A todos mis compañeros del laboratorio

A la Dani. Por todo lo bueno.

A los amigos.

A la Trici Trixi. Por haberme agarrado de las orejas en el momento justo. Gracias.

A mi socio Gigi gilard de la france por ser tan picante

A Eduardo y Solange por darme amistad y alojamiento (Edu, gracias por tu ayuda com la tesis)

A Charly. Por la inspiración

RESUMEN

En una rebanada corticoestriatal de rata, breves estimulaciones subumbrales repetitivas en la corteza, provocan potenciales en meseta de larga duración en neuronas neoestriatales. Los potenciales en meseta son seguidos de cambios espontáneos en el voltaje entre dos potenciales de membrana preferidos. Mientras que la inducción de los potenciales en meseta fue abolida por antagonistas de los receptores a glutamato no-NMDA y NMDA, el mantenimiento de las oscilaciones espontáneas del potencial de membrana fue bloqueado solo por antagonistas de los canales NMDA y de calcio tipo "L". La duración y la frecuencia de los eventos despolarizantes, similares a los vistos "in vivo" fueron aumentados por agonistas de los canales NMDA y de calcio tipo "L" así como por antagonistas de canales de K^+ y del receptor $GABA_A$. El NMDA crea una región de conductancia de pendiente negativa que cruza tres veces el cero de corriente de la relación voltaje corriente. Los dos puntos que cruzan esta curva con pendiente positiva son los indicadores de la biestabilidad en la membrana de la célula. La biestabilidad inducida por NMDA fue parcialmente bloqueada por antagonistas del canal de calcio de tipo "L". La estimulación en el soma no indujo oscilaciones del potencial de membrana o potenciales en meseta sugiriendo que estos se originan en las dendritas lejanas. Estos resultados muestran que las conductancias que atraviesan los canales NMDA y de calcio tipo "L" ayudan a generar oscilaciones del voltaje y potenciales en meseta en las neuronas espinosas medianas del neoestriado.

SUMMARY

In a rat corticostriatal slice, brief, suprathreshold, repetitive cortical stimulation evoked long lasting plateau potentials in neostriatal neurons. Plateau potentials were often followed by spontaneous voltage transitions between two preferred membrane potentials. While the induction of plateau potentials was disrupted by non-NMDA and NMDA glutamate receptor antagonists, the maintenance of spontaneous voltage transitions was only blocked by NMDA receptor and L-type Ca^{2+} channel antagonists. The frequency and duration of depolarized events, resembling up-states described *in vivo*, were increased by NMDA and L-type Ca^{2+} channel agonists as well as by GABA_A receptor and K^+ channel antagonists. NMDA created a region of negative slope conductance and a positive slope crossing indicative of membrane bistability in the current–voltage relationship. NMDA-induced bistability was partially blocked by L-type Ca^{2+} channel antagonists. Although evoked by synaptic stimulation, plateau potentials and voltage oscillations could not be evoked by somatic current injection – suggesting a dendritic origin. These data show that NMDA and L-type Ca^{2+} conductances of spiny neurons are capable of rendering them bistable. This may help to support prolonged depolarizations and voltage oscillations under certain conditions.

INDICE

| | |
|--|----|
| DEDICATORIA..... | 1 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 2 |
| RESUMEN..... | 3 |
| SUMMARY..... | 4 |
| INDICE..... | 5 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 6 |
| <i>Capítulo 1</i> | 8 |
| INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 1.1 LOS GANGLIOS BASALES:..... | 8 |
| 1.2 FUNCIÓN I/O (¿Son las dendritas simples cables pasivos?)..... | 14 |
| 1.3 GENERACIÓN DE POTENCIALES EN MESETA..... | 22 |
| 1.4 BI-ESTABILIDAD..... | 24 |
| 1.5 LAS OSCILACIONES DEL POTENCIAL DE MEMBRANA SINCRONIZAN REDES NEURONALES..... | 28 |
| 1.6 IMPORTANCIA DEL RECEPTOR-CANAL PARA NMDA..... | 29 |
| 1.7 IMPORTANCIA DE LA CORRIENTE DE CALCIO..... | 32 |
| 1.8 NEURONAS ESTRIATALES DE PROYECCIÓN..... | 37 |
| <i>Capítulo 2</i> | 41 |
| EL PROBLEMA..... | 41 |
| 2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 41 |
| 2.2 PREGUNTAS A RESPONDER:..... | 42 |
| <i>Capítulo 3</i> | 43 |
| HIPÓTESIS..... | 43 |
| <i>Capítulo 4</i> | 44 |
| METODOLOGÍA..... | 44 |
| 4.1 PREPARACIÓN DE LAS REBANADAS UTILIZADAS EN LOS REGISTROS..... | 44 |
| 4.2 REGISTRO EN CÉLULA ENTERA..... | 45 |
| <i>Capítulo 5</i> | ; |
| RESULTADOS..... | ; |
| <i>Capítulo 6</i> | 71 |
| 6.1 EN LA REBANADA LOS POTENCIALES EN MESETA Y EL ESTADO ACTIVO "UP STATE" DEPENDEN DE NMDA..... | 78 |
| 6.2 LOS CANALES DE CALCIO DE TIPO "L" CONTRIBUYEN AL MANEJO SINÁPTICO DE POTENCIALES EN MESETA Y A LAS OSCILACIONES DEL POTENCIAL DE MEMBRANA..... | 79 |
| <i>Capítulo 7</i> | 83 |
| CONCLUSIONES..... | 83 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 85 |
| ANEXO..... | 97 |
| ARTÍCULO PRINCIPAL DE LA TESIS..... | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AP5: D-(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid

CNQX: 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline disodium salt

CPN: Conductancia de pendiente negative

EPSP: Potencial posináptico excitatorio

GABA: Acido gama amino butírico

GB: Ganglios basales

Gpe: Globo pálido externo

Gpi: Globo pálido interno

IcaL: Corriente de calcio de tipo "L"

I/O: Entrada salida

IPSP: Potencial posináptico inhibitorio

IS: Segmento inicial del axón

NE: Neostriado

NEM: Neurona espinosa mediana

NMDA: N-methyl-D-aspartate

SNC: Sistema nervioso central

SNr: sustancia negra pars reticulata

TEA: tetraethylammonium

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 LOS GANGLIOS BASALES:

Los ganglios basales (GB) se encuentran ubicados en el cerebro medio y anterior de mamíferos, aves, reptiles y peces pulmonados. En muchas especies, incluyendo la mayoría de los mamíferos, los GB son la estructura telencefálica subcortical mas prominente del cerebro anterior. El gran tamaño de este núcleo y la similitud que éste mantiene en un gran número de especies sugiere que los GB deben participar en funciones esenciales del plan básico de organización del cerebro de los vertebrados terrestres. Sin embargo ha sido difícil asignarle un rol específico y definido. Las pruebas mas aceptadas acerca de la función de este núcleo se basan en observaciones de humanos afectados con desórdenes degenerativos que alteran estas estructuras. En todos los casos los desórdenes en alguna estructura de los GB generan déficit severos de los movimientos. Así, las enfermedades o accidentes que afectan a estos núcleos, generan movimientos involuntarios o una reducción de los movimientos voluntarios (Albin et al., 1989).

Entre otras hay cuatro enfermedades importantes que afectan estructuras de los GB:

- La enfermedad del Parkinson.
- La enfermedad de Huntington.
- Los balismos.
- Las diskinesias.

Los GB son el mayor componente anatómico del sistema motor extrapiramidal y se cree que actúa en paralelo pero independientemente de los sistemas motores piramidales y corticoespinal. Las conexiones anatómicas de los GB unen elementos de los aparatos sensorimotor, cognitivo y motivacional del cerebro (Kimura y Graybiel, 1995; Schultz, 1998; Miller y Wickens, 2000).

Las mayores estructuras motoras de los GB son (fig. 1):

- núcleo caudado.
- núcleo putamen.
- globo pálido externo (primate); globo pálido (roedor).
- globo pálido interno (primate); núcleo entopeduncular (roedor).
- sustancia negra compacta y reticulada.
- núcleo subtalámico.

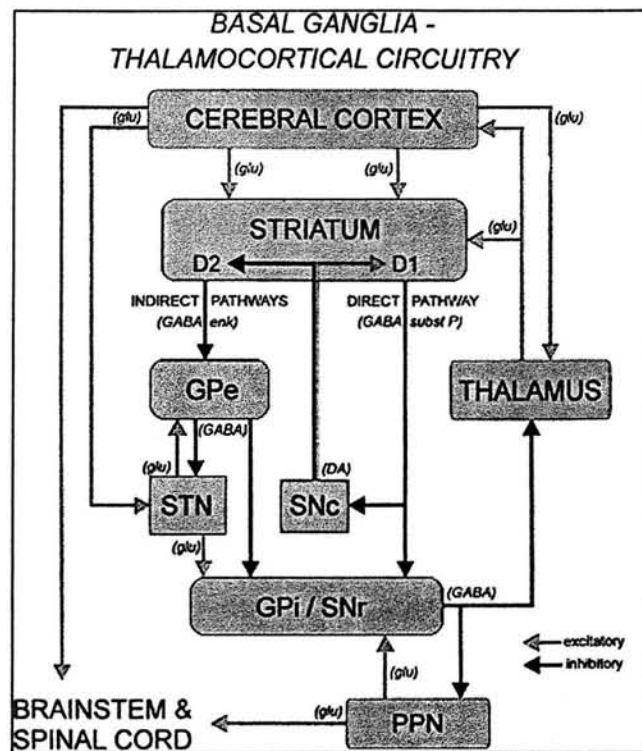


Fig.1: En este esquema se ven los principales componentes de los ganglios basales (núcleo caudado, núcleo putamen, globo pálido externo e interno, sustancia negra reticulata y compacta, núcleo subtalámico, núcleo acumbens) así como la entrada talamo cortical. En flechas claras están las sinápsis excitatorias y en flechas oscuras las inhibitorias.

Los GB reciben un gran número de aferencias de la corteza cerebral y del tálamo así como aferencias dopaminérgicas de la sustancia negra compacta y serotoninérgicas del núcleo del rafe, situados en la formación reticular del puente (Parent y Hazrati, 1995; Chesselet y Delfs, 1996; Wilson, 1998). Estas aferencias llegan en su gran mayoría al neostriado (NE). El NE está formado por los núcleos caudado, putamen y acumbens. Los núcleos caudado y putamen reciben entradas sinápticas de áreas corticales sensoriales, motoras y de asociación. De esta manera, la corteza sensorimotora y la premotora proyectan mayoritariamente al putamen (Kunzle, H. 1975) y la corteza de asociación proyecta al caudado (Yeterian EH y Van Hoesen GW., 1978). El núcleo acumbens recibe aferencias de la corteza límbica y del hipocampo.

Como acabamos de ver, la gran mayoría de entradas que reciben los GB llegan al NE. Este núcleo proyecta sus axones exclusivamente a otras estructuras dentro de los GB, principalmente a tres núcleos:

- el globo pálido externo (Gpe)
- el globo pálido interno (Gpi)
- la sustancia negra pars reticulata (SNr).

El Gpi y la SNr proyectan sus axones fuera de los GB, principalmente hacia el tálamo. El GPe en cambio proyecta sus axones a un pequeño pero importante núcleo de los GB: el núcleo subtalámico. Este núcleo, al igual que el NE, recibe entradas de la corteza cerebral y proyecta al GP y la SN. Podemos ver así que las proyecciones del NE forman dos caminos diferentes a través de los GB. Un camino conocido como la “vía directa”, está formado por neuronas que dirigen sus axones al Gpi y a la SN logrando así un acceso directo a la salida talámica de los GB. El otro camino de salida del neostriado se conoce como “vía indirecta” ya que son neuronas que dirigen sus axones al GPe, afectando así otros núcleos de los GB. Como acabamos de ver, el NE proyecta a ambos segmentos del GP y a la SNr. Esas proyecciones eferentes son salidas gabaérgicas e inhiben la acción de sus células blanco, ubicadas en otras estructuras de los GB. Así, los principales núcleos de salida de los GB están modulados por la salida estriatal. Estos núcleos de salida dirigen sus axones al tálamo donde la información proveniente de los GB es enviada nuevamente a la corteza cerebral. De esta manera, la función del NE y sus núcleos blanco es la de procesar la información proveniente de la corteza cerebral. Una vez procesada esta información, sale hacia el tálamo y regresa nuevamente a la corteza. De esta manera se realiza una retroalimentación entre la corteza, los GB y el tálamo que sirve para el refinamiento de los

movimientos. Una gran cantidad de neuronas de la corteza cerebral proyecta hacia el NE y esas entradas forman parte de un grupo ordenado de circuitos paralelos que regulan diferentes aspectos de la función motora y cognitiva (Alexander et al., 1986). Estas aferencias corticoestriatales realizan conexiones glutamatérgicas con las neuronas del NE. Pero ésta no es la única entrada excitatoria que recibe el NE; además de esta recibe entradas excitatorias glutamatérgicas provenientes del tálamo intra laminar (Parent. A, 1990). Aparte, el NE contiene neuronas de proyección e interneuronas. Las neuronas de proyección son de tamaño mediano (15-20 μM), alrededor del 95% de la población neuronal del núcleo en el roedor y sus dendritas están densamente cubiertas de espinas (neuronas espinosas medianas; NEM). Su neurotransmisor primario es el GABA. Del soma de estas neuronas se extienden troncos dendríticos con diámetros de 2-3 μm . El cuerpo celular y la parte inicial de los troncos dendríticos carecen de espinas dendríticas. Las NEM tienen entre 25 y 30 ramas dendríticas terminales las cuales están distribuidas en todas direcciones desde el soma alcanzando un radio de 300-500 μm . El axón de estas neuronas, antes de dirigirse a sus células blanco, deja en el núcleo estriado una gran cantidad de ramas colaterales que hacen sinápsis con otras NEM. Las espinas dendríticas de las NEM reciben el 85% de las aferencias en sus cabezas. Por el contrario, el número de sinapsis excitatorias que hacen blanco en el tronco dendrítico y el cuerpo celular es muy reducido. Estas sinapsis llegan en su mayoría de la corteza cerebral y de los núcleos talámicos intra laminares.(Bennett y Wilson, 2000).

Como vimos previamente, las NEM ejercen un poderoso efecto inhibitorio sobre sus células blanco, actuando a través de receptores GABA_A en la SN y en el GP. Además, se inhiben unas a otras a través de axones colaterales. Además de las NEM de proyección, el neostriado contiene diferentes tipos de interneuronas (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi y Kubota, 1995; Bolam y Bennett, 1995; Wilson, 1998; Bennett y Wilson, 2000): las interneuronas gigantes sin espinas

son inmunoreactivas a colin-acetiltransferasa y son el 2% de la población neuronal del neocórtex en el roedor (Phelps et al., 1985). A estas neuronas se las conoce como neuronas gigantes colinérgicas debido a su gran tamaño y a que forman sinápsis colinérgicas con las NEM (Izzo y Bolam, 1988).

El siguiente tipo de interneuronas es inmunoreactivo a parvalbumina y libera GABA_A en sus células blanco. Estas neuronas representan el 1% de la población neuronal del estriado, tienen el cuerpo celular redondo y de un diámetro de 13 a 15 μm .

Otro tipo de interneurona estriatal es inmunoreactiva a somatostatina y al neuropeptido "Y". Estas neuronas contienen a su vez la enzima NADPH diaforasa, la cual está involucrada en la síntesis del óxido nítrico, representan el 1% de la población estriatal y tienen un cuerpo celular esférico de 12 μm de diámetro.

El último tipo de interneuronas estriatales es la interneurona GABAérgica que contiene calretinina y representa menos del 1% de la población neuronal del estriado.

Cada NEM recibe entre 1 y 10 sinápsis excitatorias de una neurona piramidal de la corteza o de relevo del tálamo (Wilson, 1998). El papel que ejercen los receptores ionotrópicos postsinápticos a glutamato ha sido estudiado extensamente en el estriado. Con el desarrollo de antagonistas selectivos a receptores no NMDA los investigadores han demostrado que el EPSP inducido por estimulación en el cuerpo calloso y dentro del estriado contienen componentes NMDA y no NMDA. El rol del NMDA en estas sinápsis no es bien conocido. Sin embargo las neuronas espinosas medianas expresan un número considerable de estos receptores y respuestas dependientes de NMDA pueden ser observadas en rebanadas de estriado cuando se baja la concentración de Mg^{2+} extracelular. Como vamos a ver más adelante, estas neuronas son capaces de producir potenciales en meseta inducidos por la entrada sináptica cortical e "in vivo" su

potencial de membrana oscila entre dos potenciales preferidos (biestabilidad del potencial de membrana).

1.2 FUNCIÓN I/O (¿Son las dendritas simples cables pasivos?).

Uno de los principales problemas en neurociencias es el de entender cómo las neuronas transforman las señales sinápticas en potenciales de acción. Esto se conoce como la “función entrada-salida” (*input-output* o *I/O function*) de las neuronas. El papel que cumplen las dendritas en la transmisión de información entre neuronas ha sido estudiado desde comienzos del siglo XX. Originalmente Cajal postuló que las dendritas son el polo de entrada de la información que llega a las neuronas y culminó con la idea de que las dendritas son cables pasivos. El avance en el campo tecnológico permitió a los investigadores utilizar nuevas técnicas de investigación. Ahora tenemos evidencia de que las dendritas poseen conductancias activas. Sin embargo, los procesos lógicos que se suceden en el comportamiento normal de las dendritas no está del todo aclarado.

Los registros intracelulares utilizando micro electrodos de vidrio (Hyde, 1921; Ling y Gerard 1949) permitieron por primera vez a los investigadores observar la electrofisiología de las neuronas individuales. Estas aproximaciones fueron desarrolladas sistemáticamente en estudios sobre motoneuronas de la médula espinal (Brock et al., 1952). El desarrollo de estas técnicas permitió llegar a dos descubrimientos claves: Se demostró la existencia de dos tipos de potenciales posinápticos, uno excitador (EPSP) y otro inhibitorio (IPSP) (Coombs et al., 1955a; 1955b) y la inducción de potenciales de acción depolarizantes en el segmento inicial del axón (IS) (Fuortes et al., 1957). A partir de estos descubrimientos se hipotetizó que en las dendritas se suman de manera pasiva las corrientes de la red, resultado de las llegadas de EPSPs e IPSPs. Las neuronas pueden “sumar” algebraicamente las entradas sinápticas excitadoras o despolarizantes y

las entradas inhibitorias o hiperpolarizantes. Las primeras acercan y las segundas alejan a las neuronas del umbral de disparo de un potencial de acción. Por lo tanto, si la suma algebraica da como resultado un potencial de membrana menos negativo que el umbral de disparo, la neurona genera un potencial de acción (Fig. 2).

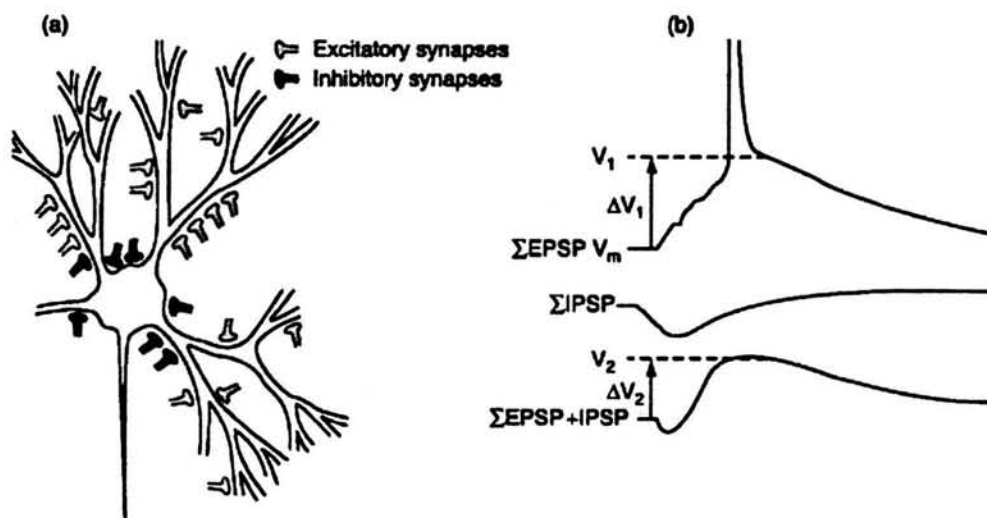


Figura 2. Suma algebraica de las entradas sinápticas. Una neurona recibe entradas excitadoras (terminales vacías) y entradas inhibitorias (terminales llenas) (a). La suma algebraica de ambas, tanto espacial como temporal, decide si el potencial de membrana llega al umbral de disparo, en cuyo caso se genera un potencial de acción (b). Esto sólo es un caso de función I/O.

Sin embargo, hay muchas otras funciones I/O. Esto se debe a que, además de las entradas sinápticas, las neuronas poseen canales iónicos en su membrana que le confieren propiedades especiales a su disparo (ver revisión en Bargas et al., 2003). Estos canales iónicos generan corrientes transmembranales intrínsecas (producidas por las mismas neuronas), además de las corrientes iónicas producidas por las entradas sinápticas que necesitan el transmisor proveniente de otra neurona para ser activadas. Veamos algunos ejemplos:

Lorente y Coundouris (1959) propusieron que las dendritas no son simplemente cables pasivos sino que éstas pueden amplificar activamente entradas sinápticas. Estos trabajos demostraron que las dendritas, además de transportar pasivamente cambios en el potencial de

membrana, eran capaces de cambiar el peso de entradas sinápticas utilizando para ello canales voltaje dependientes postsinápticos. Trabajos influyentes realizados sobre motoneuronas (Eccles 1958), neuronas de Purkinje (Llinás y Nicholson, 1971, Llinás y Hess, 1976) y neuronas piramidales (Spencer y Kandel, 1961; Andersen et al., 1966; Wong et al., 1979) introducen la idea de “potenciales de acción dendríticos” en la investigación de las dendritas. Por ejemplo, en una serie de artículos claves, Llinás y colaboradores iniciaron una nueva era dentro de la fisiología dendrítica. Para esto realizaron registros intracelulares directamente en las dendritas de neuronas de Purkinje y demostraron de manera directa la existencia de espigas dendríticas (Llinás y Nicholson, 1971, Llinás y Hess, 1976, Llinás y Sugimori, 1980). Estos resultados llevaron a la idea de que las dendritas de las neuronas de Purkinje producen potenciales en meseta y espigas de calcio además de transportar EPSPs e IPSPs, a la vez que el soma produce espigas de Na^+ . Estas neuronas tienen así dos zonas funcionalmente distintas con diferentes propiedades electrofisiológicas entre si: el soma y el árbol dendrítico, además de las propiedades pasivas de cable.

Una de las técnicas cruciales para el estudio de la fisiología de las dendritas fue la combinación de patch clamp en rebanadas de cerebro (Sakmann y Neher, 1983; Blanton et al., 1989; Edwards et al., 1989) con la videomicroscopia infrarroja (Dodt y Zieglgansberger, 1990). Esta técnica permite realizar registros identificando sistemáticamente las neuronas o partes de éstas en donde se quiere realizar el registro en una rebanada de cerebro (Stuart et al., 1993). Esto permitió realizar tanto registros dendríticos (Llinás y Hess, 1976) como registros simultáneos de las dendritas y el soma (Sugimori y Llinás, 1984). Con estas técnicas se demostró que las dendritas son capaces de producir potenciales en meseta inducidos por despolarizaciones del potencial de membrana.

Como vimos anteriormente, cuando se realizan registros intracelulares en neuronas de Purkinje se pueden observar espigas dendríticas de calcio y espigas de sodio en el soma. Experimentos con imágenes de calcio confirmaron la presencia de canales de calcio voltaje-dependientes tanto en las dendritas como en el soma de estas neuronas (Ross y Werman, 1987; Tank et al., 1988). En estos estudios la acumulación de calcio aparece en toda la dendrita cuando se registran espigas de calcio o potenciales en meseta. Experimentos electrofisiológicos y de imagen han demostrado la existencia de canales de calcio y de sodio en las dendritas de neuronas piramidales del hipocampo y de la neocorteza. El registro somático de neuronas piramidales de la corteza “in vivo” confirmó la existencia de prepotenciales rápidos después de la estimulación sináptica o por estimulación sensorial (Purpura y Shofer, 1964; Hirsch et al., 1995). Estos prepotenciales son resistentes al bloqueo de los canales de sodio con QX-314 sugiriendo que son potenciales de acción de calcio. Registros realizados en las dendritas de estas neuronas demostraron la existencia de espigas de sodio y de calcio tanto “in vitro” (Schwartzkroin y Slawski, 1977; Wong et al., 1979; Amitai et al., 1993; Kim y Connors, 1993; Stuart y Sakmann, 1994; Spruston et al., 1995) como “in vivo” (Houchin, 1973; Pockberger 1991). Aproximadamente el 20 % de los contactos sinápticos del cerebro son inhibitorios (Peters et al., 1991). Sin embargo los estudios de microscopia electrónica indican que la localización de las entradas inhibitorias en las dendritas pueden ser muy específicas (Peters et al., 1991; Buhl et al., 1994). La influencia de esas entradas inhibidoras en la fisiología de las dendritas se demostró por la inhibición de espigas dendríticas en células de Purkinje por estimulación de neuronas inhibidoras (Llinás et al., 1968). Callaway y colaboradores (1995) estudiaron el efecto de la inhibición en la acumulación de Ca^{2+} en neuronas de Purkinje y encontraron que los IPSPs reducen la despolarización dendrítica y la acumulación de Ca^{2+} producida por la activación de las fibras trepadoras. Este efecto está restringido a las ramas dendríticas individuales. Registros

intracelulares de neuronas piramidales en la neocorteza muestran que los IPSPs reducen y eventualmente bloquean las espigas dendríticas de Na^+ y Ca^{2+} generados por inyecciones de corriente (Kim et al., 1995). Estos estudios demuestran la importancia de las entradas inhibitoras en el control del funcionamiento dendrítico, además del rol tradicional de bloquear las entradas excitadoras. Así, la inhibición puede controlar aspectos temporales de la respuesta dendrítica.

Podemos ver entonces que existen diferentes tipos de neuronas con diferentes tipos de canales tanto en sus dendritas como en el soma. Esto hace que cada tipo de neurona, y en algunos casos, una misma neurona, posean diferentes modos de disparo dependiendo de la entrada sináptica que le llega y de la composición de canales iónicos posinápticos que tenga. Es importante aclarar también que tanto la pre como la post sinapsis son blanco de moduladores capaces de cambiar tanto la fuerza sináptica como la entrada presináptica para un estímulo determinado.

En la Figura 3 se ejemplifican algunos modos de disparo encontrados en neuronas. Puede verse que hay neuronas que disparan al principio del estímulo mientras que otras lo hacen con cierto retardo (Figs. 3A, B vs. 3D). Otras neuronas disparan de manera sostenida (Fig. 3A), aún si el estímulo ya se ha terminado (Fig. 3C), mientras que otras disparan en forma de ráfagas (Fig. 3F) o de manera tónica (Fig. 3A).

Estos, sin embargo, no son todos los modos de disparo. Hay neuronas con corrientes marcapaso como el corazón, por lo que disparan todo el tiempo, mientras que otras no disparan (!) como es el caso de muchas células de la retina que sólo difunden el voltaje de una sinapsis a otra. En fin, hay tantas variedades de neuronas, que si las clasificamos por su modo de disparo, es lógico suponer que las entradas sinápticas no se procesarán de la misma manera por cada tipo neuronal. Así, en la Figura 4 se ilustran ejemplos de funciones I/O que no se pueden explicar con una suma espacio-temporal de las entradas sinápticas. Si recordamos que las corrientes

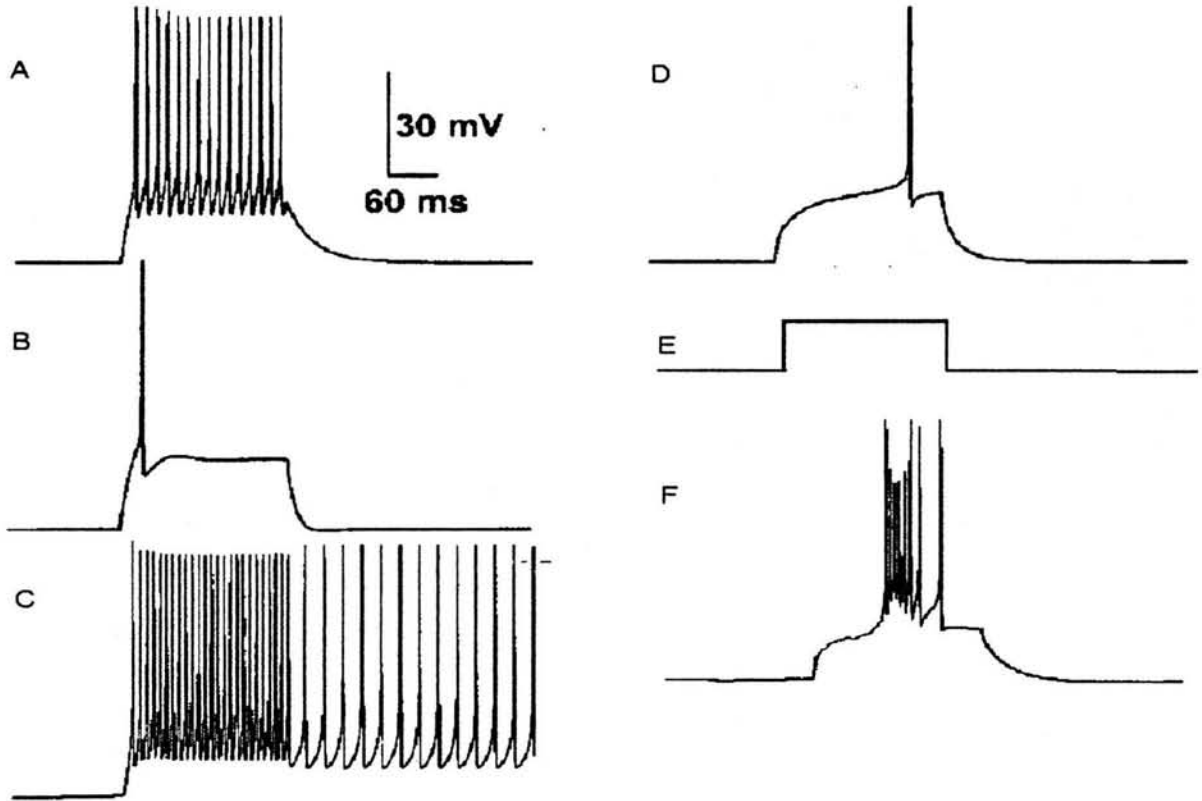


Figura 3. Diferentes modos de disparo de las neuronas. A. Disparo tónico, la frecuencia es proporcional a la intensidad del estímulo (el estímulo, un pulso rectangular de corriente, se ejemplifica en E y es el mismo para todos los casos). B. Disparo con adaptación ultra-rápida de la frecuencia. Esto es, la neurona sólo dispara al principio del estímulo y luego se calla. Este tipo de disparo lo usan muchas neuronas sensoriales. Se debe a la activación de corrientes salientes persistentes de potasio que se activan lentamente por la despolarización. C. Disparo sostenido que dura un tiempo prolongado después de que se terminó el estímulo. Este disparo lo usan muchas neuronas motoras así como aquellas neuronas que procesan la información utilizando memoria de corto plazo. Se debe a conductancias entrantes persistentes activadas por el mismo estímulo. D. Disparo con retardo. Los usan neuronas que integran estímulos sucesivos en el tiempo o detectores de secuencias. Se debe a corrientes salientes que se activan muy rápido por el estímulo pero que se inactivan si este persiste, permitiendo así, alcanzar el umbral de disparo. F. Disparo en ráfagas cortas de potenciales de acción. Lo usan neuronas sensoriales y del tálamo. Se debe a corrientes entrantes todo o nada de calcio, pero que son más lentas y de menor umbral que los potenciales de acción. Así, generan una onda despolarizante sobre la que se montan los potenciales de acción.

intrínsecas dependen del voltaje, ya sea directa o indirectamente, es fácil entender las dos funciones I/O de una neurona talámica. Cerca de -65 mV, se cumple la suma algebraica (Fig. 4Aa), pero si la neurona ha sido previamente hiperpolarizada por una fuerte entrada inhibitoria, proveniente del núcleo reticular del tálamo, la neurona se hiperpolariza a niveles cercanos a los -

80 mV. En esas condiciones, las entradas excitadoras producen un potente disparo en ráfagas (Fig. 4Ab). Esto quiere decir que, dependiendo del potencial de membrana, la misma entrada sináptica excitadora puede valer diferente. Aún más, es la fuerte entrada inhibitoria que lleva a la célula a -80 mV la que condiciona el potente disparo en ráfagas. ¿No que las entradas hiperpolarizantes son siempre inhibitorias? Asimismo, una neurona piramidal de ciertas áreas de la corteza o del hipocampo, puede responder dependiendo del potencial de membrana, o bien durante las primeras entradas sinápticas (con adaptación a -60 mV; Fig. 3Ba), o bien después de un retardo de duración variable (a -80 mV; Fig- 3Bb). En otras palabras, no sólo las neuronas de diversos tipos poseen diferentes modos de disparo, si no que una misma neurona puede exhibir diferentes mecanismos dependiendo del potencial de membrana.

Otro ejemplo, al que nos vamos a referir en el resto de esta tesis es la función I/O conferida por los “potenciales en meseta” (Fig. 5). Los potenciales en meseta (o en *plateau*) son despolarizaciones prolongadas que duran más que el estímulo que los provoca (Figs. 3C y 5B). Pueden mantener el disparo repetitivo y han sido descritos en muchos tipos neuronales tanto de invertebrados (Golowasch y Marder, 1992; Kiehn y Harris-Warrick, 1992; Zhang y Harris-Warrick, 1995; Zhang et al., 1995; Angstadt y Choo, 1996; Wilson et al., 1996; Mills y Pitman, 1997), como de vertebrados (Hounsgaard y Mintz, 1998; Kiehn, 1991; Fraser y MacVicar, 1996; Russo y Hounsgaard, 1996; Overton y Clark, 1997; Rekling y Feldman, 1997; Viana di Prisco et al., 1997; Hsiao et al., 1998; Sandler et al., 1998).

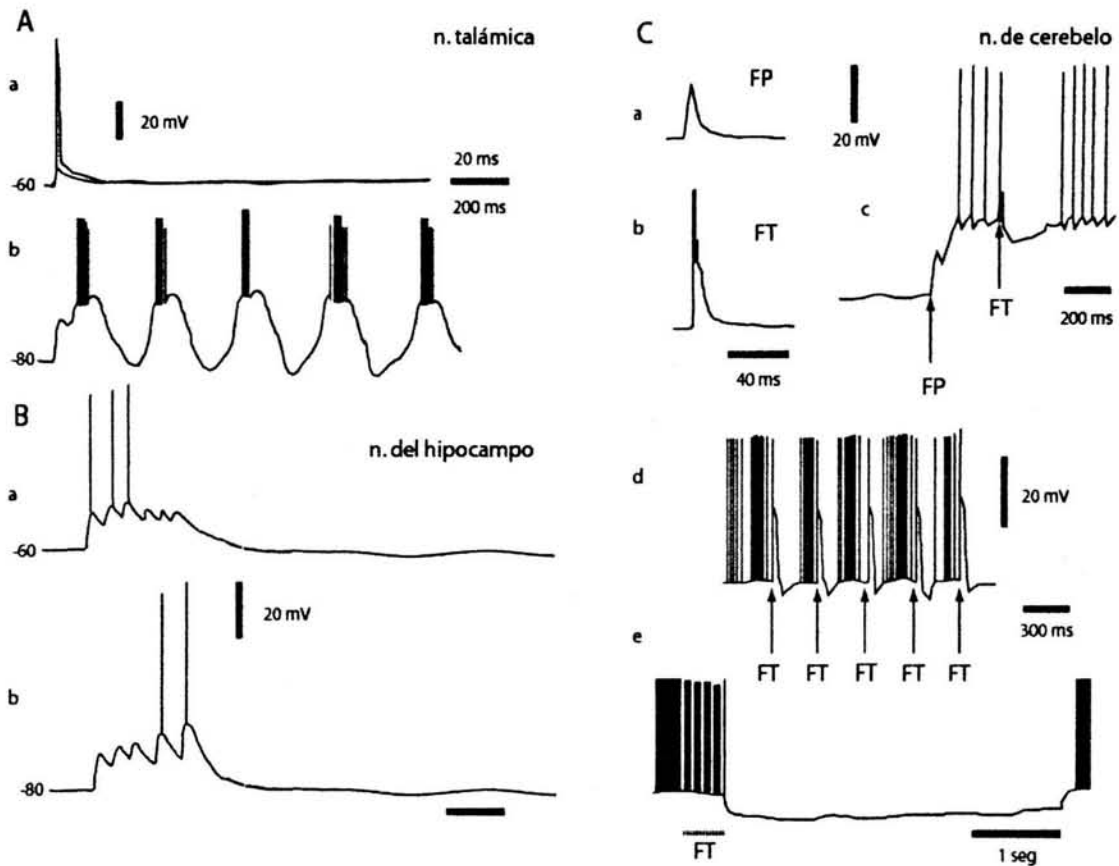


Figura 4. Diversas funciones I/O. A. Neurona talámica de relevo. Puede disparar siguiendo una suma de entradas sinápticas si su potencial de membrana es cercano a los -60 mV (a), pero si una fuerte inhibición (proveniente del núcleo reticular talámico) hiperpolariza a la neurona hasta cerca de -80 mV, resulta que las entradas excitadoras ahora producirán ráfagas de potenciales de acción (b). Esto se debe a que la corriente que produce las ráfagas sólo puede activarse a potenciales hiperpolarizados. B. Neurona piramidal del hipocampo. De nuevo, el modo de disparo depende de que corrientes son activadas más fuerte y esto a su vez depende del potencial de membrana, si es cercano a -60 , el disparo presenta adaptación, pero si es cercano a -80 , presenta retardo. C. Neurona de Purkinje del cerebello. En esta neurona hay variedad tanto de corrientes intrínsecas como sinápticas, así, se ha observado que aunque ambas, las fibras paralelas y las fibras trepadoras son excitadoras, la forma en que hacen disparar a la neurona es muy diferente. Las fibras paralelas (FP) producen potenciales sub-umbrales, se necesita la suma de muchos para hacer que la célula dispare. En cambio, las fibras trepadoras (FT) siempre hacen disparar a la neurona pues su entrada es muy potente (a). Ahora, ¿qué pasa cuando combinamos ambas? ¿Resulta que la entrada de la FT inhibe la actividad resultante de las FP! (c). Esto se debe a que la potente entrada de FT activa un potencial de calcio que a su vez activa fuertes corrientes salientes de potasio. Así, la secuencia alternada de ambas puede producir ráfagas rítmicas (d). Pero si la entrada de FT es muy prolongada, el disparo puede silenciarse por varios segundos.

Debe quedar claro, sin embargo, que hay muchos otros tipos de funciones I/O (para una revisión ver Hammond, 2001; Llinás, 1988).

1.3 GENERACIÓN DE POTENCIALES EN MESETA

Gracias a los potenciales en meseta, una sola señal sináptica puede convertirse en un tren de potenciales de acción. Así, un microcircuito formado por neuronas que funcionan de esta manera no seguirá la regla de suma lineal espacio-temporal de las entradas sinápticas para la generación de sus potenciales de acción.

¿Cómo se generan los potenciales en meseta? La llegada de un estímulo sináptico supra-umbral activa corrientes iónicas entrantes e intrínsecas de la membrana neuronal (de sodio o de calcio). Estas corrientes, cuando son persistentes, o de inactivación lenta, generan una despolarización prolongada que puede dar lugar a un tren potenciales de acción que ya no depende de la entrada sináptica inicial para ser mantenido (fig 5). Aun cuando en muchas clases de neuronas las señales de entrada son necesarias para alcanzar potenciales en meseta, éstos son usualmente mantenidos por corrientes intrínsecas posinápticas o por una combinación variable de conductancias sinápticas e intrínsecas (Llinás, 1988; Lee y Heckman, 1998^a; Timofeev et al., 2000; Reyes, 2001). Las corrientes entrantes persistentes comúnmente relacionadas a la inducción de potenciales en meseta pueden ser de calcio, que se activan alrededor de -60 o -50 mV ($Ca_v1.3$; Bischofberger y Schild, 1995; Miura et al., 1997; Reikling y Feldman, 1997; Seamans et al., 1997; Shepard y Stump, 1999; Carlin et al., 2000; Lo y Mize, 2000; Perrier y Hounsgaard, 2000), o fracciones de la corriente de sodio que no se inactivan ($Na_v1.6$; Dickson et al., 2000; Lee y Heckman, 2001; Mao et al., 2001), o una acción sinérgica de ambos tipos de corriente (Schwindt y Crill, 1980; 1998; Kim y Connors, 1993; Hsiao et al., 1998; Larkum et al., 2001; Oakley et al., 2001). Esto hace que las neuronas que funcionan de esta manera tengan diferentes funciones input-output dependiendo de si se encuentran por debajo o por arriba del umbral necesario para generar un potencial en meseta. Además, la modulación de canales NMDA

y de potasio así como la modulación de corrientes entrantes sostenidas pueden regular el umbral funcional para la inducción de potenciales en meseta.

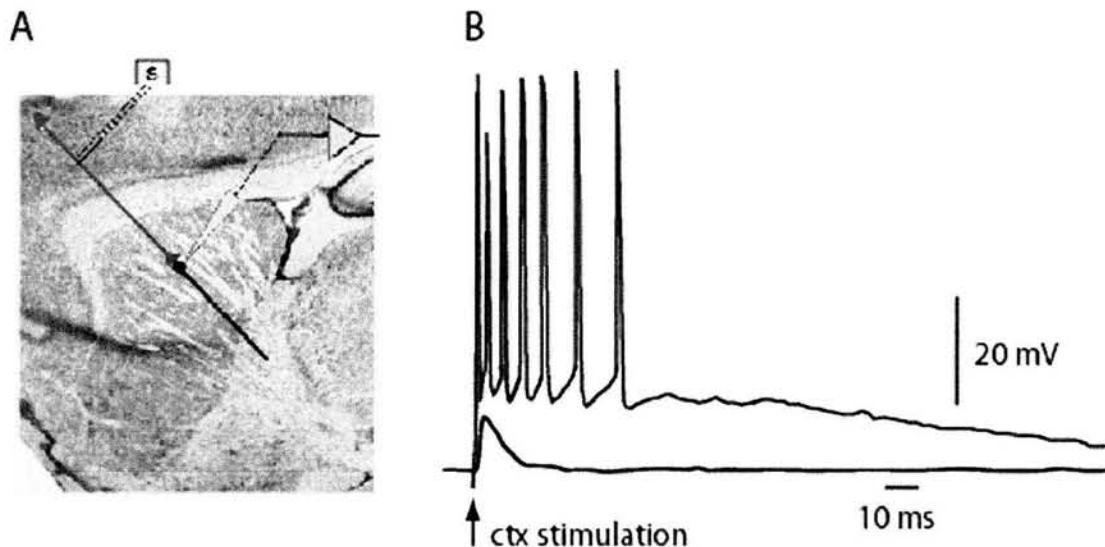


Figura 5. La llegada de un potencial sináptico (EPSP) supra-umbral induce un potencial en meseta en una neurona espinosa mediana del núcleo estriado. A. Se estimula donde está el esquema de la neurona (piramidal de la corteza; S = estimulador) y se registra la neurona estriatal de proyección (sistema de registro). B. Nótese que el potencial en meseta presenta disparo repetitivo que es generado sin la llegada de otro EPSP (Vergara et al. 2003). Sin embargo, la amplitud del potencial en meseta no es mucho mayor que la del EPSP sub-umbral.

En las motoneuronas de gato, los potenciales en meseta fueron descritos desde 1984 (Houngaard et al., 1984) pero se tenía evidencia indirecta de ellos al registrarse disparo sostenido ante un solo estímulo desde 1975 (Hultborn et al., 1975). Estas despolarizaciones no dependen de la actividad sostenida de neuronas premotoneurales sino que son mantenidos por propiedades intrínsecas de las motoneuronas postsinápticas (Houngaard et al., 1984; Croen et al., 1998; Lee y Heckman, 1996).

Una de las corrientes entrantes más comúnmente implicada en la generación de potenciales en meseta es la corriente de calcio de tipo “L” (I_{CaL}), presente en corazón, músculo estriado o liso, neuronas y células endocrinas (Houngaard y Kiehn, 1989; Nedergaard et al.,

1993; Andreasen y Lambert, 1995; Miura et al., 1997; Hsiao et al., 1998; Shepard y Stump, 1999; Carlin et al., 2000; Lo y Mize, 2000; Perrier y Hounsgaard, 2000).

1.4 BI-ESTABILIDAD

Los potenciales en meseta poseen una serie de propiedades interesantes para regular la integración sináptica, por ejemplo, pueden ser inducidos por la activación de receptores-canal a glutamato de tipo NMDA (Flatman et al., 1983; Hell et al., 1996; Schwindt y Crill, 1997; Guertin y Hounsgaard, 1998; Seamans et al., 1997; Lo y Mize, 2000), o por el bloqueo de corrientes intrínsecas a potasio (Nedergaard et al., 1993; Schwindt y Crill, 1997; del Negro et al., 1999; Golding et al., 1999; Ping y Shepard, 1999).

El comportamiento bi-estable del potencial de membrana es otra propiedad característica conferida por las corrientes entrantes persistentes de bajo umbral de activación (Flatman et al., 1983; Kiehn, 1991; Hsiao et al., 1998; Kiehn y Eken, 1998; Lee y Heckman, 1998a,b; Agrawal et al., 2001; Heyward et al., 2001).

La bi-estabilidad del potencial de membrana se caracteriza por:

a) La aparición de una zona de conductancia de pendiente negativa (CPN) en la función corriente-voltaje (curva I-V) en estado-estacionario (steady-state) producida por las corrientes entrantes sostenidas (Fig. 6). La CPN muestra pues, dos puntos estables (i.e., dos cruces en el eje del voltaje con pendiente positiva) (Schwindt y Crill, 1977; 1980; Kiehn, 1991; Hsiao et al., 1998; Lee y Heckman, 1998b; Booth y Rinzel, 1997; Carlin et al., 2000) (fig.6).

b) Estos dos puntos estables en el voltaje quieren decir que la neurona posee dos potenciales de membrana preferidos: un estado polarizado o inactivo (down state) y un estado despolarizado o activo (up state). En el estado inactivo es posible que las entradas sinápticas

sigan leyes de suma espacio-temporal. En el estado activo las mismas entradas sinápticas valen diferente y son amplificadas por el potencial en meseta para producir trenes de potenciales de acción. Así, cada uno de estos potenciales determina un estado diferente de la función input-output ya que el peso de la señal de entrada sináptica es completamente diferente en cada uno de ellos (Kiehn, 1991; Perrier y Hounsgaard, 2000; Reyes, 2001).

c) Pero el potencial en meseta no puede mantenerse permanentemente. La activación de corrientes salientes intrínsecas (de potasio) o extrínsecas (sinapsis inhibitoras) termina con el estado activo hasta que una nueva entrada excitadora lo vuelve a generar. Esto es, la zona de CPN permite fluctuaciones espontáneas o transiciones comandadas por entradas sinápticas caóticas o rítmicas entre los dos potenciales preferidos (Contreras y Steriade, 1997; Guertin y Hounsgaard, 1998; Hsiao et al., 1998; Dickson et al., 2000; Sánchez-Vives y McCormick, 2000; Heyward et al., 2001; Wang y O'Donnell, 2001) (Fig. 7). Esto es, los potenciales en meseta se alternan en un patrón rítmico con periodos silentes. Estas oscilaciones del potencial de membrana entre dos niveles estables están correlacionadas con programas motores repetitivos como la marcha, el rascado, el nado (Brownstone et al., 1994) o el mantenimiento de la postura en los vertebrados, incluyendo a los humanos (Kiehn y Eken, 1997) (Fig. 7).

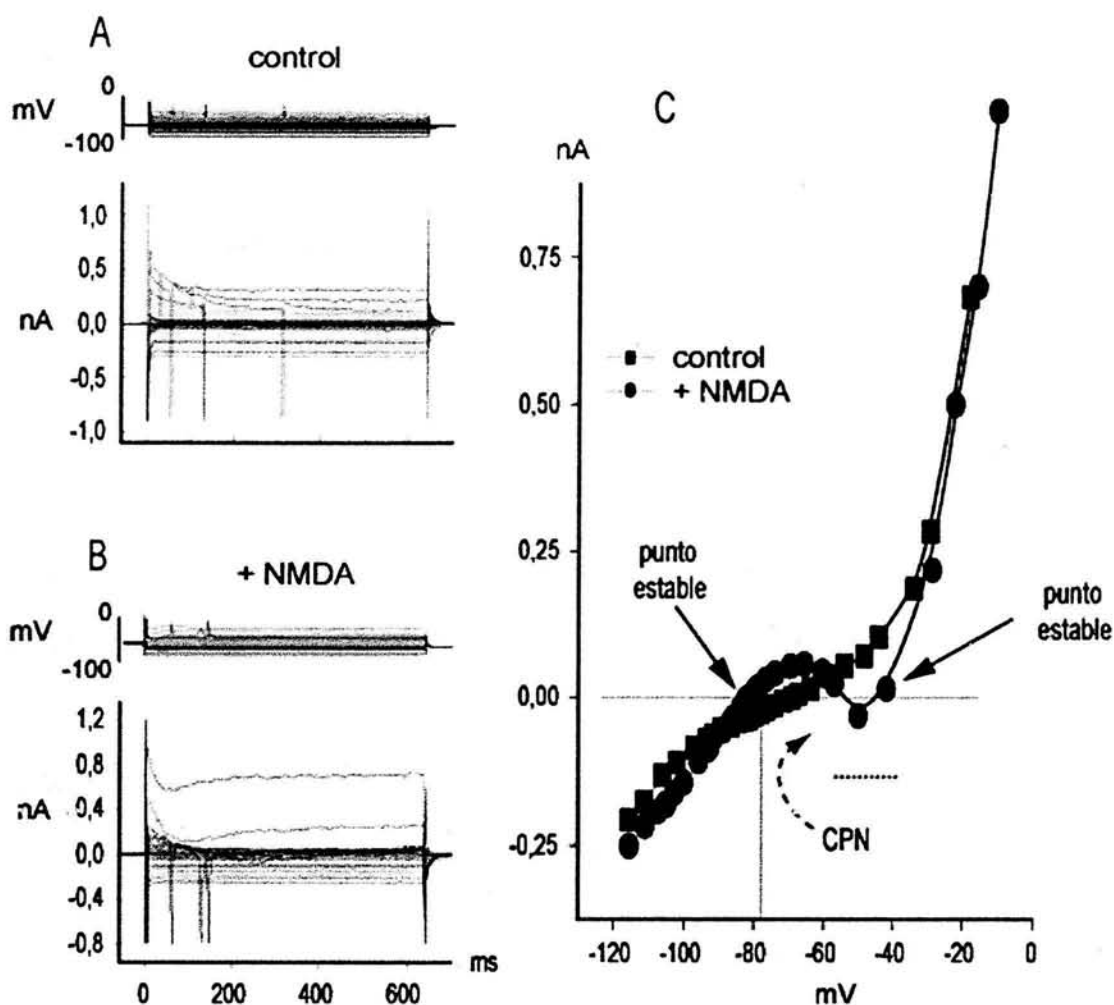


Figura 6. Función corriente-voltaje (curva I-V) de una neurona espinosa mediana del neostriado registrada “in vitro” antes y durante la presencia de 20 μM de NMDA en el medio extracelular. A,B. Los comandos de voltaje (mV) están arriba y las respuestas o corrientes intrínsecas neuronales se ilustran abajo (nA). A. Respuestas control a comandos de voltaje más y menos negativos que el potencial de reposo. B. Respuestas en presencia de NMDA. C. Curvas I-V graficando los registros en A y B (midiendo al final del comando). Los cuadrados corresponden a la curva control (A). Son de notar las rectificaciones entrante y saliente y un solo cruce en el eje de voltaje. Los círculos corresponden a la curva en presencia de NMDA (B). Es notable la aparición de una zona de conductancia con pendiente negativa (CPN), tres cruces del eje de voltaje, dos de ellos con pendiente positiva (puntos estables). El intervalo de voltaje donde se mantienen las potenciales en meseta está señalado con una línea horizontal punteada (umbral = cruce con pendiente negativa = - 64 mV). No se muestra, pero la zona CPN desaparece en presencia de bloqueadores del canal de calcio de tipo L, tales como nifedipina, nifedipina o nitrendipina (ver resultados: Vergara et al., 2003). A pesar de haber sido disparada por NMDA, la zona CPN no está siendo generada sólo por canales NMDA.

Muchos tipos de neurona del sistema nervioso central y periférico exhiben la capacidad de producir potenciales en meseta y oscilaciones en su potencial de membrana. Por ejemplo, cuando las neuronas piramidales de la corteza motora y las espinosas medianas del neostriado son

registradas “in vivo”, presentan oscilaciones espontáneas de su potencial de membrana que fluctúan entre dos potenciales “preferidos” o estables: un estado despolarizado que puede presentar disparo repetitivo y un estado hiperpolarizado prácticamente silente (Wilson, 1993) (Fig. 7).

En el asta dorsal de la médula espinal han sido registradas descargas bi-estables “in vivo” en respuesta a entradas de aferentes primarias excitadoras (Woolf y King, 1987; De Koninck y Henry, 1991). El 28% de estas neuronas presenta potenciales en meseta dependientes de voltaje, modulados por la activación de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (Morisset y Nagy, 1998), neurokininas y NMDA (De Koninck y Henry, 1991; Gerber et al., 1991; Nagy et al., 1993; Urban y Randic, 1984; Yoshimura y Jessell, 1990). Estos potenciales en meseta dependen de la entrada de calcio por canales de alto y bajo umbral, activándose alrededor de los -50 mV (Morisset y Nagy, 1996; Morisset y Nagy, 1998; Huang, 1987; 1989; Ryu y Randic, 1990).

Estudios realizados en una preparación de médula espinal de tortuga adulta describieron una actividad oscilatoria espontánea inducida por NMDA donde la frecuencia de las ráfagas fue proporcional a la concentración de NMDA en el medio (Guertin y Hounsgaard, 1998). En lampreas, el NMDA induce oscilaciones biestables moduladas por corrientes de potasio dependientes de calcio (Wallen y Grillner, 1987). En estudios “in vitro” utilizando rebanadas de núcleo trigémino, la presencia de serotonina es suficiente para inducir una zona de CPN y subsecuentes potenciales en meseta y oscilaciones biestables con disparo repetitivo (Hsiao et al., 1998). Estas neuronas tienen además corrientes marcapaso por lo que los periodos activos se suceden con asombrosa ritmicidad (son las neuronas que comandan la masticación). Estos son solo algunos ejemplos de tipos neuronales con un comportamiento biestable del potencial de membrana.

1.5 LAS OSCILACIONES DEL POTENCIAL DE MEMBRANA SINCRONIZAN REDES NEURONALES

Las oscilaciones del potencial de membrana pueden sincronizarse en grandes poblaciones neuronales, entre neuronas de un mismo núcleo, o entre neuronas de diferentes núcleos del cerebro. Así, la actividad sincrónica de los llamados “ensambles neuronales” ha sido observada en el estriado (Jog et al., 1999), el cerebelo (Thier et al., 2000), la corteza motora (Laubach et al., 2000), la corteza prefrontal (Schoenbaum and Eichenbaum, 1995) y el hipocampo (Deadwyler et al., 1996). Estos estudios se basan en el registro extracelular simultáneo de neuronas de diferentes núcleos que disparan rítmicamente trenes sostenidos de potenciales de acción de manera coordinada. Se han realizado registros intracelulares de pares de neuronas con fluctuaciones sincrónicas y biestables en el estriado dorsal y la corteza motora (Stern et al., 1998) y entre neuronas de la corteza visual (Lampl et al., 1999).

Multitud de tipos neuronales poseen funciones I/O caracterizadas por despolarizaciones prolongadas en respuesta a entradas sinápticas de corta duración. De muchas de ellas se han registrado las oscilaciones en el potencial, y de algunas, la sincronización de ensambles que pueden abarcar cientos de neuronas. La actividad rítmica de las neuronas juega un papel fundamental en la fisiología y la patofisiología en el SNC. La sincronización de poblaciones neuronales cumple un papel importante en el procesamiento de información y estados conductuales durante el funcionamiento normal del cerebro. Así, como acabamos de ver, diversas formas de descargas sincrónicas se interrelacionan entre diferentes zonas del cerebro.

1.6 IMPORTANCIA DEL RECEPTOR-CANAL PARA NMDA

El receptor-canal tipo NMDA es activado por ligando (glutamato) y facilitado por voltaje, activándose a potenciales cercanos a -50 mV, o sea, alrededor del umbral de disparo de los potenciales de acción de sodio. Cuando éste se activa se genera una curva I-V no lineal con una región de CPN causada por la remoción del magnesio que bloquea el poro del canal (Nowak et al., 1984). Estos canales, entonces, enlazan la acción de las conductancias activadas sólo por ligando de las sinapsis rápidas (GABA_A y glutamato tipo AMPA) con la acción de las conductancias intrínsecas activadas sólo por voltaje, entrantes (sodio y calcio) o salientes (potasio). Por lo tanto, son la interfase entre la tradicional suma espacio-temporal de las entradas sinápticas con las propiedades intrínsecas de las neuronas y, por lo tanto, están relacionados con el procesamiento (integración, amplificación, depresión) de estas entradas (Collingridge et al., 1988; Nicoll et al., 1992). Se sabe que estos canales están relacionados con la amplificación de los potenciales sinápticos (Collingridge et al., 1988; Nicoll et al., 1992).

Los canales, NMDA al ser dependientes de voltaje, necesitan de una cierta cantidad de entradas sinápticas sincrónicas y convergentes para ser activados. Esto es: son “detectores de entradas coincidentes” (“*coincidence detectors*”). Así, si se dan 2 estímulos sub-umbrales con un intervalo de 50 milisegundos se puede generar un potencial en meseta que no puede ser inducido por uno solo de dichos estímulos (Vergara et al., 2003). En consecuencia, el resultado de estos dos estímulos no es la suma algebraica de las dos entradas (Vergara et al., 2003; Galárraga et al., 1997; Cepeda et al., 1998; Larkum et al., 2001; Acopian y Walsh, 2002). Una vez activado, el canal NMDA activa a su vez corrientes entrantes persistentes (Flatman et al., 1983; Wallend y Grillner, 1987; Hochman et al., 1994; Kim y Chandler, 1995; Guertin y Hounsgaard, 1998), lo que da las mesetas.

La activación del canal NMDA produce efectos excitadores a través del sistema nervioso central. Sin embargo esta excitación varía en distintas regiones del cerebro.

Varios estudios han demostrado en tejido aislado de neocorteza que sus neuronas son capaces de generar diferentes tipos de oscilaciones (Burns y Webb, 1979; Flint y Connors, 1996; Silva et al., 1991). Una de las maneras de generar actividad sincrónica en la neocorteza es bajar la concentración extracelular de Mg^{2+} para desbloquear los receptores a glutamato del tipo NMDA. Esto resulta en la aparición de oscilaciones de 4 a 12 Hz. Se ha visto que de esta manera se originan oscilaciones en neuronas de la capa 5 de la corteza somatosensorial (Flint y Connors, 1996; Silva et al., 1991).

Las corrientes que atraviesan el canal NMDA contribuyen como corrientes excitadores en estas neuronas desde la primera semana de vida (Kim et al., 1995a). En la neocorteza de gato "in vitro", la respuesta inicial a la aplicación de NMDA es una despolarización prolongada con disparos repetitivos estables seguidos por despolarizaciones rítmicas con ráfagas de potenciales de acción (Flatman et al., 1986). Al contrario en el núcleo caudado de gato "in vivo", la aplicación iontoforética de NMDA induce despolarizaciones en meseta con una ráfaga rápida inicial de potenciales de acción seguido de la inactivación de las espigas de Na^+ (Herrling et al., 1983).

Por ejemplo, se ha visto que en neuronas piramidales de la capa V, y en neuronas piramidales de la amígdala, el NMDA por sí mismo es capaz de producir espigas de calcio todo o nada en las dendritas (Schiller et al., 1997; Calton et al., 2000). En las neuronas dopaminérgicas el NMDA cambia el modo de disparo de regular, con espigas simples, al de ráfagas rítmicas (Johnson et al., 1992), este comportamiento no es bloqueado por la adición de CNQX en la superfusión. Además, el TTX solo bloqueó el disparo sobre los potenciales en meseta pero no el tamaño y la duración de estos (Johnson et al., 1992).

En motoneuronas de tortuga y lamprea el NMDA induce oscilaciones biestables (Guertin y Hounsgaard, 1998; Hochman et al., 1994; Wallén y Grillner, 1987). Bajo estas condiciones, el disparo rítmico en estas motoneuronas es producido por una entrada secuencial en turnos de sinapsis excitadoras e inhibitoras desde la red premotora amplificadas por conductancias intrínsecas de las motoneuronas postsinápticas (Guertin y Hounsgaard, 1998; Hochman et al., 1994; Wallén y Grillner, 1987).

El NMDA induce respuestas excitadoras en la neocorteza de humanos en desarrollo y en neuronas del núcleo caudado, estos efectos son anulados por el antagonista del canal AP5. Sin embargo, los efectos del NMDA en la neocorteza y en el núcleo caudado fueron diferentes.

En la neocorteza el NMDA induce una despolarización sostenida acompañada de disparos repetitivos. En el núcleo caudado, el NMDA induce despolarizaciones en meseta de ritmo lento. En el núcleo caudado, la forma compleja de las despolarizaciones y las propiedades oscilatorias inducidas por NMDA podrían reflejar efectos mediados por la activación de conductancias mediadas por canales de Ca^{2+} . La ráfaga inicial de potenciales de acción rápidos puede estar compuesta por espigas rápidas de Na^+ , al tiempo que las ondas lentas y de baja amplitud parecen ser dependientes de calcio. La posthiperpolarización que sigue a la meseta inducida por NMDA puede estar generada por la apertura de canales de K^+ dependientes de la entrada de Ca^{2+} .

En neuronas espinosas medianas del estriado el NMDA produce una zona de CPN en la curva I-V. (Vergara et al., 2003). Este último punto es un requerimiento para que una neurona pueda mostrar potenciales de membrana biestables y potenciales en meseta (Schwindt y Crill, 1977; 1980; Kiehn, 1991; Hsiao et al., 1998; Lee y Heckman, 1999b; Both et al., 1997; Carlin et al., 2000). Una vez activada la corriente NMDA se produce la despolarización necesaria para activar conductancias intrínsecas (Galarraga et al., 1997; Cepeda et al., 1998; Larkum et al., 2001; Acopian y Walsh, 2002).

En resumen, en muchos tipos celulares los potenciales en meseta y las transiciones del potencial de membrana requieren la activación de canales a NMDA y muchos investigadores han utilizado NMDA para inducirlo o facilitararlo (Flatman et al., 1983; Wallend y Grillner, 1987; Hochman et al., 1994; Kim y Chandler, 1995; Guertin y Hounsgaard, 1998).

1.7 IMPORTANCIA DE LA CORRIENTE DE CALCIO

Los canales de calcio de tipo “L” se encuentran dentro de la familia de canales de calcio dependientes de voltaje. El poro esta formado por la subunidad $\alpha 1$, la cual puede ser de diferentes subtipos ($\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ y $\alpha 1F$). La subunidad $\alpha 1$ esta asociada con cuatro subunidades accesorias ($\alpha 2$, β , γ , δ) (Ertel et al., 2000). En neuronas del sistema nervioso central se expresan preferentemente dos tipos de subunidad $\alpha 1$, la “C” y la “D” (Chin et al., 1992). Los canales que contienen estas subunidades se conocen como Cav 1.2 y Cav 1.3 respectivamente (Ertel et al., 2000). Farmacológicamente los canales de calcio de tipo “L” se diferencian de los demás canales de calcio por ser sensibles a las dihidropiridinas. El canal de calcio de tipo “L” tipo Cav 1.2 es diez veces mas sensible a dihidropiridinas que el Cav 1.3 (Koschac et al., 2001). La cinética de los canales de calcio de tipo “L” registrada en neuronas disociadas es relativamente lenta. La corriente macroscópica de tipo “L” necesita mas de 7 ms para alcanzar el 90% de su valor máximo (Mermelstein et al., 2000). Estos canales se distinguen por su poca inactivación. Esta propiedad los hace buenos candidatos para generar corrientes entrantes persistentes.

Los canales de calcio de tipo “L” son conocidos como canales activados a alto voltaje, cercanos a -20 mV (Hille B, 1992). Sin embargo es de reciente conocimiento que los canales de

calcio de tipo "L" formados con la subunidad α 1D (cav 1.3) se activan a potenciales mas negativos (cercano a los -50/-60 mV).

Así, los canales de calcio de la clase Cav 1.3 pueden estar mediando el bajo umbral de las mesetas en neuronas que generan ritmos (Fisher y Bourque, 1995). La expresión de estos canales en ovocitos de *Xenopus* muestra una corriente persistente o de inactivación lenta que se activa a -50 mV (Williams et al., 1992). Estos canales se localizan en el soma y/o las dendritas de varios tipos neuronales (Westenbroek et al., 1998). Parecen estar mediando la generación y el mantenimiento de los potenciales en meseta, la biestabilidad y las ráfagas rítmicas (Conway et al., 1988; Fisher y Bourque, 1995; Jiang et al., 1999; Schwindt y Crill, 1977). Modelos de biestabilidad en neuronas apoyan la idea de que basta que estos canales se encuentren en una de las dendritas de la neurona para que se generen potenciales en meseta, biestabilidad y oscilaciones rítmicas (Booth et al., 1997).

Las motoneuronas e interneuronas de la médula espinal expresan tanto canales de calcio de tipo "L" del tipo Cav 1.2 como de tipo Cav 1.3 (Carlin et al., 2000; Westenbroek et al., 1998). Dos características generales de los potenciales en meseta de la médula espinal están mediadas con relativa importancia por alguno de estos dos subtipos de canales. En primer lugar, en éstas neuronas los potenciales en meseta son sensibles a dihidropiridinas y fueron activados por despolarizaciones moderadas del potencial de membrana (Housgaard y Mintz, 1988; Russo y Housgaard, 1994; Russo y Housgaard, 1996), sugiriendo que estos potenciales en meseta fueron generados por canales de calcio de tipo "L" de bajo umbral (Russo y Housgaard, 1996). En segundo lugar, como originalmente reportaron Housgaard y Mintz (1988), la selectividad de estos canales a las dihidropiridinas es alta mientras que la sensibilidad es relativamente baja. Estas observaciones han sido confirmadas por diferentes estudios en mamíferos (Carlin et al., 2000; Morrisset y Nagy, 1996). La idea de que las corrientes entrantes persistentes y los

potenciales en meseta son generados por los Cav 1.3 es apoyada también por la diferente ubicación inmunohistoquímica de los canales tipo "L" con subunidades $\alpha 1D$ y $\alpha 1C$ en las motoneuronas. Los canales de tipo "L" en estas neuronas expresan la subunidad tipo $\alpha 1C$ en el cuerpo celular y en las dendritas proximales y los canales que expresan la subunidad $\alpha 1D$ se encuentra principalmente en las dendritas distales. Esto se ha visto tanto en el ratón (Carlin et al, 2000) como en la tortuga (Simon et al., resultados no publicados). Esto concuerda con estudios que muestran que los potenciales en meseta son provocados por despolarizaciones selectivas en las dendritas distales (Hounsgaard y Kiehn, 1988).

La contribución dependiente de voltaje de los canales de calcio de tipo "L" en la respuesta posináptica puede verse en registros de interneuronas que generan mesetas en el cuerno dorsal (Russo y Hounsgaard, 1994; Russo y Hounsgaard, 1996). En estas neuronas, un estímulo simple aplicado en la raíz dorsal segmental ipsilateral provoca una ráfaga de larga duración. Esta respuesta fue reducida en vigor y duración cuando se estimuló a potenciales de membrana más hiperpolarizados o después de la aplicación de nifedipina. Los potenciales en meseta mediados por canales de calcio pueden formar parte del mecanismo del comportamiento biestable en las motoneuronas de la medula espinal (Hounsgaard y Mintz, 1988). Debido a su lenta cinética y tiempo de inactivación, los canales de calcio de tipo "L" generan un estado de corrientes entrantes persistentes que son capaces de mantener despolarizada la dendrita por un largo tiempo. En las neuronas de la médula espinal que expresan el canal de calcio de tipo "L", los potenciales en meseta inducidos por un pulso rectangular de corriente pueden durar segundos después del estímulo. Estos pueden ser terminados con un estímulo hiperpolarizante en la neurona postsináptica. El umbral de activación de los potenciales en meseta puede ser menor que el umbral de disparo de un potencial de acción y sin embargo, pueden contribuir a una

despolarización que esté por encima del umbral de disparo de la célula. De esta forma, la apertura de canales de calcio de tipo “L” en la postsinapsis puede generar ráfagas de potenciales de acción.

La aceleración tardía en la frecuencia de disparo durante despolarizaciones de inactivación lenta y la histéresis del disparo durante rampas despolarizantes fue debido a la activación lenta de los canales involucrados en las corrientes entrantes persistentes. Análisis más detallados sobre la generación de potenciales en meseta en las motoneuronas del cuerno dorsal revelan que hay una facilitación lenta de los canales de calcio de tipo “L” inducida por la despolarización del potencial de membrana (Russo y Hounsgaard, 1994; Russo y Hounsgaard, 1996). En estos experimentos, esta facilitación, fue observada por un lado en respuesta a estímulos repetitivos de las aferentes sinápticas primarias. Esta facilitación también se vió en respuesta a pulsos repetidos de corriente despolarizante inyectados a través del electrodo de registro. Ambos tipos de facilitación fueron dependientes de voltaje y sensibles a dihidropiridinas implicando a los canales de calcio de tipo “L”. Por esta razón se cree que este aumento en la excitabilidad de estas neuronas en respuesta a estímulos repetidos se debe a una facilitación sobre los canales de calcio de tipo “L” (Russo y Hounsgaard, 1994).

En vertebrados adultos terrestres, mamíferos y no mamíferos los canales de calcio de tipo “L” se expresan en un tipo particular de células de la red espinal sensorimotora. Ellos proveen diferentes cambios no lineales entre la entrada sináptica y la salida axonal. Varias características importantes de este canal median la función motora de la medula. La cinética inusualmente lenta de estos canales se adapta bien para proveer el manejo de los modos de disparo que regulan la actividad del músculo durante la postura y la locomoción. El comportamiento motor es el reflejo de la actividad conjunta de cientos de músculos. La contribución relativa de cada músculo, en particular para diferentes comportamientos motores, varía de cero a una total participación. La regulación sináptica metabotrópica de los canales de calcio de tipo “L” (Delgado-Lezama et al.,

1997) provee el mecanismo para cambiar la excitabilidad de las motoneuronas. De esta manera el orden de reclutamiento entre los módulos funcionales de motoneuronas pueden ser ajustados para un máximo funcionamiento relativo en un acto motor particular.

En varios tipos de neuronas los potenciales en meseta y el “up state” disparado por NMDA dependen de la entrada de calcio a través de canales de tipo “L” (Flatman et al., 1983; Schwindt y Crill, 1997; Guertin y Hounsgaard, 1998; Seamans et al., 1997; Russo y Hounsgaard, 1999; Lo y Mize, 2000; Reyes, 2001). Esta situación es similar en las neuronas espinosas medianas ya que hay interacción entre el receptor canal NMDA y las corrientes de calcio de tipo “L” (Galarraga et al., 1997; Cepeda et al., 1998; 2001; Akopian y Walsh, 2002). En motoneuronas del núcleo trigémino de cobayo la serotonina indujo una zona de CPN y subsecuentes oscilaciones en el potencial de membrana que fueron anulados por la presencia de dihidropiridinas en el baño de superfusión (Hsiao et al., 1998). Las oscilaciones vistas en motoneuronas de médula espinal de tortuga fueron inhibidas por tres diferentes tipos de antagonistas con tres lugares de unión distintos en la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio de tipo “L” (Hockerman et al., 1997) mostrando una correlación cruzada con el complejo del receptor canal a NMDA (Filloux et al., 1994). Los canales de calcio de tipo “L” contribuyen a otras propiedades inducidas por NMDA en otros sistemas: convulsiones (Palmer et al., 1993; Weiss et al., 1990), LTP (Huber et al., 1995) y producción de óxido nítrico (Rodríguez-Alvarez et al., 1997).

Así, una vez que la activación del canal NMDA dispara el potencial en meseta, este es mantenido por la entrada de calcio a través de canales tipo “L” (Flatman et al., 1983; Schwindt y Crill, 1997; Guertin y Hounsgaard, 1998; Seamans et al., 1997; Russo y Hounsgaard, 1999; Lo y Mize, 2000; Reyes, 2001; Galarraga et al., 1997; Cepeda et al., 1998; 2001; Akopian y Walsh, 2002; Hsiao et al., 1998).

Resumiendo, podemos decir que la llegada de un EPSP y la sucesiva activación de los receptores a NMDA es solo el primer paso para disparar potenciales en meseta, los cuales son producidos al menos por corrientes de calcio de tipo “L”. En muchos tipos celulares la activación del canal NMDA induce la activación de los canales de calcio tipo “L”. Esta relación entre estos dos canales constituye la base de la no linealidad y la razón por la cual la administración de NMDA parece sustituir a un estímulo de fuerza mayor.

1.8 NEURONAS ESTRIATALES DE PROYECCIÓN

Se han registrado transiciones bi-estables del potencial de membrana en neuronas espinosas medianas de proyección del neostriado in vivo (Wilson, 1993; Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997; Plenz y Kitai, 1998; Wickens y Wilson, 1998; West y Grace, 2002), y en cultivos organotípicos (Plenz y Kitai, 1998). Las transiciones del potencial de membrana encontrado en las NEM del neostriado han sido más relacionadas a una entrada sincronizada de entradas glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral que con el efecto depolarizante de conductancias entrantes intrínsecas sostenidas. Probablemente por que el uso de bloqueadores de estos canales “in vivo” no alteran este comportamiento (Stern et al., 1998).

Sin embargo, se sabe que las neuronas neostriatales de proyección son capaces de generar potenciales en meseta después de la entrada de una señal sináptica simple (Malliani y Púrpura, 1967; Wilson et al., 1983; Bargas et al., 1991) y es conocido que corrientes de calcio persistentes son capaces de mantener potenciales en meseta en presencia de QX314 en el medio intracelular (Bargas et al., 1991).

En relación con estos resultados, estudios “in vitro” muestran que las neuronas espinosas del neostriado son capaces de generar potenciales en meseta por la activación de los canales de

calcio de tipo “L” (Galárraga et al., 1997; Hernández-lopez et al., 1997; Cepeda et al., 1998; Akopian y Walsh, 2002). Además, el NMDA es capaz de producir oscilaciones intrínsecas del potencial de membrana cuando este se mantiene despolarizado con un pulso de corriente (Cherubini et al., 1998). Es sabido que las neuronas espinosas del neocóstriado reciben la mayoría de las entradas sinápticas en las espinas dendríticas (Wilson, 1995). Además, se sabe que estas células presentan canales de calcio de tipo “L” (Bargas et al., 1994) y se ha visto que presentan señales dendríticas de calcio durante el “up state” (Kerr y Plenz, 2002).

Las neuronas espinosas medianas expresan RNAm para el canal de calcio de tipo “L” de la clase “D”. Estos se abren a niveles subumbrales cercanos a los -50mV (Bargas et al., 1994; Song y Surmeier, 1996; resultados no publicados). En primates, los registros extracelulares en el cóstriado muestran disparo sostenido con o sin ritmo (Merchant et al., 1997; Kitano et al., 2002) y de manera similar a lo visto en ratas, si se estimulan ortodrómicamente desde corteza cerebral, las neuronas estriatales del primate pueden generar potenciales en meseta (Nambu et al., 2002). Estas neuronas también poseen las herramientas para sincronizar poblaciones neuronales, pues se conectan entre sí mediante sinapsis gabaérgicas, que a nivel de reposo, producen despolarización y a nivel umbral, limitan la despolarización y el disparo (Kita, 1996; Plenz and Aertsen, 1996). Por último, en las neuronas espinosas medianas la presencia de NMDA produce una zona de CPN en su curva I-V (Fig. 5). Sin embargo es necesario realizar investigaciones profundas para evaluar el nivel de la relación entre las entradas excitadoras provenientes de corteza y las corrientes intrínsecas de las neuronas espinosas medianas ya que la función del microcircuito estriatal es básica para entender la función motora. Además, el neocóstriado es el principal blanco de entradas dopaminérgicas, colinérgicas y otros moduladores cuyos ligandos agonistas o antagonistas son usados para el tratamiento de diversos desórdenes psicomotores (Foley y

Riederer, 2000; Pollack, 2001). Es por lo tanto fundamental estudiar el rol de estos moduladores en la dinámica de la función input-ouput de las neuronas del neocórtex.

En analogía con lo encontrado en las motoneuronas (el estriado es parte de los circuitos motores), el correlato de estos disparos sostenidos podría ser el movimiento del animal (Merchant et al., 1997; Kitano et al., 2002). Entonces, ¿acaso estamos ante la posibilidad de activar programas, o parte de programas motores, “in vitro”? Programas que han sido almacenados previamente en las redes neuronales del tejido cerebral. Esto es, el comando cortical simplemente “llama del archivo” una memoria de procedimiento o programa motor (*retrieval*). Por lo tanto, quizá estemos en los inicios del desciframiento de estos programas así como de averiguar las bases iónicas de sus mecanismos. Es por lo tanto fundamental estudiar el rol de los moduladores de las conductas y los programas motores, e.g., dopamina, acetil-colina, serotonina, catecolaminas, péptidos, en este tipo de actividad bioeléctrica compleja (Foley y Riederer, 2000; Pollack, 2001). La biofísica de los últimos años nos ha preparado para comenzar a atacar los fundamentos de las llamadas “propiedades emergentes” (dinámica no-lineal) de las redes neuronales.

En las motoneuronas espinales es fácil entender el significado funcional de las ráfagas rítmicas: marcha, rascado, masticación y programas motores estereotipados (Pearson y Gordon, 2000). ¿Pero cuál es su significado en un núcleo telencefálico alejado de los músculos? En primer lugar, el neocórtex forma parte de los ganglios basales y estos núcleos, se sabe desde hace tiempo, forman parte de los circuitos motores (Prescott et al., 2003). Regulan las conductas motoras voluntarias y el paso de unas a otras (Redgrave et al., 1999). Además, guardan las llamadas “memorias de procedimientos” (“procedural memories”) (Llinás, 2001). Esto es, nuestros aprendizajes motores tales como montar bicicleta, patinar, realizar cirugías o tocar el piano, se guardan en forma de programas en redes neuronales situadas en las cortezas pre-

motoras y los ganglios basales (Beiser y Houk, 1998). Una vez aprendidos mediante múltiples repeticiones y ensayos, estos programas entran a formar parte de la memoria de largo plazo y no se olvidan: son “patrones fijos de acción motora” (“fixed action patterns”) (Llinás, 2001; Bargad y Bergman, 2001) o más simplemente “programas motores”. Podemos montar bicicleta a pesar de no haberlo hecho durante años. Entonces, es lógico hipotetizar que las ráfagas bi-estables registradas en estos núcleos sean el correlato neuronal de los programas motores almacenados en ellos.

¿Pero podremos registrar ráfagas bi-estables en un pedazo de tejido aislado, tal como sucede en la médula espinal? Si el comportamiento bi-estable se pudiera registrar “in vitro” en cualquier zona del cerebro, podría estar sujeto al análisis farmacológico y biofísico, tal como sucede en la médula espinal.

Tomando en cuenta los antecedentes presentados anteriormente nosotros pensamos que es factible esperar que se pueda inducir un comportamiento biestable de estas neuronas, en la rebanada, utilizando pequeñas concentraciones (5-20 μ M) de NMDA para sustituir una entrada cortical de fuerza mayor, similar a la entrada glutamatérgica que llega “in vivo” desde la corteza. Una vez inducido este comportamiento “in vitro”, podremos estudiar el papel que ejerce el receptor canal NMDA, el canal de calcio tipo “L”, la entrada sináptica gabaérgica, y el efecto de diferentes neuromoduladores sobre el comportamiento biestable del potencial de membrana en las NEM. Por ejemplo podremos estudiar el efecto modulador que ejerce la dopamina a través de sus receptores D1 y D2 sobre este comportamiento.

Capítulo 2

EL PROBLEMA

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como vimos en el capítulo anterior se han registrado transiciones bi-estables del potencial de membrana en NEM de proyección del NE in vivo (Wilson, 1993; Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997; Plenz y Kitai, 1998; Wickens y Wilson, 1998; West y Grace, 2002), y en cultivos organotípicos (Plenz y Kitai, 1998). Sin embargo este comportamiento no ha podido ser inducido en una rebanada de neoestriado. Debido a ésto ha sido difícil estudiar las corrientes sinápticas e intrínsecas así como los moduladores que participan en estas oscilaciones. Es por esto que sería importante lograr inducir este comportamiento en una rebanada de estriado para poder así estudiar con mayor facilidad qué corrientes están implicadas y de qué manera es modulado el comportamiento biestable del potencial de membrana en las NEM del NE.

2.2 PREGUNTAS A RESPONDER:

- ¿Se pueden inducir oscilaciones biestables del potencial de membrana y potenciales en meseta en las neuronas espinosas medianas utilizando concentraciones micromolares de NMDA en el baño de superfusión?
- ¿Están implicados los canales de calcio de tipo “L” en este comportamiento?
- ¿Qué tan importante es la entrada sináptica excitadora proveniente de la corteza cerebral para inducir y mantener estas oscilaciones?
- ¿Son estas oscilaciones moduladas por dopamina?

Capítulo 3

HIPÓTESIS

- La presencia de concentraciones micromolares de NMDA en el baño de superfusión apoyado con una estimulación cortical en forma de pequeños trenes es suficiente para inducir oscilaciones biestables y potenciales en meseta en las NEM del NE.
- Tanto las oscilaciones del potencial de membrana como los potenciales en meseta dependen de apertura de los receptores canal tipo NMDA y de la entrada de calcio a través de los canales de calcio de tipo “L”.
- La liberación gabaérgica proveniente de interneuronas y colaterales de otras NEM disminuye las oscilaciones del potencial de membrana de las NEM.
- Las oscilaciones del potencial de membrana y los potenciales en meseta son modulados negativamente por la activación de receptores dopaminérgicos de la familia D2.

Capítulo 4

METODOLOGÍA

4.1 PREPARACIÓN DE LAS REBANADAS UTILIZADAS EN LOS REGISTROS.

Ratas jóvenes (18 días) de la cepa Wistar fueron anestesiadas con éter. El cerebro fue rápidamente disecado y colocado en solución salina fría (4°C) conteniendo (mM): 123 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 25 NaHCO₃ y 11 de glucosa (25°C; pH 7.4 con NaOH, 298 mili osmolas-1 con glucosa; saturado con un 95% CO₂/5% O₂). Se obtuvieron rebanadas parasagitales de neocórtex (300µM de espesor) en solución salina a 4°C utilizando el vibratomo. Las rebanadas fueron transferidas a solución salina a temperatura ambiente y se dejaron reposar durante una hora antes de ser registradas. Para registrar, cada rebanada fue transferida a una cámara de registro y superfundida con solución salina (3-6 ml min⁻¹) a temperatura ambiente.

La concentración catiónica de la solución salina favorece la aparición de oscilaciones in Vitro (Sánchez-Vives y McCormick, 2000).

4.2 REGISTRO EN CÉLULA ENTERA.

Se utilizó la técnica estándar de registros en célula entera utilizando un amplificador Axoclamp 2B. Las micro pipetas fueron estiradas utilizando vidrio de borosilicato y luego pulidas con calor (2-7 M Ω). La solución interna contiene (mM): 115 KH₂PO₄, 2 MgCl₂, 10 Hepes, 0.5 EGTA, 2 Na₂ATP y 0.2 Na₃GTP (pH 7.2, 275 mili osmolal-1). Las neuronas elegidas para ser registradas fueron las que se encontraban a 100-150 μ M de la superficie de la rebanada.

Experimentos preliminares que utilizaron inyecciones focalizadas de biocitina en el espacio extracelular de la corteza cerebral de la rebanada muestran que en condiciones similares a las condiciones de registro electrofisiológico muchas fibras corticoestriatales cruzan el cuerpo calloso en dirección al estriado. Los lugares mas comunes en donde se ubicaron los electrodos de registro y de estimulación pueden verse en el grafico de la figura 5A. La estimulación del área cortical de la sustancia blanca y la corteza sensorimotora se llevó a cabo con electrodos concéntricos bipolares (12 μ m en la punta). El estímulo fue controlado a través de una computadora de interfase con el programa Lab View (National Institute, Austin, TX, USA). Una unidad de aislamiento entre la computadora y el electrodo de estimulación fue utilizada para cambiar los parámetros de estimulación durante el experimento. Solo las neuronas con potenciales de membrana negativos (menores a -70 mV) y resistencias de entrada cercanas a 200 M Ω fueron tomadas en cuenta en este estudio. Las curvas corriente voltaje (I-V) se realizaron con comandos de voltaje en forma de pasos y rampas. Los potenciales sinápticos y las respuestas ortodrómicas fueron registradas con la solución salina control y con NMDA (5-25 μ M) en el baño de superfusión. Todos los registros fueron filtrados a 1-3 KHz y digitalizados con un digitalizador Instrutech (Instrutech Corp., Long Island, NY, USA) y un AT-MIO-16E10

(National Institute) con un DAQ board (NI-DAQ) (National Institute) en la PC. El digitalizador Instrutech fue conectado a una grabadora de video para almacenar los registros obtenidos en cada experimento. La NI-DAQ board fue utilizada para bajar los datos directamente a la computadora.

Los datos digitalizados fueron importados para ser analizados y graficados utilizando un software comercial (Igor-Pro, Wavematrix, Lake Oswego, OR, USA). Se utilizaron procedimientos estadísticos no paramétricos de distribución libre (Systat, SPSS, Chicago, IL, USA) fueron utilizados para obtener la significancia de los diferentes grupos de medidas.

Las drogas utilizadas fueron: 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoline disodium salt (CNQX), D-(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5), N-methyl-D-aspartate (NMDA), nicardipine, nitrendipine, Bay K 8644, tetraethylammonium (TEA), picrotoxin and bicuculine (Sigma-Aldrich-RBI, St Louis, MO, USA).

Capítulo 5

RESULTADOS

5.1 LA ESTIMULACIÓN CORTICAL PROVOCA POTENCIALES EN MESETA Y OSCILACIONES DE VOLTAJE EN NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS.

En una rebanada parasagital (fig. 1A), la estimulación de la sustancia gris de la corteza cerebral provocó despolarizaciones de larga duración en neuronas espinosas medianas cercanas (Bargas et al. 1991). Como se muestra en la Fig. 1B, un EPSPs decae rápidamente hasta el potencial de membrana basal. El aumento en la intensidad del estímulo genera un potencial en meseta de larga duración que presenta disparo repetitivo (Fig. 1B). Los EPSPs que logran inducir potenciales en meseta fueron marginalmente mayores que aquellos cercanos al umbral. La duración de los potenciales en meseta fue de 200-800 ms en respuesta a un estímulo simple o pareado provocado en la corteza cerebral. Esto fue visto en cerca de la mitad de las neuronas registradas (Fig. 7 a).

La activación de los potenciales en meseta depende de la activación de receptores tipo no NMDA que están involucrados en la transmisión sináptica, ya que la estimulación cortical no tuvo efecto en presencia de CNQX (10 μ M, n = 25). Cuando la intensidad de la estimulación cortical fue aumentada tres veces arriba del umbral, el potencial en meseta inicial puede estar seguido de oscilaciones del potencial de membrana (Fig. 1C) que pueden continuar por varios segundos sin necesidad de otro estímulo. Algunas de éstas oscilaciones presentan disparo repetitivo. Como se muestra abajo, éste tipo de comportamiento fue más fácil de inducir con un

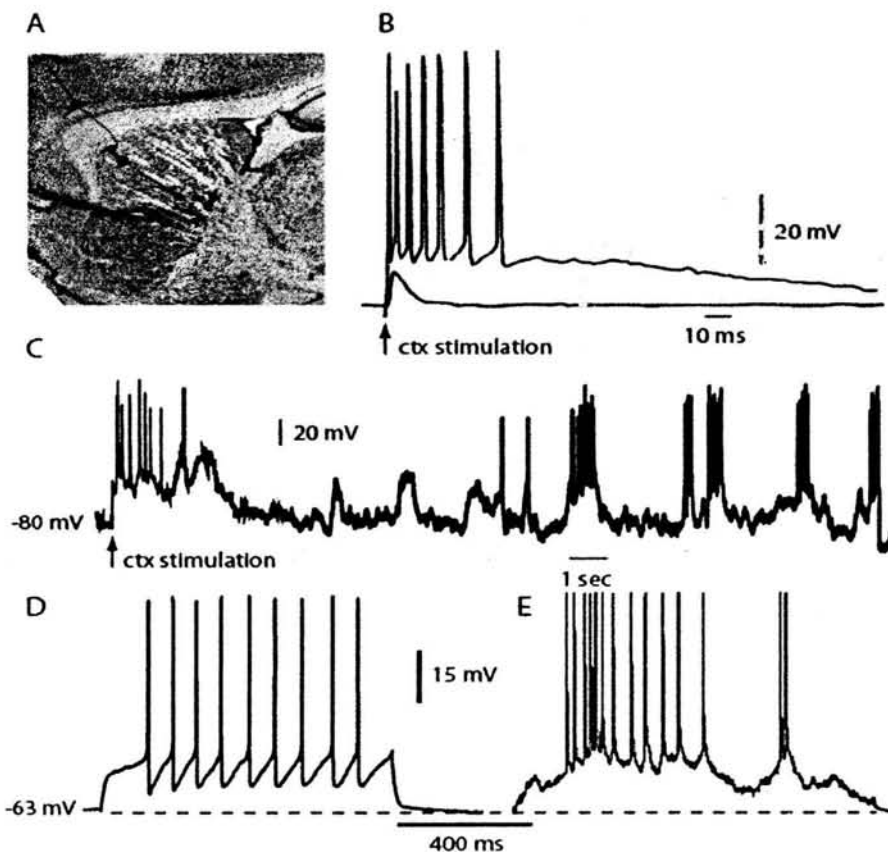
tren de estímulos. (Fig. 4B y 5C) o un par de estímulos supra-umbrales (Fig. 2 y 3). Las células piramidales de la corteza sensorimotora pueden responder también con una secuencia de oscilaciones de voltaje en respuesta a un tren de estímulos (ver Vergara et al. 2003, Fig. 1 D, 30 Hz para 500 ms, las deflexiones hacia arriba señalados con una flecha son los artefactos de estimulación). A diferencia de el disparo tónico visto en neuronas espinosas medianas en respuesta a inyecciones de corriente intracelulares en el soma (Fig. 1 E), el disparo durante las transiciones despolarizantes, o up-states, fueron de naturaleza irregular (Fig. 1E; cf. Cossart et al. 2003). Por lo que sabemos, éste es el primer reporte que muestra que oscilaciones del potencial de membrana pueden ser provocadas en una preparación de rebanada corticoestriatal. La activación sináptica de la corteza genera potenciales en meseta en la mitad de las neuronas espinosas medianas registradas ($n = 40/80$), y cerca del 10 % de las células que mostraron potenciales en meseta mostraron oscilaciones espontáneas del potencial de membrana. Además, las oscilaciones de voltaje pueden ser registradas en algunas células en ausencia de estímulo (e.g. Fig. 5). La aparición de oscilaciones en respuesta a estimulación cortical sugiere que este tipo de respuesta es fisiológica, aunque bastante poco común en la rebanada. Algunos de los siguientes experimentos intentaron encontrar condiciones en las que se facilitara la aparición de oscilaciones de voltaje de neuronas espinosas registradas “in vitro”.

En muchas ocasiones, repeticiones lentas (0,1 Hz) de la estimulación cortical que inicialmente solo evocan un potencial en meseta, resultan en la aparición de oscilaciones de voltaje autónomas que pueden persistir por muchos minutos. Un ejemplo de esto puede verse en la Fig. 2A. En éste caso, un estímulo corticoestriatal inicial provoca un potencial en meseta con disparo repetitivo (Fig. 2A). La tercera estimulación induce no solo la respuesta inicial sino que provoca una despolarización tardía que fue sub-umbral (Fig. 2B). La sexta estimulación provoca

un potencial en meseta inicial mas prolongado con descarga y un potencial en meseta posterior también con disparos que duró cerca de un segundo. Este segundo potencial en meseta fué

Fig. 1

A, Esquema de una rebanada de cerebro mostrando las conexiones estimuladas. El electrodo de estimulación fue colocado en la materia blanca de la corteza (esquema de célula piramidal) y el electrodo de registro en el neocriado dorsal (esquema de célula neocriatal). B, respuesta ortodrómioca de una NEM a un estímulo en corteza subumbral y supraumbral. Nótese el potencial en meseta con disparo repetitivo después de la estimulación supraumbral. C, un estímulo cortical tres veces superior al umbral de disparo ahora evoca potenciales en meseta seguido por varias oscilaciones del potencial de membrana, alguna de las cuales exhiben potenciales de acción. Este comportamiento se genera mas fácilmente con un tren de estímulos (ver figura 4b). D, disparo de una NEM luego de una inyección de corriente intracelular en el soma (estímulo de corriente no mostrado). F, disparo de una NEM durante una despolarización espontánea.

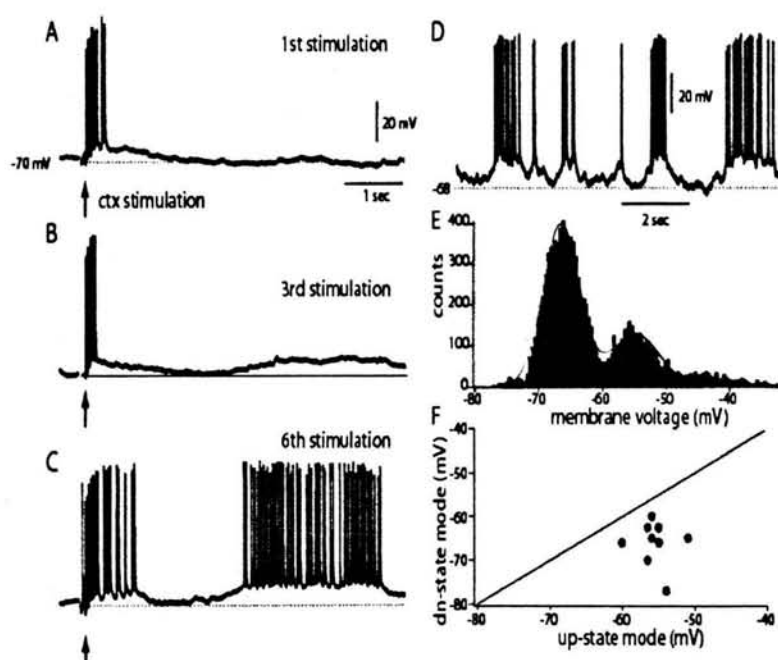


seguido por oscilaciones del potencial de membrana que, una ves iniciadas, continuaron sin necesidad de otro estímulo cortical (Fig. 2D) por varios minutos. Durante esta oscilación

aperiódica autónoma, la distribución del potencial de membrana fue claramente bimodal (Fig. 2e) (Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern et al, 1997). En este tipo de preparación “in vitro”, el valor del potencial de membrana del estado inactivo o “down state” varía considerablemente de célula a célula (-80 a -65 mV), a diferencia con lo reportado en una situación “in vivo”. Sin embargo, el estado activo o “up state”, fue cercano al umbral de disparo (-55 a -50 mV) en todas las células biestables. Un diagrama de puntos de dos modos en una muestra de neuronas ($n = 7$) se muestra en la Fig. 2F.

Aunque la estimulación sináptica induce en las NEM potenciales en meseta de larga duración (Fig. 1 y 2) que pueden ser seguidos por oscilaciones de el potencial de membrana, inyecciones de corriente despolarizantes en el soma no fueron capaces de inducir este tipo de comportamiento (Fig. 1E). Las inyecciones despolarizantes de corriente aplicadas en el soma solo pueden inducir potenciales en meseta si las neuronas son despolarizadas con el potencial de

Fig. 2

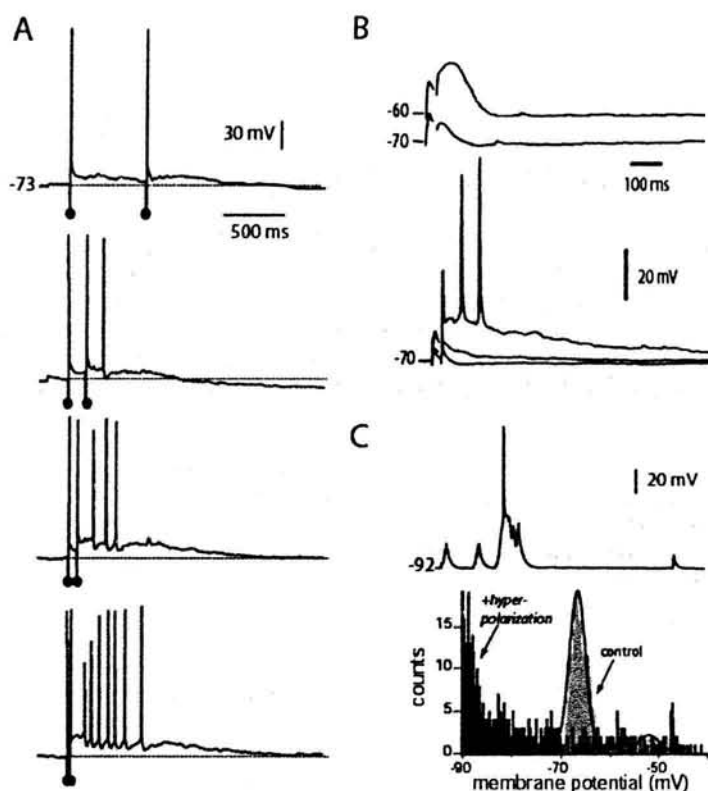


A, un par de estímulos en corteza produce un potencial en meseta similar al descrito en la Fig.1. B, la repetición del estímulo a 0.1 Hz produce una despolarización subumbral después del potencial en meseta producida por el tercer estímulo en este caso. C, continuas repeticiones (sexto estímulo) producen una despolarización supraumbral después del potencial en meseta que presenta disparos repetitivos. D, oscilaciones continuas del potencial de membrana que siguieron al último estímulo (nótese el cambio de escala) y se mantuvieron sin necesidad de otra estimulación. E, histograma de todos los puntos de valores de potencial de membrana para esta célula. Nótese la distribución gaussiana alrededor de dos valores diferentes del potencial de membrana. F, gráfica de puntos para los dos estados del potencial de membrana de un grupo de células.

mantenimiento (>-60 mV; datos no mostrados. Leer Hernández López et al. 1997, 2000). Esto es en contraste con la situación vista en otros tipos de neuronas (Hsiao et al. 1998; Lee y Heckman, 1998^a; Kiehn y Eken, 1998; Russo y Housgaard, 1999; Egorov et al. 2002). Esta observación es consistente con la proposición de que la membrana somática de las NEM no es biestable (Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern et al. 1997). Sin embargo, como la mayoría de las entradas sinápticas están localizadas en las dendritas (Wilson, 1993), es posible que sea la membrana de las dendritas y no la del soma la que exprese la maquinaria de canales iónicos capaces de inducir los potenciales en meseta y las oscilaciones vistas después de la estimulación cortical. Si este fuera el caso, la suma de entradas sinápticas deberían activar eficientemente conductancias intrínsecas entrantes en las dendritas (Larkum et al. 2001). De este modo, un par de entradas sinápticas puede ser particularmente efectiva para inducir potenciales en meseta. Concordando con esta información, un par de estímulos sub-umbrales con un corto espacio de tiempo entre uno y otro inducen potenciales en meseta cuando el espacio interestímulo es menor a 50 ms (Fig. 3A). Por otro lado, la despolarización del potencial de membrana a valores de -60 mV durante el par de estímulos, aumenta la segunda respuesta sináptica (Fig. 3B, arriba) (ver Galarraga et al. 1997; Acopian y Walsh, 2002), mientras que una hiperpolarización a -70 mV produce una depresión del pulso pareado para la misma respuesta. A -70 mV la inducción de despolarizaciones prolongadas necesita estímulos de gran intensidad (Fig.3B, abajo). Finalmente, la Fig. 3C muestra que en una oscilación del potencial de membrana que fue inducida con estimulación cortical (como en la Fig. 2D), una fuerte hiperpolarización (-90 mV) altera la generación de las oscilaciones. Sin embargo las oscilaciones continúan por un breve período de tiempo aunque su duración y amplitud fueron reducidas. La hiperpolarización del potencial de membrana hace que la distribución del potencial de membrana se desplace positivamente y elimina el segundo estado preferido y por ende la bimodalidad (Fig. 3c). Tomados en conjunto (Fig 1-3), estos experimentos

sugieren que la activación sináptica induce la apertura de canales voltaje-dependientes intrínsecos (Bargas et al. 1991; Galarraga et al. 1997; Cepeda et al. 1998; Akopian y Walsh, 2002).

Fig. 3



A, desde arriba hacia abajo el intervalo entre un par de estímulos corticales fue reducido sin cambiar la intensidad de estimulación. Nótese la despolarización prolongada con disparo repetitivo que se produce cuando el intervalo entre los estímulos es pequeño. B, se muestra la respuesta a un par de estímulos corticales supraumbrales. Ellos fueron registrados a dos potenciales de mantenimiento diferentes. Una facilitación de pulso pareado se ve a -60 mV y una depresión a -70 mV. Sin embargo si la intensidad del estímulo se incrementa se genera una despolarización prolongada con disparo repetitivo provocada a -70 mV. Estas despolarizaciones no pudieron ser inducidas con inyecciones de corriente en el soma. C, una célula que tenía oscilaciones del potencial de membrana espontáneas fue hiperpolarizada a -92 mV. Esto generó que las oscilaciones disminuyeran en tamaño y duración hasta desaparecer. Un histograma de todos los puntos revela dos picos a -70 mV y un solo pico a -92 mV:

5.2 LA ACTIVACION DEL RECEPTOR NMDA PROMUEVE POTENCIALES EN MESETA INDUCIDOS EN CORTEZA.

Estudios previos han implicado al receptor NMDA en la potenciación de respuestas sinápticas y oscilatorias en neuronas espinosas medianas, particularmente a potenciales de membrana despolarizados (Herrling et al. 1983; Cherubini et al. 1988; Galarraga et al. 1997; Cepeda et al. 1998; Acopian y Walsh, 2002). Potenciando respuestas sinápticas mediadas por el

receptor AMPA/KA, el receptor NMDA puede contribuir en la inducción de potenciales en meseta dendríticos. Si los receptores NMDA, en la región dendrítica despolarizada por una entrada sináptica, no están saturados, la adición de NMDA en el baño de superfusión puede aumentar la respuesta sináptica (Schiller y Schiller, 2001). Para explorar ésta posibilidad, nosotros examinamos la habilidad del NMDA exógeno para potenciar respuestas sinápticas cercanas al umbral. La Fig. 4A (arriba) muestra el registro de una neurona en la cual la fuerza de estimulación del par de estímulos corticales fue ajustada para que el primer EPSP fuera sub-umbral y el segundo EPSP evoque un solo disparo que decae rápidamente al potencial de membrana de reposo. Esta respuesta fue completamente abolida por el antagonista del receptor tipo AMPA (CNQX 10 μ M; n = 25. dato no mostrado). Cuando se adhirió en el baño NMDA (25 μ M) y se repitió el protocolo de estimulación, la respuesta fue más prolongada, esta respuesta fue muy parecida a la respuesta obtenida cuando se incrementa la fuerza de estimulación. Esto sugiere que el NMDA actúa potenciando solamente las respuestas que fueron lo suficientemente fuertes para provocar la remoción local del bloqueo por Mg²⁺. Este resultado sugiere que la estimulación sináptica supra-umbral puede ser capaz de activar receptores sinápticos de tipo NMDA y por este camino provocar potenciales en meseta.

El siguiente paso fue examinar el impacto del NMDA en la inducción de oscilaciones del potencial de membrana. La aplicación en el baño de NMDA (10-25 μ M) aumenta la capacidad de la estimulación cortical para inducir oscilaciones del potencial de membrana en las NEM. Un ejemplo de esto se muestra en la Fig. 4B. En ausencia de NMDA, un breve tren de estímulos subumbrales (30 Hz por 500 ms, las deflexiones hacia arriba señaladas con una flecha son artefactos de estimulación) desde la corteza evoca solo una pequeña despolarización sináptica en la neurona registrada (Fig. 4B, control). Esta estimulación fue claramente subumbral para

producir potenciales en meseta. Por otro lado, el NMDA solo ($25\mu\text{M}$) no induce oscilaciones del voltaje ni potenciales en meseta (Fig. 4B, + NMDA). Sin embargo, la misma estimulación cortical en presencia de NMDA fue suficiente para inducir oscilaciones del potencial de membrana (Fig. 4B, dos trazos continuos). Estas oscilaciones aparecen después de varios segundos de latencia pero persisten por minutos sin necesidad de otro estímulo. Resultados similares fueron obtenidos en 30 de 50 neuronas. En 5 de 50 neuronas, el NMDA induce oscilaciones del voltaje sin necesidad de un estímulo cortical. En cuatro neuronas la estimulación cortical supraumbral sin NMDA fue suficiente para provocar tanto potenciales en meseta como oscilaciones del potencial de membrana (Fig. 1C). Esto contrasta con la misma situación “in vivo” donde el NMDA solo es capaz de provocar oscilaciones del voltaje en un número mayor de casos (Herrling et al. 1983), sugiriendo que la actividad sináptica cortical hacia las NEM es mucho menor “in vitro”. En otras tres neuronas, oscilaciones del potencial de membrana espontáneas fueron vistas sin necesidad de NMDA ni estimulación cortical.

La aparición de oscilaciones en el voltaje puede ser relacionado con cambios en la relación corriente voltaje de las NEM en la dendrita cuando están presentes receptores sinápticos tipo NMDA (Schiller y Schiller, 2001). En muchas neuronas, el NMDA induce una región de conductancia de pendiente negativa y un segundo punto donde la conductancia atraviesa el cero de corriente con pendiente positiva en la relación corriente-voltaje. Esto es la marca en la membrana de la capacidad de una neurona de tener un comportamiento biestable (Booth et al. 1997; Kiehn y Eken, 1998; Schiller y Schiller, 2001; Svirskis et al. 2001). Para determinar si el NMDA puede actuar de este modo en las NEM, las neuronas fueron sujetas a fijación de voltaje y se les aplicó una rampa de dos segundos desde -80 a 0 mV en presencia y ausencia de NMDA. En la Fig. 4C podemos ver que en ausencia de NMDA la relación corriente voltaje solo muestra una pequeña zona en la cual la pendiente es negativa.

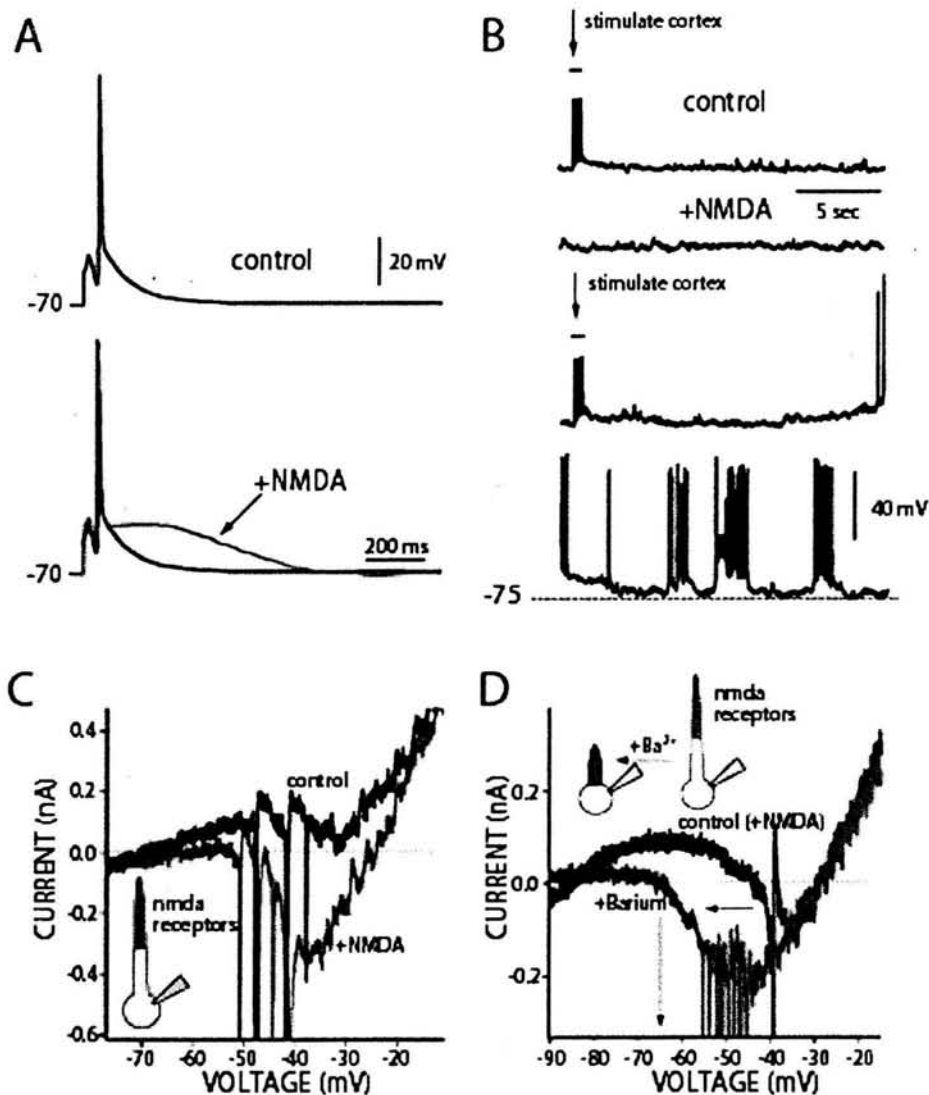


Fig. 4

A, un par de respuestas sinápticas fueron provocadas con estimulación cortical. Solo el segundo EPSP alcanzó el umbral de disparo (control). La adición de NMDA (25 μM) aumenta la duración del segundo estímulo produciendo un potencial en meseta. De esta manera el NMDA mimetiza un aumento en la intensidad del estímulo (+NMDA). B, un tren de estímulos corticales subumbrales falló para inducir oscilaciones del potencial de membrana (control). La adición de NMDA (25 μM) sin estimular en la corteza falló para inducir oscilaciones del potencial de membrana (+NMDA). Sin embargo, si se combina la estimulación cortical con la adición en el baño de NMDA se inducen oscilaciones del potencial de membrana luego de una latencia variable. C, se realizaron curvas IV con rampas de dos segundos de duración en fijación de voltaje. La respuesta control muestra que la curva presenta disparos que no fueron clampeados y que la curva no atraviesa dos veces el cero de corriente. La adición en el baño de NMDA (20 μM) facilita la aparición de una zona de conductancia de pendiente negativa que cruza el eje cero de corriente dos veces indicando biestabilidad (+NMDA). D, la reducción de la distancia electrotonica con Ba^{2+} cambia el valor de voltaje donde cruza el primer punto que atraviesa el eje cero de corriente moviendo la curva hacia la izquierda. Esto sugiere que la zona de conductancia de pendiente negativa puede ser generada en las dendritas lejanas.

(Histeresis de la curva I-V, ver Galárraga et al. 1994). Esta curva no presenta un segundo punto estable para el soma. Sin embargo, después de la administración de NMDA (10-25 μM), se pudo

observar frecuentemente la aparición de una zona de conductancia de pendiente negativa y un segundo punto con pendiente positiva que atraviesa el eje del cero de corriente (Fig. 4C + NMDA; $n = 9/10$; Schiller y Schiller, 2001). Resultados parecidos fueron obtenidos con pulsos de voltaje ($n = 5$; ver Fig. 7C). Sin embargo, la conductancia de pendiente negativa inducida por NMDA se encuentra a valores del potencial de membrana mucho más despolarizados que los que uno pudiera predecir sobre la base de los registros de fijación de corriente donde el estado activo es cercano a -50 mV (Booth et al. 1997). Una posible explicación para las diferencias entre estos dos resultados podría ser que la conductancia de pendiente negativa inducida por NMDA en estas neuronas sea de origen dendrítico; por lo tanto, ésta se generó a una distancia electrotonica remota del soma y por lo tanto del electrodo de registro. Ciertamente, la gran mayoría de sinapsis glutamatérgicas y los receptores NMDA son dendríticos en las NEM, a cientos de micras del soma (Wilson, 1993). Si esto fuera relevante, acortar la distancia electrotonica de las NEM debería traer esas regiones sinápticas cerca del soma y así reducir las diferencias (Reyes et al. 1998). Además, los canales “leak”, los principales canales de la estructura electrotonica de las NEM a potenciales de membrana despolarizados, son miembros de la familia Kir 2 sensibles a Ba^{2+} (Galárraga et al. 1994; Merlmeistein et al. 1998; Reyes et al. 1998). Concordando con esta hipótesis, la adición de Ba^{2+} ($200 \mu M$) en el baño de superfusión movió dramáticamente la zona de conductancia negativa en donde atraviesa por primera vez el eje de corriente en el cero (-22 mV, $n = 4$). En contraste, el segundo punto con pendiente positiva no fue movido significativamente con la adición de Ba^{2+} (Fig. 4D; -2 mV, $n = 4$); como uno podría predecir basado en la habilidad de los canales de K^+ activados por despolarización de limitar la despolarización y alargar la longitud electrotonica de las dendritas en estas células (Nisembaum et al. 1996; Bargas et al. 1999). Concluyendo, la activación de los receptores NMDA puede inducir cambios en la curva I-V de las NEM y esto permite que estas presenten biestabilidad.

Estos cambios ocurren probablemente en el árbol dendrítico. Pero ¿pueden esos cambios tener lugar en la actividad espontánea o en respuesta a la estimulación cortical?

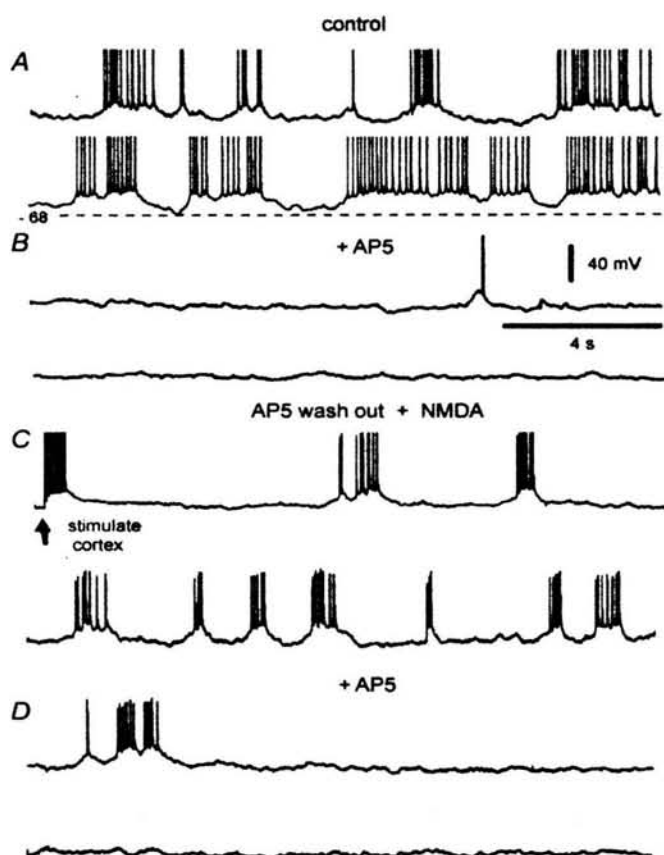


Fig 5.

A, se muestra un trazo con oscilaciones del potencial de membrana espontáneas (sin estimulación cortical ni NMDA) (control). La adición de AP5 ($50 \mu\text{M}$) en la solución salina bloquea las oscilaciones del potencial de membrana (+ AP5). C, las oscilaciones del potencial de membrana pueden ser reinducidas lavando el AP5, agregando NMDA ($10 \mu\text{M}$) y dando un tren de estímulos en la corteza (AP5 Wash-out + NMDA). D, Bajo estas condiciones el AP5 vuelve a bloquear las oscilaciones (+AP5 trazo de abajo).

Cuando el NMDA está presente en el espacio extracelular puede unirse a sus receptores los cuales necesitan una pequeña despolarización para inducir periodos sostenidos de actividad. En presencia de entradas sinápticas caóticas, se pueden generar oscilaciones de voltaje del potencial de membrana (Schiller y Schiller, 2001). La figura 5 ilustra el registro de una NEM que presentó oscilaciones espontáneas del potencial de membrana a pocos segundos de haber obtenido la configuración de whole-cell. Esto es, sin estimulación cortical ni NMDA exógeno (control). La adición del antagonista del receptor NMDA, AP5 ($50 \mu\text{M}$), en la solución salina anula las oscilaciones (Fig. 5B, + AP5), sugiriendo que esta preparación contiene glutamato endógeno

capaz de activar los receptores NMDA. Sin embargo, cuando se lavó el AP5 no se pudieron restablecer las oscilaciones. Pero si se adhiere a la solución salina NMDA (10 μ M) junto con estimulación cortical (30 Hz por 500 ms), las oscilaciones pueden ser reestablecidas (Fig. 5C). El AP5 bloquea todas las oscilaciones de voltaje en dos células que mostraron este comportamiento espontáneamente y en 8 de 10 células en las cuales las oscilaciones fueron inducidas por estimulación cortical y NMDA (10-25 μ M; Fig. 5D). En dos células, oscilaciones de corta duración pudieron ser inducidas en presencia de AP5 (Cossart et al. 2003). Estos resultados demuestran que como en muchos tipos de neuronas, los receptores NMDA son importantes para producir biestabilidad y oscilaciones de voltaje provocadas o espontáneas (Fig. 4 y 5). Estos experimentos sugieren que estas oscilaciones son un fenómeno fisiológico y que el NMDA exógeno solo los facilita; tal vez, reemplazando la pérdida de entradas sinápticas convergentes. Los receptores NMDA son importantes para la respuesta sináptica de estas neuronas (Cherubini et al. 1988). La activación de estos posiblemente ayuda a la generación de potenciales en meseta y subsecuentes oscilaciones en el voltaje (Herrling et al. 1983). Esta actividad puede ser disparada por agonistas endógenos y exógenos.

Finalmente, la adición del bloqueador de canales de K^+ , TEA (1 mM) (en presencia de NMDA 10-25 μ M) incrementa el número de neuronas en las cuales la estimulación cortical evoca oscilaciones de voltaje similares (datos no mostrados).

5.3 EL CNQX NO ALTERA LAS OSCILACIONES DE VOLTAJE UNA VEZ QUE ÉSTAS SON INDUCIDAS.

Sorpresivamente, y descartando el hecho que el antagonista del receptor AMPA (CNQX) bloquea el potencial en meseta inducido con estimulación cortical, la Fig. 6 muestra que una vez

que las oscilaciones del voltaje son inducidas, el CNQX (10 μ M) falla para terminarlos (Fig. 6B). La duración de los estados activos fue $1,1 \pm 0,11$ seg. En el control y $1,2 \pm 0,12$ en presencia de CNQX ($n = 7$; ver gráfico de cajas en la Fig. 6C). Ni la frecuencia ni el potencial de membrana en el estado activo e inactivo cambian significativamente en presencia de CNQX. Estos resultados sugieren que, en estas condiciones, la transmisión sináptica a través de los receptores tipo AMPA es necesaria para inducir el potencial en meseta inicial inducido desde la corteza, pero no necesariamente para el mantenimiento de las oscilaciones de el voltaje. Esto sugiere que otros componentes sinápticos son capaces de mantener estas oscilaciones (ej. Szabadics et al. 2001; Cossart et al. 2003; Kilb y Luhmann, 2003).

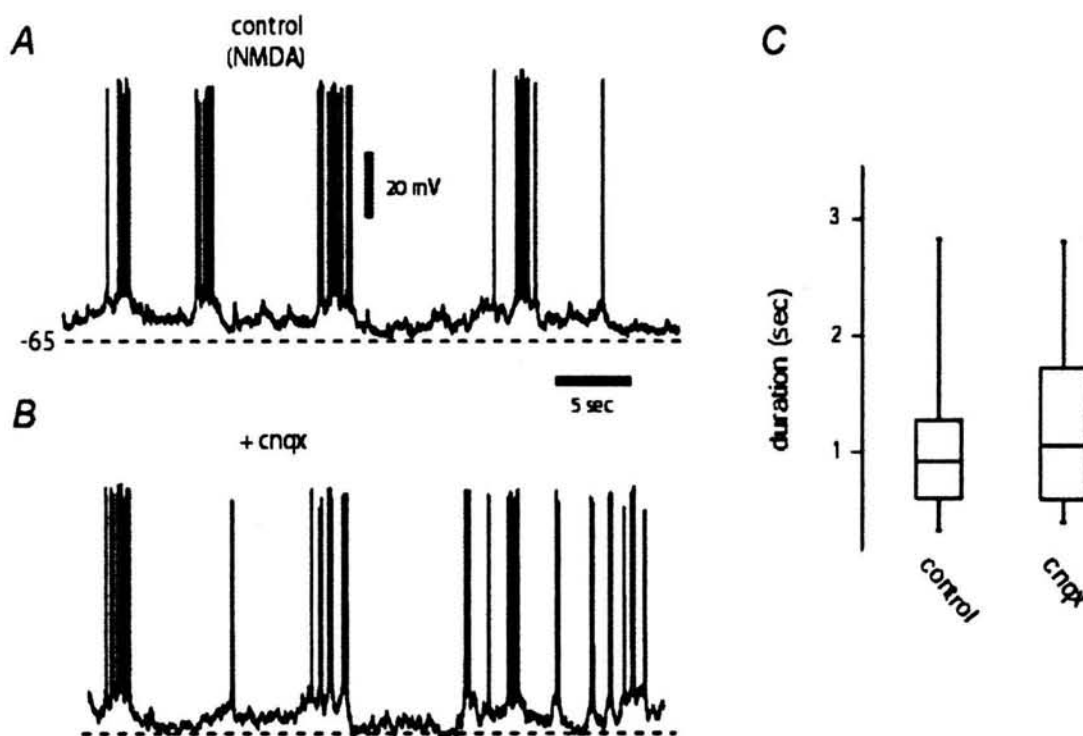


Fig. 6

A, Oscilaciones del potencial de membrana fueron inducidos con NMDA (10 μ M) y estimulación cortical. B, una vez inducidas las oscilaciones el CNQX (10 μ M) no fue capaz de cambiar ni la duración ni la frecuencia de los estados activos. C, el gráfico de cajas muestra la distribución de la duración de los estados activos para un grupo de neuronas en situación control contra CNQX ($n = 7$).

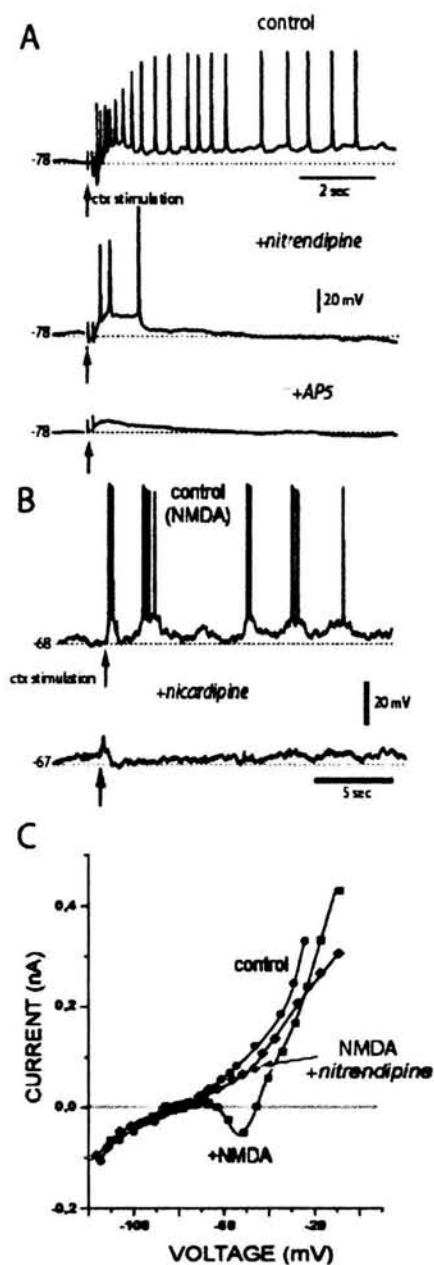


Fig. 7

A, un par de estímulos corticales supraumbrales provocan un potencial en meseta de larga duración que presenta disparo repetitivo (control). La adición en el baño de superfusión del antagonista del canal de calcio de tipo "L", nitrendipina (5 μ M), bloquea la mayor parte del potencial en meseta (+ nitrendipine). La subsecuente adición del antagonista del receptor NMDA, AP5 (50 μ M), bloquea la despolarización lenta remanente quedando solamente los componentes del EPSP (+AP5). B, oscilaciones del potencial de membrana fueron producidas con estimulación cortical mas NMDA (10 μ M) (control). La adición del antagonista de los canales de calcio de tipo "L", nicardipina (5 μ M), bloquea las oscilaciones. Nuevas estimulaciones corticales fallan para producir oscilaciones del potencial de membrana en presencia de nicardipina. C, curvas I_V superpuestas. La adición de NMDA (20 μ M) induce una zona de conductancia de pendiente negativa y biestabilidad. La subsecuente adición de nitrendipina (5 μ M) en el baño de superfusión abole la zona de conductancia de pendiente negativa inducida por NMDA.

5.4 LOS CANALES DE CALCIO DE TIPO L PROMUEVEN LA GENERACIÓN DE POTENCIALES EN MESETA.

Como mencionamos antes, en otro tipo de neuronas, la corriente que atraviesa los canales de calcio de tipo "L" es fundamental para regular el comportamiento biestable del potencial de

membrana. Trabajos previos han mostrado que los canales de calcio de tipo "L" en las NEM son esenciales para la expresión de las características tónicas de disparo, la función entrada-frecuencia y el umbral de disparo (Perez-Garci et al. 2003). Estos también son necesarios para promover la inducción de potenciales en meseta para potenciales de membrana relativamente despolarizados y generados en el soma. (-60 a -55 mV) (Hernández López et al. 1997, 2000). Finalmente, es sabido que la corriente de calcio de tipo "L" potencia la activación sináptica de los receptores NMDA en NEM (Galarraga et al. 1997; Cepeda et al. 1998; Acopian y Walsh, 2002). Pero ¿podrían las corrientes de calcio de tipo "L" jugar un papel importante en la inducción sináptica de los potenciales en meseta? ¿Participan estos de alguna manera en la inducción de oscilaciones de voltaje en respuesta a estimulación cortical? Para ayudar a resolver estas preguntas examinamos la habilidad de bloqueadores de canales de calcio de tipo "L" para suprimir los potenciales en meseta inducidos por estimulación cortical. La Fig. 7 A (arriba) muestra un potencial en meseta de larga duración inducido en una NEM por un par de pulsos supraumbrales generados por estimulación cortical (Kiehn y Eken, 1998). La aplicación del antagonista de canales de calcio de tipo "L", nitrendipina (5 μ M) (Fig. 7 A + nitrendipine), reduce el potencial en meseta en esta y otras células testadas (duración de la meseta: 750 ± 112 ms, n = 6 vs. 208 ± 98 ms, n = 4; $P < 0,01$; Mann-Whitney U test). Resultados similares fueron obtenidos con nimodipina (5 μ M, n = 3) y nicardipina (5 μ M, n = 2). La adición del antagonista del receptor NMDA, AP5 (50 μ M), en presencia de los antagonistas del canal "L" bloquea la despolarización remanente quedando como respuesta un EPSPs (Fig. 7 A + AP5).

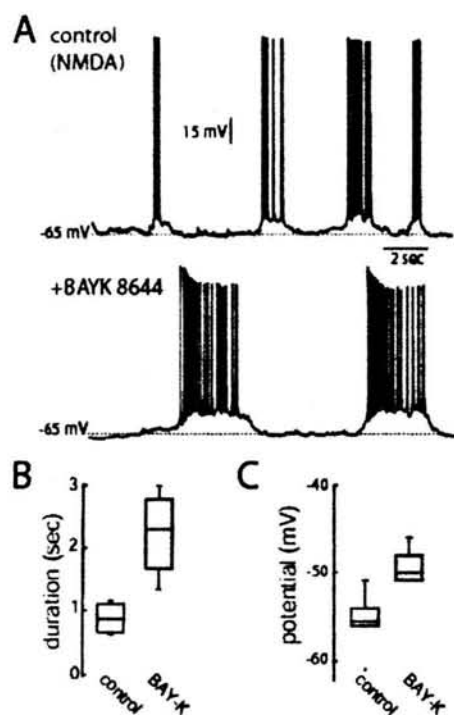


Fig. 8

A, oscilaciones del potencial de membrana fueron evocadas por estimulación cortical mas NMDA ($20 \mu\text{M}$; control). La adición de BayK 8644 ($5 \mu\text{M}$) incrementa la duración de los estados activos (+ BayK 8644 y B). C, la amplitud de los eventos fue incrementada por la adición de BayK 8644 (C).

Luego, fueron inducidas oscilaciones en el potencial de membrana con estimulación cortical y NMDA ($10 \mu\text{M}$) (Fig. 7B). En esta situación, la nicardipina ($5 \mu\text{M}$), no solo detuvo las oscilaciones sino que también previno que subsecuentes estimulaciones corticales indujeran nuevas oscilaciones (Fig. 7B). Resultados parecidos fueron obtenidos en otras cuatro neuronas. Además de esto, una curva I-V realizada con pulsos cuadrados de voltaje en el soma reveló que el bloqueador de canales de calcio de tipo "L", nitrendipina ($5 \mu\text{M}$). Elimina la zona de conductancia de pendiente negativa creada por la adición de NMDA (Fig. 7C, $n = 4$). Entonces, a pesar de ser inducida por la activación del receptor NMDA, la zona de conductancia de pendiente negativa es en parte debida a la activación de corrientes entrantes intrínsecas voltajedependientes (Hsiao et al. 1998). Estos resultados sugieren que los canales de calcio de tipo "L" trabajan juntos con los receptores NMDA para promover biestabilidad en las NEM (Galárraga et al. 1997).

Si los canales de calcio de tipo “L” están relacionados con la inducción de los potenciales en meseta, facilitando la apertura de estos, los potenciales en meseta inducidos por estimulación en corteza deberían ser de mayor tamaño. Se realizaron dos tipos de experimentos para probar esta hipótesis. Primero, EPSPs provocados con estimulación en la corteza fueron utilizados para generar potenciales en meseta en presencia de NMDA (20 μ M) y TEA (1 mM). Como era de esperar la acción del BayK 8644 (5 μ M) incremento significativamente la duración del potencial en meseta (duración del control: 750 ± 112 ms; BayK8644: 1344 ± 207 ms; n=5; $P < 0.05$; Wilcoxon t-test). Este aumento fue dependiente de la activación de los receptores NMDA ya que la adición de AP5 (50 μ M) bloquea completamente los potenciales en meseta, incluso en presencia de BayK 8644 (n=5; datos no mostrados). Posteriormente fueron analizadas las oscilaciones del potencial de membrana. La figura 8 A muestra oscilaciones del potencial de membrana inducidas por estimulación cortical en una NEM en presencia de NMDA. La aplicación en el baño de BayK 8644 (5 μ M) aumenta la duración del estado activo de 0.9 ± 0.08 segundos en el control (con NMDA) a 2.1 ± 0.2 segundos en presencia de BayK 8644 (Fig. 8b, n=6, $p < 0.03$; Wilcoxon t-test). El BayK 8644 también despolarizó significativamente el potencial del estado activo sin afectar el potencial del estado inactivo (Fig. 8c, n=6, $p < 0.05$). Estos datos en conjunto, proveen una evidencia convincente de que bajo ciertas condiciones los canales de calcio de tipo “L” trabajan en conjunto con los receptores NMDA para crear condiciones que permiten la expresión de biestabilidad en las NEM.

5.5 EL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES GABA A AUMENTA LA DURACION DE LOS ESTADOS ACTIVOS

¿Que controla la duración del estado activo? Una de las posibilidades es la activación de procesos inhibitorios mediados por GABA_A. De acuerdo con esta hipótesis, la aplicación local del antagonista del receptor GABA_A (picrotoxina) aumentó la duración de los estados activos (Fig. 9 a y b). La duración de los estados activos en el control fue de 0.9 ± 0.1 segundos mientras que en presencia de picrotoxina $10 \mu\text{M}$ o bicuculina $2 \mu\text{M}$ fue de 2.9 ± 0.7 segundos ($p < 0.03$, $n = 6$, Wilcoxon t -test) (Fig. 9). Estos resultados sugieren que la transmisión gabaérgica rápida controla la duración de los estados activos (Klausberger et al. 2003).

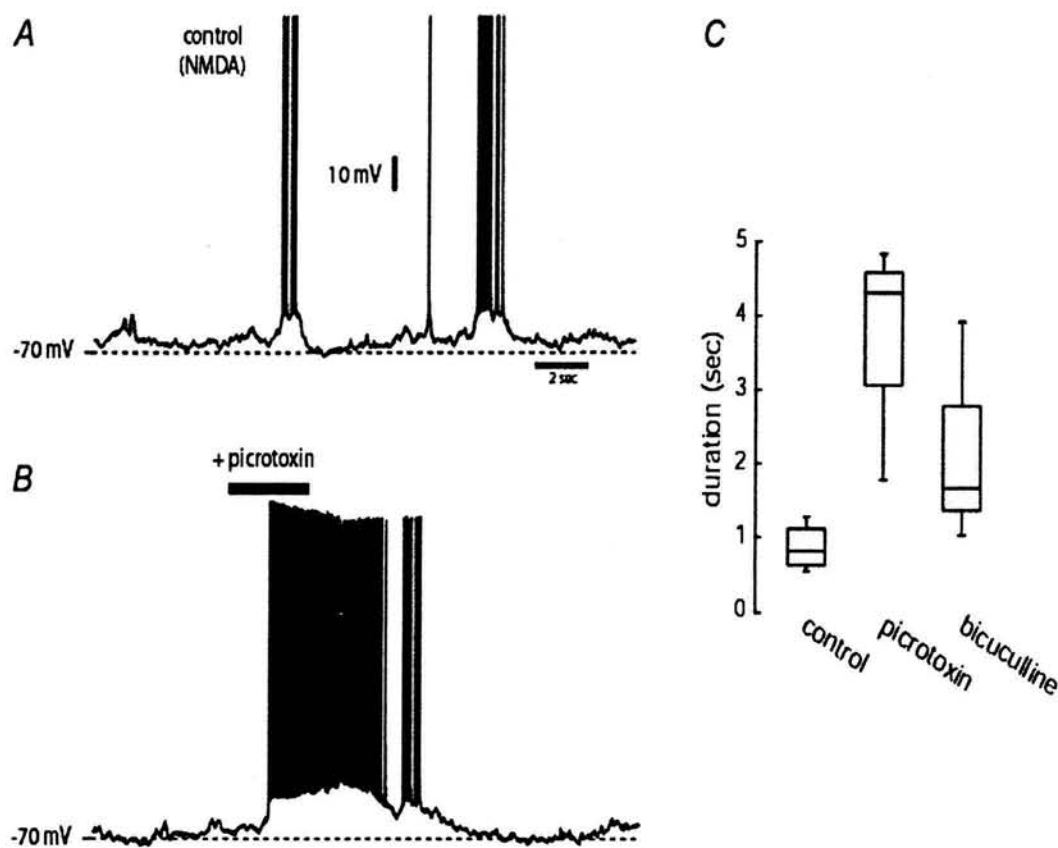


Fig. 9

A, oscilaciones del potencial de membrana fueron inducidas por estimulación cortical repetitiva mas NMDA ($10 \mu\text{M}$). B, la duración de los estados activos fue incrementada por la adición en el baño de superfusión del antagonista del receptor GABA_A (+ picrotoxin, $5 \mu\text{M}$). C, la gráfica de cajas ilustra la distribución de la duración de los estados activos antes y despues de la aplicación de picrotoxina y bicuculina ($5 \mu\text{M}$) en un grupo de neuronas ($n = 6$).

5.6 LA ADICIÓN DE TEA MÁS NMDA INDUCE EL COMPORTAMIENTO BIESTABLE ESPONTÁNEO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA SIN NECESIDAD DE ESTIMULAR EN LA CORTEZA.

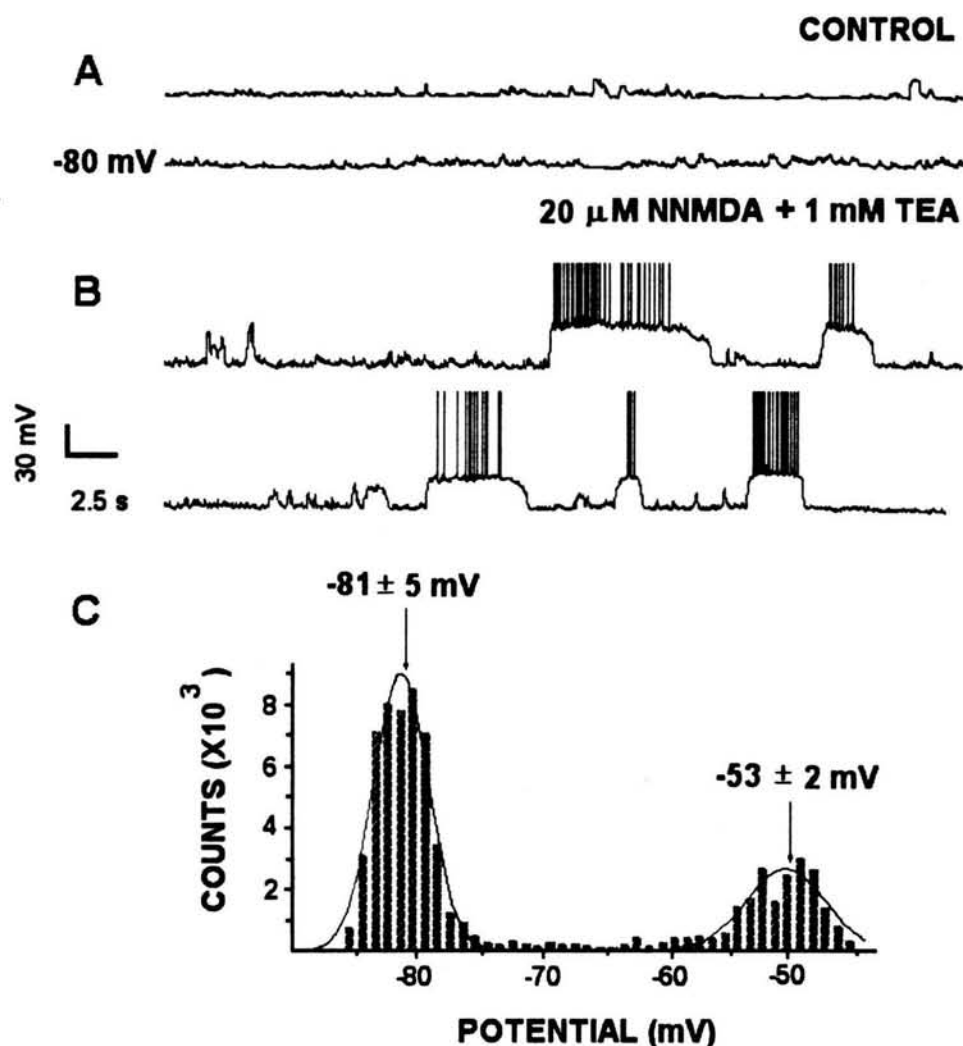
Como vimos en los resultados anteriores este comportamiento puede mimetizarse “in vitro” estimulando la corteza con un tren de estímulos repetitivos. Sin embargo, si agregamos NMDA más TEA (1-3 mM) en el baño, neuronas que en situación control se encuentran a un potencial de membrana hiperpolarizado, comienzan a oscilar de manera biestable. La figura 10 "A" muestra un registro en fijación de corriente en condición control, en donde el potencial de membrana de la célula permanece estable a -80 mV. Sin embargo, la adición de 20 μ M de NMDA y 1mM de TEA genera una oscilación del potencial de membrana entre dos valores estables (Fig. 10 B), un potencial hiperpolarizado cercano a -80 mV similar al del control y un potencial despolarizado cercano a - 50 mV que puede presentar disparo repetitivo. Es importante aclarar que el comportamiento biestable dependiente de NMDA y TEA solo apareció cuando se observó una abundante actividad sináptica en la situación control (fig. 10. A).

La figura 10 C muestra un histograma de frecuencia obtenido del registro biestable anterior. En el histograma están representados los dos estados del potencial de membrana como dos picos claramente separados, los valores sobre los picos provienen del promedio de cuatro registros biestables.

5.7 LA INDUCCIÓN DE POTENCIALES EN MESETA DEPENDE DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR IONOTRÓPICO TIPO “AMPA”.

A lo largo de este trabajo hemos visto que si se estimula ortodrómicamente la corteza en

Fig. 10.



A, las NEM "in vitro" presentan un valor de potencial de membrana estable cercano a -80 mV. B, si se adhieren NMDA ($20\mu\text{M}$) y TEA (1mM) el potencial de membrana fluctúa entre dos valores estables. C, puede verse un histograma de frecuencia del registro biestable anterior, los valores sobre los picos provienen del promedio de 4 registros biestables. Los valores del potencial de membrana fluctúan entre -81.1 ± 5 mV y -50.8 ± 2 entre el estado inactivo y el estado activo respectivamente.

presencia de NMDA o con NMDA más TEA las NEM son capaces de generar oscilaciones biestables del potencial de membrana y potenciales en meseta. En la Fig. 6 vimos que la activación de los receptores tipo AMPA es crucial para que las neuronas comiencen a oscilar. Sin embargo, una vez que las neuronas están oscilando el CNQX no causa ningún efecto sobre las variaciones en el voltaje. Nosotros quisimos ver el efecto de este bloqueador sobre la inducción

cortical de potenciales en meseta sobre las NEM. Para esto se estimuló la corteza generando dos potenciales sinápticos subumbrales en una NEM (Fig 11 A). En la figura 11 B podemos ver que la adición de NMDA $20\mu\text{M}$ más TEA 1 mM fue suficiente para generar un potencial en meseta que presenta disparo repetitivo. La adición en el baño del bloqueador del receptor a glutamato tipo "AMPA" (CNQX $10\mu\text{M}$) anula por completo los potenciales en meseta así como los potenciales sinápticos inducidos desde la corteza (Fig. 11 C). El efecto del CNQX fue reversible ya que una vez lavado de la solución salina tanto los potenciales sinápticos como los potenciales en meseta provocados en presencia de NMDA y TEA pudieron ser inducidos nuevamente con estimulación cortical (Fig. 11, D y E).

5.8 EL AGONISTA DEL CANAL DE CALCIO TIPO "L" BAY K 8644 AUMENTA LA DURACIÓN DE POTENCIALES EN MESETA INDUCIDOS CON ESTIMULACIÓN CORTICAL.

En los resultados mostrados en la Fig. 8 pudimos observar el efecto del Bay K 8644 sobre el comportamiento biestable del potencial de membrana de las NEM. Cuando se baña la rebanada con Bay K 8644 ($5\mu\text{M}$) la duración y la amplitud de los estados despolarizados del potencial de membrana aumenta de manera significativa. Este agonista de los canales de calcio tipo "L" fue probado también sobre potenciales en meseta originados por estimulación sináptica en la corteza. En la figura 12 A podemos observar que el control muestra dos potenciales sinápticos subumbrales provocados por estimulación en corteza cerebral. La adición de $20\mu\text{M}$ NMDA mas 1 mM TEA facilita la aparición de potenciales en meseta que presentan disparo repetitivo (Fig. 12 B). La adición del agonista de canales de calcio de tipo "L", Bay K 8644 ($5\mu\text{M}$), prolonga la duración del potencial en meseta y reduce el número de fallas en todas las neuronas estudiadas

(duración del control: 750 ± 112 ms; BayK 8644: 1344 ± 207 ms; $n=5$; $P < 0.05$; Wilcoxon T test) (Fig. 12 C). Este aumento fue dependiente de la activación del receptor NMDA ya que la adición del antagonista del receptor NMDA, APV ($50 \mu\text{M}$), bloquea la aparición de los potenciales en meseta en presencia de BayK 8644 (Fig. 12 D). La subsecuente adición del antagonista de receptores AMPA, CNQX, ($10 \mu\text{M}$), bloquea todas las respuestas provocadas desde corteza (Fig. 12 E).

5.8 EFECTO DE AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS DE TIPO D2 SOBRE EL COMPORTAMIENTO BIESTABLE DEL POTENCIAL DE MEMBRANA.

La dopamina ejerce poderosos efectos moduladores en las neuronas espinosas del neostriado a través de receptores tipo D1 y D2. Estudios realizados en el laboratorio muestran que la activación de los receptores de la familia D2 modula de forma negativa la acción de los canales de calcio de tipo "L" (Perez-Garci et al., 2003). Como vimos a lo largo de este trabajo, la corriente que atraviesa estos canales es crucial para inducir un comportamiento biestable del potencial de membrana así como en la inducción de la zona de conductancia negativa en la curva I-V de estas neuronas. Nosotros agregamos el agonista específico del receptor a dopamina D2 (quinelorane $10 \mu\text{M}$) en una neurona que en situación control mantenía cambios biestables de su potencial de membrana inducidos por estimulación cortical (Fig. 13) y pudimos observar que luego de agregar este agonista en el baño, el potencial de membrana de la neurona deja de oscilar y permanece en el estado inactivo alrededor de -75mV ($n = 3$).

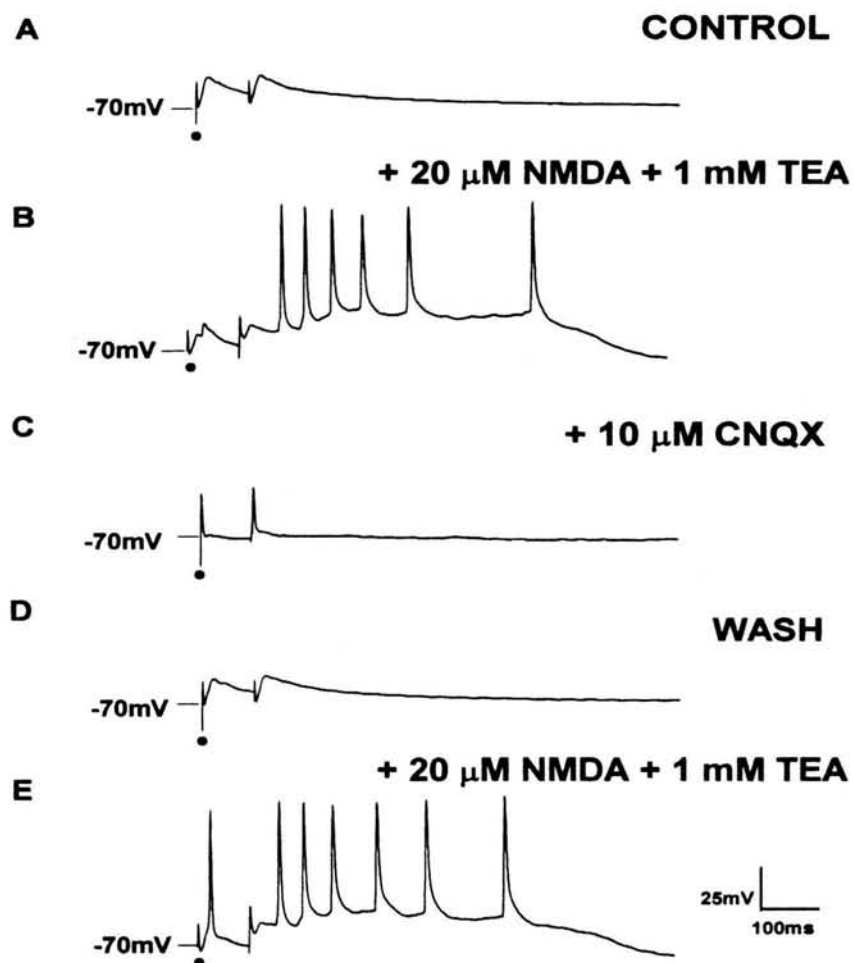


Fig. 11

A, el control muestra dos potenciales sinápticos subumbrales provocados por estimulación en corteza cerebral. B, la adición de 20 μ M NMDA mas 1 mM TEA en la solución salina facilita la aparición de potenciales en meseta después de la segunda respuesta sináptica. La intensidad del estímulo se mantiene constante. El potencial en meseta presenta disparo repetitivo. C, la adición del antagonista del receptor AMPA, CNQX (10 μ M), anula completamente esta respuesta. D y E muestran que el efecto del CNQX fue reversible.

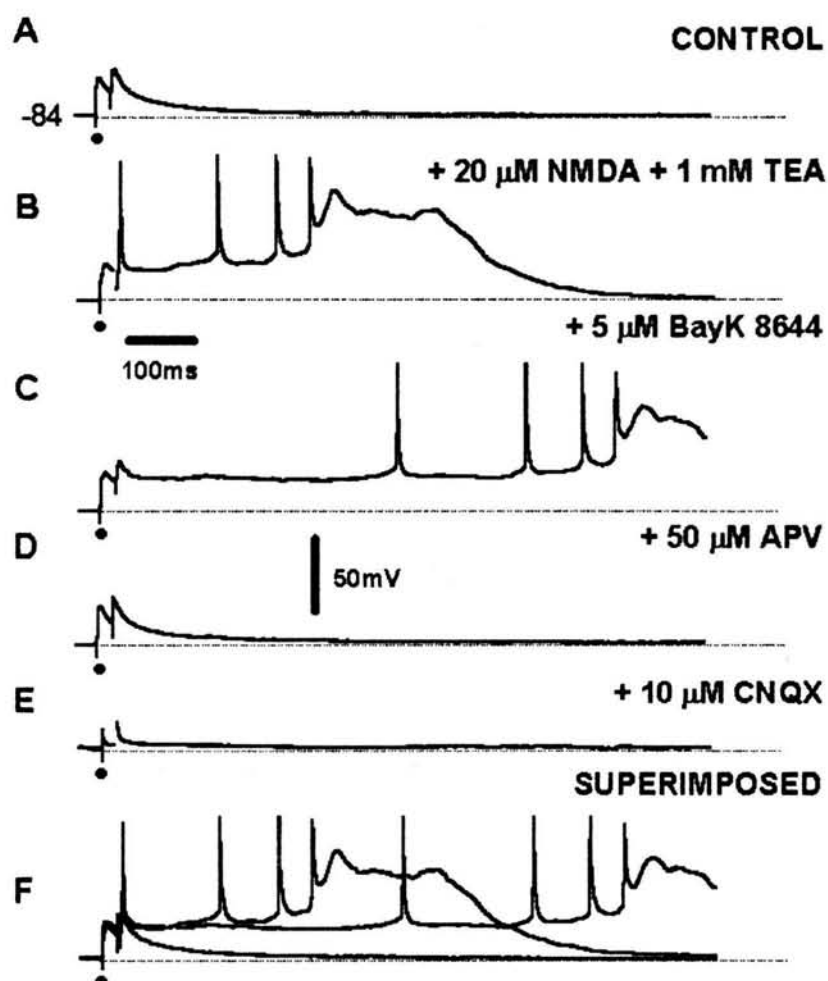


Fig. 12

A, la duración de los potenciales en meseta es aumentada por el agonista de los canales de calcio de tipo "L" BayK 8644 y reducido por antagonistas del canal NMDA. A. El control muestra dos potenciales sinápticos subumbrales provocados por estimulación en corteza cerebral. B, la adición de 20 μM NMDA mas 2 mM TEA facilita la aparición de potenciales en meseta. Nótese el disparo de potenciales de acción sobre la meseta. C, la adición del agonista de canales de calcio de tipo "L", Bay K 8644 (5 μM), prolonga la duración del potencial en meseta y reduce el número de fallas. D, la adición del antagonista del receptor NMDA, APV (50 μM), bloquea la aparición de los potenciales en meseta. E, la subsiguiente adición del antagonista de receptores AMPA, CNQX, (10 μM), bloquea todas las respuestas provocadas desde corteza. F, superposición de los trazos A, B y C.

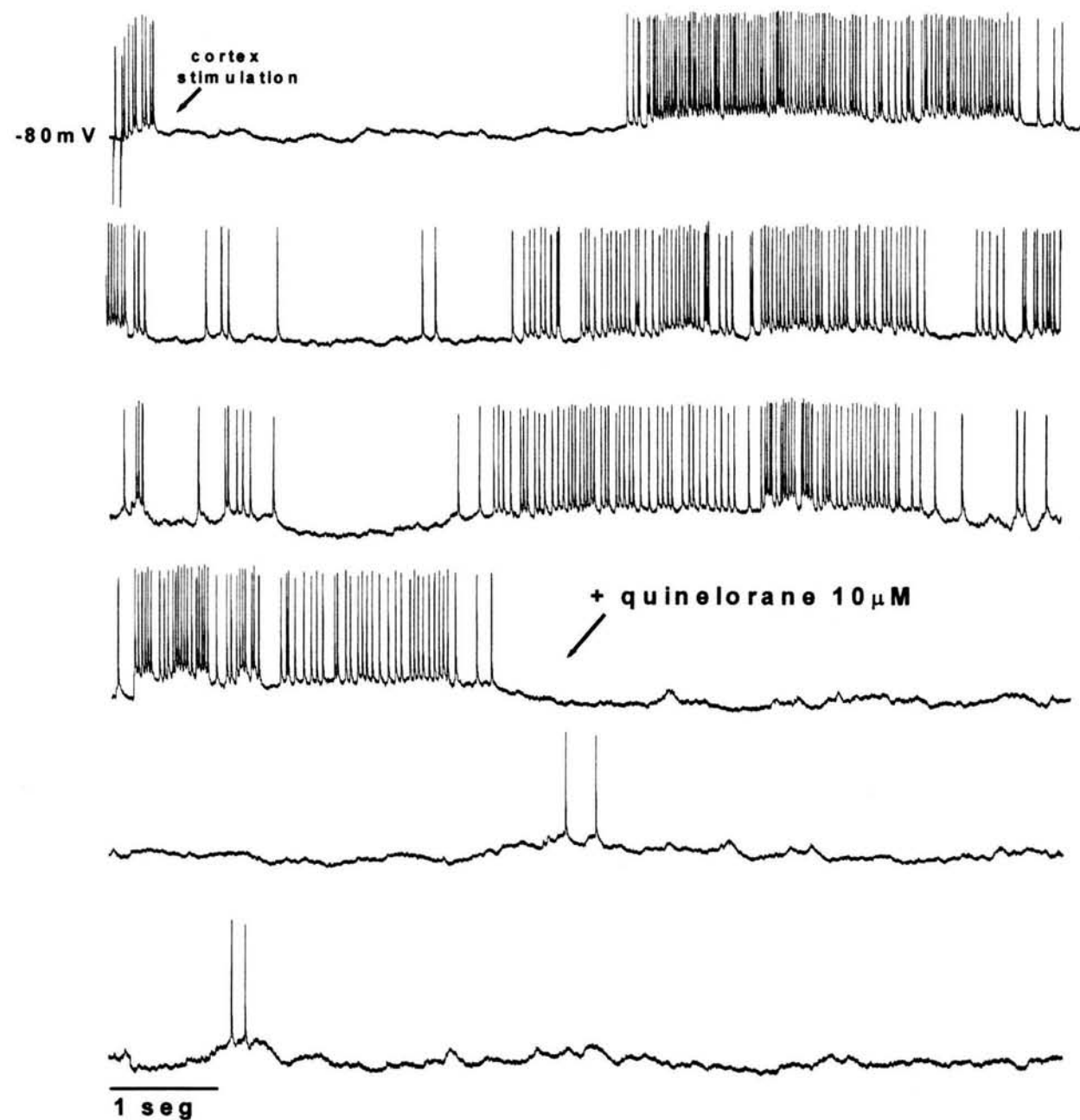


Fig. 13

A, el comportamiento biestable del potencial de membrana de una NEM inducido con un tren de estímulos ortodróxicos en la corteza cerebral es abolido por la presencia del agonista del receptor dopaminérgico tipo D2 quinlorane 10 μM en el baño de superfusión ($n=3$).

Capítulo 6

DISCUSIÓN

Se sabe que las dendritas poseen diferentes tipos de conductancias activas incluyendo corrientes de cloro, calcio, potasio y NMDA (Johnston et al., 1996; Hausser et al., 2000). Cuando se activan, confieren a las neuronas dinámicas de tipo no-lineal, lo que les permite transformar las entradas sinápticas simples en trenes de potenciales de acción, ráfagas, disparos adaptativos o múltiples modos de disparo. Además, la amplificación supra-lineal de potenciales sinápticos provoca, de alguna manera desconocida, la sincronización de las neuronas resonantes en diferentes sitios del cerebro.

Las neuronas poseen conductancias de membrana que pueden amplificar las entradas sinápticas. Estas conductancias, además, pueden ser moduladas por diferentes neurotransmisores facilitando o anulando sus efectos. Un ejemplo claro sería la modulación por dopamina sobre las neuronas espinosas del estriado. La activación de los receptores dopaminérgicos del tipo D1 modula de forma positiva a los canales de calcio de tipo "L". Si estos receptores son activados es de esperar que las NEM, en respuesta a una entrada excitadora, estén "facilitadas" para disparar en ráfagas. Por el contrario, la activación de los receptores a dopamina del tipo D2 modula de manera negativa a los canales de calcio de tipo "L" en las neuronas espinosas del estriado. Si estos receptores son activados, las neuronas espinosas ya no generaran disparos en ráfagas y su potencial de membrana permanecerá en el estado hiperpolarizado o "down state". En este estado, estas neuronas pueden provocar sus disparos a través de la sumación lineal de entradas sinápticas.

Podemos ver así, que la misma neurona es capaz de producir dos patrones de disparo completamente distintos dependiendo de la forma en que es modulada.

Antes de este trabajo se pensaba que generar ritmos en una rebanada de neocóstriado no era posible. Se pensaba que las oscilaciones observadas “in vivo” en las neuronas espinosas era totalmente dependiente de la fuerte entrada excitadora proveniente de la corteza y que en la rebanada, al dañar gran parte de estas aferencias, la fuerza sináptica no era suficiente para inducir potenciales en meseta y biestabilidad. Sin embargo, las neuronas espinosas del neocóstriado poseen receptores-canal a glutamato de tipo NMDA en sus dendritas, y poseen, también en las dendritas, canales de calcio de tipo “L”. Como vimos a lo largo de este trabajo, muchos tipos neuronales utilizan estos canales como mecanismo para generar oscilaciones del potencial de membrana y potenciales en meseta. Estos canales producen una fuerte corriente entrante capaz de despolarizar a la neurona por varios segundos si son activados. Sin embargo, en los estudios hechos “in vivo” en el neocóstriado, la importancia de estos canales en el comportamiento biestable del potencial de membrana de las NEM no ha podido ser demostrada.

El principal hallazgo de este estudio fue que, en la rebanada, la estimulación cortical (pequeños trenes de estímulos) fue capaz de inducir oscilaciones del potencial de membrana en las NEM del neocóstriado. Una vez iniciadas, las oscilaciones continúan sin necesidad de otro estímulo en la corteza fluctuando entre dos estados preferidos (up y down state) de manera similar a las oscilaciones observadas “in vivo” y en cultivos organotípicos (Wilson, 1993; Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997; Plenz y Kitai, 1998; Wang y O’Donnell, 2001).

Existen ciertas condiciones que pueden ser necesarias para observar este comportamiento “in vitro”. Primero, marcando de manera anterógrada a las fibras corticoestriatales con biocitina en la rebanada parasagital se observaron las zonas de probable contacto entre las neuronas piramidales de la corteza y las neuronas espinosas del estriado. Esto nos dio una idea de qué zona

del estriado recibe la mayor cantidad de aferencias en la rebanada y de donde provienen estas fibras; dándonos así una idea de dónde registrar en el estriado así como de dónde colocar el electrodo de estimulación para obtener la mayor fuerza sináptica posible. En segundo lugar fue utilizada una solución en el baño con concentraciones de K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} más cercanas a las que aparentemente existen “in vivo” (Sánchez-Vivez y McCormick, 2000). Con estas condiciones de registro, la estimulación de las fibras aferentes corticales fue capaz de provocar potenciales en meseta y oscilaciones biestables en NEM.

La rebanada posee fragmentos de la red neuronal natural del neostriado de la rata así como sus conexiones con la corteza cerebral. La importancia de haber logrado generar oscilaciones del potencial de membrana, muy similares a las que se presentan en el animal vivo, es que se facilita mucho el estudio de los componentes sinápticos e intrínsecos de la biestabilidad de las NEM. Además, se puede estudiar también cómo este comportamiento es modulado por diferentes neurotransmisores de gran importancia en el funcionamiento normal del neostriado.

De manera interesante, este tipo de estimulación induce también transiciones de voltaje en neuronas piramidales de rebanadas corticales (Shu, et al., 2003).

Si bien estudios anteriores demuestran que la estimulación de neuronas corticales o de la sustancia blanca es capaz de producir potenciales en meseta en las NEM (Wilson, et al., 1983; Bargas et al., 1991; Galárraga et al., 1997; Schlooser et al., 1999), la relación de estos potenciales en meseta con las oscilaciones del potencial de membrana observados “in vivo” no había sido aun descrita. En este trabajo demostramos que las oscilaciones de membrana en las neuronas espinosas medianas fueron afectadas tanto por propiedades intrínsecas de las neuronas espinosas como por propiedades específicas de la red corticoestriatal. Las transiciones al estado activo “up state” fueron facilitadas por el aumento de corrientes entrantes a través del receptor-canal tipo

NMDA y del canal de calcio de tipo "L" y suprimidas por corrientes acarreadas por canales GABAA, canales de potasio sensibles a TEA y agonistas dopaminérgicos tipo D2.

Los trabajos en rebanadas de cerebro están empezando a clasificar y estudiar este tipo de fenómenos. Así, algunos estudios encuentran fundamentales las variables sinápticas y de red en la inducción de oscilaciones (Szabadics et al., 2001; Shu et al., 2003), en otros se ve la gran importancia de las propiedades intrínsecas de las neuronas (Hsiao et al., 1998; Traub et al., 2003) y por otro lado, varios estudios muestran que, en varios tipos de neuronas, son necesarias tanto las propiedades sinápticas y de red como las propiedades intrínsecas de las neuronas para la inducción de oscilaciones (Guertin y Hounsgaard, 1998; Bevan et al., 2000). Si bien queda mucho trabajo por hacer, creemos que las oscilaciones descritas en este trabajo podrían pertenecer al último grupo. Nosotros hemos identificado corrientes iónicas de membrana que facilitan las transiciones al estado activo. Sin embargo la activación de estas conductancias dependientes de voltaje necesitó de la actividad sináptica en la membrana sináptica de las dendritas. Mostramos que el receptor-canal NMDA juega un papel fundamental como interfase entre la entrada sináptica y las conductancias intrínsecas de las NEM, posiblemente produciendo mesetas prolongadas capaces de lograr la despolarización suficiente de la dendrita para que se abran canales dependientes de voltaje de inactivación lenta. Cuando los receptores-canal NMDA fueron bloqueados fue imposible inducir oscilaciones de membrana y potenciales en meseta. Las neuronas espinosas medianas presentan canales de Ca de tipo "L" funcionales a voltajes subumbrales (Perez-Garci et al., 2003) siendo capaces de producir potenciales en meseta, biestabilidad y fluctuaciones de voltaje entre dos potenciales de membrana. Estos canales pueden ser activados por entradas sinápticas (Galarraga et al., 1999). En este trabajo hay indicios que indicarían que la apertura de los receptores a NMDA estarían facilitando la apertura de los canales de calcio de tipo "L", quizás produciendo la despolarización suficiente en la dendrita para

que estos se abran. Esto se ve en la inducción de potenciales en meseta. Si se agrega nitrendipina ($5\mu\text{M}$), la duración de esas despolarizaciones disminuye considerablemente. En ese estado queda solamente un pequeño componente despolarizante sensible a AP5 (NMDA), lo que muestra que éstos potenciales en meseta están generados en gran parte por la corriente que atraviesa los canales de calcio de tipo “L”. Sin embargo, si en ausencia de dihidropiridinas se agrega un bloqueador del canal NMDA, los potenciales en meseta ya no pueden inducirse por estimulación ortodrómica de la corteza. Los potenciales en meseta en las NEM se generan principalmente por la entrada de calcio a través de canales de calcio de tipo “L”. Sin embargo estos potenciales en meseta no se pueden activar sin la apertura de los canales de tipo NMDA. Estos se encuentran en la zona sináptica, rodeando a los receptores canal de tipo AMPA y son los primeros en abrirse en respuesta a una entrada sináptica rápida capaz despolarizar a la dendrita al nivel umbral de los receptores-canal NMDA. Nosotros creemos que la despolarización producida por la apertura de estos canales es la que lleva el potencial de membrana al umbral de acción de los canales de calcio de tipo “L”. Una vez que éstos se abren se genera la meseta en toda su magnitud. Sin embargo, son necesarios más estudios para dilucidar cuándo y cómo estos canales cumplen este rol fisiológico.

Existen similitudes y diferencias entre las oscilaciones del potencial de membrana observadas “in vitro” con las observadas “in vivo”. He aquí las similitudes: El estado activo (up state) depende en parte de entradas sinápticas excitadoras (Wilson, 1993; Stern et al., 1997). Los potenciales en meseta y las oscilaciones no pueden ser generados por una inyección de corriente desde el soma; en contraste con lo visto en las motoneuronas (Perrier y Hounsgaard, 2000). Coincidiendo con los registros realizados “in vivo”, el estado activo o “up state” en la rebanada, alcanza potenciales de membrana que se encuentran en el rango de los -50 mV , justo por debajo del umbral de disparo de las neuronas espinosas medianas (-45mV). El potencial de membrana

del estado inactivo o “down state” durante las oscilaciones inducidas desde la corteza se distribuyó de manera unimodal (Wilson, 1993; 1995; Stern et al., 1997; 1998; West y Grace, 2002). La duración del “up state” *in vitro* fue similar a la duración de los “up state” registrados en animales anestesiados, en el rango de cientos de milisegundos a segundos. Además tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” los up states son aperiódicos y disparan potenciales de acción de manera irregular. Estas similitudes parecen reflejar mecanismos comunes para generar los cambios del potencial de membrana tanto “*in vivo*” como en la rebanada. Sin embargo se observaron diferencias entre los registros de las dos técnicas: “*In vivo*”, antagonistas de corrientes entrantes sostenidas aplicadas por el electrodo de registro, intracelular o “sharp electrode” no afectaron las oscilaciones del voltaje (Wilson, 1993; Stern et al., 1997; Wilson y Kawaguchi, 1996). Las neuronas registradas “*in vitro*” permanecen más tiempo en el estado inactivo que las neuronas registradas “*in vivo*”, además de que el estado inactivo “*in vitro*” tiene una tendencia a permanecer a niveles más despolarizados que “*in vivo*”. Hay que hacer notar, sin embargo, que la facilitación de las oscilaciones por NMDA “*in vivo*”, estuvieron acompañadas de un efecto despolarizante sobre el potencial de membrana (Herrling et al., 1983). Esta tendencia del potencial de membrana a despolarizarse también se observa en respuesta a trenes repetitivos de estimulación en otros sistemas (Steriade y Timoofov, 2003). Es importante destacar también que la adición de NMDA exógeno puede activar parcialmente receptores sinápticos que normalmente son activados por la entrada cortical. Esto no es sustituto de la activación bidimensional espacial de contactos dañados (Kilb y Luhmann, 2003) o de contactos provenientes de aferencias importantes como lo son los de la red talámica y subtalámica-palidal (Bevan et al., 2002). Otra razón de las diferencias entre las oscilaciones vistas “*in vitro*” con las vistas “*in vivo*” puede deberse a la utilización de la anestesia en estas últimas. Es bien conocido que los anestésicos pueden potenciar la actividad GABAérgica así como pueden disminuir la actividad de tipo

NMDA y AMPA de diferentes maneras (Richards, 2002). Nosotros hemos mostrado la importancia de la acción a través de los receptores de tipo NMDA y de los GABAA en las oscilaciones biestables en una preparación de rebanadas. Estos cambios en la actividad sináptica pueden tender a suprimir ciertos mecanismos intrínsecos y llevar a las neuronas a depender en mayor manera de la actividad extrínseca. En otras neuronas, los mecanismos intrínsecos que soportan la biestabilidad son debilitados por un aumento en la actividad gabaérgica en las dendritas (Miura et al.,1997).

Los estudios citados previamente y el presente trabajo coinciden en que las neuronas espinosas medianas no son capaces de generar potenciales en meseta y biestabilidad desde el soma. En este trabajo se presenta evidencia de que posiblemente los mecanismos que generan el comportamiento biestable y los potenciales en meseta dependen principalmente de conductancias localizadas en las dendritas. Los mecanismos mediados por sinapsis de tipo NMDA pueden disparar mecanismos intrínsecos como los canales de calcio de tipo "L"(Schiller y Schiller, 2001). La integración sináptica incluye los potenciales en meseta y las oscilaciones del potencial de membrana. Esta observación permite una conclusión cautelosa de que las oscilaciones vistas bajo las condiciones de este trabajo puede ser solo un subconjunto de un número mayor de modos de actividad oscilatoria (Steriade y Timoofov, 2003). Estos mecanismos intrínsecos pueden tener profundas implicaciones para la integración estriatal por la disociación de la duración de la entrada cortical con la duración de la salida estriatal bajo ciertas condiciones. La entrada sináptica excitadora fue necesaria para inducir las oscilaciones. Sin embargo, una vez que las NEM están oscilando, no se requiere de entradas excitadoras rápidas para que las oscilaciones continúen. Este resultado podría estar insinuando que el mismo estriado tiene los mecanismos sinápticos e intrínsecos necesarios para mantenerse disparando de manera biestable. De esta manera, la corteza podría simplemente encender comandos de trabajo que estarían definidos dentro del

núcleo, sin necesidad de seguir estimulándolo. Esto es solamente una hipótesis, pero demuestra la gran cantidad de variantes que podría presentar este comportamiento de las NEM.

6.1 EN LA REBANADA LOS POTENCIALES EN MESETA Y EL ESTADO ACTIVO “UP STATE” DEPENDEN DE NMDA

Nuestros resultados muestran que la entrada sináptica puede inducir despolarizaciones prolongadas del potencial de membrana de las NEM. Los potenciales en meseta en la rebanada fueron eliminados por bloqueadores de los receptores AMPA-KA y NMDA con CNQX y AP5 respectivamente. Sin embargo, trenes cortos de entradas ortodrómicas corticales fueron efectivas para provocar potenciales en meseta y subsecuentes oscilaciones en el voltaje de membrana. La unión entre la activación sináptica y los potenciales en meseta fue evidente dada la capacidad del NMDA exógeno para aumentar la inducción de potenciales en meseta. La estimulación repetitiva en la corteza cerebral en presencia de concentraciones micro molares (5-25) de NMDA fue el protocolo mas efectivo para inducir fluctuaciones en el potencial de membrana. Estas concentraciones de NMDA son suficientes para inducir una zona de conductancia de pendiente negativa en la curva IV de las neuronas espinosas medianas. Este fenómeno es la “marca” en la membrana de la capacidad de la neurona de producir biestabilidad (Schwindt y Crill, 1977; 1980; Kiehn y Eken, 1998; Hsiao et al., 1998; Lee y Heckman, 1998b; Booth et al., 1997; Carlin et al., 2000; Schiller y Schiller, 2001; Svirskis et al., 2001). Es importante recordar que tanto los potenciales en meseta como las oscilaciones del potencial de membrana no pudieron ser provocados cuando los receptores a NMDA fueron bloqueados con AP5. El NMDA exógeno acompañado de la entrada sináptica, es un potente inductor de biestabilidad del potencial de membrana y oscilaciones de voltaje en otras preparaciones (Wallend y Grillner, 1987; Kim y

Chandler, 1995; Guertin y Hounsgaard, 1998; rev. in Schiller y Schiller, 2001). La conjunción del NMDA con la entrada sináptica sirve, presumiblemente, para aumentar selectivamente los componentes sinápticos lentos que naturalmente ocurren, ayudando a la activación de conductancias intrínsecas dependientes de voltaje (Larkum et al., 2001; Oakley et al., 2001; Schiller y Schiller, 2001). En las neuronas espinosas medianas es probable que esta interacción ocurra en las dendritas donde se localiza la gran mayoría de las entradas excitadoras (*Wilson, 1993*). Esto es consistente con la capacidad mostrada por el bloqueo del canal Kir2, con bario, para cambiar sustancialmente la zona de conductancia negativa hacia potenciales de membrana más negativos. Además es importante recordar que los potenciales en meseta no pudieron ser provocados con inyecciones de corriente despolarizantes en el soma de las NEM. Esta es otra evidencia de que los potenciales en meseta se generan en las dendritas lejanas.

6.2 LOS CANALES DE CALCIO DE TIPO “L” CONTRIBUYEN AL MANEJO SINÁPTICO DE POTENCIALES EN MESETA Y A LAS OSCILACIONES DEL POTENCIAL DE MEMBRANA.

¿Qué conductancias intrínsecas son facilitadas por la entrada sináptica en las neuronas espinosas medianas? ¿Por que el rango de voltaje en el cual el Mg^{2+} bloquea al canal NMDA se encuentra a niveles similares con el rango de activación de algunas corrientes entrantes dependientes de voltaje? La corriente NMDA actua en conjunto con varios tipos de estos canales. Uno de esos canales es el canal de calcio de tipo “L”. Este canal es esencial para fijar el modelo tónico de disparo, la relación entrada-frecuencia (rango dinámico) y el umbral de disparo de las neuronas espinosas medianas (Perez-Garci et al., 2003). Como vimos a lo largo de este trabajo, los potenciales en meseta y las oscilaciones de voltaje inducidas por la activación del receptor

NMDA dependen también de la activación de los canales de calcio de tipo “L” en diferentes tipos de neuronas (Flatman et al., 1983; Schwindt y Crill, 1997; Guertin y Hounsgaard, 1998; Seamans et al., 1997; Russo y Hounsgaard, 1999; Lo y Mize, 2000; Reyes, 2001; Schiller y Schiller, 2001). Esto parece ser similar en las neuronas estriatales (Galarraga et al., 1997; Cepeda et al., 1998; 2001; Akopian y Walsh, 2002). En estas neuronas la modulación por dopamina parece residir principalmente en estos canales (Hernandez-Lopez et al., 1997, 2000). Este trabajo muestra que los potenciales en meseta y las subsecuentes oscilaciones del voltaje dependen en parte de la activación de los canales de calcio de tipo “L”, ya que al bloquearlos se anulan ambos fenómenos. Recíprocamente, la facilitación de los canales de calcio de tipo “L” por Bay K 8644 aumenta la duración y la frecuencia de los estados activos “up states” inducidos por estimulación cortical así como de los potenciales en meseta.

La proximidad de los canales de calcio tipo “L” de bajo umbral con los receptores NMDA parece ser importante en la inducción de potenciales en meseta (Andreasen y Lambert, 1995; Carlin et al., 2000; Guertin y Hounsgaard, 1998; Golding et al., 1999; Schwindt y Crill, 1997; 1998; Seamans et al., 1997; Schiller y Schiller, 2001). Estos canales de calcio necesitan estar en unas pocas ramas dendríticas para que la neurona tenga la capacidad de generar un comportamiento biestable del potencial de membrana (Svirskis et al., 2001). La dependencia de corrientes de calcio de tipo “L” en la zona de conductancia de pendiente negativa de la curva IV inducida por NMDA es consistente con la idea de que estos canales están co-localizados en la región dendrítica y que ésta es crítica para la inducción de potenciales en meseta y la biestabilidad. Las neuronas espinosas medianas coexpresan los canales de calcio de tipo “L” Cav 1.2 y Cav 1.3 teniendo estos canales un umbral de apertura prominentemente bajo (Bargas et al., 1994; Song y Surmeier, 1996; Perez-Garci et al., 2003), pero queda por demostrar cuál de estos canales es fundamental en la interacción con el NMDA para generar potenciales en meseta y

biestabilidad. Sin embargo, queda claro que los canales de calcio de tipo “L” dendríticos son capaces de dar forma a la respuesta de una entrada sináptica excitatoria en las neuronas espinosas medianas del estriado.

El hallazgo más sorprendente fue la capacidad de una breve estimulación repetitiva en la corteza para generar oscilaciones biestables del potencial de membrana en las neuronas espinosas del estriado. Estas oscilaciones continúan, sin necesidad de un nuevo estímulo, por arriba de una hora de registro. Estas oscilaciones no fueron ostensiblemente periódicas en la gran mayoría de los casos. Una vez inducidas, ya no dependieron de la activación de los receptores a glutamato de tipo AMPA. Esto sugiere que, quizás, alguna sinapsis gabaérgica proveniente de ínter neuronas estriatales pueda mediar la despolarización necesaria para abrir los canales a glutamato de tipo NMDA. Pero ¿cómo puede una sinapsis gabaérgica despolarizar la dendrita? El potencial de membrana de las NEM en el estado inactivado (down state) es cercano a los -80 mV. El potencial de inversión del ion cloro en estas neuronas se encuentra alrededor de los -60 mV. De esta manera, si una entrada GABAérgica llega a una NEM mientras esta se encuentra en el estado inactivo producirá una despolarización del potencial de membrana en estas neuronas. En el estado activo, que tiene un potencial de membrana cercano a -50 mV, la entrada gabaérgica llevará el potencial de membrana a potenciales más hiperpolarizados. Vemos así que el mismo GABA podría ser capaz de producir los estados activos y también de terminarlos.

Se puede calcular que para que en una neurona estriatal con una resistencia de entrada cercana a los 200 M Ω se registre un EPSP supraumbrales, son necesarias entre 15 y 30 neuronas de la corteza disparando y activándola de manera sincrónica. Esta cantidad de neuronas es inferior al que se encuentra en un módulo o columna cortical. El reclutamiento de más neuronas corticales incrementará la duración de la meseta y el número de potenciales de acción producidos. Las neuronas espinosas del neostriado son altamente dependientes de la entrada sináptica para

inducir potenciales en meseta, quizás porque necesitan una fuerte despolarización inicial para abrir los receptores-canal de tipo NMDA. Sin embargo, una vez activados, estos canales inician una serie de procesos no-lineales.

La activación del receptor a dopamina del tipo D2 modula negativamente el comportamiento biestable del potencial de membrana de las NEM. Se sabe que la activación de los receptores dopaminérgicos de la familia D2 modula de manera negativa la actividad de los canales de calcio de tipo "L" (Perez-Garci et al, 2003). Nosotros probamos el efecto que ejerce la aplicación en el baño del agonista dopaminérgico de la familia D2 (Quinelorane) sobre las oscilaciones biestables en las NEM. La adición de quinelorane abolió las oscilaciones en estas neuronas.

Estos resultados son simplemente el comienzo de un camino largo que queda por recorrer. Quedan por dilucidar el papel de diferentes neuromoduladores como serotonina y muscarina en el comportamiento biestable del potencial de membrana de las NEM del neostriado. La manera como una neurona procesa la información sináptica tiene consecuencias significativas para las propiedades computacionales que una red neuronal puede tener. Estamos recién comenzando a entender cómo funcionan los circuitos estriatales. .

Capítulo 7

CONCLUSIONES

- La estimulación cortical en forma de pequeños trenes subumbrales acompañado de pequeñas cantidades de NMDA (5-20 μ M) en el baño de superfusión es capaz de inducir potenciales en meseta y oscilaciones biestables en NEM neostriatales en una rebanada de cerebro.
- Tanto las oscilaciones biestables del potencial de membrana como los potenciales en meseta dependen de la apertura de los receptores canal tipo NMDA y de los canales de calcio de tipo “L”
- La activación de los receptores glutamatergicos de tipo AMPA es crucial para iniciar las oscilaciones espontáneas del potencial de membrana y los potenciales en meseta. Sin embargo, una vez iniciadas las oscilaciones no necesitan de la apertura de este tipo de canales para ser mantenidas.
- El bloqueo de receptores canal tipo GABA_A y de canales de K⁺ sensibles a TEA facilita la aparición de oscilaciones biestables del potencial de membrana en NEM del NE.

- La activación de los receptores a dopamina de tipo D2 anula por completo las oscilaciones del potencial de membrana inducido por estimulación cortical en las NEM del NE.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal N, Hamam BN, Magistretti J, Alonso A, Ragsdale DS. (2001). Persistent sodium channel activity mediates subthreshold membrane potential oscillations and low-threshold spikes in rat entorhinal cortex layer V neurons. *Neurosci* **102**: 53-64.
- Akopian, G. & Walsh, JP. (2002). Corticostriatal paired-pulse potentiation produced by voltage-dependent activation of NMDA receptors and L-type Ca²⁺ channels. *J Neurophysiol* **87**: 157-165.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TINS* **12**:366-375.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*. **9**: 357-81. Review
- Amitai, Y, Friedman, A, Connors, BW, and Gutnick, MG (1993). Regenerative activity in apical dendrites of pyramidal cells in neocortex. *Cerebral Cortex*. **3**: 26-38.
- Andersen P, Holmquist B, and Voorhoeve PE (1966). Excitatory synapses on hippocampal apical dendrites activated by entorhinal stimulation. *Acta Physiol. Scand*. **66**: 461-472.
- Andreasen M, and Lambert JD (1995). Regenerative properties of pyramidal cell dendrites in area CA1 of the rat hippocampus. *J Physiol* **483**: 421-441.
- Angstadt JD, Choo JJ. (1996). Sodium-dependent plateau potentials in cultured retzius cells of the medicinal leech. *J Neurophysiol* **76**: 1491-1502.
- Avery RB, and Johnston D. (1996). Multiple channel types contribute to the low-voltage-activated calcium current in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J. Neurosci* **16**: 5567-5582.
- Bargas J, Ayala G X, Vilchis C, Pineda J C, and Galarraga E. (1999). Ca²⁺-Activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* **88**: 429-488.
- Bargas J, Galarraga E, & Aceves J. (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res* **539**: 159-163.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y. and Surmeier DJ. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* **14**: 6667-6686.
- Bargas J, Cervantes L, Galarraga E, Fraguera A. (2003). Ion Channels: Keys to neuronal specialization. En: *"The Hand-Book of Brain Theory and Neural Networks"*, ed. por: M.A. Arbib. MIT Press. pp.: 585-590.
- Bar-Gad I, Bergman H. (2001). Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 689-695.
- Beiser DG, Houk JC. (1998). Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events. *J Neurophysiol* **79**: 3168-3188.
- Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson CJ. (2002) Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci* **25**: 525-531.
- Bischofberger J and Schild D.(1995).Different spatial patterns of [Ca²⁺] increase caused by N- and L-type Ca²⁺ channel activation in frog olfactory bulb neurones. *J Physiol* **487**: 305-317.

- Blanton MG, Lo Turco JJ, and Kriegstein AR. (1989). Whole-cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Meth.* **30**: 203-210.
- Booth V, Rinzel J, and Kiehn O. (1997). Compartmental model of vertebrate motoneurons for Ca^{++} -dependent spiking and plateau potentials under pharmacological treatment. *J Neurophysiol* **78**: 3371-3385.
- Brock, L.G., Coombs, J.S., and Eccles, J.C. (1952). The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode. *J. Physiol.* **117**: 431-460.
- Brownstone RM, Gossard JP, and Hultborn H. (1994). Voltage-dependent excitation of motoneurons from spinal locomotor centres in the cat. *Exp Brain Res* **102**: 34-44.
- Burns, B. D., Webb, A. C. (1979). The correlation between discharge times of neighbouring neurons in isolated cerebral cortex. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **203**: 347-360,
- Calton JL, Kang MH, Wilson WA, & Moore SD. (2000). NMDA Receptor-dependent synaptic activation of voltage-dependent calcium channels in basolateral amygdala. *J Neurophysiol*, **83**: 685-692.
- Carlin KP, Jones KE, Jiang Z, & Jordan LM. Brownstone RM. (2000). Dendritic L-type calcium currents in mouse spinal motoneurons: implications for bistability. *Eur J Neurosci* **12**: 1635-1646.
- Cazalets JR, Borde M. and Clarac F. (1995). Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *Journal of Neuroscience* **15**, 4943-4951.
- Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Chandler SH. & Levine MS. (1998). Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *J Neurophysiol* **79**: 82-94.
- Cepeda C, Hurst RS, Altemus KL, Flores-Hernandez J, Calvert CR, Jokel ES, Grandy DK, Low MJ, Rubinstein M, Ariano MA. & Levine MS. (2001). Facilitated glutamatergic transmission in the striatum of D2 dopamine receptor-deficient mice. *J Neurophysiol* **85**: 659-670.
- Chang HT. (1988). Dopamine-acetylcholine interaction in the rat striatum: a dual-labeling immunocytochemical study. *Brain Res Bull.* Aug; 21(2): 295-304.
- Cherubini E, Herrling PL, Lanfumey L. & Stanzione P.(1988). Excitatory amino acids in synaptic excitation of rat striatal neurones in vitro. *J Physiol* **400**: 677-690.
- Chesselet, M.F and Delf, M.J. 1996. Basal Ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci.* **19**: 417-422
- H. Chin, M.A. Smith, H.L. Kim, H. Kim. (1992) . Expression of dihydropyridine-sensitive brain calcium channels in the rat central nervous system, *FEBS Lett.* 299 69-74.
- Collingridge GL, Herron CE, Lester RA. (1988). Frequency-dependent *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *J Physiol* **399**: 301-312.
- Compte A, Brunel N, Goldman-Rakic PS, Wang XJ. (2000). Synaptic mechanisms and network dynamics underlying spatial working memory in a cortical network model. *Cereb Cortex* **10**, 910-923.
- Contreras D, Steriade M. (1997). State-dependent fluctuations of low-frequency rhythms in corticothalamic networks. *Neurosci* **76**: 25-38.
- Conway BA, Hultborn H, Kiehn O, Mintz I. (1988). Plateau potentials in alpha-motoneurons induced by intravenous injection of L-dopa and clonidine in the spinal cat. *J Physiol* **405**: 369-84.
- Coombs SJ, Eccles JC, and Fatt, P. (1955a). Excitatory synaptic actions in motoneurons. *J. Physiol.* **130**: 374-395.

- Coombs, SJ, Eccles JC, and Fatt, P. (1955b). The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory post-synaptic potential. *J. Physiol.* **130**: 395-413.
- Cossart R, Aronov D, Yuste R. (2003). Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature*. **423**, 283-288.
- Crone C, Hultborn H, Kiehn O, Mazieres L, Wigstrom H. (1988). Maintained changes in motoneuronal excitability by short-lasting synaptic inputs in the decerebrate cat. *J Physiol* **405**: 321-43.
- Day, M., Olson, P.A., Platzter, J., Striessnig, J. & Surmeier, D.J. (2002). Stimulation of 5-HT₂ receptors in prefrontal pyramidal neurons inhibits Ca_v1.2 L type Ca²⁺ currents via a PLCbeta/IP3/calcineurin signaling cascade. *Journal of Neurophysiology* **87**, 2490-2504.
- De Koninck Y, Henry JL. (1991). Substance P-mediated slow excitatory postsynaptic potential elicited in dorsal horn neurons *in vivo* by noxious stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:11344 –11348.
- Del Negro CA, Hsiao CF, Chandler SH. (1999). Outward currents influencing bursting dynamics in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* **81**: 1478-1485.
- Deadwyler SA, Bunn T, Hampson RE. (1996). Hippocampal ensemble activity during spatial delayed-nonmatch-to-sample performance in rats. *J Neurosci* **16**: 354-372.
- R. Delgado-Lezama, J. Hounsgaard, Adapting motoneurons for motor Behavior. (1999) . *Prog. Brain Res.* **123**: 57–63.
- R. Delgado-Lezama, J.F. Perrier, S. Nedergaard, G. Svirskis, J.nHounsgaard. (1997). Metabotropic synaptic regulation of intrinsic response properties of turtle spinal motoneurons, *J. Physiol.* 504 (Pt 1) 97–102.
- Dickson CT, Magistretti J, Shalinsky M, Hamam B. & Alonso A. (2000). Oscillatory activity in entorhinal neurons and circuits. Mechanisms and function. *Ann NY Acad Sci* **911**: 127-150.
- Dilger JP. (2002). The effects of general anaesthetics on ligand-gated ion channels. *Br J Anaesth.* **89**, 41-51.
- Dimova R, Vuillet J, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L. (1993). Ultrastructural features of the choline acetyltransferase-containing neurons and relationships with nigral dopaminergic and cortical afferent pathways in the rat striatum. *Neuroscience.* Apr; **53**(4): 1059-71.
- Dotd H U, and Zieglgansberger W.(1990). Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC. *Brain Res.* **537**: 333-336.
- Eccles, J.C., Libet, B., and Young, R.R. (1958). The behavior of chromatolyzed motoneurons studied by intracellular recording. *J. Physiol (Lond.)* **143**: 11-40.
- Edwards, F.A., Konnerth, A., Sakmann, B., and Takahashi, T. (1989). A thin slice preparation for patch recordings from neurones of mammalian central nervous system. *Pflugers. Arch.* **414**: 600-612.
- E.A. Ertel, K.P. Campbell, M.M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T.P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R.W. Tsien, W.A. Catterall. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels, *Neuron* **25**: 533–535.
- Fisher TE and Bourque G. (1995). Voltage-gated calcium currents in the magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol* **486**: 571–580.
- Flatman JA, Schwindt PC, Crill WE. & Stafstrom CE. (1983). Multiple actions of N-methyl-D-aspartate on cat neocortical neurons *in vitro*. *Brain Res* **266**: 169-173.

- Flatman JA, Schwindt PC, Crill WE. (1986). The induction and modification of voltage-sensitive responses in cat neocortical neurons by N-methyl-D-aspartate. *Brain Res. Jan 15; 363(1): 62-77.*
- Fint, A. C., Connors, B. W. (1996) Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations. *J. Neurophysiol. 75: 951-956,*
- Foley P, Riederer P. (2000). The motor circuit of the human basal ganglia reconsidered. *J Neural Transm Suppl 58: 97-110.*
- Fox AP, Nowycky MC and Tsien RW. (1987). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol 394: 149-172.*
- Fraser DD, MacVicar BA. (1996). Cholinergic-dependent plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci 16: 4113- 4128.*
- Fuortes MGF, Frank K, and Becker MC. (1957). Steps in the production of the motoneurons spikes. *J. Gen. Physiol. 40: 735-752.*
- Galarraga, E., Bargas, J., Sierra, A., Aceves, J. (1989). The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Experimental Brain Research 75: 157-168.*
- Galarraga, E., Pacheco-Cano, M. T., Flores-Hernandez, J. V. & Bargas, J. (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Experimental Brain Research 100: 239-249.*
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Barral J. & Bargas J. (1997). Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca^{2+} conductance. *NeuroReport 8: 2183-2186.*
- Gerber G, Cerne R, & Randic M. (1991). Participation of excitatory amino acid receptors in the slow excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn. *Brain Res 561: 236 -251.*
- Golding NL, Jung HY, Mickus T. & Spruston N. (1999). Dendritic calcium spike initiation and repolarization are controlled by distinct potassium channel subtypes in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci 19: 8789-8798.*
- Golowasch J, Marder E. (1992). Ionic currents of the lateral pyloric neuron of the stomatogastric ganglion of the crab. *J Neurophysiol 67: 318 -331.*
- Guertin PA. & Hounsgaard J. (1998). NMDA-Induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles. *J Neurophysiol 80: 3380-3382.*
- Hausser M, Spruston N, Stuart GJ. (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science 290: 739-744.*
- Hernández-Lopez S, Bargas J, Surmeier JD, Reyes A. & Galarraga E. (1997). D_1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny by modulating an L-Type Ca^{2+} conductance. *J Neurosci 9: 3334 - 3342.*
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm, H. And Surmeier DJ. (2000). D_2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca^{2+} currents and excitability via a novel PLC[β] 1 -IP 3 -calcineurin-signaling cascade. *Journal of Neuroscience 20: 8987-8995.*
- Hell JW, Westenbroek RE, Breeze LJ, Wang KK, Chavkin C. & Catterall WA. (1996). N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons. *Proceed Nat Acad Sci USA 93: 3362-3367.*
- Herrling PL, Morris R, and Salt, T.E. (1983). Effects of excitatory amino acids and their antagonists on membrane and action potentials of cat caudate neurones. *Journal of Physiology 339, 207-222.*

- Heyward P, Ennis M, Keller A, Shipley MT. (2001). Membrane bistability in olfactory bulb mitral cells. *J Neurosci* **21**: 5311-5320.
- Hille B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Sunderland, MA, , pp. 607.
- Hirsch, J.A., Alonso, J.-M., and Reid, R.C. (1995). Visually evoked calcium action potentials in cat striate cortex. *Nature*. **378**: 612-616.
- Houchin, J. (1973). Porcion yellow electrodes for intracellular recording and staining of neurons in the somatosensory cortex of the rat. *J. Physiol.* **232**: 67-69.
- Hochman S, Jordan LM, Schmidt BJ. (1994). TTX-resistant NMDA receptor-mediated voltage oscillations in mammalian lumbar motoneurons. *J Neurophysiol* **72**: 2559-2562.
- Hounsgaard J, Hultborn H, Jespersen B, Kiehn O. (1984). Intrinsic membrane properties causing a bistable behaviour of alpha-motoneurons. *Exp Brain Res* **55**: 391-394.
- Hounsgaard J, Kiehn, O. (1985) . Ca dependent bistability induced by serotonin in spinal motoneurons, *Exp. Brain Res.* **57** 422-425.
- Hounsgaard J. & Keihn O. (1989). Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J Physiol* **414**: 265-282.
- Hounsgaard J, Mintz I. (1988). Calcium conductance and firing properties of spinal motoneurons in the turtle. *J Physiol* **398**: 591- 603.
- Hsiao C, Del Negro CA, Trueblood PR. & Chandler SH. (1998). Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* **79**: 2847-2856.
- Huang LY. (1987). Electrical properties of acutely isolated, identified rat spinal dorsal horn projection neurons. *Neurosci. Lett* **82**: 267-272.
- Huang L-Y. (1989). Calcium channels in isolated rat dorsal horn neurons, including labelled spinothalamic and trigeminothalamic cells. *J Physiol* **411**: 161-177.
- Hultborn H, Wigstrom H, Wangberg H. (1975). Prolonged activation of soleus motoneurons following a conditioning train in soleus 1 afferents—a case for a reverberating loop? *Neurosci. Lett* **1**: 147-152.
- Hyde I H. (1921). A micro-electrode and unicellular stimulation. *Biol. Bull.* **40**, 130-133.
- Izzo PN, Bolam JP. (1988). Cholinergic synaptic input to different parts of spiny striatonigral neurons in the rat. *J Comp Neurol.* **269**(2): 219-34.
- Jack, J.J.B., Noble, D. & Tsien, R.W. (1983). *Electric Current Flow in Excitable Cells*. Clarendon Press, Oxford UK.
- Jaffe, D.B., Johnston, D., Lasser-Ross, N., Lisman, J.E., Miyakawa, H., and Ross, W.N. (1992). The spread of Na spikes determines the pattern of dendritic Ca entry into hippocampal neurons. *Nature*. **357**: 244-246.
- Jiang MC, Liu L, Gebhart GF. (1999). Cellular properties of lateral spinal nucleus neurons in the rat L6-S1 spinal cord. *J Neurophysiol* **81**(6): 3078-86.
- Jog MS, Kubota Y, Connolly CI, Hillegaart V, Graybiel AM. (1999). Building neural representations of habits. *Science* **26**: 1745-1749.
- Johnson SW, & North RA. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Physiol* **12**(2): 483-8.

- Johnston D, Magee JC, Colbert CM, Christie BR. (1996). Active properties of neuronal dendrites. *Annu Rev Neurosci* **19**: 165-186.
- Kawaguchi, Y. (2001). Distinct firing patterns of neuronal subtypes in cortical synchronized activities. *Journal of Neuroscience* **21**: 7261-7272
- Kiehn O. (1991). Plateau potentials and active integration in the 'final common pathway' for motor behaviour. *Trends Neurosci* **14**: 68-73.
- Kiehn O, Eken T. (1997). Prolonged firing in motor units: evidence of plateau potentials in human motoneurons?. *J Neurophysiol* **78**: 3061-3068.
- Kiehn O. & Eken T. (1998). Functional role of plateau potentials in vertebrate motor neurons. *Curr Op Neurobiol* **8**: 746-752.
- Kiehn O, Harris-Warrick RM. (1992). Serotonergic stretch receptors induce plateau properties in a crustacean motor neuron by a dualconductance mechanism. *J Neurophysiol* **68**: 485-495.
- Kim HG. & Connors BW. (1993). Apical dendrites of the neocortex: correlation between sodium- and calcium-dependent spiking and pyramidal cell morphology. *J of Neurosci* **13**: 5301-5311.
- Kim YI. & Chandler SH. (1995). NMDA-induced burst discharge in guinea pig trigeminal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol* **74**: 334-346.
- Kita H. (1996). Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to neostriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neurosci* **70**: 925-940.
- Kitano K, Cateau H, Kaneda K, Nambu A, Takada M, Fukai T. (2002). Two-state membrane potential transitions of striatal spiny neurons as evidenced by numerical simulations and electrophysiological recordings in awake monkeys. *J Neurosci* **22**(12): RC230.
- Koschak A, Reime D, Huber I, Grabne M, Glossmann H, Engel J and Striessnig, J. (2001). α_{1D} ($Ca_v1.3$) subunits can form L-type Ca^{2+} channels activating at negative voltages. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 22100-22106.
- Kubota Y, Inagaki S, Shimada S, Kito S, Eckenstein F, Tohyama M. (1987). Neostriatal cholinergic neurons receive direct synaptic inputs from dopaminergic axons. *Brain Res.* Jun 9; 413(1): 179-84.
- Kunzle H. (1975). Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia: an autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain Res* **33**: 195-209.
- Lampl I, Reichova I, Ferster D. (1999). Synchronous membrane potential fluctuations in neurons of the cat visual cortex. *Neuron* **22**(2): 361-74.
- Larkum ME, Zhu JJ. & Sakmann B. (2001). Dendritic mechanisms underlying the coupling of the dendritic with the axonal action potential initiation zone of adult rat layer 5 pyramidal neurons. *J Physiol* **533**: 447-466.
- Laubach M, Wessberg J, Nicolelis MA. (2000). Cortical ensemble activity increasingly predicts behaviour outcomes during learning of a motor task. *Nature*. **405**(6786): 567-71.
- Lee RH, Heckman CJ. (1996). Influence of voltage-sensitive dendritic conductances on bistable firing and effective synaptic current in cat spinal motoneurons in vivo. *J Neurophysiol*. **76**(3): 2107-10.
- Lee RH. & Heckman CJ. (1998a). Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic variations in rhythmic firing patterns. *J Neurophysiol* **80**: 572-582.
- Lee RH. & Heckman CJ. (1998b). Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic variations in persistent inward currents. *J Neurophysiol* **80**: 583-593.

- Lee RH. & Heckman CJ. (2001). Essential role of a fast persistent inward current in action potential initiation and control of rhythmic firing. *J Neurophysiol* **85**: 472-475.
- Leznik E, Makarenko V, Llinás R. (2002). Electrotonically mediated oscillatory patterns in neuronal ensembles: an in vitro voltage-dependent dye-imaging study in the inferior olive. *Journal of Neuroscience*. **22**, 2804-2815.
- Llinás R, and Nicholson C (1971). Electroresponsive properties of dendrites and somata in alligator Purkinje cells. *J. Neurophysiol.* **34**: 532-551.
- Llinás R., and Hess R. (1976). Tetrodotoxin-resistant dendritic spikes in avian Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 2520-2523
- Llinás R, and Sugimori M. (1980). Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cells dendrites in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol.* **305**: 197-213.
- Llinás R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* **242**: 1654-1664.
- Lo FS. & Mize RR. (2000). Synaptic regulation of L-type Ca^{2+} channel activity and long-term depression during refinement of the retinocollicular pathway in developing rodent superior colliculus. *J Neurosci* **20**: RC58:1-6
- Malliani A. & Púrpura DP. (1967). Intracellular studies of the corpus striatum II. Patterns of synaptic activities in lenticular and entopeduncular neurons. *Brain Res* **6**: 341-354.
- Mao BQ., Hamzei-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R.C. & Yuste, R. (2001). Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* **32**: 883-898.
- Merchant H, Zainos A, Hernandez A, Salinas E, Romo R. (1997). Functional properties of primate putamen neurons during the categorization of tactile stimuli. *J Neurophysiol* **77**: 1132-1154.
- Mermelstein, H. Bito, K. Deisseroth, R.W. Tsien. (2000). Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J. Neurosci.* **20**: 266-273.
- Mills JD, Pitman RM. (1997). Electrical properties of a cockroach motor neuron soma depend on different characteristics of individual Ca components. *J Neurophysiol* **78**: 2455-2466.
- Miura M, Yoshioka M, Miyakawa H, Kato H. & Ito KI. (1997). Properties of calcium spikes revealed during GABA_A receptor antagonism in hippocampal CA₁ neurons from guinea pigs. *J Neurophysiol* **78**: 2269-2279.
- Morisset V, Nagy F. (1996). Modulation of regenerative membrane properties by stimulation of metabotropic glutamate receptors in rat deep dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* **76**: 2794-2798.
- Morisset V, Nagy F. (1998). Nociceptive integration in the rat spinal cord: role of nonlinear membrane properties of deep dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* **10**: 3642-3652.
- Nagy I, Maggi CA, Dray A, Woolf CJ, Urban L. (1993). The role of neurokinin and N-methyl-D-aspartate receptors in synaptic transmission from capsaicin-sensitive primary afferents in the rat spinal cord *in vitro*. *Neurosci* **52**: 1029-1037.
- Nambu A, Kaneda K, Tokuno H, Takada M. (2002). Organization of corticostriatal motor inputs in monkey putamen. *J Neurophysiol.* **88**(4): 1830-42.
- Nedergaard S, Flatman JA, Engberg I. (1993). Nifedipine- and omega-conotoxin-sensitive Ca^{2+} conductances in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones. *J Physiol* **466**: 727-47.

- Nicoll A, Larkman A, Blakemore C. (1992). EPSPs in rat neocortical pyramidal neurones *in vitro* are prolonged by NMDA receptor-mediated currents. *Neurosci Lett* **143**: 5-9.
- Nisenbaum ES. and Wilson CJ. (1995). Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *Journal of Neuroscience* **15**: 4449-4463.
- Nisenbaum ES, Wilson CJ, Foehring RC and Surmeier DJ. (1996). Isolation and characterization of a persistent potassium current in neostriatal neurons. *Journal of Neurophysiology* **76**: 1180-1194.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**: 462-465.
- Oakley JC, Schwandt PC. & Crill WE. (2001). Initiation and Propagation of Regenerative Ca^{2+} -Dependent Potentials in Dendrites of Layer 5 Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol* **86**: 503-513.
- Overton PG, Clark D. (1997). Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Rev* **25**: 312-334.
- Parent, Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1990 Jul; 13(7): 254-8. Review.
- Pearson K. y Gordon J. (2000). Locomotion. In: Principles of Neural Science (eds.: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M.). *McGraw-Hill, New York*. pp: 737-755.
- Pérez-Garci E, Bargas J and Galarraga E. (2003). The role of Ca^{2+} channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *NeuroReport* **14**: 1253-1256.
- Perrier JF, & Hounsgaard J. (2000). Development and regulation of response properties in spinal cord motoneurons. *Brain Research Bulletin* **53**: 529-535.
- Phelps PE, Houser CR, Vaughn JE. (1985). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol.* Aug **15**: 238(3): 286-307.
- Ping HX, Shepard PD. (1999). Blockade of SK-type Ca^{2+} -activated K^{+} channels uncovers a Ca^{2+} -dependent slow afterdepolarization in nigral dopamine neurons. *J Neurophysiol* **81**(3): 977-84.
- Plenz D, Aertsen A. (1996). Neural dynamics in cortex-striatum co-cultures--II. Spatiotemporal characteristics of neuronal activity. *Neurosci* **70**(4): 893-924.
- Plenz D, & Kitai ST. (1998). Up and down states in striatal medium spiny neurons simultaneously recorded with spontaneous activity in fast-spiking interneurons studied in cortex-striatum-substantia nigra organotypic cultures. *J Neurosci* **18**: 266-283.
- Pockberger H. (1991). Electrophysiological and Morphological properties of rat motor cortex neurons *in vivo*. *Brain Res.* **539**: 181-190.
- Pollack AE. (2001). Anatomy, physiology, and pharmacology of the basal ganglia. *Neurol Clin* **19**(3): 523-34, v. Review.
- Prescott TJ, Gurney K, Redgrave P. (2003). Basal Ganglia. En: "The Hand-Book of Brain Theory and Neural Networks", ed. por: M.A. Arbib. MIT Press. pp. 147-151.
- Purpura DP, and Shofer RJ. (1964). Cortical intracellular potentials during augmenting and recruiting responses. I. Effects on injected hyperpolarizing currents on evoked membrane potential changes. *J. Neurophysiol.* **27**: 117-132.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K. (1999) The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neurosci* **89**: 1009-1023.

- Rekling JC. & Feldman JL. (1997). Calcium-dependent plateau potentials in rostrals ambiguous neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J Neurophysiol* **78**: 2483-2492.
- Reyes A. (2001). Influence of conductances on the input-output properties of neurons. *Annual Review of Neurosci* **24**: 653-675.
- Ross WN, and Werman R. (1987). Mapping calcium transients in the dendrites of Purkinje cells from guinea-pig cerebellum in vitro. *J. Physiol.* **389**:319-336.
- Russo R.E. V, J. Hounsgaard. (1994). Short-term plasticity in turtle dorsal 21 horn neurons mediated by L-type Ca channels, *Neuroscience* **61** 191–197.
- Russo RE, Hounsgaard J. (1996). Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an *in vitro* preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol (Lond)* **493**: 39–54.
- Russo RE. & Hounsgaard J. (1999). Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **72**: 329-365.
- Ryu PD, Randic M. (1990). Low- and high-voltage-activated calcium currents in rat spinal dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* **63**: 273–285.
- Sakmann, B., and Neher, E. (1983). *Single channel recording* (New York: Plenum).
- Sanchez-Vives MV. & McCormick DA. (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* **3**: 1027-1034.
- Sandler VM, Puil E, Schwarz DWF. (1998). Intrinsic response properties of bursting neurons in the nucleus principalis trigemini of the gerbil. *Neurosci* **83**: 891–904.
- Schiller J & Schiller Y. (2001). NMDA receptor-mediated dendritic spikes and coincident signal amplification. *Current Opinion in Neurobiology* **11**: 343-348.
- Schiller J, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B. (1997). Calcium action potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal neurons in rat brain slices. *J Physiol (Lond)* **505**: 605-616.
- Schoenbaum G, Eichenbaum H. (1995). Information coding in the rodent prefrontal cortex. II. Ensemble activity in orbitofrontal cortex. *J Neurophysiol* **74**(2): 751-62.
- Schlosser B, ten Bruggencate G and Sutor B. (1999). Local disinhibition of neocortical neuronal circuits causes augmentation of glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the rat neostriatum in vitro. *Experimental Neurology* **157**:180-193.
- Schwartzkroin, P.A., and Slawski, M. (1977). Probable calcium spikes in hippocampus neurons. *Brain Res.* **135**:157-161.
- Schwindt P. & Crill WE. (1977). A persistent negative resistance in cat lumbar motoneurons. *Brain Res* **120**: 173-178.
- Schwindt PC.& Crill WE. (1980). Role of persistent inward current in motoneuron bursting during spinal seizures. *J Neurophysiol* **43**: 1296-1318.
- Schwindt PC, Crill WE. (1997). Local and propagated dendritic action potentials evoked by glutamate iontophoresis on rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **77**: 2466-2483.
- Schwindt PC. & Crill WE. (1998). Synaptically evoked dendritic action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **79**: 2432-2446.

- Seamans JK, Gorelova NA. & Yang CR. (1997). Contributions of voltage-gated Ca²⁺ channels in the proximal versus distal dendrites to synaptic integration in prefrontal cortical neurons. *Journal of Neurosci* **17**: 5936-5948.
- Shepard PD. & Stump D. (1999). Nifedipine blocks apamin-induced bursting activity in nigral dopamine-containing neurons. *Brain Res* **817**: 104-109.
- Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA. (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*. **423**: 288-293.
- Silva, L. R., Amitai, Y., Connors, B. W. Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* **251**: 432-435, 1991
- Song WJ. & Surmeier DJ. (1996). Voltage-dependent facilitation of calcium channels in rat neostriatal neurons. *J Neurophysiol* **76**: 2290-2306
- Spruston N, Schiller Y, Stuart G, and Sakmann B. (1995). Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science*. **286**: 297-300.
- Steriade M, Timofeev I. (2003) Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron*. **37**: 563-576.
- Spencer WA, and Kandel ER. (1961). Electrophysiology of hippocampal neurons: IV. Fast prepotentials. *J Neurophysiol*. **24**: 272-285.
- Stern EA, Kincaid AE. & Wilson CJ. (1997). Spontaneous subthreshold membrane potential fluctuations and action potential variability of rat corticostriatal and striatal neurons in vivo. *J Neurophysiol* **77**: 1697-1715.
- Stern EA, Jaeger D. & Wilson CJ. (1998). Membrane potential synchrony of simultaneously recorded striatal spiny neurons in vivo. *Nature* **394**: 475-478.
- Strick, P.L., Dum, R.P. & Picard, N. (1995). Macro-organization of the circuits connecting the basal ganglia with the cortical motor areas. In: *Models of Information Processing in the Basal Ganglia* (eds.: Houk, J.C., Davis, J.L., Beiser, D.G.) Mit Press, Cambridge MA. pp: 117-130.
- Stuart, G. J., Dodt, H.-U., and Sakmann, B. (1993). Patch clamp recording from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers. Arch.* **423**: 511-518.
- Stuart GJ, and Sakmann B. (1994). Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* **367**: 69-72.
- Svirskis G, Gutman A and Hounsgaard J. (2001). Electrotonic structure of motoneurons in the spinal cord of the turtle: inferences for the mechanisms of bistability. *Journal of Neurophysiology* **85**:391-398.
- Szabadics J, Lorincz A, Tamas G. (2001) Beta and gamma frequency synchronization by dendritic gabaergic synapses and gap junctions in a network of cortical interneurons. *Journal of Neuroscience*. **21**: 5824-5831.
- Tank D W, Sugimori, M, Connor JA., and Llinás RR.(1988). Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice. *Science*. **242**: 773-777.
- Timofeev I., Grenier F. and Steriade M. (2000). Impact of intrinsic properties and synaptic factors on the activity of neocortical networks in vivo. *Journal of Physiology Paris* **94**: 343-355.
- Thier P, Dicke PW, Haas R, Barash S. (2000). Encoding of movement time by populations of cerebellar Purkinje cells. *Nature*. **405(6782)**: 72-6.
- Tryba AK, Pena F, Ramirez JM. (2003) Stabilization of bursting in respiratory pacemaker neurons. *Journal of Neuroscience*. **23**: 3538-3546.

- Urban L, Randic M. (1984). Slow excitatory transmission in rat dorsal horn: possible mediation by peptides. *Brain Res* **290**: 336–341.
- Vergara R, Rick C, Hernández-López, S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E, Surmeier DJ and Bargas J. (2003). Membrane potential oscillations of striatal medium spiny neurons in a corticostriatal slice. *J Physiol. Enviado*.
- Viana di Prisco G, Pearlstein E, Robitaille R, Dubuc R. (1997). Role of sensory-evoked NMDA plateau potentials in the initiation of locomotion. *Science* **278**: 1122–1125.
- Wallen P. & Grillner S. (1987). N-methyl-d-aspartate receptor-induced, inherent oscillatory activity in neurons active during fictive locomotion in the lamprey. *J Neurosci* **7**: 2745-2755.
- Wang J. & O'Donnell P. (2001). D₁ dopamine receptors potentiate NMDA-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons. *Cereb Cortex* **11**: 452-462.
- Westenbroek RE, Hoskins L. & Catterall WA. (1998). Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* **18**: 6319-6330.
- West AR. & Grace AA. (2002). Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining in vivo intracellular recordings and reverse microdialysis. *J Neurosci* **22**: 294-304.
- Wickens JR, Wilson CJ. (1998). Regulation of action-potential firing in spiny neurons of the rat neostriatum in vivo. *J Neurophysiol.* **79(5)**: 2358-64.
- Wilson C J. (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. In: Chemical signaling in the basal ganglia. *Brain Res* **99**: 227-297.
- Wilson CJ. (1995).The contribution of cortical neurons to the firing pattern of striatal spiny neurons. In: Models of Information Processing in the Basal Ganglia (eds.: Houk, J.C., Davis, J.L., Beiser, D.G.) Mit Press, Cambridge MA. pp: 29-50
- Wilson CJ. and Kawaguchi, Y. (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *Journal of Neuroscience* **16**, 2397-2410.
- Wilson C J, Chang HT. & Kitai ST. (1983). Disfacilitation and long-lasting inhibition of neostriatal neuron in the rat. *Ex Brain Res* **51**: 227--235.
- Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM. (1992). Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* **8(1)**: 71-84.
- Wong RKS, Prince DA, and Basbaum AI (1979). Intradendritic recordings from hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 986-990.
- Woolf CJ, King AE. (1987). Physiology and morphology of multireceptive neurons with C-afferent fiber inputs in the deep dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *J Neurophysiol* **58**: 460–479.
- Xu W and Lipscombe, D. (2001). Neuronal Ca_v1.3α₁ L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *Journal of Neuroscience* **21**, 5944-5951.
- Yeterian EH, Van Hoesen GW.(1978). Cortico-striate projections in the rhesus monkey: the organization of certain cortico-caudate connections. *Brain Res.* Jan 6; **139(1)**: 43-63.
- Yoshimura M, Jessell TM. (1990). Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *J Physiol (Lond)* **430**: 315–335.

Yuste R, Gutnick MJ, Saar D, Delaney KD, and Tank DW. (1994). Calcium accumulations in dendrites from neocortical neurons: an apical band and evidence for functional compartments. *Neuron*. **13**:23-43.

Yuste R, and Denk W. (1995). Dendritic spines as basic units of synaptic integration. *Nature*. **375**: 682-684.

Zhang B, Harris-Warrick RM. (1995). Calcium-dependent plateau potentials in a crab stomatogastric ganglion motor neuron. I. Calcium current and its modulation by serotonin. *J Neurophysiol* **74**: 1929 –1937.

Zhang B, Wootton JF, Harris-Warrick RM. (1995). Calcium-dependent plateau potentials in a crab stomatogastric ganglion motor neuron. II. Calcium-activated slow inward current. *J Neurophysiol* **74**: 1938 –1946.

Anexo

ARTÍCULO PRINCIPAL DE LA TESIS.

Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice

R. Vergara, C. Rick*, S. Hernández-López*, J. A. Laville, J. N. Guzman, E. Galarraga, D. J. Surmeier* and J. Bargas

Department of Biophysics, Instituto de Fisiología Celular UNAM, Mexico City 04510, Mexico and *Department of Physiology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago 60611, USA

In a rat corticostriatal slice, brief, suprathreshold, repetitive cortical stimulation evoked long-lasting plateau potentials in neostriatal neurons. Plateau potentials were often followed by spontaneous voltage transitions between two preferred membrane potentials. While the induction of plateau potentials was disrupted by non-NMDA and NMDA glutamate receptor antagonists, the maintenance of spontaneous voltage transitions was only blocked by NMDA receptor and L-type Ca^{2+} channel antagonists. The frequency and duration of depolarized events, resembling up-states described *in vivo*, were increased by NMDA and L-type Ca^{2+} channel agonists as well as by GABA_A receptor and K⁺ channel antagonists. NMDA created a region of negative slope conductance and a positive slope crossing indicative of membrane bistability in the current–voltage relationship. NMDA-induced bistability was partially blocked by L-type Ca^{2+} channel antagonists. Although evoked by synaptic stimulation, plateau potentials and voltage oscillations could not be evoked by somatic current injection – suggesting a dendritic origin. These data show that NMDA and L-type Ca^{2+} conductances of spiny neurons are capable of rendering them bistable. This may help to support prolonged depolarizations and voltage oscillations under certain conditions.

(Resubmitted 4 July 2003; accepted after revision 4 September 2003; first published online 5 September 2003)

Corresponding author J. Bargas: Instituto de Fisiología Celular UNAM, PO Box 70-253, Mexico City DF 04510, Mexico.
Email: jbargas@ifisiol.unam.mx

The striatum is a component of the basal ganglia circuitry controlling movement, associative learning and procedural memory (e.g. Beiser & Houk, 1998). Its output neurons are the medium spiny neurons (Wilson, 1993). *In vivo*, these neurons move between hyperpolarized ‘down-states’ and depolarized ‘up-states’ in response to cortical excitatory synaptic input (Wilson, 1993; Stern *et al.* 1997). We wanted to know whether similar voltage fluctuations could be induced *in vitro*.

In a variety of cell types, the generation of stable depolarized states depends upon a combination of synaptic inputs and intrinsic conductances (e.g. Lee & Heckman, 1998a; Russo & Hounsgaard, 1999). Persistent or slowly inactivating Ca^{2+} currents (Seamans *et al.* 1997; Carlin *et al.* 2000; Perrier & Hounsgaard, 2000) and slowly inactivating sodium currents (Schwindt & Crill, 1998; Hsiao *et al.* 1998; Larkum *et al.* 2001) figure prominently in the maintenance of depolarized plateau potentials in many neurons. These currents create a region of negative slope conductance and a second stable point in the current–voltage relationship (Booth *et al.* 1997; Kiehn & Eken, 1998; Hsiao *et al.* 1998; Lee & Heckman, 1998b; Schiller & Schiller, 2001; Svirskis *et al.* 2001). In this situation, neurons become bistable, allowing transient depolarizing synaptic inputs to produce prolonged depolarizations and sustained periods of spiking.

Sustained periods of spiking are the cellular correlate of working memory (Romo *et al.* 1999; Compte *et al.* 2000; Egorov *et al.* 2002) and the neostriatum with prefrontal and motor cortices are posited as the basic circuit for procedural memory (Beiser & Houk, 1998).

Often, bistability emerges in response to agonists or neuromodulators that enhance NMDA and inward currents (Guertin & Hounsgaard, 1998; Perrier & Hounsgaard, 2000; Wang & O’Donnell, 2001; Schiller & Schiller, 2001; Egorov *et al.* 2002). One of these inward currents is carried by L-type Ca^{2+} channels (Hounsgaard & Kiehn, 1989) and L-type Ca^{2+} channels are known to be modulated by dopamine in neostriatal neurons (Hernandez-Lopez *et al.* 1997, 2000). Two types of these channels have been located in the somato-dendritic membrane of many neurons: Cav1.2 and Cav1.3 (Westenbroek *et al.* 1998; Xu & Lipscombe, 2001). Cav1.3 L-type channels may be particularly important in this regard as they activate at subthreshold membrane potentials (Koschak *et al.* 2001; Xu & Lipscombe, 2001). Striatal medium spiny neurons express mRNA for both subtypes and have a prominent L-type current at subthreshold membrane potentials (Bargas *et al.* 1994; Olson *et al.* 2001). The contribution of this current to shape the normal firing pattern (Galarraga *et al.* 1989, 1994; Perez-Garci *et al.* 2003) and the synaptic responses

(Galarraga *et al.* 1997; Akopian & Walsh, 2002) are well-established. Enhancement or block of these currents with dihydropyridine L-type channel agonists and antagonists facilitates or blocks, respectively, plateau potentials or their underlying currents in spiny neurons (Galarraga *et al.* 1997; Hernandez-Lopez *et al.* 1997, 2000; Cepeda *et al.* 1998; Akopian & Walsh, 2002).

Therefore, we asked whether synaptic activation could be elicited in conditions that were permissive for the participation of these inward currents. In addition, we wanted to explore whether the participation of these inward currents would favour the generation of spontaneous voltage oscillations. In slices that preserve some measure of corticostriatal connectivity, it was seen that transient stimulation of the cortex is capable of inducing long-lasting plateau potentials in spiny neostriatal neurons (Bargas *et al.* 1991; Galarraga *et al.* 1997; Schlosser *et al.* 1999). Similar plateau potentials have been observed *in vivo* (Herrling *et al.* 1983; Wilson *et al.* 1983). It was also observed that, upon repetitive stimulation, plateau potentials were often followed by spontaneous fluctuations between two different membrane potentials. The probability of these transitions was strongly modulated by the enhancement of inward currents known to underlie bistability in several cell types – namely L-type Ca^{2+} and NMDA currents.

METHODS

Preparation

Young Wistar rats (18 days old) were anaesthetized with ether and the brain was quickly removed into ice-cold saline (4°C) containing (mM): 123 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 25 NaHCO₃ and 11 glucose (25°C; pH 7.4 with NaOH, 298 mosmol l⁻¹ with glucose; saturated with 95% CO₂/5% O₂). Parasagittal neostriatal slices (300 μm thick) were cut in 4°C saline using a vibratome. Slices were then transferred to saline at room temperature (21–25°C) where they remained for at least an hour before recording. All procedures conformed with the Animals Scientific Procedures Committee guidelines of the Instituto de Fisiología Celular and the Northwestern University. Individual slices were transferred to a plexiglass recording chamber and superfused with the above saline (3–6 ml min⁻¹) at room temperature (21–25°C). The cationic concentration of this saline favours the appearance of up-states *in vitro* (Sanchez-Vives & McCormick, 2000).

Whole-cell recordings

Standard whole-cell techniques using an Axoclamp 2B amplifier were employed. Micropipettes were pulled from borosilicate glass and fire polished (2–7 MΩ). The internal solution contained (mM): 115 KH₂PO₄, 2 MgCl₂, 10 Hepes, 0.5 EGTA, 2 Na₂ATP and 0.2 Na₂GTP (pH 7.2, 275 mosmol l⁻¹). Neurons roughly 100–150 μm below the surface were chosen for recording. Preliminary experiments used biocytin injections made focally into extracellular space in slice preparations maintained *in vitro* in the recording chamber (6–8 h). In conditions similar to those used for electrophysiological recordings, cortical injections of biocytin revealed the trajectory of several corticostriatal fibres crossing through the corpus callosum in the slice. Our recordings were carried out in those areas of the dorsal striatum that most frequently receive an abundance of those fibres. A commonly used

arrangement of recording and stimulating electrodes is indicated in Fig. 1A. The stimulation of cortical white matter or cortical sensory motor areas was performed with concentric bipolar electrodes (12 μm at the tip). Stimuli were controlled through the computer interface (see below) with a LabView program (National Instruments, Austin, TX, USA). Isolation units between the computer and the stimulating electrodes were used to change stimulus parameters during the experiment. Neurons with negative resting membrane potentials (<–70 mV) and input impedance about 200 MΩ were chosen for further study. Voltage steps or voltage ramp commands were used to perform current–voltage relationships (*I*–*V* plots). Synaptic potentials and orthodromic responses were recorded in control saline and during the superfusion with *N*-methyl-D-aspartate (NMDA: 5–25 μM). All recordings were filtered at 1–3 KHz and digitized with an Instrutech digitizer (Instrutech Corp., Long Island, NY, USA) and an AT-MIO-16E10 (National Instruments) with a DAQ board (NI-DAQ) (National Instruments) in a PC. The Instrutech digitizer was connected to a tape recorder for off-line analysis, while the NI-DAQ board was used to save data directly to a computer. On-line data acquisition used custom LabView programs.

Digitized data were imported for analysis and graphing with commercial software (Igor Pro, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). Non-parametric, distribution-free statistical procedures (Systat, SPSS, Chicago, IL, USA) were used to determine the significance of differences in group measures.

Drugs used were: 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoline disodium salt (CNQX), D-(–)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5), *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), nicardipine, nitrendipine, BayK 8644, tetraethylammonium (TEA), picrotoxin and bicuculline (Sigma-Aldrich-RBI, St Louis, MO, USA).

RESULTS

Cortical stimulation is capable of evoking plateau potentials and voltage oscillations in medium spiny neurons

In a parasagittal slice (Fig. 1A), stimulation of the cortical grey matter was capable of evoking long-lasting depolarizations with repetitive action potentials in nearby medium spiny neurons (Bargas *et al.* 1991). As shown in Fig. 1B, subthreshold EPSPs decayed rapidly back to baseline. Increasing the stimulus intensity (more than two times threshold) resulted in the generation of a long-lasting plateau potential with repetitive firing (Fig. 1B). The amplitude of EPSPs evoking plateaus was only marginally larger (as seen with a somatic electrode) than that of near threshold EPSPs. Plateau potentials lasting 200–800 ms in response to single or paired cortical stimulus were seen in about half of the trials (cf. Fig. 7A). Activation of plateau potentials depended on non-NMDA receptor-mediated synaptic transmission, as cortical stimulation was without effect in the presence of CNQX (10 μM, *n* = 25). When the strength of cortical stimulation was increased above three times threshold, the initial plateau potential could be followed by oscillations of the membrane potential (Fig. 1C) that lasted several seconds without any further stimulus. Some of these oscillations exhibited firing. As shown below, this type of behaviour

was more commonly elicited with a stimulus train (Figs 4B and 5C) or a pair of suprathreshold stimulus (Figs 2 and 3). Pyramidal cells in the sensorimotor cortex can also respond with a sequence of voltage oscillations after a stimulus train (Fig. 1D, 30 Hz for 500 ms, upward deflections

signalled by the arrow are the stimulation artifacts) (Shu *et al.* 2003). In contrast to tonic firing encountered in spiny cells after intracellular current injections at the soma (Fig. 1E), the firing during the depolarizing transitions, or up-states, was irregular in nature (Fig. 1F; cf. Cossart *et al.*

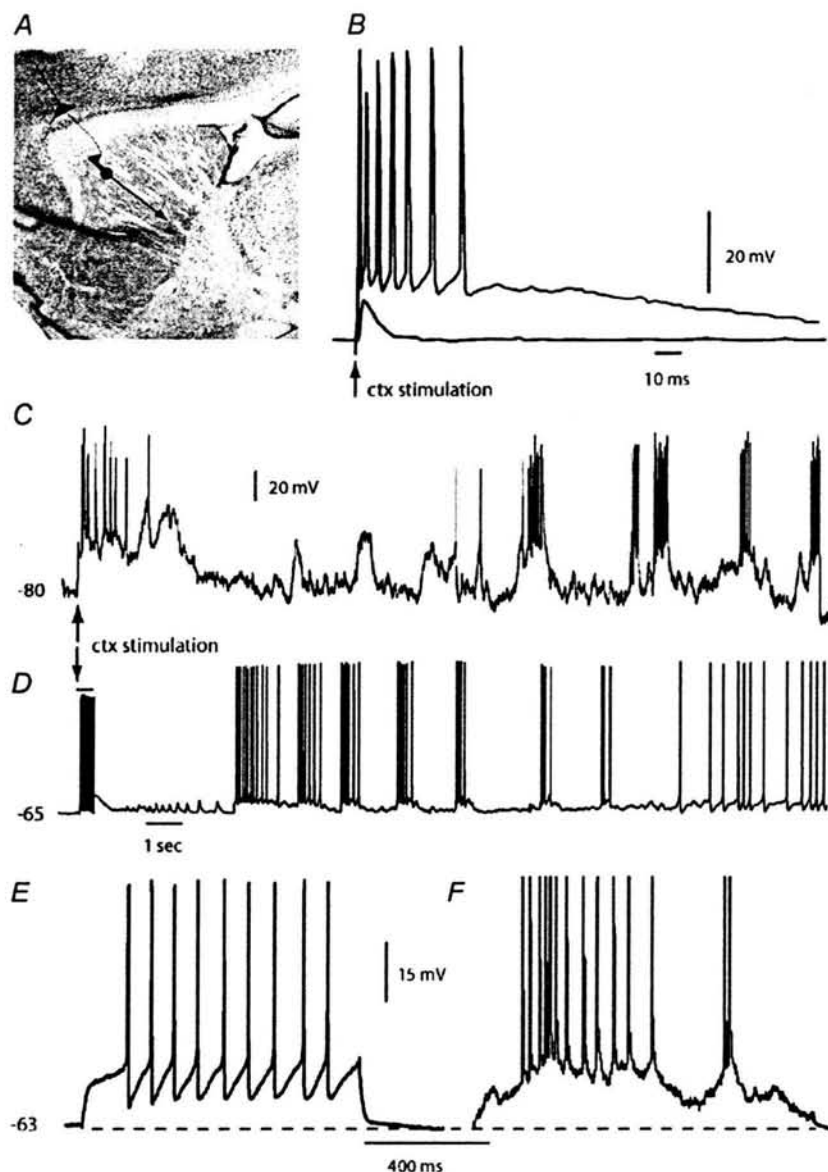


Figure 1. Cortical stimulation evoked long-lasting plateau potentials with repetitive firing in medium spiny neurons

A, scheme of a brain slice showing the connection stimulated. The stimulating electrode was placed in the cortical grey or white matter (pyramidal cell scheme), and the recording electrode on the dorsal neostriatum (neostriatal cell scheme). B, orthodromic response of a spiny neostriatal neuron to single subthreshold and suprathreshold stimulus in the cortex. Notice plateau potential with repetitive discharge after suprathreshold stimulus. C, a three times threshold cortical stimulus now evokes a plateau potential followed by several membrane potential oscillations, some of which exhibit the firing of action potentials. This behaviour is more commonly elicited with a stimulus train (see Fig. 4B). The time scale is different in B and C. D, a stimulus train can also evoke an arrhythmic sequence of voltage oscillations in pyramidal cells (sensorimotor cortex, layer 5). E, firing of a neostriatal neuron after an intracellular current injection at the soma (current stimulus not shown). F, firing of a neostriatal neuron during a spontaneous depolarization or 'up-state'. Action potentials are clipped due to digitization procedures in E and F.

2003). To our knowledge, this is the first report showing that membrane potential oscillations can be evoked in a neostriatal slice preparation. Synaptic activation from the cortex generates plateau potentials in about half of neostriatal cells ($n = 40/80$), and in about 10% of the cells exhibiting plateau potentials voltage oscillations could ensue. In addition, voltage oscillations could also be recorded in some cells in the absence of stimulus (e.g. Fig. 5). The appearance of voltage oscillations after a cortical stimulus suggested that this type of response was physiological, although rather uncommon in the slice. Some of the following experiments attempted to find conditions that further facilitate the appearance of voltage oscillations in spiny neurons recorded *in vitro*.

In many occasions, slow repetition (0.1 Hz) of a cortical stimulus that initially only evoked a plateau potential (two to three times threshold) frequently resulted in the emergence of nominally autonomous oscillations that persisted for many minutes. An example is shown in Fig. 2. Here, the initial cortical stimulation elicited a plateau potential with repetitive firing (Fig. 2A). The third stimulation elicited not only the initial response but also a later depolarization that was sub-threshold (Fig. 2B). The

sixth stimulation elicited a more prolonged initial plateau with discharge and a later plateau also with discharge that lasted over 1 s (Fig. 2C). This second plateau was followed by membrane potential oscillations that, once initiated, continued without overt cortical stimulation (Fig. 2D) for several minutes. During these nominally autonomous, aperiodic oscillations, the membrane potential distribution was distinctly bimodal (Fig. 2E) (Wilson & Kawaguchi, 1996; Stern *et al.* 1997). However, the membrane potential of the nominal down-state mode varied considerably in these *in vitro* preparations (-80 to -65 mV), in contrast with the *in vivo* situation. Nonetheless, the depolarized mode was always near spike threshold (-55 to -50 mV). A scatter plot of the two modes in a sample of neurons ($n = 7$) is shown in Fig. 2F.

Although synaptic stimulation evoked plateau potentials that outlasted stimulus duration (Figs 1 and 2) and that could be followed by membrane potential oscillations, depolarizing current injections at the soma were unable to elicit this behaviour (Fig. 1E). Somatic current injection could induce plateau potentials only from depolarized holding potentials (> -60 mV; not shown but see Hernandez-Lopez *et al.* 1997, 2000). This is in contrast with the

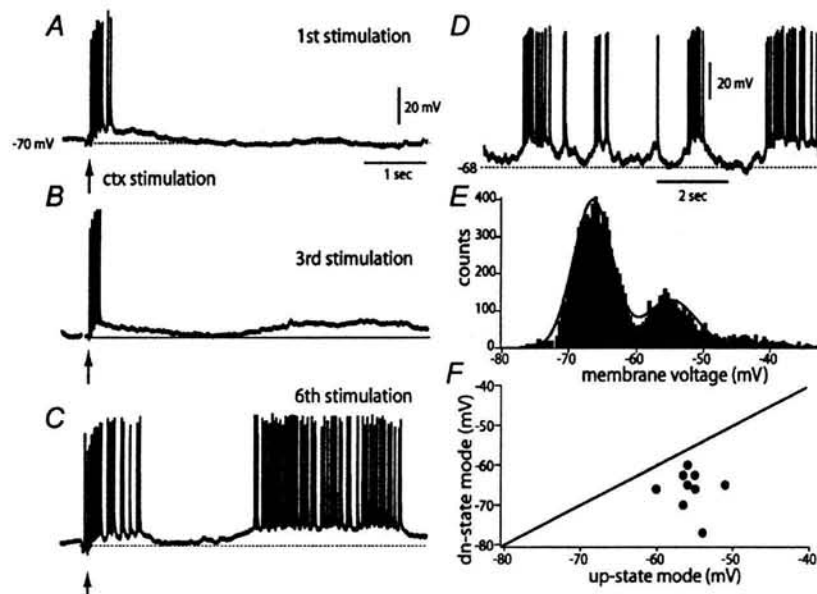


Figure 2. Evoked oscillation of the membrane potential after repetitive cortical stimulation

A, a pair of cortical stimuli (arrow) produces a plateau potential similar to that depicted in Fig. 1 (cf. time scale). B, repetition of the stimulus at 0.1 Hz produced a late subthreshold depolarization after the plateau potential produced by the third stimulus. C, continuous repetition of the same stimulus induced a suprathreshold late depolarization after the plateau potential evoked by the sixth stimulus. D, a continuous oscillation of the membrane potential followed this later plateau (see change in time scale, action potentials are clipped or incomplete due to digitization) without any further cortical stimulus. Several cells exhibited a tendency to slowly depolarize but continued to exhibit voltage oscillations for several minutes without overt cortical stimulation. E, an all point histogram of the membrane potential is shown for this cell. Notice Gaussian distributions around two different membrane potential values. F, a scatter plot for two-state membrane potential is shown for a sample of cells. This experiment was performed in the absence of NMDA. However, in other cells, NMDA greatly facilitated the appearance of membrane potential oscillations after the initial, evoked, plateau potential.

situation found in other types of neuron (Hsiao *et al.* 1998; Lee & Heckman, 1998a; Kiehn & Eken, 1998; Russo & Hounsgaard, 1999; Egorov *et al.* 2002). These observations are consistent with the proposition that the somatic membrane of medium spiny neurons is not bistable (Wilson & Kawaguchi, 1996; Stern *et al.* 1997). However, since most synaptic inputs are located in the dendrites (Wilson, 1993), it is possible that it is the dendritic membrane, not the somatic, that expresses the ion channel machinery capable of producing the plateau potentials observed after cortical stimulation. If this were the case, summation of synaptic inputs, should efficiently activate intrinsic inward conductances in the dendrites due to their temporal profile (Larkum *et al.* 2001). Thus, a pair of synaptic inputs should be particularly effective in evoking plateau potentials. In agreement with this view, a pair of near-threshold stimuli delivered in rapid succession evoked a plateau potential when the inter-stimulus interval was less than 50 ms (Fig. 3A). On the other hand, membrane depolarization to -60 mV during a pair of stimuli, enhanced the second synaptic response (Fig. 3B, top) (see Galarraga *et al.* 1997; Akopian & Walsh, 2002), whereas hyperpolarization to -70 mV led to paired pulse depression of the same responses. At -70 mV, the generation of prolonged depolarizations needed stronger stimulus strength (Fig. 3B, bottom). Finally, Fig. 3C shows that once membrane potential oscillations were activated by cortical stimulation (as in Fig. 2D), a strong hyperpolarization (ca. -90 mV) disrupted the generation of the oscillations. However, notice that oscillations continued during a brief time although their amplitude and duration were reduced. Hyperpolarization led to a positively skewed membrane potential distribution, and the elimination of the second 'preferred' state and bimodality (Fig. 3C, bottom). Taken together (Figs 1–3), these experiments suggest that synaptic activation induce the operation of voltage-dependent conductances (Bargas *et al.* 1991; Galarraga *et al.* 1997; Cepeda *et al.* 1998; Akopian & Walsh, 2002).

NMDA receptor activation promotes cortically evoked plateau potentials

Previous studies have implicated NMDA receptors in the potentiation of synaptic and oscillatory responses in medium spiny neurons, particularly at depolarized membrane potentials (Herrling *et al.* 1983; Cherubini *et al.* 1988; Galarraga *et al.* 1997; Cepeda *et al.* 1998; Akopian & Walsh, 2002). By potentiating α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate/kainate (AMPA/KA) receptor mediated synaptic responses, NMDA receptors may contribute to generate dendritic plateau potentials. If NMDA receptors in the dendritic region depolarized by the synaptic input are not saturated, the addition of NMDA to the bath should enhance the synaptic response (Schiller & Schiller, 2001). To explore this possibility, the ability of exogenous NMDA to potentiate near threshold synaptic responses was examined. Figure 4A (top) shows

records of a neuron in which the stimulus strength of a pair of cortical stimuli was adjusted so that the first EPSP was subthreshold and the second EPSP evoked a single spike to decay rapidly back to the resting membrane potential. This response was completely abolished by the AMPA receptor antagonist CNQX ($10 \mu\text{M}$; $n = 25$, not shown). When NMDA ($25 \mu\text{M}$) was added to the bath and the stimulus protocol repeated, the response became more prolonged, ostensibly mimicking the effect of increasing stimulus strength. This suggests that NMDA was acting to potentiate only the synaptic responses that were strong enough to produce local relief from Mg^{2+} blockade. Further, this result suggests that synaptic suprathreshold stimulation may be capable of activating NMDA synaptic receptors, and, in this way, elicit plateau potentials.

Next, the impact of NMDA on the generation of membrane potential oscillations was examined. Bath application of NMDA (10 – $25 \mu\text{M}$) enhanced the ability of cortical

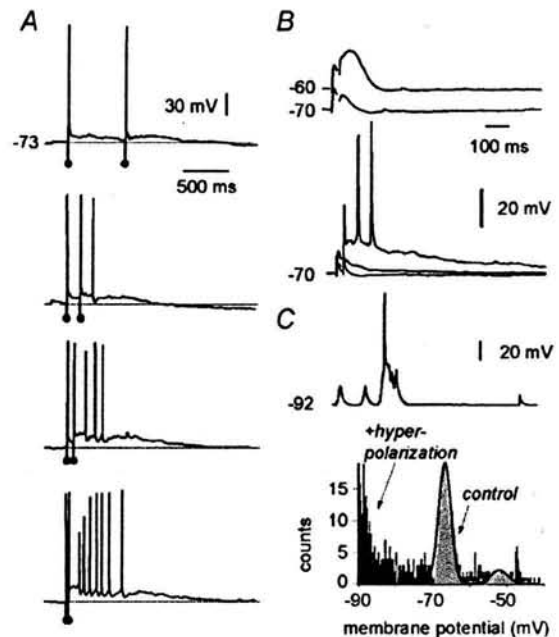


Figure 3. Plateau potentials are easily evoked after paired pulse stimulation

A, from top to bottom, the time interval between a pair of cortical stimuli was reduced without changing the stimulus strength. Notice a prolonged depolarization capable of sustaining repetitive firing after the briefer interval. B, the responses to a pair of subthreshold stimuli are shown. They were recorded at two different holding potentials. Paired-pulse facilitation is shown at -60 mV, and depression at -70 mV (top). However, if stimulus strength was increased, a prolonged depolarization could be elicited at -70 mV (bottom). This was never obtained by depolarizing the soma with current injections. C, a cell was hyperpolarized to -92 mV (top) while having voltage oscillations, as in Fig. 2D. Oscillations were reduced in both duration and amplitude to finally stop after this manoeuvre. An all point histogram (bottom) revealed bimodality of the membrane potential at -70 mV, but only a single peak at -92 mV.

stimulation to induce voltage oscillations in medium spiny neurons. An example is shown in Fig. 4B. In the absence of NMDA, a brief subthreshold train of stimuli (30 Hz for 500 ms, upward deflections signalled by the arrow are the simulation artifacts) from the cortex evoked only small synaptic depolarizations in the recorded neuron (Fig. 4B, control). This stimulation was clearly subthreshold to produce plateau potentials. On the other hand, NMDA alone (25 μM) did not induce voltage oscillations or plateaus (Fig. 4B, +NMDA). However, the same cortical stimulus in the presence of NMDA was able to induce oscillations in the membrane potential (Fig. 4B two continuous traces at bottom). Oscillations appeared after a latency of seconds but then persisted for minutes without additional cortical stimulation. Similar results were obtained in 30 out of 50 neurons. In 5 out of 50 neurons, NMDA induced voltage oscillations without overt cortical stimulation. In four neurons suprathreshold cortical stimulation without NMDA was enough to elicit both plateau potentials and voltage oscillations (vg. Fig. 1C). This is in contrast to the *in vivo* situation in which NMDA alone is capable of eliciting voltage oscillations in most instances (Herrling *et al.* 1983), suggesting that cortical synaptic activity onto spiny cells is much lower *in vitro*. In three other neurons, spontaneous voltage oscillations were seen without the addition of NMDA or cortical stimulation (see below).

The emergence of voltage oscillations in the presence of NMDA may be linked to alterations in the current–voltage relationship of medium spiny neurons in the dendritic regions where synaptic NMDA receptors are present (Schiller & Schiller, 2001). In many neurons, NMDA induces a region of negative slope conductance and a second crossing, with positive slope, of the zero-current axis by the current–voltage relationship. This is the landmark of membrane potential bistability (Booth *et al.* 1997; Kiehn & Eken, 1998; Schiller & Schiller, 2001; Svirsakis *et al.* 2001). To determine whether NMDA can act in this way in medium spiny neurons, neurons were subjected to somatic voltage clamp and ramped from -80 to 0 mV in 2 s in the presence and absence of NMDA. A typical result is shown in Fig. 4C. In the absence of NMDA at this ramp speed, there was only a small region in which the current–voltage relationship (I – V plot) had a negative slope as seen from the soma (cf. I – V plot hysteresis in Galarraga *et al.* 1994). There was not a second stable point evident from the soma. However, after the addition of NMDA (10–25 μM), a negative slope region was frequently present and a second, positive slope crossing of the zero-current axis was apparent (Fig. 4C +NMDA; $n = 9/10$; Schiller & Schiller, 2001). Similar results were obtained with voltage steps ($n = 5$; see Fig. 7C). However, the NMDA-induced negative slope region was at much more

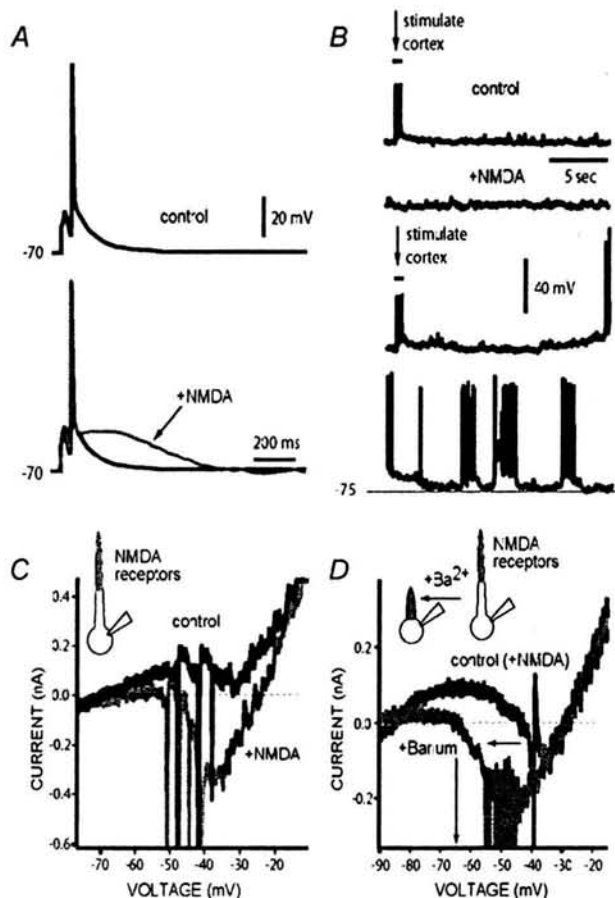


Figure 4. NMDA facilitates plateau potentials and membrane potential oscillations

A, a pair of synaptic responses was evoked with cortex stimulation. Only the second EPSP reached threshold (control). Addition of NMDA (25 μM) increased the duration of the second response and produced a plateau potential. Thus, NMDA mimicked an increase in stimulus strength (+NMDA). B, a train of orthodromic subthreshold stimuli were given at the cortex (arrow signals upward deflections of stimulus artifacts). The response was subthreshold to produce any plateau or oscillatory response (control). Superfusion with NMDA (25 μM) without a cortical stimulus did not produce oscillatory responses in most cases (+NMDA). However, the combined administration of a cortical stimulus and NMDA evoked membrane potential oscillations after a variable latency (two continuous traces at bottom). C, a 2 s ramp was given at the soma and the whole current response plotted against this voltage command. Control response shows firing of unclamped action currents but no crossings of the zero current axis. Addition of NMDA (20 μM) facilitated a negative slope conductance region, and a double crossing of the zero current axis, indicative of bistability (+NMDA). D, reduction of the electrotonic length with Ba^{2+} , shifted the first crossing of the zero-current axis and the negative slope conductance region to the left in the voltage axis. This suggests that the origin of bistability is located on the dendrites. The graph also shows the inward rectifier block by Ba^{2+} .

depolarized potentials than one would predict on the basis of the current clamp recordings where the up-state is near -50 mV (Booth *et al.* 1997). A potential explanation for the differences between these two results is that the bistable region induced by NMDA was dendritic; therefore, it was electrotonically remote from the somatic electrode. Certainly, the vast majority of glutamatergic synapses – and presumably NMDA receptors – are dendritic in medium spiny neurons and hundreds of microns from the soma (Wilson, 1993). If this were relevant, shortening the electrotonic structure of medium spiny neurons should bring these synaptic regions closer to the soma and reduce the differences (Reyes *et al.* 1998). Besides leak channels, the principal channels governing the electrotonic structure of medium spiny neurons at hyperpolarized membrane potentials are members of the Ba^{2+} -sensitive Kir_2 family (Galarraga *et al.* 1994; Mermelstein *et al.* 1998; Reyes *et al.* 1998). In agreement with this hypothesis, the addition of Ba^{2+} ($200 \mu M$) to the bath dramatically shifted the negative slope crossing of the zero current axis (modal shift = -22 mV, $n = 4$). In contrast, the second positive slope crossing was not significantly shifted by the addition of Ba^{2+} in most of these neurons, as for the neuron illustrated in Fig. 4D (modal shift = -2 mV, $n = 4$); as one might predict based upon the ability of depolarization activated K^+ channels to limit depolarization and lengthen the electrotonic length of the dendrites in these cells (Nisenbaum *et al.* 1996; Bargas *et al.* 1999). To conclude, the activation of NMDA receptors can induce changes in the $I-V$ plot of medium spiny neurons that allow the establishment of membrane potential bistability. These changes most probably occur at the dendritic arbor. But, do these changes take place during spontaneous activity or in response to cortical stimulation?

When NMDA is present in the extracellular space it can bind to its receptors, which only need a brief depolarization to induce sustained periods of activity. In the presence of chaotic synaptic inputs, this may lead to voltage oscillations of the membrane potential (Schiller & Schiller, 2001). Figure 5 illustrates recordings from a neuron which exhibited spontaneous voltage oscillations a few seconds after obtaining the whole-cell configuration, that is, without cortical stimulation or exogenous NMDA (control). Addition of the NMDA receptor antagonist, AP5 ($50 \mu M$), to the bath saline abolished the voltage oscillations (Fig. 5B, +AP5), suggesting that this preparation had enough endogenous glutamate capable of activating NMDA receptors. However, wash-out of AP5 was not enough to restore the oscillations. Nonetheless, if $10 \mu M$ NMDA was added to the bath saline, together with cortical stimulation (arrow, 30 Hz for 500 ms), the oscillations could be re-established (Fig. 5C). AP5 blocked all voltage oscillations in two cells that exhibited this behaviour spontaneously and in 8 out of 10 cells in which oscillations were produced by cortical stimulation and NMDA

($10-25 \mu M$; Fig. 5D). In two cells, short lasting oscillations could still be induced after AP5 (Cossart *et al.* 2003). It is concluded that, as in many other neuron types, NMDA receptors are important in producing bistability and spontaneous or evoked voltage oscillations (Figs 4 and 5). The experiments suggest that these oscillations represent a physiological phenomenon and that exogenous NMDA only facilitates it; perhaps, by replacing the loss of convergent synaptic inputs. Since NMDA receptors are important for the synaptic response of these neurons (Cherubini *et al.* 1988), its activation may possible help to

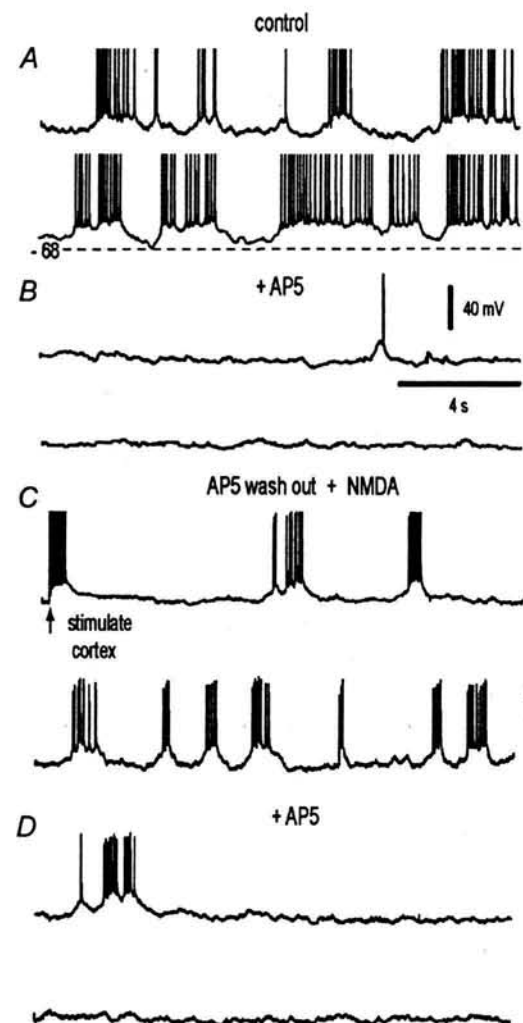


Figure 5. AP5 blocks membrane potential oscillations

A, representative sweeps of spontaneous (in the absence of cortical stimulus or NMDA) membrane potential oscillations recorded in a neostriatal neuron (control). Action potentials are clipped or incomplete due to digitizing procedures. B, addition of AP5 ($50 \mu M$) in the bath saline blocked the membrane potential oscillations (+AP5). C, membrane potential oscillations could be restored after cortical stimulation and addition of NMDA ($10 \mu M$) during AP5 wash-out (AP5 wash-out + NMDA). D, AP5 could block voltage oscillations induced by cortical stimulation and NMDA in a sample of cells as this one (+AP5 traces at bottom).

the generation of plateau potentials and the subsequent voltage oscillations (Herrling *et al.* 1983). This activity can be triggered by endogenous or exogenous agonists.

Finally, the addition of the K⁺ channel blocker TEA (1 mM) (in the presence of 10–25 μ M NMDA) increased the number of neurons in which cortical stimulation evoked similar voltage oscillations (not shown; see Nisenbaum *et al.* 1996).

CNQX did not alter membrane potential oscillations once they start

Surprisingly, and despite of the fact that the AMPA receptor antagonist CNQX blocked the plateau potential evoked by cortical stimulation, Fig. 6 illustrates that once the membrane potential oscillations began (Fig. 6A), CNQX (10 μ M) failed to terminate them (Fig. 6B). The duration of up-states was 1.1 ± 0.11 s in the control and 1.2 ± 0.12 s in the presence of CNQX (NS; $n = 7$; see box plots in Fig. 6C). Neither frequency nor down-state membrane potential changed significantly after CNQX. These results suggest that, in the present conditions, AMPA transmission is required to induce the initial cortically evoked plateau potentials, but not necessary for the maintenance of the subsequent voltage oscillations. It is then concluded that other synaptic components are capable of maintaining the oscillations (e.g. Szabadics *et al.* 2001; Cossart *et al.* 2003; Kilb & Luhmann, 2003).

L-type Ca²⁺ channels promote plateau potential generation

As mentioned above, in other neuron types L-type Ca²⁺ channel currents are major regulators of bistability. Previous work has shown that L-type Ca²⁺ channels in striatal medium spiny neurons are essential for the expression of their characteristic tonic firing pattern, input–frequency function and firing threshold (Perez-Garci *et al.* 2003). They are also necessary to promote the generation of plateau potentials from relatively depolarized holding potentials if elicited from the soma (–60 to –55 mV) (Hernandez-Lopez *et al.* 1997, 2000). Finally, L-type Ca²⁺ currents are known to potentiate the synaptic activation of NMDA receptors in medium spiny neurons (Galarraga *et al.* 1997; Cepeda *et al.* 1998; Akopian &

Walsh, 2002). But do L-type Ca²⁺ currents play a role in the generation of synaptically evoked plateau potentials? Do they participate in the generation of membrane potential oscillations in response to cortical stimulation? To help answer these questions, the ability of L-type Ca²⁺ channel antagonists to suppress evoked plateau potentials was examined. Figure 7A (top) shows a prolonged plateau potential evoked in a medium spiny neuron by paired suprathreshold cortical stimulation (Kiehn & Eken, 1998). The application of the L-type Ca²⁺ channel antagonist, nitrendipine (5 μ M) (Fig. 7A +nitrendipine), reduced the plateau potential in this and other cells tested (control plateau duration 750 ± 112 ms, $n = 6$ vs. 208 ± 98 ms, $n = 4$; $P < 0.01$; Mann-Whitney U test). Similar results were obtained with the L-type channel antagonists nimodipine (5 μ M, $n = 3$) and nicardipine (5 μ M, $n = 2$). Addition of the NMDA receptor antagonist, AP5 (50 μ M), in the presence of the L-type channel antagonists, blocked the remaining depolarization and revealed the underlying EPSPs (Fig. 7A +AP5). A variance in the amplitude of the first spikes of the train on top of the plateau potential was noticed. Although to a lesser degree, this is also seen in Figs 1B, 2A–C and 3A (bottom). Up-states commonly exhibited variations in spike amplitude. This has been reported before (Bargas *et al.* 1991; Hsiao *et al.* 1998) and it has been explained by depolarizations strong enough to propagate to the spike triggering zone (Larkum *et al.* 2001), thus partially inactivating the spikes as seen from the somatic electrode.

Next, membrane potential oscillations were induced by cortical stimulation and NMDA (10 μ M) (Fig. 7B). In this situation, nicardipine (5 μ M) not only stopped the ongoing oscillations but also prevented subsequent cortical stimulation from evoking oscillations (Fig. 7B). Similar results were obtained in four other neurons. In addition, I – V plots built with somatic voltage commands revealed that L-type Ca²⁺ channel blockade (nitrendipine, 5 μ M) eliminated the negative slope conductance region created by the addition of NMDA (Fig. 7C, $n = 4$). Thus, despite being induced by NMDA receptor activation, the negative slope conductance region is in part due to the activation of intrinsic inward currents (Hsiao *et al.* 1998). These results

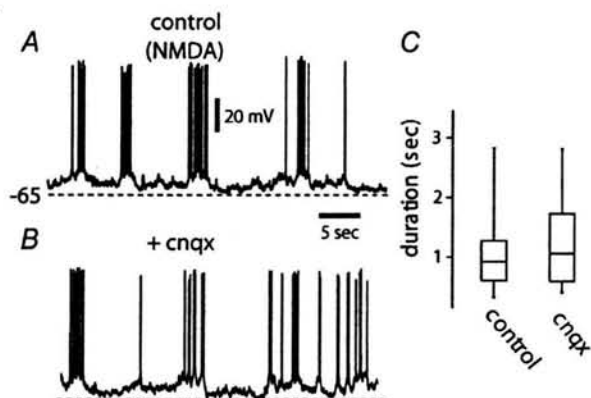


Figure 6. CNQX does not block membrane potential oscillations

A, membrane potential oscillations were induced by repetitive cortical stimulation plus NMDA (10 μ M). B, once induced, membrane potential oscillations did not change in frequency or duration after the addition of CNQX (10 μ M). C, box plots illustrate distributions of up-state duration before and during CNQX in a sample of neurons ($n = 7$).

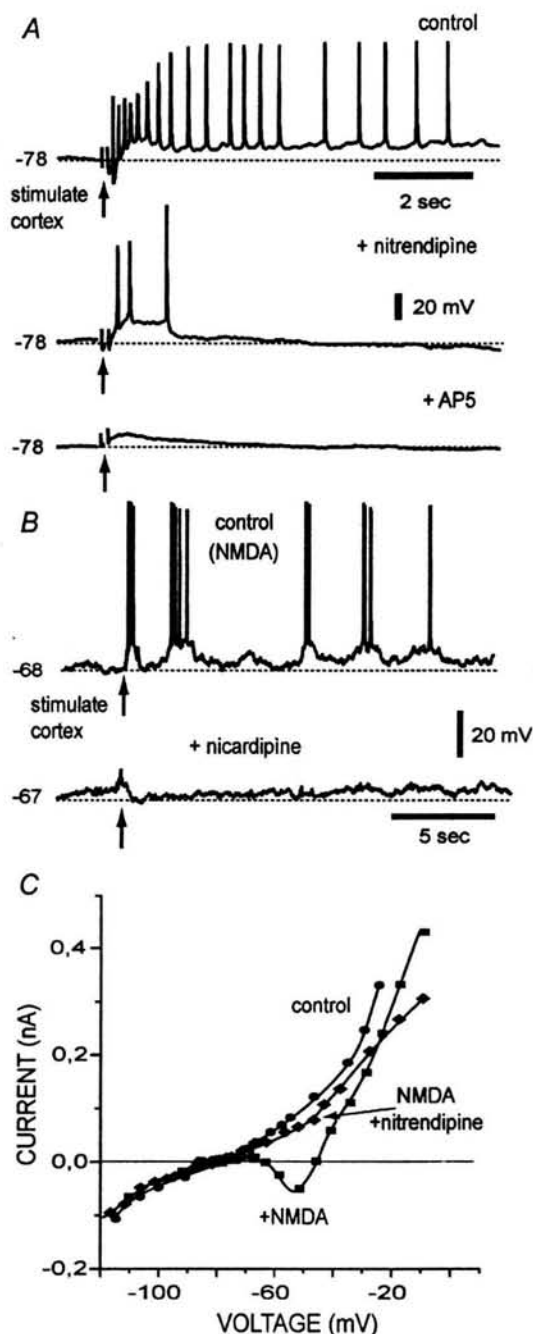
argue that L-type Ca^{2+} channels work together with NMDA receptors to promote bistability in medium spiny neurons (Galarraga *et al.* 1997).

If L-type channels are involved in plateau potential generation, then facilitating channel opening should enhance the response to cortical stimulation. Two types of experiments were performed to test this hypothesis. First, cortically evoked EPSPs were used to generate plateau potentials in the presence of NMDA ($20 \mu\text{M}$) and TEA (1 mM). As predicted, the addition of BayK 8644 ($5 \mu\text{M}$) significantly increased the duration of the plateau (control duration: $750 \pm 112 \text{ ms}$; BayK 8644: $1344 \pm 207 \text{ ms}$; $n = 5$;

$P < 0.05$; Wilcoxon T test). This enhancement was dependent upon NMDA receptor activation since AP5 ($50 \mu\text{M}$) completely blocked the plateau potential, even in the presence of BayK 8644 ($n = 5$; not shown). Next, cortically evoked membrane potential oscillations were examined. Figure 8A shows cortically evoked membrane potential oscillations in a medium spiny neuron in the presence of NMDA. Bath application of BayK 8644 increased the duration of the up-states from $0.9 \pm 0.08 \text{ s}$ in the control (with NMDA) to $2.1 \pm 0.2 \text{ s}$ in BayK 8644 (Fig. 8B, $n = 6$, $P < 0.03$; Wilcoxon T test). BayK 8644 also significantly depolarized the modal up-state potential without affecting the down-state potential (Fig. 8C, $n = 6$, $P < 0.05$). Taken

Figure 7. L-type Ca^{2+} channels participate in the generation of synaptically evoked plateau potentials and membrane potential oscillations

A, a pair of suprathreshold cortical stimuli evoked a long-lasting plateau potential in a spiny cell (control). Notice sustained firing. Addition of the L-type Ca^{2+} channel antagonist, nitrendipine ($5 \mu\text{M}$), blocked most of the plateau potential (+nitrendipine). The subsequent addition of the NMDA receptor antagonist, AP5 ($50 \mu\text{M}$), blocked the remaining slow depolarization disclosing the underlying EPSPs (+AP5). **B**, membrane potential oscillations were evoked with cortical stimulation and NMDA ($10 \mu\text{M}$) (control). Addition of the L-type Ca^{2+} channel antagonist, nicardipine ($5 \mu\text{M}$), blocked the oscillations and made cortical stimulation ineffective for evoking them. **C**, superimposed current-voltage ($I-V$) plots from a medium spiny cell (control). Addition of NMDA ($20 \mu\text{M}$) induces a negative slope conductance region and bistability. A subsequent addition of nitrendipine ($5 \mu\text{M}$) to the bath saline abolished the negative slope conductance region induced by NMDA.



together, these data provide compelling evidence that, under certain conditions, L-type Ca^{2+} channels may work in concert with NMDA receptors to create a condition permissive for the expression of bistability in medium spiny neurons.

Blockade of GABA_A receptors enhanced the duration of the up-states

What controls the duration of the up-state? Active inhibitory processes mediated by GABA_A receptors are one possibility. In agreement with this hypothesis, the local application of the GABA_A receptor antagonist picrotoxin increased the duration of up-states (Fig. 9A and B). The up-state duration in a sample of control neurons was 0.9 ± 0.1 s, while it was 2.9 ± 0.7 s in the presence of either picrotoxin ($10 \mu\text{M}$) or

bicuculline ($2 \mu\text{M}$) ($P < 0.03$, $n = 6$, Wilcoxon T test) (Fig. 9, right). This result suggests that fast GABAergic transmission controls the duration of the up-states (Klausberger *et al.* 2003)

DISCUSSION

The principal finding of this study was that, in the slice, cortical stimulation is capable of evoking membrane

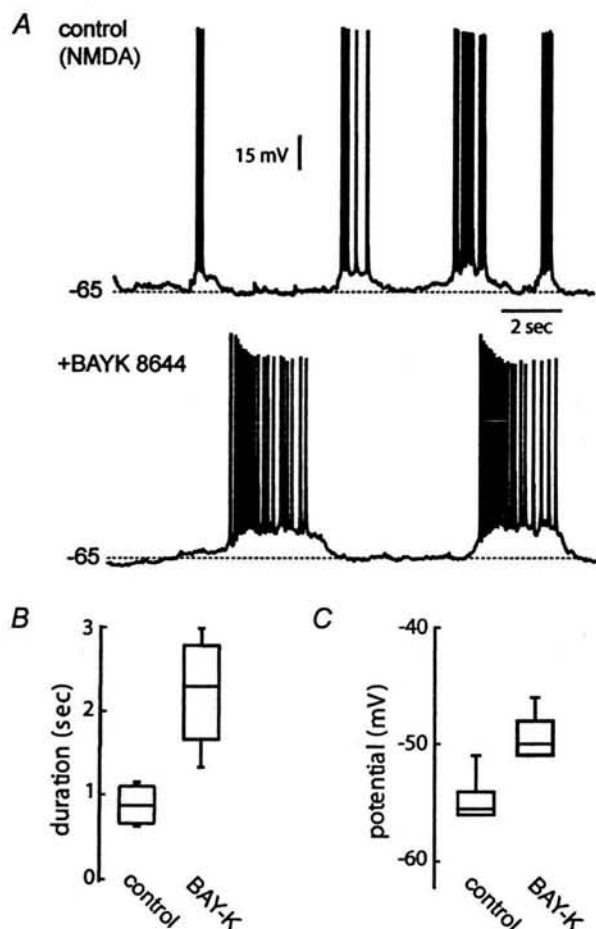


Figure 8. L-type Ca^{2+} channel agonist, BayK 8644, increased the duration of membrane potential oscillations

A, membrane potential oscillations were evoked by cortical stimulation plus NMDA ($20 \mu\text{M}$; control). Addition of BayK 8644 ($5 \mu\text{M}$) increased the duration of up-state events (+BayK 8644 and B). C, the amplitude of these events was also increased after BayK 8644 (C).

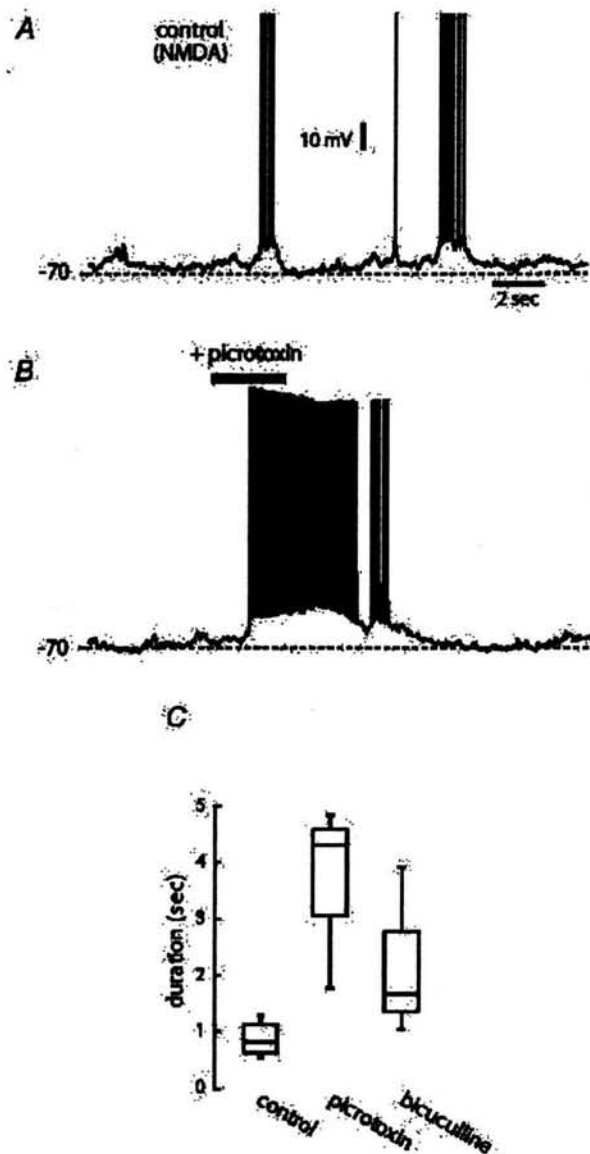


Figure 9. GABA_A receptor antagonists enhance up-state duration

A, membrane potential oscillations were induced by repetitive cortical stimulation plus NMDA ($10 \mu\text{M}$). B, the duration of up-states was enhanced by the addition of GABA_A receptor antagonists to the bath saline (+picrotoxin, $5 \mu\text{M}$). C, box plots illustrate distributions of up-state duration before and during the GABA_A receptor antagonists picrotoxin and bicuculline ($5 \mu\text{M}$) in a sample of neurons ($n = 6$).

potential oscillations in striatal medium spiny neurons. Once initiated, these oscillations continued without overt cortical stimulation resembling up- and down-voltage transitions seen *in vivo* and in organotypic cultures (Wilson, 1993; Wilson & Kawaguchi, 1996; Stern *et al.* 1997; Plenz & Kitai, 1998; Wang & O'Donnell, 2001). Interestingly, similar stimuli also evoke voltage transitions in cortical slice preparations (Shu *et al.* 2003). Although previous studies have shown that cortical or white matter stimulation is capable of evoking plateau potentials in medium spiny neurons (Wilson *et al.* 1983; Bargas *et al.* 1991; Galarraga *et al.* 1997; Schlosser *et al.* 1999), the relation of these plateau potentials with subsequent voltage oscillations had not been described. It is shown that oscillations can be controlled by both intrinsic and circuit-based factors. Transitions to the up-state were promoted by augmentation of inward currents carried by NMDA receptors and L-type Ca^{2+} channels and suppressed by currents carried by GABA_A receptors and TEA-sensitive K^{+} channels.

Several physiological oscillatory phenomena have been described during brain activity. Their generating mechanisms may vary and, moreover, distinct kinds of oscillations may coalesce (e.g. Szabadics *et al.* 2001; Bevan *et al.* 2002; Steriade & Timofeev, 2003). Studies in the slice preparation are just beginning to classify and study these phenomena. Thus, some studies stress the predominance of synaptic and network variables (e.g. Szabadics *et al.* 2001; Shu *et al.* 2003), others underscore the importance of intrinsic neuronal properties (Hsiao *et al.* 1998; Traub *et al.* 2003), and still others report a mixed participation of intrinsic and synaptic factors (Guertin & Hounsgaard, 1998; Bevan *et al.* 2002). Although much remains to be done, the oscillations described here can be listed in the last group. We have identified ionic conductances that appear to facilitate the generation of oscillations. However, the activation of voltage-dependent conductances ultimately depends on network synaptic activity most probably originating on the synaptic membrane at the dendrites. It was shown that NMDA receptors play a key role to interlock synaptic and intrinsic components. L-type Ca^{2+} channels are present and functional at sub-threshold voltages in medium spiny neostriatal neurons (Perez-Garci *et al.* 2003) and are able to induce plateau potentials, bistability and voltage fluctuations between two membrane potentials. They can be activated by synaptic inputs if their temporal profile is appropriate (Galarraga *et al.* 1997). Therefore, it is a matter of future research to determine when and how these ion channel machinery plays a physiological role.

Certain conditions may be necessary to observe these phenomena *in vitro*. First, by tracking corticostriatal afferent fibres in parasagittal slices with anterograde biocytin transport, the most probable connected regions of the

cortex and striatum were identified in these slices and targeted for stimulation and recording. Next, bathing solutions with K^{+} and Ca^{2+} concentrations that more closely resemble those thought to exist *in vivo* (Sanchez-Vives & McCormick, 2000) were used. In these conditions, stimulation of cortical afferent fibres was capable of evoking plateau potentials and up- and down-type of voltage oscillations in a subset of medium spiny neurons.

The oscillations seen in the slice have both similarities and differences with those seen *in vivo*. There are a number of similarities: up-states depended upon excitatory synaptic input (cf. Wilson, 1993; Stern *et al.* 1997). Neither plateau potentials nor oscillations could be evoked with somatic current injections – in contrast to the case of motoneurons (Perrier & Hounsgaard, 2000). As *in vivo*, the up-state seen in the slice had a preferred membrane potential range near -50 mV, just below spike threshold. The down-state potentials during cortically induced oscillations in the slice, were unimodally distributed (Wilson, 1993; Stern *et al.* 1997). Up-state durations *in vitro*, during nominally autonomous oscillations, were also similar to those reported in anaesthetized animals, ranging from a few hundred milliseconds to seconds. Furthermore, both *in vivo* and *in vitro* up-states are aperiodic and triggered irregular spiking. These similarities argue that at the very least, there are some common mechanisms governing membrane potential oscillations in the slice preparation and *in vivo*. Nevertheless, differences were also observed: *in vivo*, inward current antagonists administered through the recording sharp electrode did not affect the voltage oscillations (Wilson, 1993; Wilson & Kawaguchi, 1996; Stern *et al.* 1997). The range of membrane potentials during the down-state is larger *in vitro* than *in vivo*, with a tendency towards more depolarized potentials. Noticeably, the facilitatory actions of NMDA, when tested *in vivo*, had a depolarizing effect on the membrane potential (Herrling *et al.* 1983). This was also true for trains of repetitive stimuli in other systems (Steriade & Timofeev, 2003). Most importantly, although the addition of exogenous NMDA may partially activate synaptic receptors normally activated by cortical inputs, it does not substitute for bi-dimensional spatial activation of impaired contacts (Kilb & Luhmann, 2003) or for contacts coming from important afferents such as the thalamus and the subthalamic-pallidal network (Bevan *et al.* 2002).

Another reason for the differences found with *in vivo* oscillatory activity might be the anaesthetics used. Anaesthetics are known to potentiate GABAergic signalling and impair NMDA or AMPA signalling in different degrees (Richards, 2002). NMDA and GABAergic synaptic mechanisms were shown here to be critical for the emergence of bistability in the slice preparation. It is not difficult to see how changes in these synaptic actions might tend to suppress intrinsic mechanisms and shift the

neurons towards a more extrinsically dependent activity. In other neurons, the intrinsic mechanisms supporting bistability are weakened by an enhancement of dendritic GABAergic inputs (e.g. Miura *et al.* 1997).

Finally, it was hard to find synchronicity with surrounding neurons (J. Bargas, unpublished observations). This again is explained by a reduced number of synaptic contacts by Cossart *et al.* (2003) who show that, in the slice, only a few neurons out of hundreds are firing synchronously. Partial confirmatory experiments of this hypothesis have recently been published (Kilb & Luhmann, 2003): up-state frequency decays when recordings are performed in the slice, instead of 'intact cerebral cortex' preparations.

Nonetheless, both previous studies and the present work agree in that medium spiny neurons lack somatic bistability as a determinant of plateau potentials or voltage oscillations. The present work shows evidence that medium spiny neurons most probably turn bistable due to dendritically located conductances. An NMDA-mediated synaptic mechanism appears to trigger an intrinsic mechanism mediated by L-type Ca^{2+} channels (Schiller & Schiller, 2001). Synaptic integration includes the generation of plateau potentials and membrane potential oscillations. These observations allow the cautious conclusion that oscillatory phenomena observed under the present conditions may represent a subset of a larger spectrum of oscillatory activities (Bevan *et al.* 2002; Steriade & Timofejev, 2003). This intrinsic mechanism could have profound implications for striatal integration by dissociating the duration of cortical input from the duration of striatal output under certain circumstances.

Plateau potentials and up-states in the slice are dependent upon NMDA receptors

Our results show that synaptic input may trigger prolonged depolarizing events. Plateau potentials in the slice were eliminated by blockade of either AMPA/KA receptors with CNQX or NMDA receptors with AP5. Furthermore, short trains of cortical synaptic inputs similar to those seen with temporally convergent inputs *in vivo* were effective triggers of plateau potentials and subsequent voltage oscillations. The linkage between synaptic activation and plateau potentials was strengthened by the ability of exogenous NMDA to enhance the generation of plateau potentials from near threshold EPSPs. Repetitive cortical stimulation in the presence of micromolar concentrations of NMDA in the bath was the most effective protocol to trigger membrane potential transitions. This concentration of NMDA was sufficient to create a region of negative slope conductance and a second positive slope crossing the I - V relationship of medium spiny neurons. These phenomena are the landmark of membrane potential bistability (Booth *et al.* 1997; Kiehn & Eken, 1998; Hsiao *et al.* 1998; Lee & Heckman, 1998b; Carlin *et*

al. 2000; Schiller & Schiller, 2001; Svirsakis *et al.* 2001). In fact exogenous NMDA in conjunction with synaptic input is a potent inducer of membrane potential bistability and voltage oscillations in other preparations (Guertin & Hounsgaard, 1998; review in Schiller & Schiller, 2001). The conjunction of NMDA and synaptic input presumably serves to selectively enhance the slower NMDA component of the naturally occurring synaptic potential profile, leading to the activation of intrinsic voltage-dependent conductances (Larkum *et al.* 2001; Schiller & Schiller, 2001). In medium spiny neurons, this interaction is likely to be occurring in the dendrites, where the vast majority of excitatory inputs are located (Wilson, 1993). This inference is consistent with the ability of Kir_2 channel blockade with Ba^{2+} to substantially shift the negative slope region toward more negative membrane potentials.

L-type Ca^{2+} channels contribute to synaptically driven plateau potentials and membrane potential oscillations

Which dendritic conductances are engaged by synaptic input in medium spiny neurons? Because the voltage range in which Mg^{2+} block is relieved overlaps with the activation range for a number of inward conductances, NMDA currents could interact with several channel types. One of these is the L-type Ca^{2+} channel. L-type Ca^{2+} channels are essential to fix the tonic firing pattern, the input-frequency relationship (dynamic range) and the firing threshold of medium spiny neurons (Perez-Garci *et al.* 2003). In a number of neurons, plateau potentials and voltage oscillations triggered by NMDA receptor activation are dependent upon L-type Ca^{2+} channels (Seamans *et al.* 1997; Schwandt & Crill, 1997; Guertin & Hounsgaard, 1998; Russo & Hounsgaard, 1999; Schiller & Schiller, 2001). The situation appears to be similar in medium spiny neurons (Galarraga *et al.* 1997; Cepeda *et al.* 1998; Akopian & Walsh, 2002) in which dopamine modulation greatly resides in their Ca^{2+} -channels (Hernández-Lopez *et al.* 1997, 2000). This work shows that plateau potentials and subsequent voltage oscillations are dependent upon L-type Ca^{2+} channels, as their blockade abolished both phenomena. Conversely, facilitation of L-type currents with BayK 8644 enhanced the duration and frequency of up-states evoked by cortical stimulation.

Low threshold L-type channels in proximity to NMDA receptors seem particularly important in the generation of plateau potentials (Seamans *et al.* 1997; Schwandt & Crill, 1997, 1998; Guertin & Hounsgaard, 1998; Carlin *et al.* 2000; Schiller & Schiller, 2001). These L-type Ca^{2+} channels need to be present at only a few dendritic branches for bistability to emerge (Svirsakis *et al.* 2001). The dependence of the NMDA-induced negative slope conductance region on L-type channels is consistent with the proposition that these channel types are co-localized in dendritic regions

and critical to the up-state. Medium spiny neurons co-express Cav1.2 and Cav1.3 channels and have a prominent low threshold L-type current (Bargas *et al.* 1994; Olson *et al.* 2001; Perez-Garci *et al.* 2003), but further study will be required to determine which of these channel types is critical to this interaction with NMDA receptors. Nevertheless, it is clear that dendritic L-type Ca^{2+} channels are capable of shaping the responses to excitatory synaptic input in medium spiny neurons.

What is more perplexing is the ability of brief repetitive cortical stimulation to induce lasting oscillations in the membrane potential of medium spiny neurons. These oscillations continue without overt extrinsic cortical stimulation for up to 1 h or more in some cases. Oscillations were not obviously periodic in most neurons. One hypothesis is that the inducing stimulation set up cortical oscillations that continued to drive striatal state transitions (Kilb & Luhmann, 2003). Another possibility is that the oscillations, although triggered by cortical stimulus, depend upon striatal mechanisms for their maintenance. What these mechanisms might be are unclear at these moment.

Conclusions

Cortical stimulation of striatal medium spiny neurons in tissue slices is capable of evoking plateau potentials and sustained oscillatory activity bearing a strong resemblance to state transitions seen *in vivo*. The plateau potentials and up-state transitions were dependent upon NMDA receptors and L-type Ca^{2+} channels. The data presented clearly implicate intrinsic mechanisms in the up-state transitions and argue that dendritic regions of medium spiny neurons exhibit conditional bistability.

REFERENCES

- Akopian G & Walsh JP (2002). Corticostriatal paired-pulse potentiation produced by voltage-dependent activation of NMDA receptors and L-type Ca^{2+} channels. *J Neurophysiol* **87**, 157–165.
- Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, Pineda JC & Galarraga E (1999). Ca^{2+} -activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* **88**, 429–488.
- Bargas J, Galarraga E & Aceves J (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res* **539**, 159–163.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y & Surmeier DJ (1994). Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* **14**, 6667–6686.
- Beiser DG & Houk JC (1998). Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events. *J Neurophysiol* **79**, 3168–3188.
- Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP & Wilson CJ (2002). Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci* **25**, 525–531.
- Booth V, Rinzel J & Kiehn O (1997). Compartmental model of vertebrate motoneurons for Ca^{2+} -dependent spiking and plateau potentials under pharmacological treatment. *J Neurophysiol* **78**, 3371–3385.
- Carlin KP, Jones KE, Jiang Z, Jordan LM & Brownstone RM (2000). Dendritic L-type calcium currents in mouse spinal motoneurons: implications for bistability. *Eur J Neurosci* **12**, 1635–1646.
- Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Chandler SH & Levine MS (1998). Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *J Neurophysiol* **79**, 82–94.
- Cherubini E, Herrling PL, Lanfumey L & Stanzione P (1988). Exzitatory amino acids in synaptic excitation of rat striatal neurones *in vitro*. *J Physiol* **400**, 677–690.
- Compte A, Brunel N, Goldman-Rakic PS & Wang XJ (2000). Synaptic mechanisms and network dynamics underlying spatial working memory in a cortical network model. *Cereb Cortex* **10**, 910–923.
- Cossart R, Aronov D & Yuste R (2003). Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* **423**, 283–288.
- Egorov AV, Hamam BN, Franssen E, Hasselmo ME & Alonso AA (2002). Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature* **420**, 173–178.
- Galarraga E, Bargas J, Sierra A & Aceves J (1989). The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res* **75**, 157–168.
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Barral J & Bargas J (1997). Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca^{2+} conductance. *Neuroreport* **8**, 2183–2186.
- Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernandez JV & Bargas J (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res* **100**, 239–249.
- Guertin PA & Hounsgaard J (1998). NMDA-Induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles. *J Neurophysiol* **80**, 3380–3382.
- Hernández-Lopez S, Bargas J, Surmeier J D, Reyes A & Galarraga E (1997). D₁ receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny by modulating an L-type Ca^{2+} conductance. *J Neurosci* **9**, 3334–3342.
- Hernández-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H & Surmeier DJ (2000). D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca^{2+} currents and excitability via a novel PLC β 1–IP3–calcineurin–signaling cascade. *J Neurosci* **20**, 8987–8995.
- Herrling PL, Morris R & Salt TE (1983). Effects of excitatory amino acids and their antagonists on membrane and action potentials of cat caudate neurones. *J Physiol* **339**, 207–222.
- Hounsgaard J & Kiehn O (1989). Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J Physiol* **414**, 265–282.
- Hsiao C, del Negro CA, Trueblood PR & Chandler SH (1998). Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* **79**, 2847–2856.
- Kiehn O & Eken T (1998). Functional role of plateau potentials in vertebrate motor neurons. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 746–752.
- Kilb W & Luhmann H J (2003). Carbachol-induced network oscillations in the intact cerebral cortex of the newborn rat. *Cereb Cortex* **13**, 409–421.
- Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JDB, Cobden PM, Buzsáki G & Somogyi P (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons *in vivo*. *Nature* **421**, 844–848.
- Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J & Striessnig J (2001). α_{1D} ($\text{Ca}_v1.3$) subunits can form L-type Ca^{2+} channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* **276**, 22100–22106.

- Larkum ME, Zhu JJ & Sakmann B (2001). Dendritic mechanisms underlying the coupling of the dendritic with the axonal action potential initiation zone of adult rat layer 5 pyramidal neurons. *J Physiol* 533, 447–466.
- Lee RH & Heckman CJ (1998a). Bistability in spinal motoneurons *in vivo*: systematic variations in rhythmic firing patterns. *J Neurophysiol* 80, 572–582.
- Lee RH & Heckman CJ (1998b). Bistability in spinal motoneurons *in vivo*: systematic variations in persistent inward currents. *J Neurophysiol* 80, 583–593.
- Mermelstein PG, Song WJ, Tkatch T, Yan Z & Surmeier DJ (1998). Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci* 18, 6650–6661.
- Miura M, Yoshioka M, Miyakawa H, Kato H & Ito KI (1997). Properties of calcium spikes revealed during GABA_A receptor antagonism in hippocampal CA₁ neurons from guinea pigs. *J Neurophysiol* 78, 2269–2279.
- Nisenbaum ES, Wilson CJ, Foehring RC & Surmeier DJ (1996). Isolation and characterization of a persistent potassium current in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 76, 1180–1194.
- Olson PA, Platzer J, Streissnig J, Miller RJ & Surmeier DJ (2001). Cav1.3 channels are primary determinants of L-type calcium currents in striatal medium spiny neurons. *Soc Neurosci Abs* 67.12.
- Pérez-Garci E, Bargas J & Galarraga E (2003). The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14, 1253–1256.
- Perrier JF & Hounsgaard J (2000). Development and regulation of response properties in spinal cord motoneurons. *Brain Res Bull* 53, 529–535.
- Plenz D & Kitai ST (1998). Up and down states in striatal medium spiny neurons simultaneously recorded with spontaneous activity in fast-spiking interneurons studied in cortex-striatum-substantia nigra organotypic cultures. *J Neurosci* 18, 266–283.
- Reyes A, Galarraga E, Flores-Hernandez J, Tapia D & Bargas J (1998). Passive properties of neostriatal neurons during potassium conductance blockade. *Exp Brain Res* 120, 70–84.
- Richards CD (2002). Anaesthetic modulation of synaptic transmission in the mammalian CNS. *Br J Anaesthesiol* 89, 79–90.
- Romo R, Brody CD, Hernandez A & Lemus L (1999). Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature* 399, 470–473.
- Russo RE & Hounsgaard J (1999). Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. *Prog Biophys Mol Biol* 72, 329–365.
- Sanchez-Vives MV & McCormick DA (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3, 1027–1034.
- Schiller J & Schiller Y (2001). NMDA receptor-mediated dendritic spikes and coincident signal amplification. *Curr Opin Neurobiol* 11, 343–348.
- Schlosser B, ten Bruggencate G & Sutor B (1999). Local disinhibition of neocortical neuronal circuits causes augmentation of glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the rat neostriatum *in vitro*. *Exp Neurol* 157, 180–193.
- Schwandt PC & Crill WE (1997). Local and propagated dendritic action potentials evoked by glutamate iontophoresis on rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 77, 2466–2483.
- Schwandt PC & Crill WE (1998). Synaptically evoked dendritic action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 79, 2432–2446.
- Seamans JK, Gorelova NA & Yang CR (1997). Contributions of voltage-gated Ca²⁺ channels in the proximal versus distal dendrites to synaptic integration in prefrontal cortical neurons. *J Neurosci* 17, 5936–5948.
- Shu Y, Hasenstaub A & McCormick DA (2003). Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 423, 288–293.
- Steriade M & Timofeev I (2003). Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron* 37, 563–576.
- Stern EA, Kincaid AE & Wilson CJ (1997). Spontaneous subthreshold membrane potential fluctuations and action potential variability of rat corticostriatal and striatal neurons *in vivo*. *J Neurophysiol* 77, 1697–1715.
- Svirskis G, Gutman A & Hounsgaard J (2001). Electrotonic structure of motoneurons in the spinal cord of the turtle: inferences for the mechanisms of bistability. *J Neurophysiol* 85, 391–398.
- Szabados J, Lorincz A & Tamas G (2001). β and γ frequency synchronization by dendritic gabaergic synapses and gap junctions in a network of cortical interneurons. *J Neurosci* 21, 5824–5831.
- Traub RD, Buhl EH, Gloveli T & Whittington MA (2003). Fast rhythmic bursting can be induced in layer 2/3 cortical neurons by enhancing persistent Na⁺ conductance or by blocking BK channels. *J Neurophysiol* 89, 909–921.
- Wang J & O'Donnell P (2001). D₁ dopamine receptors potentiate NMDA-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons. *Cereb Cortex* 11, 452–462.
- Westenbroek RE, Hoskins L & Catterall WA (1998). Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 18, 6319–6330.
- Wilson CJ (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99, 227–297.
- Wilson CJ, Chang HT & Kitai ST (1983). Disfacilitation and long-lasting inhibition of neostriatal neuron in the rat. *Exp Brain Res* 51, 227–235.
- Wilson CJ & Kawaguchi Y (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16, 2397–2410.
- Xu W & Lipscombe D (2001). Neuronal Cav1.3 α_1 L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21, 5944–5951.

Acknowledgements

We are grateful to C. Vilchis and D. Tapia for technical help. This work was supported by CONACyT (Mexico) and Millennium Research Initiative grants: 31839-N and W-8072 (35806-N) to J.B. and E.G., DGAPA-UNAM grants IN 202100 to E.G. and IN 202300 to J.B., NIH grants NS34696 and DA12958 to D.J.S. and FIRCA-NIH grant TWO1214 to D.J.S., J.B. and E.G.